

تقييم كفاءة نوعين من البكتيريا النافعة *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas fluorescens* في تحسين نمو نبات البندورة المعدي بالبكتيريا الممرضة *Pseudomonas corrugata* المسببة لمرض موت لب ساق البندورة

لورا أحمد^{1*} وإبراهيم العبيد¹ وياسر حماد²



¹ قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.

² قسم علوم التربة والمياه، كلية الزراعة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية

(*للمراسلة: م. لورا أحمد، البريد الإلكتروني: lourahmad1998@gmail.com، هاتف: +963982602696).

تاريخ الاستلام: 2024 /06 /18 تاريخ القبول: 2024 /08 /5

الملخص

أجري هذا البحث بهدف تقييم كفاءة نوعين من البكتيريا المحفزة لنمو النبات وهي *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas fluorescens* في تحسين معايير نمو نبات البندورة المعدي بالبكتيريا الممرضة *Pseudomonas corrugata*، بينت نتائج البحث زيادة في قيم جميع المعايير المدروسة (ارتفاع النبات، الوزن الطازج والجاف للمجموع الخضري، ووزن الثمار) عند التلقيح بالبكتيريا النافعة بغياب ووجود العدوى بالبكتيريا الممرضة وخفض تأثير البكتيريا الممرضة في معايير نمو النبات. حقق التلقيح بالبكتيريا النافعة بشكل مفرد أو بشكل مختلط زيادة معنوية في جميع المعاملات المدروسة بالمقارنة مع الشاهد السليم، وأظهرت النتائج تفوق البكتيريا *B. subtilis* وبفارق معنوي إحصائياً مقارنة مع البكتيريا *P. fluorescens* وكانت معاملات التلقيح المختلط بمزيج من نوعي البكتيريا النافعة هي الأفضل في تحفيز نمو النبات وخفض تأثير البكتيريا الممرضة.

الكلمات المفتاحية: *B. subtilis*، *P. fluorescens*، نمو النبات، مرض موت لب ساق البندورة.

المقدمة:

يتبع نبات البندورة *Solanum lycopersicum* إلى العائلة الباذنجانية Solanaceae ويعد من أهم محاصيل الخضر التي تزرع في معظم دول العالم ومنطقة البحر المتوسط (Panno et al., 2021). تحتل زراعة البندورة في البيوت المحمية في سورية أهمية كبيرة وذلك لدورها في تأمين حاجة المواطن من الدخل والغذاء، وبلغت المساحة المزروعة بالبندورة في البيوت المحمية لعام 2021 حوالي 3938 هكتار بإجمالي إنتاج 592420 طن وقد وصل عدد البيوت البلاستيكية المزروعة بالبندورة إلى 96484 بيتاً (المجموعة الإحصائية الزراعية السورية، 2021). يتعرض نبات البندورة للإصابة بعدة أمراض فطرية وبكتيرية وفيروسية، ويعد مرض تنخر ساق البندورة Pith necrosis من الأمراض البكتيرية التي تصيب هذا النبات (Jinnah et al., 2002).

يتسبب المرض عن عدة أنواع من الجنس *Pectobacterium* (سابقاً *Erwinia*) مثل *Pectobacterium carotovorum* و *Pectobacterium atrosepticum* subsp. *carotovorum* (Aysan et al., 2005 ; Molan et al., 2010).

والجنس *Pseudomonas* مثل (*P. mediterranea*, *P. cichorii*, *P. viridiflava*) ويعد النوع *Pseudomonas corrugata* هو الأكثر انتشاراً (Saygili et al., 2008 ; Molan, et al., 2010). تشمل الأعراض اصفرار وذبول في قمة النبات باتجاه الأسفل (بياعة ووراق، 1990)، قد يصحب ذلك حدوث ذبول جانبي في النبات، مناطق بنية على الساق ويكون اللب أغمق عند قاعدة النبات (Licciardello et al., 2007)، كذلك يحدث تغير في لون اللب إلى بني مصفر وقد يحوي على تجاويف تشبه الجيوب وقد تتشقق الساق المصابة بشدة (Licciardello et al., 2007 ; Molan et al., 2010) ومن الأعراض الظاهرية للإصابة المميزة للمرض هو تشكل جذور عرضية (هوائية) على طول الساق (Catara, 2007 ; Licciardello et al., 2007)، سُجّل المرض لأول مرة في سورية في حلب عام 1990 حيث تم عزل المسبب المرضي وعرف على أنه بكتيريا *Pseudomonas corrugata* (بياعة ووراق، 1990)، كما لوحظ تواجده في المنطقة الساحلية في سورية وتم دراسة حصر انتشاره في محافظتي اللاذقية وطرطوس (الغزاوي وآخرون، 2016). يتم اتباع طرائق ووسائل مختلفة في سبيل الوقاية من المرض كعامل البذور بهيبوكلوريت الصوديوم تركيز 1% لمدة 5 دقائق، ومعاملة البذور ببيروكسيد الهيدروجين تركيز 5% لمدة 15 دقيقة (Molan et al., 2010). كما تعد مكافحة الأحيائية باستخدام البكتيريا المحفزة لنمو النبات PGPR من الطرائق الواعدة في السيطرة على هذا المرض (Abo-elyousr et al., 2019)، إذ تتميز هذه البكتيريا بقدرتها على الحد من الإصابة بالأمراض وتعزيز قوة ونمو النبات (Amkraz et al., 2010)، وذلك بشكل مباشر من خلال تحسين تطور الجذور وبالتالي امتصاص الماء والعناصر الغذائية من قبل النبات بشكل أفضل، إضافة إلى إنتاج الهرمونات (الأوكسين والجبرلين، والسيتوكينين) (Sharan and Nehra, 2011)، أو بشكل غير مباشر من خلال منع تأثير الممرضات المؤذية للنبات بالتضاد معها أو بإنتاج مركبات مثل Siderophores (المركبات المخلبة للحديد) والمركبات المضادة لنمو البكتيريا والفطريات الممرضة للنبات وبعض المركبات المتطايرة السامة مثل سيانيد الهيدروجين (Bouizgarne, 2013).

