تأثير عزلتين من البكتيريا المحفزة للنمو PGPR في نشاط أنزيم البيروكسيداز وكمية الكلوروفيل الكلي لنباتات الفليفلة المعداة بفيروس التجعد البني لثمار

البندورة ToBRFV

سلام علي $^{(1)*}$ وابراهيم العبيد $^{(1)}$ وعماد اسماعيل $^{(1)}$

(1). قسم وقاية النبات، كلية الهندسة الزراعية، جامعة اللاذقية، اللاذقية، سورية.

(*المراسلة: م. سلام على. البريد الإلكتروني: Salamkhali43@gmail.com)

تاريخ الاستلام: 2024/09/30 تاريخ القبول: 2025/02/24

الملخص

أجري البحث لدراسة تأثير معاملة نباتات الفليفلة بعزلتين من البكتيريا المحسنة لنمو النبات PGPR Bacillus sp. strain · Bacillus subtilis :plant growth promoting rhizobacteria (ABC3,cbs123) على الإصابة بفيروس التجعد البني لثمار البندورة (ABC3,cbs123) brown rugose fruit virus، وتأثيرهما في زيادة نشاط أنزيم البيروكسيداز وصبغات الكلوروفيل في نباتات الفليفلة المعداة بالفيروس في ظل ظروف الزراعة المحمية، حيث أظهرت النتائج زبادة في نشاط أنزيم البيروكسيداز على هجيني الفليفلة المدروسين (دالاس – برافو)، كما أظهرت زيادة في كمية الكلوروفيل الكلى في النباتات المعاملة، زادت السلالتان البكتيريتان المدروستان من نشاط أنزيم البيروكسيداز بعد 15 يوماً من العدوى بالفيروس بنسب مختلفة سواء بوجود الفيروس أو في غيابه، ففي نباتات الهجين دالاس المعاملة بالعزلة البكتيرية .Bacillus sp والعدوى بالفيروس بلغت نسبة الزيادة حوالي 10.9%، بينما عند المعاملة بالعزلة البكتيرية .Bacillus sp والعدوي بالفيروس بلغت نسبة الزبادة حوالي 17.6%، وعند المعاملة بخليط من البكتيريا Bacillus subtilis والبكتيريا .Bacillus sp والعدوي بالفيروس بلغت نسبة الزيادة حوالي 16.2%. كما زاد نشاط أنزيم البيروكسيداز بعد 45 يوماً من العدوى لدى جميع المعاملات، وكان للسلالة البكتيرية. Bacillus sp. الدور الأكبر في هذه الزبادة سواء بوجود الفيروس أو في غيابه، بينما كانت العزلة Bacillus subtilis أفضل من العزلة (Bacillus sp. strain (ABC3,cbs123 في زبادة كمية الكلوروفيل الكلي، ففي نباتات الهجين دالاس عند المعاملة بالعزلة البكتيرية Bacillus subtilis والعدوي بالفيروس بلغت نسبة الزبادة حوالي 65.5%، بينما عند المعاملة بالعزلة البكتيرية .Bacillus sp والعدوي بالفيروس بلغت نسبة الزيادة حوالي 33.80%، وبالنسبة للهجين برافو عند المعاملة بالعزلة البكتيرية Bacillus subtilis والعدوي بالفيروس بلغت نسبة الزبادة حوالي 42%، بينما عند المعاملة بالعزلة البكتيرية .Bacillus sp والعدوي بالفيروس بلغت نسبة الزيادة حوالي 52.92%.

الكلمات المفتاحية: ToBRFV ، Bacillus ، PGPR ، نبات الغليلفة، أنزيم البيروكسيداز ، كمية الكلوروفيل الكلي.

المقدمة:

محصول الفليفلة من محاصيل العائلة الباذنجانية المهمة وكغيره يتعرض للإصابة بالعديد من أمراض النبات الفيروسية ، ويطلق عليه اسم "لاقط الفيروسات" (Laemmlen, 2004)، ويمكن للأمراض الفيروسية التي تصيبه أن تخفض من إنتاجية المحصول بما يقارب 90% بالإضافة لصعوبة مقاومتها (Reddick and Habera, 1999). انطلاقاً من أهمية محصول الفليفلة، فقد تم العمل على مقاومة الأمراض الفيروسية التي تصيبه، وقد لوحظ انتشار الاستخدام الواسع للبكتيريا المحفزة لنمو النبات في المكافحة الحيوية للعديد من أمراض النبات الفيروسية، إضافةً إلى الآثار الإيجابية التي تقدمها هذه البكتيريا لنباتاتها العائلة، كما أن انتشار فيروس التجعد البني لثمار البندورة يفتح المجال للاهتمام بدراسته، اكتشف فيروس التجعد البني لثمار البندورة الأول مرة في الأردن Salem) et al., 2016) على نباتات البندورة في سورية من قبل Hasan وآخرون (2022) على نباتات البندورة في البيوت المحمية، وسجل على محصول الفليفلة في سورية ولبنان لأول مرة من قبل (Abou Kubaa et al., 2022)، كما تم تسجيل الفيروس في العديد من الدول الأخرى، وتم تصنيف هذا الفيروس كآفة حجريّة، إن هذا الفيروس سهل الانتقال بالوسائل الميكانيكية، ينتقل الفيروس على أغلفة البذور وأحياناً في الإندوسبرم ولا يتواجد أبداً في جنين البذرة (Caruso et al., 2022) ، وينتقل عن طريق تداول وحدات الإكثار النباتية الملوثة بالفيروس (Panno et al., 2020)، كما ينتقل الفيروس عن طريق النحل الطنان terrestris عن طريق الملامسة أو التلوث ولكنه لا يعد ناقل حشري له ، النباتات العائلة الرئيسية لهذا الفيروس هي نباتات البندورة Lycopersicon esculentum والفليفلة المزروعة .Panno et al., 2020) Capsicum sp، وبالتالي تعدد وسائل الانتقال يؤدي لانتشاره السريع داخل البيوت المحمية ومناطق إنتاج المحصول الذي يصيبه هذا الفيروس، ومنه يجب محاولة القضاء على وسائل انتشار العدوي من النباتات المصابة، وبرز استخدام بكتيربا الجذور في مقاومة الأمراض الفيروسية حيث تعد هذه البكتيربا وسيلة لحماية المحصول، ويمكن تطبيقها على البذور أو تخلط مع التربة قبل الزراعة أو التشتيل، إضافة لدورها في السيطرة المباشرة على ممرضات التربة، وتم إثبات دورها في الوقاية من عدد من الممرضات النباتية كما استخدمت كبدائل فعالة للمبيدات الكيميائية، الدور الأساسي لبكتيريا الجذور المحسنة لنمو النبات هو تحفيز المقاومة الجهازية، حيث يتمثل دور البكتيريا المحفزة لنمو النبات بشكل عام في هذا المجال من خلال التأثير غير المباشر للبكتيريا ومستقلباتها على الفيروسات النباتية حيث ترتبط بالجسيمات الفيروسية وتقوم بتخريبها (Sorokan et al., 2023)، كما تؤثر على آليات التضاد الحيوي وتحفز آليات الدفاع في النبات العائل .(Rana et al., 2020)

