تأثير ثلاثة أنواع من البكتيريا المحفزة للنمو PGPR في تحريض المقاومة الجهازية ضد فيروس موزاييك الخيار لدى نبات البندورة

رامز محمد الشامي*[1] وعماد داود اسماعيل[1] وياسر علي حماد[2]

(1). قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.
(2). قسم علوم التربة والمياه، كلية الزراعة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.
(*للمراسلة: م. رامز محمد الشامي. البريد الإلكتروني: ramezalshami924@gemail.com).

تاريخ الاستلام: 2017/06/30 تاريخ القبول: 2017/10/03

الملخّص

هدف البحث إلى دراسة تأثير ثلاثة أنواع من البكتريا المحفزة لنمو النبات (*Frateuria aurantia*، *Bacillus megaterium*، *Azotobacter chroococcum*) بتلقيح بذور أو شتول نباتات البندورة المزروعة بأصص داخل نفق بلاستيكي، في الحد من تأثير فيروس موزاييك الخيار في محافظة طرطوس، بتقدير كمية الفينولات الكلية، وصبغات التركيب الضوئي (كلوروفيل A، وكلوروفيل B، والكاروتينوئيدات) بعد 30 يوماً من العدوى بالفيروس. أظهرت مقارنة النتائج تفوق التلقيح المفرد عند استخدام النوع *Frateuria aurantia* بشكل معنوي على النوعين البكتيريين *Bacillus megaterium* و *Azotobacter chroococcum* بالنسبة لكمية الفينولات الكلية، في حين تفوق النوع البكتيري *Azotobacter chroococcum* على النوعين الآخرين بالنسبة لصبغات التركيب الضوئي، وأظهرت المعاملة المختلطة ABF+CMV (تلقيح بذور وتلقيح شتول) أعلى زيادة في كمية الفينولات الكليه إذ بلغت (37.75 و 47.09 مغ/100غ)، وصبغات التركيب الضوئي إذ بلغت (كلوروفيل A0.973 و1.065 مغ/غ) و(كلوروفيل B0.872 و0.903 مغ/غ) و(كاروتينوئيدات 0.972 و 0.995 مغ/غ) على التوالي، بالمقارنة مع باقي المعاملات ومعاملتي الشاهد السليم والمعدى. إنّ زيادة كمية الفينولات الكلية وصبغات التركيب الضوئي، أدت إلى زيادة قدرة البكتيريا المدروسة على تحريض المقاومة الجهازية وتخفيض تأثير الفيروس على نباتات البندورة.

الكلمات المفتاحية: فيروس موزاييك الخيار، بكتريا محفزة لنمو النبات (PGPR)، البندورة، فينولات كلية، صبغات التركيب الضوئي.

المقدمة:

تحتل البندورة .*Lycopersicon esculentum* Mill موقعاً رئيساً بين محاصيل الخضار في سورية لقيمتها الغذائية والتصنيعية، إذ وصل عدد البيوت المحمية المزروعة بالبندورة نحو 68 ألف بيتاً عام 2014 (وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، 2014).

سجل عالمياً إصابة البندورة بأكثر من 30 فيروساً، التي تتبع 16 عائلة مختلفة (Martelli and Quacquarelli, 1983)، ومنها فيروس موزاييك الخيار *Cucumber mosaic virus* الذي يتبع جنس *Cucumovirus* وعائلة Bromoviridae (CMV) ويصيب أكثر من 1000 نوعاً نباتياً ومنها البندورة (Soleimani *et al.*, 2011). ينتقل الفيروس ميكانيكياً بالعصارة النباتية،

كما ينتقل بوساطة بذور أجناس نباتية مختلفة من العائلة القرعية ونباتات التبغ، وينتقل بواسطة التطعيم، والحامول، وحبوب الطلع، كما ينتقل من نبات إلى آخر بوساطة أكثر من 60 نوعاً حشرياً من فصيلة المن *Aphidae* بالطريقة غير المثابرة Non persistent Manner (Sutic *et al.,* 1999, *Brunt et al.*, 1996: ,Francki, 1985). تظهر أعراض الموزاييك على الأوراق بشكل تبقع شديد بالتناوب بين الأخضر الخفيف والأخضر الغامق، ثم يتقزم النبات وتتماوت القمم النامية (Brunt *et al.,* 1996; Sutic *et al.,* 1999; Agrios, 2005; Cerkauskas,2004). يُعد فيروس موزاييك الخيار من الفيروسات الأكثر خطورة على البندورة في بلدان عديدة (Lancioni, 2008) وقد سجل ظهوره في سورية على البندورة في المنطقة الوسطى والساحلية (خليل، 2007) والجنوبية (Kawas, 2006).