أهمية وأهداف البحث:

تأتي أهمية البحث من أهمية نبات البندورة كأحد المزروعات الاقتصادية في العديد من البلدان والمناطق بما فيها الساحل السوري، ومن ضرورة الاهتمام به والعمل على تخفيف الأضرار التي تصيب هذا المحصول والتي تتسبب عن مسببات مرضية مختلفة ومنها مرض موت لب ساق البندورة المتسبب عن البكتيريا *Pseudomonas corrugata* والعمل على استخدام وسائل مكافحة تكون بعيدة عن المبيدات للتقليل من آثارها السلبية قدر الإمكان، لذلك فقد هدف البحث إلى:

1- عزل وتوصيف وتعريف البكتيريا المسببة للمرض من خلال الخصائص المزرعية والاختبارات البيوكيميائية واختبار القدرة الإراضية.

2- دراسة بعض معايير النمو عند استخدام نوعين من البكتيريا المحفزة لنمو النبات (PGPR) والعدوى بالبكتيريا الممرضة.

مواد البحث وطرائقه:

موقع تنفيذ البحث:

تم تنفيذ البحث في مخبر الأمراض البكتيرية والفيروسية ومخبر الأحياء الدقيقة وأبحاث علوم التربة والمياه، إضافة إلى بيت بلاستيكي في مشتل الجامعة (جامعة تشرين_ كلية الهندسة الزراعية).

هجين البندورة المستخدم: هجين بندورة (مجلينا ف1).

الأنواع البكتيرية النافعة المستخدمة:

استخدمت البكتيريا *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* وهي عزلات مشخصة ومحفوظة في مخبر الأحياء الدقيقة في كلية الزراعة بجامعة تشرين (Hammad, 2020).

عزل البكتيريا الممرضة:

جمعت عينات من نباتات بندورة تظهر عليها أعراض الإصابة بالبكتيريا *Pseudomonas corrugata* من خمسة مواقع تنتشر فيها نباتات البندورة المزروعة في بيوت محمية وهي (بانياس، الخراب، حريصون، الجماسة، جبلة). أخذت قطع صغيرة من 1.5-2 سم من سوق نباتات البندورة المصابة ووضعت في جفنة وهاون معقمن وعقمت بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم 2.5% لمدة 3 دقائق، ثم بالكحول تركيز 70% لمدة دقيقة واحدة، ثم غسلت بماء مقطر ومعقم ومن ثم قطعت بواسطة المشرب المعقم إلى قطع صغيرة ووضعت في ماء مقطر ومعقم وتركت لمدة 10-15 دقيقة، أخذت قطرة من المسحوق برأس إبرة الزرع ونشرت في طبق بتري يحوي بيئة (NA) Nutrient Agar، حضنت الأطباق في درجة حرارة $28 \pm 2^\circ\text{C}$ لمدة 48 ساعة، أخذت مستعمرة مفردة بعد ظهور المستعمرات ونشرت من جديد في طبق بتري للتأكد من نقاوة العزلة البكتيرية.

الصفات المزرعية والاختبارات البيوكيميائية:

تم تعريف العزلات البكتيرية عن طريق الصفات المزرعية مثل لون المستعمرة البكتيرية وشكلها وحواها، والاختبارات البيوكيميائية واختبار القدرة الإمراضية، وشملت الاختبارات البيوكيميائية:

صبغ غرام:

أخذ جزء من مستعمرة بكتيرية حديثة النمو ومزج بقطرة ماء على شريحة زجاجية (slide)، بعدها عولمت بصبغة الكريستال البنفسجي ثم محلول اليود ثم صبغة السفرانين وتم تثبيت الشريحة بواسطة اللهب وإجراء الفحص المجهرى على العدسة $100\times$ ، تعتبر البكتيريا موجبة غرام إذا ظهرت بلون بنفسجي تحت المجهر وسالبة غرام إذا ظهرت بلون أحمر (Paray et al., 2023).

التنفس:

أخذ جزء من المستعمرة البكتيرية حديثة النمو ووضع في طبق بتري يحوي على ماء مقطر ومعقم ثم مزج حتى تتشكل عكارة، وبواسطة إبرة تلقح معقمة أخذ جزء من المعلق البكتيري وتم تخطيطه بشكل طولي وعرضي على طبق بتري يحوي بيئة غذائية عامة للبكتيريا NA، عقت السواتر (Clover Glass) بالكحول وعرضت للهب وتركت لمدة دقيقة حتى تبرد ثم وضعت ساترتين فوق الخطوط البكتيرية التي تم تحضيرها، وضعت الأطباق في الحاضنة على درجة حرارة $28 \pm 2^\circ\text{C}$ وتم الكشف عليها بعد يومين، حيث تكون البكتيريا هوائية إجبارية إذا نمت خارج الساترة، وهوائية اختيارية إذا نمت تحت الساترة وخارج الساترة ولاهوائية إجبارية إذا نمت فقط تحت الساترة.