أهمية البحث وأهدافه:

تأتي أهمية البحث من أهمية محصول الفليفلة في المنطقة الساحلية، ومن انتشار فيروس التجعد البني لثمار البندورة على محصول الفليفلة في المنطقة (Abou Kubaa et al., 2022)، لذلك هدف البندورة (Hasan et al., 2022)، والذي سجل على محصول الفليفلة في المنطقة (Bacillus sp. strain (ABC3, cbs 123)، الفلك هجن البحث إلى دراسة تأثير البكتيريا المختيريا المناورة. وتم إجراء هذا البحث كتنفيذ لتوصية في مقالة سابقة بمتابعة دراسة تأثير كل من العزلتين البكتيريتين على نشاط أنزيم البيروكسيداز، ومحتوى الكلوروفيل الكلي.

مواد البحث وطرائقه:

1-موقع تنفيذ البحث:

تم تنفيذ البحث في مخبر الأمراض البكتيرية والفيروسية في قسم وقاية النبات في كلية الهندسة الزراعية - جامعة اللاذقية، إضافة إلى بيت بلاستيكي (40 × 9.25 × 2.5 متر) في مشتل الجامعة.

2-العائل النباتي:

تم استخدام اثنين من هجن نباتات الفليفلة وهما: الهجين دالاس، وهوهجين فليفلة حلو، ثماره كروية الشكل، والهجين برافو، وهوهجين فليفلة معتدل الحرافة، ثماره متطاولة، نسبة النقاوة لكلا الهجينين 99%، وكذلك نسبة الإنبات 95% لكليهما.

3-إنتاج الشتول:

تم ملء صواني الإنبات الفلينية (أبعادها 54 × 28 سم) بمادة التورب الزراعي المعقم، ووضعت بذرتان لكل من الهجينين دالاس وبرافو في كل حفرة، وبعد الإنبات تم تغريد النباتات، والإبقاء على بادرة واحدة في كل حفرة. بعد وصول البادرات إلى الطول المناسب 10–12 سم تم نقلها إلى أكياس بلاستيكية سوداء اللون سعة 2 ليتر مملوءة بخليط من التورب والتربة المعقمة شمسياً بنسبة 1:1، وتم إنتاج الشتول في مخبرالأمراض البكتيرية والفيروسية في قسم وقاية النبات، إضافة إلى بيت بلاستيكي تابع لكلية الهندسة الزراعية – جامعة اللاذقية.

4-العزلة الفيروسية:

استخدمت عزلة محلية مجموعة من منطقة الساحل السوري من نبات بندورة مصاب بفيروس التجعد البني لثمار البندورة ، وتم تعريف الإصابة من قبل Hasan وآخرون (2022) في مخبر الأمراض الفيروسية، وتم تصنيف العزلة جزيئياً في الأردن. وتم الإعداء بها لعدد من شتول هجيني الفليفلة (دالاس- برافو)، وتمت حماية النباتات تحت تغطية شبكية بعيداً عن الحشرات.

5-تحضير اللقاح الفيروسى والعدوى الميكانيكية:

تم تحضير اللقاح الفيروسي حسب طريقة Jefferies (1998) بسحق 1 غ من أوراق البندورة التي تبدي أعراض إصابة نموذجية بفيروس التجعد البني لثمار البندورة مع 5 مل ماء مقطر (1غ:5مل) في جفنة بورسلان وهاون معقمين. وأجريت العدوى الميكانيكية على الورقة الثالثة لنباتات الفليفلة، وذلك بنثر مادة كربيد السيليكون Carborandum بشكل خفيف على الأوراق المراد إعداؤها، ومن ثم تم مسح الأوراق بقطعة شاش مبللة باللقاح الفيروسي باتجاه واحد. وتم غسل الأوراق المعداة بالماء للتخلص من بقايا العصيرالخلوي وكربيد السيليكون. أما بالنسبة للشاهد فتم إجراء العدوى عليه باتباع نفس الخطوات السابقة لكن مع ماء مقطر ومعقم فقط، لتوفير حالة حقيقية للمقارنة، احتوت كل معاملة على ثلاث مكررات و كل مكرر احتوى على خمس نباتات، وتم وضع النباتات تغطية شبكة في المختبر.

6-العزلات البكتيرية:

تم استخدام عزلتين بكتيريتين للجنس Bacillus من البكتيريا المحسنة لنمو النبات، وهذه العزلات هي: Bacillus sp. strain (ABC3,cbs123) عزلت من وهي عزلة محلية من نبات البندورة من قبل الدكتور ابراهيم العبيد، والثانية (ABC3,cbs123) عزلت عن قبل الدكتورة لبنى رجب من نبات الخيار ثم صنفت مزرعياً وبيوكيميائياً في مخبر الأمراض البكتيرية والفيروسية – كلية الهندسة الزراعية – جامعة اللاذقية من قبل الدكتور ابراهيم العبيد، ثم صنفت جزيئياً من قبل الدكتور ابراهيم العبيد في ألمانيا.