تضم البكتيريا المحفزة لنمو النبات Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) مجموعة متعددة من البكتيريا المتواجدة في منطقة جذور النبات، والتي تعمل على تحريض نوعي وكمي لنموه وتسهيل امتصاص النبات للمواد الموجودة في التربة (Singh, 2013; Saharan and Nehra, 2011). يظهر التحريض غير المباشر لنمو النباتات من خلال قدرة هذه البكتيريا على الحد من تأثير ممرضات النبات، وذلك بالتضاد وإنتاج بعض المركبات مثل حاملات أو مثبتات الحديد Siderophores والأجسام المضادة وغاز السيانيد (Bouizgarne, 2013).

تقوم البكتيريا المحرضة لنمو النبات بدور أساسي في المكافحة الحيوية إذ تقدم حماية للنبات من الأمراض الفيروسية (Zehnder *et al,.* 2000., 2001; Murphy *et al.,* 2003; Jee, 2007; Damayanti*et al.,* 2007; El-Borollosy*et al.,* 2012; Jacobsen, 2013; Mishra *et al*., 2014; Dashti *et al.,* 2007, 2014)

أكد Zehnder *et al*., (2000) أن معاملة نباتات البندورة في الظروف الحقلية بسلالات معينة من PGPR أدى إلى انخفاض في حدوث وتطور الإصابة بفيروس موزاييك الخيار، وحرضت المقاومة الجهازية للنباتات. كما أجريت دراسة في البيوت البلاستيكية على نباتات البندورة في العراق قام بها سلومي (2014) فتبين أن البكتريا *Pseudomonas striata* و*Azospirillum lipoferum* و*Bacillus megaterium* والخميرة *Saccharomyces cerevisiae* قد زاد محتوى الكلوروفيل بشكل معنوي بالمقارنة مع الشاهد. كما قام Park *et al*., (2006) بدراسة في كوريا على نبات البطاطا لمعرفة تأثير السلالة **EXTN-1** من بكتريا *Bacillus vallismortis*. وجد زيادة في محتوى الأوراق من الكلوروفيل في النباتات المعاملة بالبكتريا. كما أشار Dashti *et al*., (2014) أنّ سلالتين من البكتيريا المحرضة للنمو *Pseudomonas aeruginosa* و*Stenotrophomonasrizophilia* قد زادتا محتوى الفينول في النباتات المعداة بالفيروس والمعاملة بالبكتريا بالمقارنة مع الشاهد المصاب بفيروس موزاييك الخيار.

قام Shahwan, (2010) بدراسة تأثير رواشح الكمبوشا Kombucha (خميرة وبكتريا نافعة تفرز مجموعة أحماض عضوية وبعض المضادات الحيوية ومضادات الفيروسات وفيتامينات ومواد مضادة للأكسدة ومنشطات انزيمية) على نباتات البندورة المصابة بفيروس موزاييك الخيار CMV فتبين زيادة محتوى الأوراق من الكلوروفيل A و B ومحتوى النبات من الفينول بالمقارنة مع الشاهد.

نظراً لأهمية محصول البندورة الغذائية والاقتصادية، حيث يعتبر مصدراً هاماً للدخل في سورية. وبسبب تعرض نباتات البندورة للإصابة بفيروس موزاييك الخيار في الزراعات الحقلية والمحمية (خليل، 2007; Kawas, 2006)، ولأهمية بكتيريا PGPR في تحريض المقاومة الجهازية ضد فيروس موزاييك الخيار، يهدف هذا البحث لدراسة تأثير بكتريا PGPR في الحد من تأثير فيروس

موزاييك الخيار على نبات البندورة ضمن ظروف الزراعة المحمية (أصص) من خلال: تقدير الفينولات الكلية وتحديد الأصباغ النباتية في النبات (الكلورفيل A والكلوروفيل B والكاروتينوئيدات).

مواد البحث وطرائقه:

المادة النباتية ومكان تنفيذ البحث:

استخدم في الدراسة هجين البندورة سويتي Sweety F1 غير محدود النمو (نسبة الإنبات 85%، والنقاوة 99%، منشأ الصين ومعاملة بالثيرام، إنتاج عام 2013، الثمار كروية، ذات لون أحمر، متعددة الحجرات). نُفذ البحث في الموسم الزراعي في الفترة ما بين أشهر شباط/فبراير وأيار/مايو (كاف الحمام) التي تبعد 30 كم شمال شرق طرطوس على ارتفاع 560 م عن سطح البحر، في الساحل السوري بمحافظة طرطوس، وذلك داخل بيت بلاستيكي مساحته 165 م^2(6×27.5 م) وارتفاعه 3 أمتار. كما تم تغطية الأبواب بقماش شبكي ناعم لمنع دخول الحشرات.