تشكل اللوفان:

زرعت البكتيريا حديثة النمو (بعمر 24 ساعة) بشكل خط مستقيم على الوسط المغذي (2 غرام مستخلص الخميرة، 5 غرام NaCl، 50 غرام سكروز، 15 غرام آغار، 1000 مل ماء مقطر، pH 7.2) وحضنت البكتيريا في درجة حرارة $28 \pm 2^\circ\text{C}$ لمدة ثلاثة أيام، اعتبرت العزلة موجبة للاختبار إذا أعطت نمواً مخاطياً غزيراً ولامعاً محدباً، وسالبة إذا كان نموها عادياً مسطحاً (Lelliot et al., 1966).

القدرة على تحلل البكتين:

استخدمت شرائح من درنات البطاطا بسماكة 2 سم مقطوعة حديثاً وتم غسلها بماء معقم وتجفيفها، تم وضع 100 ميكروليتر من المعلق البكتيري (تركيز 10^7 cfu/ml) وتم ضبط تركيز البكتيريا باستخدام جهاز المطياف الضوئي عند طول موجة 600 نانومتر) في حفر وسط الشرائح قطرها 4 مم وعمقها 5 مم، حضنت الشرائح ضمن نواقيس زجاجية تحوي في جزئها السفلي ماء معقم على درجة حرارة $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ، أخذت القراءات بعد 24 ساعة حيث يدل وجود تحلل في أنسجة الدرنة إلى قدرة البكتيريا على تحليل البكتين، وعدم وجود تحلل يشير إلى عدم قدرة البكتيريا على تحلل البكتين (Klement and Rudolph, 1990).

الكاتالاز:

نفذ الاختبار بأخذ جزء من مستعمرة بكتيرية حديثة النمو بواسطة إبرة تلقح معقمة، ووضعها على شريحة سوداء ويضاف لها قطرة من بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 ، يعتبر الاختبار موجب في حال تشكل الفقاعات، وسالب في حال عدم تشكل فقاعات.

اختبار القدرة الإراضية:

تم إجراء اختبار القدرة الإراضية لثلاث عزلات بكتيرية تطابقت مواصفاتها مع مواصفات البكتيريا المسببة للمرض حيث حضرت أصص بلاستيكية معقمة قطرها 15 سم وملئت بالتورب المعقم، تم استخدام شتول بندورة من الهجين مجدلينيا ف1 تحت ظروف البيت البلاستيكي، بعد ثلاثة أسابيع من الشتل تم حقن ساق كل نبات بمعلق من البكتيريا الممرضة *Pseudomonas corrugata* وبمعدل 0.5 مل تركيز (10^8 cfu/ml) لكل عذلة مع تغطية النباتات بأكياس بولي إيثيلين لمدة 72 ساعة (Kudela et al., 2010).

تحضير اللقاحات البكتيرية:

تم تحضير اللقاح البكتيري باستخدام بيئة غذائية سائلة (TSB) Tryptic Soy Broth، ووضع في زجاجات خاصة بتنمية البكتيريا BIOGEN سعة 2 لتر تسمح بالتحريك وتأمين التهوية الملائمة للنمو، استخدمت وحدة تنمية لكل عذلة بكتيرية. تم تلقح البيئة السائلة بالعزلات بعد تنشيطها للحصول على مستعمرات حديثة، وضعت على هزاز بسرعة 100 دورة بالدقيقة وحضنت على درجة حرارة 28°C ، لمدة 48 ساعة، تم استخدام شريحة Burkner لتقدير تركيز البكتيريا وضبطها في المعلق وفق التراكيز المطلوبة 10^9 cfu/ml (وحدة تكوين مستعمرة) للبكتيريا النافعة واستخدم المرق المغذي (Nutreint Broth) لتحضير اللقاح المعدي من البكتيريا الممرضة بتركيز 10^8 cfu/ml.

معاملة البذور والزراعة:

تم تعقيم سطح بذور البندورة بهيبوكلوريت الصوديوم 2.5% لمدة 2 دقيقة، وغسلت بالكحول 70% لمدة 1 دقيقة ثم بالماء المقطر والمعقم عدة مرات. نقعت البذور بمعلق من الأنواع البكتيرية النافعة (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescense*) كل على حدا بتركيز 10^9 CfU/ml لمدة 2-3 ساعة ثم تركت لتجف قليلاً، وزرعت في صواني إنبات مملوءة بالتورب المعقم، ووضعت في غرفة النمو ظروف النهار الطويل (16 ساعة و 8 ليل على حرارة 25°C ورطوبة نسبية 65%)، نقلت الشتول إلى الأكياس البلاستيكية عند ظهور الورقة الحقيقية الثالثة والرابعة، ثم سقيت بمعلق البكتيريا النافعة 10^9 CfU/ml كل على حدا، وتم إضافة 10 مل من محلول كبريتات النحاس تركيز 2% كشاهد قياسي وسقي الشاهد الأساسي بالماء المقطر والمعقم، وضعت الأكياس بعد التشتيل في الى بيت بلاستيكي ضمن مشتل الكلية.

العدوى الاصطناعية بالبكتيريا الممرضة:

أجريت العدوى الاصطناعية بالبكتيريا الممرضة *Pseudomonas corrugata* عند وصول نباتات البندورة لعمر 3 أسابيع من التشتل، حيث تم استخدام العزلة الأكثر شراسة بعد اختبار القدرة الإراضية، ونفذت العدوى بحقن ساق النبات عند الورقة الحقيقية الأولى بـ 0.5 مل من معلق اللقاح المعدي باستخدام محقن طبي معقم، وحقنت النباتات في معاملة الشاهد بماء مقطر ومعقم فقط (0.5 مل لكل نبات)، وتركت النباتات ضمن بيت بلاستيكي وتم القيام بعمليات الخدمة اللازمة، وبعد أسبوعين تم فحص تحلل لب ساق النباتات عند ظهور الأعراض الخارجية بإجراء قطاع طولي في ساق النبات وقياس طول المنطقة المتحللة.