7-تحضير البيئات المغذية الخاصة بالبكتيربا:

تم تحضير البيئة الصلبة بإضافة 28 غ بودرة وسط الأغار المغذي Nutrient agar (NA) ثم تم إكمال الحجم إلى ليتر واحد بالماء المقطر، وتم خلطها بشكل جيد بواسطة هزاز ميكانيكي، ثم عقمت بالأوتوغلاف لمدة 20 دقيقة عند درجة الحرارة 121 درجة مئوية ثم سكبت في أطباق بتري قطر 9 سم وتركت لتبرد عند درجة حرارة المختبر في جو معقم.

8-تحضير المعلقات البكتيرية وطرائق تطبيقها:

تمت زراعة العزلات البكتيرية على البيئة الصلبة بهدف تنشيطها، وحضنت أطباق البتري التي لقحت بالبكتيريا عند درجة حرارة 28 درجة مئوية لمدة 24 ساعة، في البداية تم تحضير المعلق البكتيري الذي تركيزه 10° CFU/ml (عدد الوحدات المشكلة للمستعمرة البكتيرية/مل) حيث قدرت كثافة البكتيريا في المعلق الأم باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer عند كثافة ضوئية 000=000، ومن ثم تم غمر بذور هجيني الفليفلة المدروسين بهذا المعلق البكتيري لمدة ساعتين والشاهد بالماء المقطر مع الرج بين الحين والآخر، ثم وضع بذرة في كل حفرة إنبات في صينية الإنبات، ثم تركت البذور حتى تنبت، بعد إنبات البذور بأسبوعين تم نقل البادرات إلى أكياس بلاستيكية تحوي خليط من التربة والتورب بنسبة 1:1، بعد نقل البادرات إلى الأكياس البلاستيكية تم إضافة 10 مل من المعلق البكتيري إلى كل شتلة بواسطة سيرنج معقم حسب معاملات التجربة.

9-المؤشرات التي تم دراستها:

9-1- استخلاص أنزيم البيروكسيداز و تقدير نشاطه:

تم استخلاص أنزيم البيروكسيداز وفق طريقة خريبة وآخرون (2015) المعدلة عن Altunkaya ورقية من نباتات الفليفلة في أكياس بلاستيكية تحمل رقم المعاملة ورقم المكرر، ثم تم سحق 1 غ من أوراق الفليفلة تم جمع عينات ورقية من نباتات الفليفلة في أكياس بلاستيكية تحمل رقم المعاملة ورقم المكرر، ثم تم سحق 1 غ من أوراق الفليفلة مع 3 مل من محلول الاستخلاص المحلول المنظم الفوسفاتي 4 مل ومن ثم تم تعريضها للطرد المركزي لمدة 10 دقائق عند سرعة 8000 دورة/ وضع ناتج السحق في أنبولات إبندورف سعة 1.5 مل ومن ثم تم تعريضها للطرد المركزي، تم قياس نشاط أنزيم البيروكسيداز بعد تحضير دقيقة عند درجة حرارة 4 درجة مئوية. تم أخذ الرشاحة الناتجة عن الطرد المركزي، تم قياس نشاط أنزيم البيروكسيداز بعد تحضير تركيز 1.0 مول، و200 ميكروليتر مستخلص أنزيم البيروكسيداز، و 6.25 ميكروليتر جواكول Guoacol وتم وضع الأنابيب في حمام مائي على حرارة 25-28 درجة مئوية لمدة 5 دقائق. وقبل أن يتم وضع العينات في جهاز المطياف الضوئي مباشرة، تمت المستخلص الأنزيمي. تم وضع 3 مل من مزيج النفاعل السابق في حجرة المطياف الضوئي (7632). تم أخذ قراءات الامتصاص المستخلص الأنزيمي عدد ميكرومولات الماء الأوكسجيني المستخلص الأنزيمي عدد ميكرومولات الماء الأوكسجيني التي تتفكك بواسطة 100 ملغ من النسيج النباتي الداخل في تشكيل المستخلص الأنزيمي في الدقيقة الواحدة عند حرارة 25 درجة المؤبة. وتم حساب النشاط الأنزيمي وقق معادلة الشركة المصنعة للمادة القياسية للأنزيم:

 $PA = B \times SDF / Rt \times V$

بحبث:

Pyroxidase Activity :PA نشاط الأنزيم.

B: كمية الماء الأوكسجيني H2O2 المتفككة بين الزمن الأولي والزمن النهائي.

Sample Dilution Factor :SDF معامل تخفيف العينة.

Reaction time :Rt زمن التفاعل مقدراً بالدقيقة.

V: حجم العينة المضافة إلى حجرة المطياف الضوئي مقدرة بـ مل.

مع العلم أن SDF=1 و SDF=1 ثم تم حساب نسب الزيادة في نشاط أنزيم البيروكسيداز بالاعتماد على معامل التصحيح حيث تم تصحيح الشاهد السليم إلى 100، حسب معاملات التصحيح لباقي المعاملات وفق (2007):

معامل التصحيح= قيمة نشاط الأنزيم للمعاملة/ قيمة نشاط أنزيم البيروكسيداز للشاهد السليم ×100

ومن ثم حسبت نسب الزيادة بإيجاد الفرق بين معامل تصحيح المعاملة ومعامل تصحيح الشاهد السليم بالنسبة للمعاملات بكتيريا فقط، والفرق بين معامل تصحيح المعاملة و معامل تصحيح الشاهد المعدى بالنسبة للنباتات المعداة والمعاملة بالبكتيريا فقط.

2-9- تقدير المحتوى الكلي للكلوروفيل Total Chlorophyll:

قدر محتوى الكلوروفيل الكلي وفق طريقة Dere وآخرون (1998) حيث: غسلت الأوراق المأخوذة للتحليل تحت تيار من الماء الجاري لإزالة الأتربة والأوساخ والغبار عن سطح الورقة ونشفت، وتم وزن 1 غ من النسيج النباتي من الأوراق الطازجة، ثم هرس هذا النسيج النباتي في هاون نظيف بعد إضافة 10 مل أسيتون تركيز 80%، ثم فصلت الخلاصة بالطرد المركزي 1000 لفة/دقيقة، ورشحت بوساطة طبقتين من الشاش النظيف، وفصلت بالطرد المركزي للمرة الثانية 2500 لفة/ 10 دقائق.