العزلة الفيروسية المستخدمة وطريقة العدوى:

استخدمت عزلة محلية من فيروس موزاييك الخيار معرفة سابقاً في المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (إيكاردا) محفوظة كعينات مجففة ومبردة (مجففة) في مخبر الأمراض الفيروسية، كلية الزراعة، جامعة تشرين. تم إكثار عزلة الفيروس على هجين البندورة دلولة، ثم أخذت من نباتات البندورة أوراق ظهرت عليها أعراض الإصابة النموذجية بالفيروس. تم تحضير اللقاح الفيروسي بسحق حوالي 20 غ من عينة نباتية مصابة بفيروس موزاييك الخيار طازجة من نباتات مختبرة ضمن جفنة بورسلان بعد إضافة مادة كربيد السيليكون (مادة خادشة)، و40 مل من محلول فوسفاتي منظم درجة حموضته pH=7 حسب طريقة Jefferies (1998). أعديت نباتات البندورة بلقاح فيروس موزاييك الخيار على الورقتين الحقيقتين الرابعة والخامسة بعد أسبوع من نقلها إلى الأكياس البلاستيكية –بعد أسبوع من التلقيح البكتيري– بما فيها معاملة الشاهد بالفيروس فقط. وأخذ شاهد سليم دون عدوى بالفيروس حيث أعدي فقط بالمحلول الفوسفاتي المنظم المستخدم في تحضير اللقاح الفيروسي المعدي.

تنشيط الأنواع البكتيرية وتحضير اللقاح:

استخدمت ثلاث أنواع بكتيرية مختلفة كالآتي:

– النوع *Azotobacter chroococcum*: بكتيريا محلية مثبتة للآزوت الجوي معزولة من تربة مزروعة بنبات البندورة (حماد والشامي، 2017)، تم تنميتها على البيئة المتخصصة Ashby،s Mannitol Agar (Technical Data, 2011)، ضمن أطباق بتري وحضنت عند درجة حرارة 28°س لمدة ثلاثة أيام.

– النوع *Bacillus megaterium* : بكتيريا ميسّرة للفوسفور معزولة من المستحضر التجاري (BIOPHOS/GET–PHOS) (حماد والشامي، 2017)، تم تنميتها على البيئة المتخصصة بالبكتيريا الميسرة للفوسفور Pikoviskaya,s Agar Technical) (Data, 2011)، ضمن أطباق بتري، ثم حُضّنت الأطباق عند درجة حرارة 33 °س لمدة ثلاثة أيام.

– النوع *Frateuria aurantia*: بكتيريا ميسرة للبوتاس معزولة من المستحضر التجاري (BIO–NPK/BHARPUR) (حماد والشامي، 2017)، تم تنميتها على البيئة المتخصصة بالبكتيريا الميسرة للبوتاس – Glocuse– Yeast extract $CaCO_3$ (Lisdiyanti *et al.*, 2003)، ثم حضنت الأطباق عند درجة حرارة 28 °س لمدة ثلاثة أيام.

تحضير اللقاح البكتيري:

حضر اللقاح البكتيري باستخدام بيئة غذائية سائلة Tryptic Soy Broth (TSB)، في زجاجات خاصة بتنمية البكتيريا BIOGEN/ سعة 2 ليتر تسمح بالتحريك وتأمين التهوية الملائمة للنمو، استخدمت وحدة تنمية لكل نوع من البكتيريا المدروسة، لقحت البيئة السائلة بالعزلات المنشطة والحصول على مزارع حديثة، وضعت على هزاز بسرعة 100 دورة بالدقيقة وحضنت عند درجة حرارة 28 °س، لمدة 48 ساعة، تم استخدام شريحة العد Bürker لتقدير تركيز/كثافة البكتيريا وضبطها في المعلق وفق التركيز المطلوب 10^9 خلية/مل.

تلقيح نباتات البندورة بالبكتريا والعدوى بفيروس موزاييك الخيار:

التلقيح بالبكتريا:

أضيفت اللقاحات البكتيرية المحضرة من العزلات المختلفة (معلقات بتركيز 10^9 خلية/مل) وفق المعاملات المدروسة بطريقتين كالآتي: تلقيح البذور (s): أضيف اللقاح البكتيري إلى البذور بنقعها لمدة 4 ساعات. ونقعت بذور الشاهد بالماء المقطر وزرعت في صواني، وبعد 30 يوماً من الزراعة نقلت شتول البندورة إلى الأكياس البلاستيكية ضمن نفق بلاستيكي.