تصميم التجربة وتوزيع المعاملات:

نفذت تجربة عاملية وفق تصميم القطاعات العشوائية الكاملة تضمن العامل الأول العدوى بالبكتيريا الممرضة (نباتات معداة وغير معداة) أما العامل الثاني فتضمن البكتيريا النافعة (*Bacillus subtilis* و *Pseudomonas fluorescens*) أو مزيج منهما ومعاملة كبريتات النحاس، حيث تضمنت 10 معاملات، كل معاملة 3 مكررات، وكل مكرر 3 نباتات وفق الجدول (1).

الجدول (1): المعاملات المدروسة بوجود وغياب العدوى بالبكتيريا الممرضة *pseudomonas corrugata*

دون عدوى	عدوى بالبكتيريا الممرضة <i>P. corrugata</i> (Infection)
شاهد دون تلقح (C)	شاهد معدى دون تلقح بالبكتيريا النافعة (Ci)
تلقح ببكتيريا <i>Bacillus subtilis</i> (B.s)	تلقح ببكتيريا <i>B. subtilis</i> + <i>P. corrugata</i> (B.s)i
تلقح ببكتيريا <i>Pseudomonas fluorescens</i> (P.f)	تلقح ببكتيريا <i>P. fluorescens</i> + <i>P. corrugata</i> (P.f)i
تلقح ببكتيريا <i>P. fluorescens</i> + <i>B. subtilis</i> (P.f+B.s)	تلقح ببكتيريا <i>P. fluorescens</i> + <i>B. subtilis</i> (P.f+B.s)i
كبريتات النحاس $Cu SO_4$	كبريتات النحاس $Cu SO_4$ مع العدوى

تأثير البكتيريا النافعة *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas fluorescens* في بعض معايير النمو بعد العدوى بالبكتيريا

الممرضة *Pseudomonas corrugata*:

- الوزن الطازج للمجموع الخضري (غ/نبات): تم ذلك من خلال استخدام ميزان الكتروني حساس لقياس الوزن بعد قلع النبات الأخضر وجمع الثمار عنه، وتم وزن النبات بعد فصل الجذر عن المجموع الخضري عند منطقة التاج.
- الوزن الجاف للمجموع الخضري (غ/نبات): باستخدام ميزان الكتروني حساس وبعد قلع النبات الأخضر وجمع الثمار عنه وفصل الجذر عن المجموع الخضري عند منطقة التاج ومن ثم تجفيف النبات على درجة حرارة 70 °م حتى ثبات الوزن.
- ارتفاع النبات (سم): تم قياس طول كل نبات بدءاً من منطقة التاج وحتى قمة الساق الرئيسية في النبات.
- وزن الثمار (غ/نبات): وذلك باستخدام ميزان الكتروني حساس بعد جمع الثمار عن النبات.

التحليل الاحصائي:

حللت النتائج احصائياً باستخدام تحليل التباين وقورنت المتوسطات الحسابية باستخدام أقل فرق معنوي عند مستوى معنوية 5% وذلك باستخدام البرنامج الاحصائي Genstat 12.

النتائج والمناقشة:

الصفات المزراعية:

تبين لدينا بعد جمع العينات وعزل البكتيريا من الأجزاء النباتية المصابة وزرعها على بيئة الأغار المغذي (Nutrient Agar) NA أن البكتيريا تشكل مستعمرات مجعدة ونادراً ما تكون ملساء، ذات لون كريمي، وبالفحص المجهرى تحت المجهر الضوئي

لوحظ أنها عسوية، ذات لون أحمر مما يدل أنها سالبة لصبغة غرام وتتفق هذه الصفات مع Catara (2007) وكذلك مع Trantas (2014)، كما أظهرت نتائج الاختبارات البيوكيميائية جدول (2).

الاختبارات البيوكيميائية:

الجدول (2): نتائج الاختبارات البيوكيميائية للبكتيريا الممرضة *Pseudomonas corrugata*

الاختبار	صبغة غرام	التنفس	تشكل اللوفان	تحلل البكتين	الكاتالاز
النتيجة	سالبة	هوائية إجبارية	سالبة	سالبة	موجب

يتبين من الجدول (2) أن البكتيريا سالبة غرام، ذات شكل عصوي، حيث تلونت البكتيريا باللون الأحمر الذي تم ملاحظته من خلال الفحص المجهرى تحت المجهر الضوئي، واعتبرت البكتيريا هوائية إجبارية لأنها نمت خارج الساترة فقط، وهي سالبة لاختبار تشكل اللوفان، حيث أنها أعطت نمواً بكتيرياً عادياً مسطحاً ولم يلاحظ تشكل أي نمو بكتيري مخاطي لامع، وسالبة أيضاً لاختبار تحلل البكتين لأنها لم تسبب أي تحلل في أنسجة درنات البطاطا المستخدمة، ولوحظ أن البكتيريا موجبة لاختبار الكاتالاز، حيث تشكل فقاعات على ورقة الترشيح، ويعود السبب إلى إنتاج البكتيريا أنزيم الكاتالاز الذي يعمل على التخلص من سمية H_2O_2 وذلك بكسر الرابطة إلى ماء وأوكسجين، وتتفق نتائج الاختبارات البيوكيميائية لهذه الدراسة مع نتائج دراسات سابقة (الغزاوي وآخرون، 2016؛ بياعة وورق، 1990).