وضعت العينات في أنابيب نظيفة 4 مل من كل عينة من المستخلص النباتي أما بالنسبة للشاهد فقد أضيف 4 مل أسيتون تركيز 80% فقط، وتم قياس كمية الامتصاص لكل عينة بوساطة جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer على طول الموجة 663.6 nm فقط، بالنسبة للكلوروفيل a وطول الموجة 646.6 nm

قدر المحتوى الكلي للكلوروفيل (مغ/غ) Total Chlorophyll حسب طريقة Dere وآخرون (1998) ومن خلال المعادلة التالية: (Porra et al., 2002; Porra et al., 1989)

Total Chlorophyll = 17.76 (A 646.6 nm) + 7.34 (A 663.6 nm)

التحليل الإحصائي:

نفذت كافة تجارب البحث وفق تصميم القطاعات العشوائية الكاملة Randomized Complete blocks Design ، وفق تصميم القطاعات العشوائية الكاملة ANOVA ، وفق اختبار تحليل التباين ANOVA ، وخللت نتائج التجارب إحصائياً باستخدام البرنامج الإحصائي BM SPSS Statistics 23 ، واختبرت الفروق المعنوية بين المتوسطات حسب أقل فرق معنوي معنوية 5% (Least Significant Difference عند مستوى معنوية 5%).

النتائج والمناقشة:

حساب نشاط أنزيم البيروكسيداز في العينات المدروسة:

بينت نتائج تقدير نشاط أنزيم البيروكسيداز بعد 15 يوماً من العدوى بالفيروس حدوث زيادة نشاط أنزيم البيروكسيداز في النباتات المعاملة كما يلي: في النباتات المعاملة بالبكتيريا والمعداة بالفيروس عند الهجين دالاس فقد بينت النتائج ما يلي:

عند المعاملة بالعزلة البكتيرية B. Subtilis والعدوى بالفيروس بلغ نشاط أنزيم البيروكسيداز 0.0430 نانوغرام/مول مقارنة مع الشاهد المعدى الذي بلغ نشاط أنزيم البيروكسيداز فيه 0.0325 نانوغرام/مول وبلغت نسبة الزيادة حوالي 0.0325, بينما المعاملة بالعزلة البكتيرية B. B والعدوى بالفيروس بلغ نشاط أنزيم البيروكسيداز 0.3309 نانوغرام/مول مقارنة مع الشاهد المعدى 0.0325 والعدوى نانوغرام/مول وبلغت نسبة الزيادة حوالي 0.0325، وعند المعاملة بخليط من البكتيريا 0.0325 والبكتيريا 0.0325 بالفيروس بلغ نشاط أنزيم البيروكسيداز 0.0369 نانوغرام/مول وبلغت نسبة الزيادة حوالى 0.0325.

وأما في نباتات الهجين برافو المعاملة بالبكتيريا والمعداة بالفيروس فقد بينت النتائج ما يلي:

عند المعاملة بالعزلة البكتيرية B. subtilis والعدوى بالفيروس بلغ نشاط أنزيم البيروكسيداز 0.06849 نانوغرام/مول مقارنة مع الشاهد المعدى 0.00392 نانوغرام/مول وبلغت نسبة الزيادة حوالي 0.00392 بينما عند المعاملة بالعزلة البكتيرية 0.00392 والعدوى

بالفيروس بلغ نشاط أنزيم البيروكسيداز 0.00897 نانوغرام/مول مقارنة مع الشاهد المعدى 0.00392 نانوغرام/مول وبلغت نسبة الزيادة حوالي 17.6%، وعند المعاملة بخليط من البكتيريا B. sp. والبكتيريا B. sp. والبكتيريا الغيروس بلغ نشاط أنزيم البيروكسيداز 0.00628 نانوغرام/مول مقارنة مع الشاهد المعدى 0.00392 نانوغرام/مول وبلغت نسبة الزيادة حوالي 16.2%.

وبينت نتائج تقدير نشاط أنزيم البيروكسيداز بعد 45 يوماً من العدوى بالفيروس حدوث زيادة نشاط أنزيم البيروكسيداز في النباتات المعاملة كما يلي:

في النباتات المعاملة بالبكتيريا والمعداة بالفيروس عند الهجين دالاس فقد بينت النتائج أنه:

عند المعاملة بالعزلة البكتيرية B.subtilis والعدوى بالفيروس بلغ نشاط أنزيم البيروكسيداز نشاط أنزيم البيروكسيداز نشاط أنزيم البيروكسيداز فيه 0.31001 نانوغرام/مول وبلغت نسبة الزيادة حوالي نانوغرام/مول مقارنة مع الشاهد المعدى الذي بلغ نشاط أنزيم البيروكسيداز فيه 0.3790 نانوغرام/مول مقارنة هي المعاملة بالعزلة البكتيرية .g والعدوى بالفيروس بلغ نشاط أنزيم البيروكسيداز 0.3790 نانوغرام/مول وبلغت نسبة الزيادة حوالي 22.3%، وعند المعاملة بخليط من البكتيريا 8. sp والبكتيريا والبكتيريا B. sp والعدوى بالفيروس بلغ نشاط أنزيم البيروكسيداز 0.3778 نانوغرام/مول مقارنة مع الشاهد المعدى 1.86%.

أما في نباتات لهجين برافو المعاملة بالبكتيريا والمعداة بالفيروس فقد بينت النتائج ما يلي:

عند المعاملة بالعزلة البكتيرية B. subtilis والعدوى بالفيروس بلغ نشاط أنزيم البيروكسيداز نشاط أنزيم البيروكسيداز نشاط أنزيم البيروكسيداز فيه 0.0276 نانوغرام/مول وبلغت نسبة الزيادة نانوغرام/مول مقارنة مع الشاهد المعدى الذي بلغ محتوى نشاط أنزيم البيروكسيداز فيه 0.3065 نانوغرام/مول وبلغت نسبة الزيادة حوالي 0.808%، بينما عند المعاملة بالعزلة البكتيرية B. sp. والعدوى بالفيروس بلغ نشاط أنزيم البيروكسيداز 0.0276 نانوغرام/مول وبلغت نسبة الزيادة حوالي 0.99%، وعند المعاملة بخليط من البكتيريا 0.0276 والبكتيريا 0.0276 نانوغرام/مول وبلغت نسبة الزيادة حوالي 0.0276 نانوغرام/مول مقارنة مع الشاهد المعدى 0.0276%.