تلقيح الشتول (sh): أضيف اللقاح البكتيري بسقاية الشتول بعد نقلها الى وسط الزراعة بمعدل 15 مل لكل نبات مزروع من المعلق البكتيري تركيزه 10^9 خلية/ مل حسب كل معاملة، وأضيف 15 مل ماء مقطر للشاهد.

أعديت نباتات التجربة بلقاح فيروس موزاييك الخيار على الورقتين الحقيقتين الرابعة والخامسة بعد أسبوع من نقلها إلى الأكياس البلاستيكية– بعد أسبوع من التلقيح البكتيري– بما فيها معاملة الشاهد بالفيروس فقط. وأخذ شاهد سليم دون عدوى بالفيروس.

تصميم البحث والتحليل الإحصائي:

استخدمت تربة زراعية جيدة الخواص متوسطة القوام، أضيف لها سماد عضوي متخمر بنسبة 4:1 سماد عضوي: تربة حجماً، وغطيت بشريحة من البلاستيك الشفاف سماكته 200 ميكرون للتعقيم الشمسي، عبئت الخلطة الزراعية ضمن أكياس بلاستيكية أبعادها 30×40 سم سعتها 28 لتراً، وزعت الأكياس حسب المعاملات والمكررات على 4 خطوط مزدوجة والبعد بين الخط المفرد والآخر، وبين النبات والآخر 40 سم، وبين الخطين المزدوجين وبين المكرر والآخر 100 سم، وقدمت لنباتات التجربة كافة العمليات الزراعية اللازمة.

اتبع في تصميم البحث نظام العشوائية الكاملة حيث تضمن 16 معاملة بأربع مكررات لكل معاملة و3 نباتات لكل مكرر. بلغ عدد النباتات الكلي 192 نباتاً.

الجدول 1. تصميم ومعاملات البحث

معاملات تلقيح بذور وعدوى بالـ CMV	معاملات تلقيح شتول وعدوى بالـ CMV
A+CMV s	A+CMV sh
B+CMV s	B+CMV sh
F+CMV s	F+CMV sh
AB+CMV s	AB+CMV sh
AF+CMV s	AF+CMV sh
BF+CMV s	BF+CMV sh
ABF+CMV s	ABF+CMV sh
معاملة شاهد بدون تلقيح بالبكتيريا وبدون عدوى بالفيروس	
معاملة شاهد عدوى بـ CMV فقط	

***Azotobacte rchroococcum*(A), *Bacillus megaterium*(B), *Fraturia aurantia*(F)**

تلقيح بذور:s، تلقيح شتول: sh ,CMV: *Cucumber mosaic virus*

حلّلت النتائج إحصائياً باستخدام برنامج Genstat-12، واختبار One-way ANOVA (no Bloking)، ومقارنة الفروق بين المتوسطات باستخدام اختبار أقل فرق معنوي LSD 1% واختبار دانكان.

القراءات:

تقدير المركبات الفينولية الكلية:

تم تقدير المركبات الفينولية الكلية باستخدام طريقة كاشف الفولين سيوكالتو (Singleton and Rossi, 1965) ، تم أخذ 2 غرام من أوراق نباتات البندورة الطازجة بعد 30 يوماً من العدوى الفيروسية, ثم طحنت في جفنة بورسلان وإضافة 15 مل من 80% إيثانول مع رمل نقي, ثم رشح المزيج ضمن ورق ترشيح ووضعت الرشاحة ضمن مثفلة على سرعة 10000 دورة/دقيقة ولمدة 15 دقيقة، جمعت المواد الطافية (الرائق) وأعيد الاستخلاص مرتين بالكحول والترشيح، جفف المستخلص الإيتانولي هوائياً عند درجة حرارة الغرفة لقرب الجفاف ثم أضيف إليه 5 مل ماء مقطر. وحضر محلول كربونات الصوديوم Na_2co_3 (200 غ/لتر)، وكاشف فولين (Merck, Germany)، ومحلول حمض الكاتيكول القياسي (CHEMIE-LOBA, India) الذي حضر بتركيز 1 غرام/ليتر. تمّ القياس أولاً بتحضير سلسلة عيارية من حمض الكاتيكول بتراكيز تتراوح بين (400- 0 مغ/لتر). أخذ 20 ميكروليتر من المستخلص المحضر سابقاً أو محاليل السلسلة العيارية (واستبدلت العينة بالميتانول 70% في الشاهد) وأضيف إليها 100 ميكرو ليتر من كاشف فولين-سيوكالتيو و 1.58 مل من الماء المقطر. حُرِّك المزيج بعد ذلك جيداً ومن ثم ترك لمدة 5 دقائق ليضاف بعدها 300 ميكرو ليتر من محلول كربونات الصوديوم 200 غ/لتر، ثم تُرك المزيج في الظلام لمدة ساعة ونصف، وقيست بعدها الامتصاصية الضوئية للمحلول الناتج باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer (JASCO – اليابان) عند موجة طولها 650 نانوميتر. حُسب المحتوى الفينولي للعينات بالاستعانة بالمنحني القياسي وبقيمة امتصاصية العينة حيث تم تعويض قيمة الامتصاصية للعينة في معادلة المنحني القياسي لإيجاد تركيز المركبات الفينولية في العينة مقدرة بعدد الميلي غرامات المكافئة من حمض الكاتيكول القياسي.