ظهور الأعراض:

ظهرت نتائج العدوى الاصطناعية على النباتات بعد 10 أيام من العدوى بالبكتيريا الممرضة على شكل أعراض ظاهرية متمثلة باصفرار قمة النبات مع ظهور تلونات سوداء في منطقة العدوى، وعند إجراء مقطع طولي في ساق بعض النباتات المصابة لوحظ تلون اللب بلون أصفر إلى بني وحدوث تجايف داخل اللب تشبه الجيوب وتوافق هذا مع دراسات (Molan et al., 2010)؛ الغزاوي وآخرون، 2016)، ولوحظ تشكل جذور عرضية على معظم النباتات المعده وتوافق ذلك مع Licciardello وآخرون (2007) و Catara (2007).

تأثير البكتيريا النافعة في بعض معايير النمو وفي إصابة نبات البندورة بالبكتيريا *Pseudomonas corrugata*:

- ارتفاع النبات:

أظهرت نتائج هذه الدراسة جدول (3) أن إعداء النباتات بالبكتيريا الممرضة *P. corrugata* خفّض من قيم جميع معايير النمو المدروسة، إذ بلغ المعدل العام لارتفاع النبات 106.3 سم في المعاملة المعده والملقحة بالبكتيريا *B. subtilis* و 99.3 سم في المعاملة المعده والملقحة بالبكتيريا *P. fluorescens* و 110 سم في المعاملة المعده والملقحة بالخليط بين النوعين *B. subtilis* و *P. fluorescens* و 88.33 سم في المعاملة المعده والملقحة بكبريتات النحاس $CuSO_4$ وذلك مقارنة مع الشاهد المعدي 88.3 سم، وتفاوتت جميع المعاملات المعده والملقحة على معاملة الشاهد المعدي وكانت نسبة الزيادة (20.38%)، (12.45%، 24.57%) على التوالي إلا أنه يلاحظ في المعاملات غير المعده والملقحة بالبكتيريا النافعة أن البكتيريا النافعة قللت من التأثير السلبي للبكتيريا الممرضة إذ بلغ المعدل العام لارتفاع النبات 118 سم في المعاملة الملقة بالبكتيريا *B. subtilis* و 107.6 سم في المعاملة الملقة بالبكتيريا *P. fluorescens* و 124.3 سم في المعاملة الملقة بالخليط بين النوعين *B. subtilis* و *P. fluorescens* و 101.7 سم في معاملة كبريتات النحاس وتفاوتت جميع المعاملات الملقة وغير المعده على معاملة الشاهد السليم 103.3 سم وكانت نسبة الزيادة (14.23%، 3.29%، 20.32%) على التوالي. وفي كلتا الحالتين للمعاملات المعده وغير المعده كان التلقيح المختلط هو الأفضل، ولدى مقارنة تأثير التلقيح المفرد بالبكتيريا النافعة، تفوق التلقيح

المفرد بالبكتيريا *B. subtilis* على النوع البكتيري الآخر *P. fluorescens*، في حين أن المعاملة بالنحاس لم تحقق تأثيراً مقارنة بالعزلات البكتيرية وكانت قريبة من معاملة الشاهد.

الجدول(3): ارتفاع نباتات البندورة الملقحة بالبكتيريا النافعة (سم) ونسبة الزيادة % بوجود وغياب العدوى بالبكتيريا الممرضة *P. corrugata*

معداة ببكتيريا <i>P. corrugata</i>		غير معداة		المعاملات
نسبة الزيادة مقارنة مع الشاهد المعدى %	ارتفاع النبات	نسبة الزيادة مقارنة مع الشاهد السليم %	ارتفاع النبات	
-	88.3 ^g	-	103.3 ^e	Control
20.38	106.3 ^d	14.23	118 ^b	<i>B. subtilis</i>
12.45	99.3 ^f	3.29	106.7 ^d	<i>P. fluorescens</i>
24.57	110 ^c	20.32	124.3 ^a	Mix(<i>B. subtilis</i> + <i>P. fluorescens</i>)
0.03	88.33 ^g	98.45	101.7 ^{ef}	Cu SO ₄
2.956				LSD 5%

- الوزن الطازج للمجموع الخضري:

أظهرت النتائج في الجدول (4) أن إعداء النباتات بالبكتيريا الممرضة *P. corrugata* خفّض من الوزن الطازج للمجموع الخضري فقد بلغ المعدل العام للوزن الطازج للنباتات المعداة 276.3 غ/نبات في المعاملة المعداة والملقحة بالبكتيريا *B. subtilis* و 242.7 غ/نبات في المعاملة المعداة والملقحة بالبكتيريا *P. fluorescens* و 344.3 غ/نبات في المعاملة المعداة والملقحة بالخليط بين النوعين *B. subtilis*+*P. fluorescens* و 197.3 غ/نبات في معاملة كبريتات النحاس المعداة CuSO₄ وذلك بالمقارنة مع معاملة الشاهد المعدى 184.6، حيث تفوقت جميع المعاملات الملقحة بالبكتيريا النافعة والمعداة بالبكتيريا الممرضة على معاملة الشاهد المعدى وبلغت نسبة الزيادة (49.67%، 31.47%، 86.51%) على التوالي. ويلاحظ أنه في المعاملات غير المعداة بالبكتيريا الممرضة *P. corrugata* والملقحة بالبكتيريا النافعة فقد قلت البكتيريا النافعة من التأثير السلبي للبكتيريا الممرضة إذ بلغ المعدل العام للوزن الطازج للمجموع الخضري 371.6 غ/نبات في المعاملة غير المعداة والملقحة بالبكتيريا *B. subtilis* و 338.3 غ/نبات في المعاملة غير المعداة والملقحة بالبكتيريا *P. fluorescens* و 392.7 غ/نبات في المعاملة غير المعداة والملقحة بالخليط بين النوعين *B. subtilis*+*P. fluorescens* و 260.7 غ/نبات في معاملة كبريتات النحاس غير المعداة CuSO₄ وذلك مقارنة مع معاملة الشاهد السليم 235.2 غ/نبات، وتفوقت جميع المعاملات غير المعداة والملقحة بفروق معنوية على معاملة الشاهد السليم وبلغت نسبة الزيادة (49.67%، 31.47%، 86.51%). وفي كلتا الحالتين للمعاملات المعداة وغير المعداة فقد كان التلقيح المختلط هو الأفضل وتفوق التلقيح المفرد بالبكتيريا *B. subtilis* على التلقيح المفرد بالنوع البكتيري الآخر *P. fluorescens*، في حين أن معاملة النحاس لم يكن لها تأثير مقارنة بالعزلات البكتيرية وكانت قريبة من معاملة الشاهد.