زادت السلالتان البكتيريتان المدروستان من نشاط أنزيم البيروكسيداز بعد 15 يوماً من العدوى بالفيروس بنسب مختلفة سواء بوجود الفيروس أو في غيابه، كما ازداد نشاط أنزيم البيروكسيداز بعد 45 يوماً من العدوى لدى جميع المعاملات وكان للسلالة البكتيرية .B. sp الدور الأكبر في هذه الزيادة سواء بوجود الفيروس أو في غيابه.

توافقت نتائج زيادة نشاط أنزيم البيروكسيداز بفعل البكتيريا المستخدمة مع ما أشار إليه Li وآخرون (2016) بزيادة نشاط أنزيم البيروكسيداز وأنزيم فينيل ألانينين أمونيالياز PAL في نباتات البندورة المعاملة بالسلالة البكتيرية PAL أثنويم البيروكسيداز وأنزيم فينيل ألانينين أمونيالياز PAL في نباتات البندورة المعاملة بالسلالة البكتيريا قد BQ9 والمعداة بالفيروس (TYLCV). كما توافقت مع دراسة أجرتها قواس وآخرون (2018) أشارت إلى أن المعاملة بالبكتيريا قد حسنت من نشاط أنزيم البيروكسيداز بعد 78 يوماً بنسب تراوحت ما بين 2.15%–6.35% قياساً بالشاهد غير المعامل (0.002) نانومول)، وبعد 94 يوماً من المعاملة بنسب تراوحت بين 60.71% قياساً بالشاهد غير المعامل (0.056 نانومول)، وبعد 94 يوماً من المعاملة بنسب تراوحت بين المحفزة وتبيوكيميائية في النبات كتراكم البروتينات المرتبطة بالإمراضية (PRs) لنمو النبات كتراكم البروتينات المرتبطة بالإمراضية (PRs) والتي يمكنها أن تكون عبارة عن أنزيمات مضادة للأكسدة، شل أنزيم بوليفينيل أوكسيداز (PPO) Pathogenesis related proteins المركبات الفينولية إلى كينونات سامة تشبط

الفيروس عن طريق تعطيل حمضه النووي (Lamb and Dixon., 1997; Damayanti et al, 2007) ، وقد يعود تثبيط الفيروس بفعل البكتيريا إلى كون البروتينات المرتبطة بالإمراضية ومنها أنزيم البيروكسيداز قد عملت على ترسيب الفيروس من خلال الإرتباط بمعطفه البروتيني، أو عن طريق تعطيل تصنيع بروتين الفيروس أو تعطيل تصنيع حمضه النووي (Chessin et al.,1995) ، وقد يكون تعطيل تصنيع بروتينات الفيروس ناتج عن تثبيط عمل الريبوزومات أو بفعل التنافس بينها وبين البروتينات المرتبطة بالإمراضية، حيث أن البكتيريا تؤثر على الفيروس تأثيراً غير مباشر ، وذلك لعدم وجود تماس بين البكتيريا والفيروس (van Loon et al.,1998 ؛al., 2005)

الهجين دالاس: الجدول (2): نشاط أنزيم البيروكسيداز عند طول الموجة 420 نانومتر بعد 15 يوماً وبعد 45 يوماً من العدوى بالفيروس ونسب الزيادة في نشاط الأنزيم للهجين دالاس.

نسب الزيادة في نشاط أنزيم البيروكسيداز بعد 45 يوماً من العدوى %	نشاط أنزيم البيروكسيداز عند طول الموجة 420 نانومتر بعد 45 يوماً من العدوى	نسب الزيادة في نشاط أنزيم البيروكسيداز بعد 15 يوما من العدوى%	نشاط أنزيم البيروكسيداز عند طول الموجة 420 نانومتر بعد 15 يوما من العدوى	المعاملة
0.024	0.3692°	0.033	0.2692°	B.sub
0.0212	0.42486 ^b	0.021	0.42489 ^a	B.sp
0.02	0.5949 ^a	0.267	$0.0338^{\rm f}$	B.sub+B.sp
16.14	0.36005 ^b	3.09	0.0430^{d}	B.sub +V
22.3	0.3790^{c}	10.9	0.3309^{b}	<i>B</i> .sp +V
21.86	0.3778 ^a	1.35	0.0369 ^e	B.sub+B.sp+V
	0.31001 ^d		$0.0325^{\rm f}$	control +V
	0.00009e		0.00009^{g}	control
	0.00018		0.00013	LSD 5%

Bacillus sp. strain (ABC3, نباتات معاملة بالعزلة البكتيرية Bacillus sp. strain (ABC3, نباتات معاملة بالعزلة البكتيرية البكتيرية البكتيرية البكتيرية Bacillus sp. strain (ABC3, cbs123) و Bacillus subtilis و B.sub+B.sp ، cbs123. نباتات معاملة بالعزلة البكتيرية Bacillus subtilis ومعداة بالفيروس B.sp +V ، ToBRFV ومعداة بالفيروس Bacillus sp. strain (ABC3, cbs123) ومعداة بالفيروس Bacillus sp. strain (ABC3, cbs123) و Bacillus sp. strain (ABC3, cbs123) ومعداة بالفيروس Bacillus sp. strain (ABC3, cbs123) و Bacillus sp. strain (ABC3, cbs123) و المعدى المعامل بالماء المعلم المعامل بالماء المقطر فقط.

الجدول (3): نشاط أنزيم البيروكسيداز عند طول الموجة 420 نانومتر بعد 15 يوماً وبعد 45 يوماً من العدوى بالفيروس ونسب الزيادة في نشاط الأنزيم للهجين برافو.