تقدير كمية صبغات التركيب الضوئي:

تم استخلاص وتقدير كمية صباغ الكلوروفيل A وB والكاروتينوئدات حسب (Arnon, 1949) بأخذ 1غ عينات الأوراق الطازجة بعد 30 يوماً من العدوى الفيروسية، وطحنت في جفنة بورسلان مع إضافة 10 مل من 80% أسيتون مع وجود رمل مجفف ومغسول وكمية قليلة من $Caco_3$ (0.1 غ) لمعادلة الأحماض العضوية في الأوراق الطازجة بعدها تم ترشيحها من خلال قمع ترشيح، ثم غسل الباقي بإضافة الأسيتون عدة مرات حتى زوال اللون الأخضر من العينة النباتية وأكمل الحجم حتى 25 مل. ثم حددت الكثافة البصرية للمستخلص باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer عند طولي الموجتين 663 و645 نانوميتر للكلوروفيل A وB, وعند موجة طولها 440 نانوميتر لصبغة الكاروتينوئدات.

وحسبت وفق المعادلات (Kalaivani *et al.*, 2013)

كلوروفيل A بـ مغ/غ = $\frac{V}{1000*W} * [(A_{645}) * 2.69 - (A_{663}) * 12.7]$

كلوروفيل B بـ مغ/غ = $\frac{V}{1000*W} * [(A_{663}) * 4.68 - (A_{645}) * 22.9]$

كاروتينوئيدات بـ مغ/غ = $\frac{V}{1000*W} * [(\text{B كلوروفيل} + \text{A كلوروفيل}) * 0.268 - (A_{440}) * 4.965]$

حيث:A= الامتصاصية عند طول الموجة المحددة.V= الحجم النهائي للمستخلص بالأسيتون تركيز 80%.W= الوزن الطازج للنسيج النباتي المستخدم.

النتائج والمناقشة:

تأثير البكتيريا المحرضة لنمو النبات في محتوى الفينولات الكلية في أوراق نباتات البندورة:

بينت النتائج (الجدول 2) زيادة في كمية الفينولات الكلية داخل النبات في كل المعاملات المدروسة بالمقارنة مع الشاهدين السليم والمصاب غير المعاملين بالبكتريا، إذ وجد لدى طريقتي التلقيح بالبكتيريا بذور وشتول فروقاً معنوية بين كافة المعاملات ومعاملتي الشاهد السليم 17.01 مغ/100غ والشاهد المصاب 14.66 مغ/100غ، مع تفوق واضح لطريقة التلقيح بالشتول على طريقة التلقيح بالبذور، كما وجد تفوق للمعاملة المختلطة ABF على باقي المعاملات في طريقتي التلقيح بالبذور والشتول إذ بلغت 37.75 مغ/100غ و 47.09 مغ/100غ على التوالي. ولدى المقارنة بين الأنواع البكتيرية الثلاثة وجد تفوق معنوي للبكتريا *Fraturia aurantia* يليها النوع البكتري *Bacillus megaterium* ثم النوع *Azotobacter chroococcum* في تحريض تشكيل المركبات الفنولية الكلية، حيث زات كمية الفينولات الكلية بالرغم من وجود العدوى والإصابة الفيروسية وهذا يدل على قدرة البكتريا على تحفيز النبات لتشكيل المواد الدفاعية المسؤولة عن تشكيل المقاومة الجهازية ضد الممرضات إذ تلعب الفينولات دوراً هاماً في لجننة الخلايا مما يعيق حركة وانتقال الفيروس داخل النبات (Rajinimala *et al.*, 2007).