الجدول(4): الوزن الطازج لنباتات البندورة الملقحة بالبكتيريا النافعة (غ) ونسبة الزيادة % بوجود وغياب العدوى بالبكتيريا الممرضة *P. corrugata*

معداة ببكتيريا <i>P. corrugata</i>		غير معداة		المعاملات
نسبة الزيادة مقارنة مع الشاهد المعدى %	الوزن الطازج (غ)	نسبة الزيادة مقارنة مع الشاهد السليم %	الوزن الطازج (غ)	
	184.6 ⁱ		235.2 ^g	Control
49.67	276.3 ^d	57.99	371.6 ^b	<i>B. subtilis</i>
31.47	242.7 ^f	43.83	338.3 ^c	<i>P. fluorescens</i>
86.51	344.3 ^c	66.96	392.7 ^a	Mix(<i>B. subtilis</i> + <i>P. fluorescens</i>)
6.87	197.3 ^h	10.84	260.7 ^e	Cu SO ₄

7.238			LSD _{5%}
-------	--	--	-------------------

الوزن الجاف للمجموع الخضري:

أظهرت نتائج الجدول (5) أن إعداء النباتات بالبكتيريا الممرضة *P. corrugata* خفّض من الوزن الجاف للمجموع الخضري فقد بلغ المعدل العام للوزن الجاف للنباتات المعدة 54.66 غ/نبات في المعاملة المعدة والملقحة بالبكتيريا *B. subtilis* و 43.33 غ/نبات في المعاملة المعدة والملقحة بالبكتيريا *P. fluorescens* و 59.43 غ/نبات في المعاملة المعدة والملقحة بالخليط بين النوعين *B. subtilis+P. fluorescens* و 36.5 غ/نبات بالمقارنة مع الشاهد المعدى 33.5 غ/نبات، حيث تفوقت جميع المعاملات الملقحة بالبكتيريا النافعة والمعدة بالبكتيريا الممرضة على معاملة الشاهد المعدى وبنسبة زيادة بلغت (63.16%، 29.34%، 77.40%) على التوالي. ويلاحظ أن التلقيح بالبكتيريا النافعة قلل من التأثير السلبي للبكتيريا الممرضة إذ بلغ المعدل العام للوزن الجاف للمجموع الخضري 74.53 غ/نبات في المعاملة غير المعدة والملقحة بالبكتيريا *B. subtilis* و 57.8 غ/نبات في المعاملة غير المعدة والملقحة بالبكتيريا *P. fluorescens* و 86 غ/نبات في المعاملة غير المعدة والملقحة بمزيج من النوعين *B. subtilis+P. fluorescens* و 47 غ/نبات في معاملة كبريتات النحاس غير المعدة $CuSO_4$ وذلك مقارنة مع معاملة الشاهد السليم 235.2 غ/نبات، وتفوقت جميع المعاملات غير المعدة والملقحة بفروق معنوية على معاملة الشاهد السليم وبلغت نسبة الزيادة (64.41%، 27.50%، 89.71%). وفي كلتا الحالتين للمعاملات المعدة وغير المعدة فقد كان التلقيح المختلط هو الأفضل وتفوق التلقيح المفرد بالبكتيريا *B. subtilis* على التلقيح المفرد بالنوع البكتيري الآخر *P. fluorescens*، في حين أن معاملة النحاس لم يكن لها تأثير مقارنة بالعزلات البكتيرية وكانت قريبة من معاملة الشاهد.

الجدول(5): الوزن الجاف لنباتات البندورة الملقحة بالبكتيريا النافعة ونسبة الزيادة % بوجود وغياب العدوى بالبكتيريا الممرضة

P. corrugata

معداة ببكتيريا <i>P. corrugata</i>		غير معداة		المعاملات
نسبة الزيادة مقارنة مع الشاهد المعدى %	الوزن الجاف (غ)	نسبة الزيادة مقارنة مع الشاهد السليم %	الوزن الجاف (غ)	
-	33.50 ^c	-	45.33 ^d	Control
63.16	54.66 ^c	64.41	74.53 ^b	<i>B. subtilis</i>
29.34	43.33 ^d	27.50	57.8 ^c	<i>P. fluorescens</i>
77.40	59.43 ^c	89.71	86.0 ^a	Mix(<i>B. subtilis+ P. fluorescens</i>)
8.95	36.50 ^e	3.68	47.0 ^d	Cu SO ₄
	5.887			LSD _{5%}

وزن الثمار:

أظهرت النتائج في الجدول (6) أن إعداء النباتات بالبكتيريا الممرضة *P. corrugata* خفّض من وزن الثمار فقد بلغ المعدل العام لوزن الثمار للنباتات المعدة 42.33 غ/نبات في المعاملة المعدة والملقحة بالبكتيريا *B. subtilis* و 34.33 غ/نبات في المعاملة المعدة والملقحة بالبكتيريا *P. fluorescens* و 33.83 غ/نبات في المعاملة المعدة والملقحة بمزيج من النوعين *B. subtilis+P. fluorescens* و 27 غ/نبات وذلك بالمقارنة مع معاملة الشاهد المعدى 26.33، حيث تفوقت جميع المعاملات الملقحة بالبكتيريا النافعة والمعدة بالبكتيريا الممرضة على معاملة الشاهد المعدى وبلغت نسبة الزيادة (59%، 28%، 37%) على التوالي. ويلاحظ أنه في المعاملات غير المعدة بالبكتيريا الممرضة *P. corrugata* والملقحة بالبكتيريا النافعة فقد قللت البكتيريا النافعة من التأثير السلبي للبكتيريا الممرضة إذ بلغ المعدل العام لوزن الثمار 51.33 غ/نبات في المعاملة غير المعدة والملقحة بالبكتيريا *B. subtilis* و 38.33 غ/نبات في المعاملة غير المعدة والملقحة بالبكتيريا *P. fluorescens* و 55.83 غ/نبات في

المعاملة غير المعداة والملقحة بمزيج من النوعين *B. subtilis*+*P. fluorescens* و 36 غ/نبات في معاملة كبريتات النحاس غير المعداة $CuSO_4$ مقارنة مع معاملة الشاهد السليم 36.33 غ/نبات، وتوقفت جميع المعاملات غير المعداة والملقحة بفروق معنوية على معاملة الشاهد السليم وبنسبة زيادة (48%، 11%، 57%) على التوالي. وفي كلتا الحالتين للمعاملات المعداة وغير المعداة تفوق التلقيح المفرد بالبكتيريا *B. subtilis* على التلقيح المفرد بالنوع البكتيري الآخر *P. fluorescens*، في حين أن معاملة النحاس لم يكن لها تأثير مقارنة بالعزلات البكتيرية وكانت قريبة من معاملة الشاهد.

الجدول(5): وزن ثمار نباتات البندورة الملقحة بالبكتيريا النافعة (غ) ونسبة الزيادة % بوجود وغياب العدوى بالبكتيريا الممرضة *P. corrugata*

معداة ببكتيريا <i>P. corrugata</i>		غير معداة		المعاملات
نسبة الزيادة مقارنة مع الشاهد المعدى %	وزن الثمار (غ)	نسبة الزيادة مقارنة مع الشاهد السليم %	وزن الثمار (غ)	
-	26.33 ^f	-	36.33 ^{de}	Control
59	42.33 ^c	48	51.33 ^b	<i>B. subtilis</i>
28	34.33 ^c	11	38.33 ^d	<i>P. fluorescens</i>
37	33.83 ^c	57	55.83 ^a	Mix(<i>B. subtilis</i> + <i>P. fluorescens</i>)
2.54	27 ^f	99.09	36 ^{de}	Cu SO ₄
	2.435			LSD _{5%}

وتتفق هذه النتائج مع نتائج دراسات سابقة عند استخدام أنواع من بكتيريا الـ PGPR في تحسين معايير نمو نبات البندورة (عاقل وآخرون، 2020 ؛ المغربي وآخرون، 2018).

الاستنتاجات:

- لوحظ زيادة في قيم معايير النمو التالية: ارتفاع النبات، الوزن الطازج للمجموع الخضري، الوزن الجاف للمجموع الخضري، ووزن الثمار في النباتات الملقحة بالبكتيريا النافعة.
- تفوق المعاملة بالنوع البكتيري *B. subtilis* على المعاملة بالنوع البكتيري الآخر *P. fluorescens* في تحسين المعايير المدروسة، وكذلك كانت المعاملة بالخليط بين النوعين هي الأفضل.

المراجع:

- الغزاوي، عبداللطيف. محمد، أبو غرة، محمود، الأحمد بك، نبيل، والبغدادي، رعدة، هيثم. (2016). حصر أولي لمسببات موت لب ساق البندورة في الزراعة المحمية في المنطقة الساحلية من سورية. المجلة السورية للبحوث الزراعية. المجلد (3). العدد (1).
- المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية. (2021). مديرية الإحصاء والتخطيط وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، الجمهورية العربية السورية. جدول رقم 60.
- المغربي، صباح، حماد، ياسر، رزق، بشرى. (2018). مكافحة مرض الذبول الفيوزاري في البندورة باستخدام بعض فطريات الميكوريزا وبكتيريا *Leguminosarum Rhizobium*. المجلة الأردنية في العلوم الزراعية. المجلد 14. العدد 1.
- بياعة، بسام، ووزاق، واثق. (1990). أول تسجيل لمرض ذبول وموت مخ البندورة في سورية. 1- أعراض المرض، توصيف الكائن الممرض وبعض الظروف المهيئة للإصابة. مجلة وقاية النبات العربية. 8: 88-95.

عاقل، حسن، إنصاف،، الرحية، علي، قصي،، قواس، نادر، حنان،، اسماعيل، دأود، عماد.(2020). تأثير سلالتين من بكتيريا الجذور المحفزة للنمو في نسبة وشدة الإصابة بفيروس تجعد واصفرار أوراق البندورة/الطماطم وفي بعض مؤشرات النمو لنبات البندورة/الطماطم تحت ظروف البيوت المحمية. مجلة وقاية النبات العربية، مجلد 38. عدد 3.

Abo-elyousr, K. A. M., Bagy, H. M. M. K., Hashem, M., Alamri, S. A. M., and Mostafa, Y. S.(2019). Biological control of the tomato Wilt caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* using formulated plant growth promoting bacteria. Egyptian Journal of Biological Pest Control. 29:54.