الهجين برافو:

نسب الزيادة في نشاط أنزيم البيروكسيداز بعد 45 يوما من العدوي%	نشاط أنزيم البيروكسيداز عند طول الموجة 420 نانومتر بعد 45 يوماً من العدوى	نسب الزيادة في نشاط أنزيم البيروكسيداز بعد 15 يوماً من العدوي %	نشاط أنزيم البيروكسيداز عند طول الموجة 420 نانومتر بعد 15 يوما من العدوى	المعاملة
0.02	0.561546 ^b	1.89	0.00884 ^b	B.sub
0.02	0.4892°	1.39	0.00658^{d}	B.sp
0.017	0.54 ^a	1.154	0.00789°	B.sub+B.sp
10.80	0.2831 ^e	6.1	0.06849 ^a	B.sub +V

9.9	0.3065 ^d	17.6	$0.00897^{\rm b}$	<i>B</i> .sp +V
5.8	0.5414 ^a	16.2	0.00628^{d}	B.sub+B.sp +V
	$0.0276^{\rm f}$		0.00392e	control +V
	$0.00009^{\rm g}$		$0.00009^{\rm f}$	control
	0.00018		0.00013	LSD 5%

Bacillus sp. strain (ABC3, نباتات معاملة بالعزلة البكتيرية Bacillus sp. strain (ABC3, وBacillus subtilis وBacillus subtilis وBacillus sp. strain (ABC3, cbs123) وBacillus subtilis بخليط من العزلتين البكتيريتين Bacillus subtilis ومعداة بالغيروس Bacillus subtilis بنباتات معاملة بالعزلة البكتيرية Bacillus subtilis ومعداة بالغيروس Bacillus subtilis ومعداة بالغيروس Bacillus sp. strain (ABC3, cbs123) نباتات الشاهد المعدى درستات الشاهد المعلم بالفيروس control +V، ToBRFV ومعداة بالفيروس ToBRFV بالفيروس ToBRFV د نباتات الشاهد المعلم بالفيروس ToBRFV د نباتات الشاهد المعلم بالماء المقطر فقط.

2-حساب محتوى الكلوروفيل في أوراق العينات المدروسة:

تم قياس محتوى الكلوروفيل الكلي بعد 45 يوماً من العدوى وأشارت النتائج إلى حدوث زيادة في محتوى الكلوروفيل الكلي في النباتات المعاملة كالآتي: بالنسبة للهجين دالاس عند المعاملة بالعزلة البكتيرية B. subtilis بلغ محتوى الكلوروفيل الكلي فيه 30.1 مغ/غ مقارنة مع الشاهد السليم الذي بلغ محتوى الكلوروفيل الكلي فيه 30.1 مغ/غ وبلغت نسبة الزيادة حوالي 46.18%.

أما بالنسبة للنباتات المعاملة بالبكتيريا والمعداة بالفيروس عند الهجين دالاس فقد بينت النتائج ما يلي:

عند المعاملة بالعزلة البكتيرية B. subtilis والعدوى بالفيروس بلغ محتوى الكلوروفيل الكلي 47 مغ/غ مقارنة مع الشاهد المعدى B. الذي بلغ محتوى الكلوروفيل الكلي فيه 28.4 مغ/غ وبلغت نسبة الزيادة حوالي 65.5%، بينما عند المعاملة بالعزلة البكتيرية B. والعدوى بالفيروس بلغ محتوى الكلوروفيل الكلي 38 مغ/غ مقارنة مع الشاهد المعدى 28.4 مغ/غ وبلغت نسبة الزيادة حوالي B. 33.80%.

وبالنسبة للهجين برافو المعامل بالعزلة البكتيرية B. subtilis بلغ محتوى الكلوروفيل الكلي 48 مغ/غ مقارنة مع الشاهد السليم 31.42 مغ/غ وبلغت نسبة الزيادة حوالي 52.8%.

أما بالنسبة للنباتات المعاملة بالبكتيريا والمعداة بالفيروس عند الهجين برافو فقد بينت النتائج ما يلي:

عند المعاملة بالعزلة البكتيرية B. Subtilis والعدوى بالفيروس بلغ محتوى الكلوروفيل الكلي B. Subtilis مقارنة مع الشاهد المعدى 18.31 مغ/غ وبلغت نسبة الزيادة حوالي 42%، بينما عند المعاملة بالعزلة البكتيرية B. B. B. والعدوى بالفيروس بلغ محتوى الكلوروفيل الكلي 28 مغ/غ مقارنة مع الشاهد المعدى 18.31 مغ/غ وبلغت نسبة الزيادة حوالي 52.92%.

تتفق هذه النتائج مع دراسة أجراها الشامي وآخرون (2018) لوحظ فيها بأن النوع البكتيري الشاهد السليم والمعدى. أعطى زيادة في كمية الفينولات الكلية وصبغات التركيب الضوئي بالمقارنة مع باقي المعاملات ومعاملتي الشاهد السليم والمعدى. وبالتالي فإن زيادة كمية الفينولات الكلية وصبغات التركيب الضوئي، أدت إلى زيادة قدرة البكتيريا المدروسة على تحريض المقاومة الجهازية وتخفيض تأثير الفيروس على نباتات البندورة.

وتختلف هذه النتائج مع ما توصلت إليه العجورية وآخرون (2021) بأن الإصابة بفيروس موزاييك الخيار توصلت الله العجورية وآخرون (2021) (Taline F1،Amani F1 ،Harek F1 ،Marvilo F1) قد أثرت من نباتات الفليفلة (حسن الفليفلة المعدوى بالفيروس العدوى بالفيروس الكلوروفيل الكلوروف

بالفيروس بفروق معنوية كبيرة بالمقارنة مع نباتات الشاهد،أما بعد 45 يوماً من العدوى بالفيروس فقد انخفض تأثير الإصابة الفيروسية مع تقدم النبات بالعمر، وقد أدى انخفاض قيم الصبغات الضوئية إلى انخفاض عملية التركيب الضوئي، تختلف نتائج العجورية وآخرون (2021) عن نتائج هذه الدراسة بعدم وجود البكتيريا النافعة فيها.