الجدول 2. تأثير البكتيريا المحرضة لنمو النبات في المحتوى الفينولي الكلي (مغ/100غ) في أوراق نباتات البندورة

طريقة التلقيح / المعاملات	تلقيح بذور	تلقيح شتول
A+CMV	17.08^{b}	**20.41^{c}**
B+CMV	18.92^{c}	**27.26^{e}**
F+CMV	23.58^{d}	**31.77^{fg}**
AB+CMV	26.62^{d}	**34.43^{h}**
AF+CMV	30.47^{f}	**36.56^{i}**
BF+CMV	33.01^{gh}	**37.45i**
ABF+CMV	37.75^{i}	**47.09^{j}**
شاهد معدى بـCMV	**14.66^{b}**	
شاهد سليم Control	**17.01^{a}**	
LSD 5%	0.918	

***Azotobacter chroococcum*(A), *Bacillus megaterium*(B), *Fraturia aurantia*(F)**

القيم التي يتبعها حروف متشابهة في نفس العامود لايوجد بينها فرق معنوي عند مستوى احتمال 1 %

تأثير البكتيريا المحرضة لنمو النبات في كمية الكلوروفيل A في أوراق نباتات البندورة:

يظهر الجدول (3) أنّ المعاملات الملقحة بالبكتريا في كلا طريقتي التلقيح بالبكتيريا قد تفوقت معنوياً على معاملة الشاهد المعدى بالفيروس 0.773 مغ /غ ومعاملة الشاهد السليم 0.83 مغ/غ. كما تبين أن المعاملة المختلطة ABF+CMV تفوقت معنوياً على كل المعاملات بما فيها الشاهد السليم والمصاب الغير معاملين بالبكتريا إذ بلغت كمية الكلوروفيل A في الأوراق في طريقتي تلقيح البذو والشتول والبذور0.973 و 1.065 مغ/غ، على التوالي، كما تبين تفوق واضح لطريقة تلقيح الشتول على طريقة تلقيح البذور. ولدى مقارنة كمية الكلوروفيل A لدى معاملات التلقيح المفرد بالأنواع البكتيرية الثلاثة تبين تفوق معاملة التلقيح بالبكتريا *Azotobacter chroococcum* على النوعين الأخريين في كلا الطريقتين.

الجدول 3. تأثير البكتيريا المحرضة لنمو النبات في كمية الكلوروفيل A بـ (مغ/غ) في أوراق نباتات البندورة

طريقة التلقيح / المعاملات	تلقيح بذور	تلقيح شتول
A+CMV	0.901^{cde}	0.935^{ef}
B+CMV	0.831^{ab}	0.877^{bcde}
F+CMV	0.842^{bc}	0.893^{bcde}
AB+CMV	0.875^{bcde}	0.918^{def}
AF+CMV	0.923^{def}	0.981^{f}
BF+CMV	0.864^{bcd}	0.885^{bcde}
ABF+CMV	0.973^{f}	1.065^{g}
شاهد معدى بـCMV	**0.774^{a}**	
شاهد سليم Control	**0.83^{ab}**	
LSD 1%	**0.034**	

***Azotobacter chroococcum*(A), *Bacillus megaterium*(B),*Fraturia aurantia*(F)**

القيم التي يتبعها حروف متشابهة في نفس العامود لايوجد بينها فرق معنوي عند مستوى احتمال 1 %

تأثير البكتيريا المحرضة لنمو النبات في كمية الكلوروفيل B في أوراق نباتات البندورة:

أظهرت النتائج الجدول (4) زيادة كمية الكلوروفيل B في أوراق نباتات البندورة في جميع المعاملات المدروسة بالمقارنة مع معاملتي الشاهد السليم والمعدى بالفيروس. وكانت أكبر زيادة في كمية الكلوروفيل B هي للمعاملة المختلطة ABF+CMV في كلا طريقتي التلقيح بذور وشتول إذ بلغت 0.872 و 0.903 مغ/غ على التوالي، بالمقارنة مع الشاهد السليم 0.652 مغ/غ والشاهد المعدى 0.582 مغ/غ مع تفوق واضح لطريقة التلقيح بالشتول على طريقة تلقيح البذور.