Amkraz, N., Boudyach, H., Boubaker, H., Bouizgarne, B.(2010). Screening for fluorescent pseudomonades, isolated from the rhizosphere of tomato, for antagonistic activity toward *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. World Microbiol Biotechnol. 26:1059-1065.

Aysan, Y., Mirik, M., Ustun, N., Sahin, F. and saygili, H.(2006). Defenses' in symptomatic, phenotypic and genotypic characteristics of Erwinia and pseudomonas species causing stem and pith necrosis of tomato in Turkey. 12th Mediterranean phytopathological congress Rhodes Island, Greece 10-15 June 2006.

Aysan, Y., Sahin, F., Cetinkaya-Yildiz, R., Mirikand, M., and Yuce, F.(2005). Occurrence and primer inoculum sources of bacterial stem rot caused by Erwinia Species on tomato in the eastern Mediterranean region of Turkey. Journal of Plant Diseases and Protection. 112(1):42-51

Bouizgarne, B.(2013). Chapter2. Bacteria for Plant Growth Promotion and Disease Management. D.K. Maheshwari (ed.), Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Catara, V.(2007). *Pseudomonas corrugata*: plant pathogen and/ or biological resource?. Molecular Plant Pathology.8(3):233-244.

Jinnah, M. A., Khalequzzaman, K. M., Islam, M. S., M. A. K. S., and Ashrafuzzaman, M.(2002). Control of bacterial wilt of tomato by *pseudomonas fluorescence* in the field. Pakistan Journal of Biological Sciences.5(11):1167-1169.

Hammad, Y.(2020). Isolation and identification of some species of plant growth rhizobacteria (PGPR) from some biofertilizers. Arab Journal of Arid Environments. Volum 13 number 1, Article 17.

Klement, Z. K. and Rudolph, D. C.(1990). Methods in phytobacteriology. Academiai Kiado, Budapest. Pp:11-121.

Kudela, V., Krejazar, V. and Pankova, I.(2010). Pseudomonas corrugata and Pseudomonas marginalis Associated with the collapse of tomato plant in Rockwool slab hydroponic culture.Plant Protection Science. 46(1): 1-11.

aLelliott, R. A.; E. Billing; and A. C. Hayward (1966). Determinative scheme for the nuorescent plant pathogenic pseudomonads. J. Appl. Hacteriol. 29:470-489.

Licciardello, G., Bertani, I., Steindler, L., Bella, P., Venturi, V., and Catara, V.(2007). Pseudomonas corrugata contains a conserved N-acyl homoserine lactone quorum sensing system; its role in tomato pathogenicity and tobacco hypersensitivity response.

Molan, Y. Y., Ibrahim, Y. E., and AL-masrahi, A. A.(2010). Identification in Saudi Arabia of *Pseudomonas corrugata*, the tomato Pith necrosis pathogen, and assessment of cultivar resistance and seed treatment. Journal of Plant Pathology. 92(1): 213-218.

- Panno, S., Davino, S., Carruso, A. G., Bertacca, S., Crnogorac, A., Mandić, A., Noris, E., and Matic, S.(2021).
- Paray, A. A., Singh, M., Mir, M.A. and Kaur, A.(2023). Gram Staining: A Brief Review. International Journal.10(09): 336-341.
- Areview of the most common and economically important diseases that undermine the cultivation of tomato crop in the Mediterranean Basin. Journal Agronomy .V(11).2188.
- Pinela, J., Barros, L., Carvalho, A. M., and Ferreira, I. C. F. R.(2012). Nutritional composition and antioxidant activity of four tomato(*Lycopersicum esculentum* L.) farmer varieties in North eastern Portugal home gardens.
- Saharan, B. S. and Nehra, V.(2011). Plant Growth Promoting Rhizobacteria:A Critical Review. Life sciences and medicine research, Volume: LSMR-21.
- Saygili, H., Aysan, Y., Ustun, N., Mirik, M. and Sabin, F. (2008). Tomato Pith Necrosis disease caused by *Pseudomonas* species in Turkey. Springer Science. 357-366.

Evaluating the Efficiency of Two Types of Beneficial Bacteria *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* in Improving the Growth of Tomato Plants Infected with the Pathogenic Bacteria *Pseudomonas corrugata* Which Causes Tomato Pith Necrosis

Loora Ahmad *¹, Ibrahim Alabid ¹, and Yaser Hammad²

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

² Department of Soil and Water Sciences, Faculty of Agricultural Engineering, Tishreen University, Lattakia, Syria.



(*Corresponding author: Loora Ahmad. E-Mail: loorahmad1998@gmail.com. Phone:+963982602696).

Received: 18/ 06/ 2024 Accepted: 5/ 08/ 2024

Abstract

This research was conducted with the aim of evaluating the efficiency of two types of beneficial bacteria , *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* in improving the growth parameters of tomato plants infected with the pathogenic bacteria *Pseudomonas corrugata*. The research results showed an increase in all the values of all studied parameters presence of (Plant height, fresh and dry weight of shoots, and fruit weight) when inoculated with beneficial bacteria in the absence and presence of infection with pathogenic bacteria and a reduction in the effect of pathogenic bacteria on plant growth parameters. Inoculation with beneficial bacteria singly or in a mixed achieved a significant increase in all studied treatments compared to the healthy control. The results showed that *Bacillus subtilis* bacteria was outperformed with a statistically significant difference compared to *Pseudomonas fluorescens* bacteria. Mixed inoculation treatments with a mixture of the two types of beneficial bacteria were the best in stimulating growth plant and reduce the effect of pathogenic bacteria.

Keywords: *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, Plant growth, Tomato pith necrosis disease.