الهجين دالاس:

العدوى بالفيروس للهجين دالاس.	45 يوماً من	الكلور وفيل الكلى بعد	4): محتوى	الجدول (
0 - 0 - 0 - 0	J J		- (-	, 55

نسبة الزيادة في محتوى الكلوروفيل	محتوى الكلوروفيل الكلي في المعاملة	المعاملة
الكلي في المعاملة %	(مغ/غ)	
46.18	44 ^b	B.sub
10.63	33.3 ^d	B.sp
4.65	31.5 ^d	B.sub+B.sp
65.5	47ª	B.sub +V
33.80	38°	<i>B</i> .sp +V
12.7	32 ^d	<i>B.sub</i> + <i>B.</i> sp +V
	28.4 ^e	control +V
	30.1 ^d	control
	3.4	LSD 5%

Bacillus sp. strain (ABC3, نباتات معاملة بالعزلة البكتيرية Bacillus sp. strain (ABC3, وBacillus sp. strain (ABC3, cbs123) و Bacillus subtilis و البكتيرية البكتيرية البكتيرية البكتيرية البكتيرية البكتيرية البكتيرية Bacillus subtilis ومعداة بالفيروس Bacillus subtilis بنباتات معاملة بالعزلة البكتيرية Bacillus subtilis ومعداة بالفيروس Bacillus subtilis ومعداة بالفيروس Bacillus sp. strain (ABC3, cbs123) ومعداة بالفيروس Bacillus sp. strain (ABC3, cbs123) ومعداة بالفيروس Bacillus sp. strain (ABC3, cbs123) و Bacillus sp. strain (ABC3, cbs123) و المعدى المعدى المعامل بالماء المقطر فقط.

الهجين برافو:

الجدول (5): محتوى الكلوروفيل الكلي بعد 45 يوماً من العدوى بالفيروس للهجين برافو.

المعاملة	محتوى الكلوروفيل الكلي في المعاملة (مغ/غ)	نسبة الزيادة في محتوى الكلوروفيل الكلي في المعاملة %
B.sub	48 ^a	52.8
B.sp	39 ^b	24.12
<i>B.sub</i> + <i>B.</i> sp	35 ^b	11.4
B.sub +V	26°	42
B.sp +V	28°	52.92
B.sub+B.sp+V	24 ^d	31.1
control +V	18.31 ^e	
control	31.42 ^d	
LSD 5%	9.5	

Bacillus sp. strain (ABC3, نباتات معاملة بالعزلة البكتيرية Bacillus sp. strain (ABC3, وBacillus sp. strain (ABC3, cbs123) و Bacillus subtilis و البكتيرية البكتيرية البكتيرية البكتيرية البكتيرية البكتيرية البكتيرية البكتيرية Bacillus subtilis ومعداة بالفيروس Bacillus subtilis بنباتات معاملة بالعزلة البكتيرية البكتيرية البكتيرية البكتيرية البكتيرية Bacillus subtilis ومعداة بالفيروس Bacillus sp. strain (ABC3, cbs123) ومعداة بالفيروس Bacillus sp. strain (ABC3, cbs123) ومعداة بالفيروس Bacillus sp. strain (ABC3, cbs123) و Bacillus sp. strain (ABC3, cbs123) و المعدى الفيروس Bacillus sp. strain (ABC3, cbs123) و المعدى المعامل بالماء المعلم المعامل بالماء المقطر فقط.

الاستنتاجات:

- 1. كانت العزلة البكتيرية Bacillus sp. strain (ABC3,cbs123) أفضل من العزلة البكتيرية (Bacillus subtilis في زيادة نشاط أنزيم البيروكسيداز.
- 2. كانت العزلة Bacillus sp. strain (ABC3,cbs123) أفضل من العزلة Bacillus sp. strain (ABC3,cbs123) في زيادة كمية الكلوروفيل الكلي.

التوصيات:

متابعة دراسة تأثير كل من العزلتين البكتيريتين على معايير النمو والإنتاجية على نباتات الفليفلة في ظروف الزراعة المحمية وفي ظروف الحقل، وإمكانية تطبيقها حقلياً على نباتات العائلة الباذنجانية.

المراجع:

- الشامي، رامز محمد ؛ عماد اسماعيل وياسر حماد (2018). تأثير ثلاثة أنواع من البكتيريا المحفزة للنمو PGPR في تحريض الشامي، رامز محمد ؛ عماد اسماعيل وياسر حماد (2018). 239–239. المقاومة الجهازية ضد فيروس موزاييك الخيار لدى نبات البندورة. المجلة السورية للبحوث الزراعية 5 (4): 227–239.
- العجورية، حلا؛ عماد اسماعيل وبديع سمرة (2021). تأثير الإصابة بفيروس موزاييك الخيار Cucumber mosaic virus على العجورية، حلا؛ عماد السورية للبحوث الزراعية الصبغات الضوئية لبعض هجن الفليفلة (Capsicum annum L.) في محافظة اللاذقية. المجلة السورية للبحوث الزراعية 8 (3): 115–125.
- خريبة، محمد عماد؛ وغزال ،ابتسام؛ والعظمة، محمد فواز .(2015). تأثير الميكورايزا الداخلية في مكافحة مرض سقوط بادرات البندورة من خلال تتشيط إفراز بعض الهرمونات والإنزيمات الدفاعية. أطروحة دكتوراه.104 صفحة.
- قواس، حنان؛ عمر حمودي، أحمد أحمد وعماد اسماعيل(2018). تأثير معاملة بذور صنف البندورة ميريل بأربع سلالات من بكتيريا PGPR في تحفيز نشاط أنزيم البيروكسيداز وتحسين نمو النباتات. المجلة السورية للبحوث الزراعية 5 (1): 114-124.
- ALTUNKAYA, A., Gokmen, V. (2011). Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase, Peroxidase and Lipoxygenase from Freshly Cut Lettuce (L. sativa). *Food Technoogyl Biotechnology*. 49: 249–256.
- BENHAMOU, N.; R.R. Belanger.; T. C. Paulitz (1996). Induction of deferential host responses by *Pseudomonas yuorescens* in Ri T-DNA transformed pea roots after challenge with *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* and *Pythium ultimum*. *Phytopathology*. 86: 174-178.
- CARUSO, A.G.; Bertacca, S.; Parrella, G.; Rizzo, R.; Davino, S.; Panno, S.(2022). Tomato brown rugose fruit virus: A pathogen that is changing the tomato production worldwide. *Ann. Appl. Biol.* 2022, 23, 1262–1277.
- CHESSIN, M.; Deborde, D., Zipf, A. (1995). Antiviral proteins in high plants. RC press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 180.pp. Cited from Shahwan, E.D.M. 2010. Inducing systemic resistance against some tomato virus diseases. Ph.D. Thesis, *Plant Pathol.*, Fac. Agric., Moshtohor, Benha Univ., Egypt, (Viral Diseases). 225 pp.
- DAMAYANTI, D.; Hendra, P., Mubarik, N. R. (2007). Utilization of Root-Colonizing Bacteria to Protect Hot-Pepper against *Tobacco Mosaic Tobamovirus*. *Journal of Biosciences*, 14: 105-109.
- DERE, S., Gunes, T., Sivaci, R. (1998). Spectrophotometric determination of chlorophyll- A, B and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. Tr. J. of Botany, 22: 13-17.