الجدول 4. تأثير البكتيريا المحرضة لنمو النبات في كمية الكلوروفيل B بـ (مغ/غ) في أوراق نباتات البندورة

طريقة التلقيح / المعاملات	تلقيح بذور	تلقيح شتول
A+CMV	0.697^{abc}	**0.716^{bcd}**
B+CMV	0.69^{ab}	**0.713^{bcd}**
F+CMV	0.703^{bc}	**0.74^{bcd}**
AB+CMV	0.745^{bcd}	**0.762^{bcde}**
AF+CMV	0.82^{cdef}	**0.826^{def}**
BF+CMV	0.751^{bcd}	**0.763^{bcde}**
ABF+CMV	0.872^{ef}	**0.903^{f}**
شاهد معدى بـCMV	**0.582^{a}**	
شاهد سليم Control	**0.652^{ab}**	
LSD 1%	0.062	

***Azotobacter chroococcum*(A), *Bacillus megaterium*(B),*Fraturia aurantia*(F)**

القيم التي يتبعها حروف متشابهة في نفس العامود لايوجد بينها فرق معنوي عند مستوى احتمال 1 %

تأثير البكتيريا المحرضة لنمو النبات في كمية الكاروتينوئيدات في أوراق نباتات البندورة:

وجد أن كمية الكاروتينوئيدات زادت في كل المعاملات المدروسة بالمقارنة مع معاملتي الشاهدين السليم والمعدى بالفيروس الغير ملقحين بالبكتيريا (الجدول 5). كما تبين انخفاض كمية الكاروتينوئيدات في أوراق نباتات البندورة في معاملات طريقة تلقيح بذور

بالمقارنة مع معاملات طريقة تلقيح شتول، كما تفوقت جميع المعاملات في كلا الطريقتين على معاملة الشاهد المعدى 0.513 مغ/غ. كما وجد أن المعاملة ABF+CMV تفوقت معنوياً على كل المعاملات بما فيها الشاهد السليم والمصاب الغير معاملين بالبكتريا إذ بلغت كمية الكاروتينوئيدات في الأوراق 0.972 مغ/غ في طريقة تلقيح بذور و0.995 مغ/غ. ولدى المقارنة كمية الكاروتينوئيدات بين معاملات الأنواع البكتيرية الثلاثة تفوقت البكتريا *Azotobacterchroococcum* على النوعين البكتيرين *Fraturiaaurantia*و *Bacillus megaterium*.

الجدول 5. تأثير البكتيريا المحرضة لنمو النبات في كمية الكاروتينوئيدات بـ (مغ/غ) في أوراق نباتات البندورة

طريقة التلقيح / المعاملات	تلقيح بذور	تلقيح شتول
A+CMV	0.723^{b}	0.776^{c}
B+CMV	0.715^{b}	0.719^{b}
F+CMV	0.722^{b}	0.751^{bc}
AB+CMV	0.753^{bc}	0.782^{c}
AF+CMV	0.832^{d}	0.856^{d}
BF+CMV	0.751^{bcd}	0.752^{bc}
ABF+CMV	0.972^{e}	0.995^{e}
شاهد معدى بـCMV	0.513^{a}	
شاهد سليم Control	0.712^{b}	
LSD 1%	**0.044**	

***Azotobacterchroococcum*(A), *Bacillus megaterium*(B), *Fraturiaaurantia*(F)**

القيم التي يتبعها حروف متشابهة في نفس العامود لايوجد بينها فرق معنوي عند مستوى احتمال 1 %

توافقت نتائج البحث مع دراسة سابقة (Dashti *et al.*, 2014) إذْ وجد أن سلالتين من البكتريا المحفزة للنمو *Pseudomonas aeruginosa* و *Stenotrophomonasrizophilia* زادتا من محتوى الفينول في النباتات المعداة بالفيروس والمعاملة بالبكتريا بالمقارنة مع الشاهد المصاب بفيروس موزاييك الخيار، كما بين Kacjan *et al.*, (2011) أنّ العديد من مركبات الفلافونيئيدات ومضادات الأكسدة في نباتات البندورة تعود للمركبات الفينولية الكلية، وأي زيادة في المركبات الفينولية الكلية سيحسن من نوعية ثمار البندورة . وأشار Vanloon *et al.*, (1998) أنّ زيادة المحتوى الفينولي دليل على تفعيل المقاومة الجهازية داخل النبات، كما بين Witing, (2000) أنّ زيادة المحتوى الفينولي داخل النبات مثل اللجنين والفلافونوئيدات تحفز النبات لمقاومة الأمراض الفيروسية. كما وجد Sahwan *et al.*, (2010) زيادة في المركبات الفينولية الكلية لدى نباتات البندورة المصابة بفيروس موزاييك الخيار CMV المعاملة برواشح الكمبوشا، إذ تحدث المركبات الفينولية تغيرات فيزيولوجية في الخلايا ومورفولوجية وفيزيائية في جدرها تعيق انتقال الفيروس، كما تبين زيادة في محتوى الأوراق من الكلوروفيل A و B والكاروتينوئيدات، وبالتالي زيادة في النمو والانتاج، لدورها الأساسي في الاصطناع الحيوي للمواد الغذائية، وهذا يتوافق مع نتائج البحث إذ زاد كل من المركبات الفينولية الكلية، وصبغات التركيب الضوئي بوجود البكتريا المحفزة لنمو النبات. تم دراسة تأثير البكتيريا المحفزة في تخفيض الشدة الإمراضية والنسبة المئوية لتخفيض الإصابة بفيروس موزاييك الخيار ومعايير النمو والإنتاج لهذا الموسم (اسماعيل وآخرون، 2017؛ الشامي وآخرون أ، ب، 2017)، لوحظ في نتائج هذه الأبحاث بالمقارنة مع البحث الحالي توافق انخفاض الشدة الإمراضية بفيروس بموزاييك الخيار، وزيادة معايير النمو والإنتاج مع المعاملات التي زادت فيها صبغات التركيب الضوئي والفينولات الكلية، وعملت البكتيريا على تحفيز النمو والإنتاج لنبات البندورة بالرغم من وجود الفيروس. وأشار Park *et al.*, (2006) إلى زيادة في محتوى الأوراق من الكلوروفيل في نباتات البطاطا المعاملة بسلالة البكتيريا **EXTN-1** *Bacillus vallismortis* مما سبب زيادة في كمية المحصول، كما تبين تفعيل مسارات المقاومة الجهازية داخل النباتات المعاملة بالبكتريا.