- HAMMOUDI, O. (2007). Einfluss milkrobieller Antagonisten auf den Befall napus L.var.napus mit *Phoma lingam* und *Vereticillium dahlia* var. longisporum an Raps (Brassica). Dissertation Univ.Kiel. 123 pp
- HASAN, Z.M.; Salem, N.M.; Ismail, I.D.; Akel, E.H., Ahmad, A.Y. (2022). First report of Tomato brown rugose fruit virus on greenhouse tomato in Syria. *Plant Disease*, 106-772.
- JEFFRIES C.J. (1998).Potato. FAO/IPGRI technical guidelines for the safe movement of germplasm Potato. Publication Type, Book. 1998.vol 19, 62–63.
- LAEMMLEN, F. (2004). Viruses in peppers. http://cesantabarbara.ucdavis.edu/ccah604.pdf.
- LAMB, C.1., Dixon R.A. (1997). The Oxidative Burst In Plant Disease Resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1997 Jun. 48: 251-275.
- LI, H.; Ding, X.; Wang, C.; Ke, H.; WU, Z.; Wang, Y.; Liu, H., J. Guo (2016). Control of *Tomato yellow leaf curl* virus disease by Enterobacter asburiae BQ9 as a result of priming plant resistance in tomatoes. *Turkish Journal of Biology*. 40: 150-159.
- PANNO S.; Caruso A.G.; Blanco G.; Davino S. (2020). First report of tomato brown rugose fruit virus infecting sweet pepper in Italy. New Dis Rep 41:588–2044. https://doi.org/10.5197/j. 2044-0588. 2020. 041.020.
- PORRA, R.J.; Thompson, W.A. and Kreidemann, P.E. (1989). Determination of accurate extinctions coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption Xuspectroscopy Biochim Biophys Acta, 975: 384-94.
- PORRA, R.J. (2002). The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. Photosynth. Res.73: 149-156.
- RANA, K. L.; Kour, D.; Kaur, T.; Devi, R.; Yadav, A. N.; Yadav, N.; Dhaliwal, H. S., Saxena, A. K. (2020). Endophytic microbes: Biodiversity, plant growth-promoting mechanisms and potential applications for agricultural sustainability. Antonie Leeuwenhoek, 113, 1075–110.
- REDDICK, B. B., Habera, L. F. (1999). New Resistance to Plant Viruses in Pepper. The University of Tennessee, Knoxville, TN, USA.
- SALEM N.; Mansour A.; Ciuffo M.; Falk B.W.; Turina M. (2016). A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan. *Arch Virol* 161:503–506. doi: 10.1007/s00705-015-2677-7.
- SHAHWAN, E.D.M. (2010). Inducing systemic resistance against some tomato virus diseases. Ph.D. Thesis, Plant Pathology., Fac. Agric., Moshtohor, Benha Univ., Egypt, (Viral Diseases). 225 pp.
- SOROKAN, A. V.; Burkhanova, G. F.; Veselova, S. V.; Singh, B. P.; Upadhyaya, K.; Khairullin, R. M. and Maksimov, I. V. (2023). Endophytic bacteria to control plant viruses: an overview. *Microbial Endophytes and Plant Growth*, 51-66.
- VAN LOON, L.C.; Bakker, P.A.H.M. and Pieterse, C.M.J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 36: 453-483.
- WALTERS, D.R.; Walsh, D.; Newton, A.C. and Lyon, G.D. (2005). Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance elicitors. *Phytopathology*,:1368-1373.

Effect of two isolates of growth-promoting rhizobacteria PGPR on peroxidase activity and total chlorophyll content of pepper plants infected with tomato brown fruit virus (ToBRFV)

Salam Ali (1)*, Ibrahim Alabid (1), and Imad Ismail (1)

(1). Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Engineering, Lattakia University, Lattakia, Syria.

(*Corresponding author: Salam Ali. E-mail: Salamkhali43@gmail.com).

Received: 30/09/2024 Accepted: 24/02/2025

Abstract

The study was conducted to study the effect of treating pepper plants with two isolates of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Bacillus subtilis, Bacillus sp. strain (ABC3, cbs123) on infection with Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV), and their effect on increasing the activity of peroxidase enzyme and chlorophyll pigments in pepper plants infected with the virus under protected cultivation conditions. The results showed an increase in the activity of peroxidase enzyme on the two studied pepper hybrids (Dallas - Bravo), and an increase in the amount of total chlorophyll in the treated plants. The two studied bacterial strains increased the activity of peroxidase enzyme after 15 days of infection with the virus at different rates, whether in the presence or absence of the virus. In the Dallas hybrid plants treated with the bacterial isolate *Bacillus* sp. The infection with the virus increased by about 10.9%, while when treated with the bacterial isolate Bacillus sp. and the infection with the virus increased by about 17.6%, and when treated with a mixture of Bacillus subtilis and Bacillus sp. and the infection with the virus increased by about 16.2%. The activity of the peroxidase enzyme also increased after 45 days of infection in all treatments, and the bacterial strain Bacillus sp. played the greatest role in this increase, whether in the presence or absence of the virus, while the isolate *Bacillus* subtilis was better than the isolate Bacillus sp. strain (ABC3, cbs123) in increasing the amount of total chlorophyll. In the Dallas hybrid plants when treated with the bacterial isolate *Bacillus subtilis* and infection with the virus, the increase increased by about 65.5%, while when treated with the bacterial isolate *Bacillus* sp. The infection with the virus increased by about 33.80%, and for the Bravo hybrid when treated with the bacterial isolate Bacillus subtilis and infection with the virus, the increase was about 42%, while when treated with the bacterial isolate *Bacillus* sp. and infection with the virus, the increase was about 52.92%.

Keywords: PGPR, *Bacillus*, ToBRFV, pepper plant, peroxidase enzyme, total chlorophyll amount.