كما وجد Mishra *et la.*, (2014) أن نباتات البندورة المعاملة بالبكتيريا *Pseudomonas* spp. والمصابة بفيروس تجعد أوراق البندورة *Tomato Leaf Curl Virus* (ToLCV) أظهرت مقاومة للفيروس تجلى بزيادة في محتوى الكلوروفيل، بالمقارنة مع الشاهد. وأشار Murphy, (2003) إلى أن مزيج من عدة أنواع من البكتيريا المحرضة لنمو الجذور يمكن أن يساهم في المكافحة الحيوية ضد عدد من الممرضات النباتية عن طريق إعاقة عدد من ميكانيكيات تطور المرض. كما أن زيادة المحتوى الفينولي في النبات تعمل على زيادة اللجننة في الخلايا النباتية مما يعيق حركة وانتقال الفيروس ضمن النبات ويحفز مسارات الدفاع النباتية والمقاومة الجهازية للنبات (Diyansah *et al.*, 2013).

الاستنتاجات:

- زيادة كمية الفينولات الكلية والكلوروفيل A والكلوروفيل B والكاروتينوئدات داخل أوراق نباتات البندورة، وتفوق المعاملة ABF+CMV على كافة معاملات التجربة.
- أظهر النوع البكتيري *Frateuria aurantia* أكبر زيادة في كمية الفينولات الكلية في أوراق النبات يليها *Bacillus megaterium* ثم *Azotobacter chroococcum* في حين تفوق النوع البكتيري *Azotobacter chroococcum* على النوعين البكتيرين الآخرين بالنسبة لصبغات التركيب الضوئي.
- حفزت البكتريا المستخدمة المقاومة الجهازية داخل نباتات التجربة ضدَ فيروس موزاييك الخيار نتيجة زيادة كمية الفينولات الكلية داخل النبات وصبغات التركيب الضوئي.

التوصيات:

- نوصي باستخدام الأنواع البكتيرية الثلاثة معاً بطريقة معاملة البذور قبل الزراعة وري الشتول.
- إمكانية استخدام بكتيريا الدراسة ضد فيروس موزاييك الخيار، وإجراء دراسات حول فعاليتها ضد الممرضات الأخرى.

المراجع:

اسماعيل، عماد داؤد وياسر علي حماد ورامز محمد الشامي (2017). تأثير بعض أنواع بكتيريا الرايزوسفير في الشدة الإمراضية ونسبة الإصابة بفيروس موزاييك الخيار على نبات البندورة في ظروف الزراعة المحمية. مجلة جامعة تشرين– سلسلة العلوم البيولوجية. سورية. 39(3):16.

الشامي، رامز وياسر حماد وعماد اسماعيل (2017). تقييم فعالية التلقيح بالبكتيريا المحفزة لنمو النبات في الحد من تأثير فيروس موزاييك الخيار في بعض معايير نمو نباتات البندورة. مجلة جامعة البعث. 39:20.

الشامي، رامز وياسر حماد وعماد اسماعيل (2017). تأثير التلقيح ببعض أنواع بكتريا الرايزوسفير في عدد من معايير إنتاج نباتات البندورة المعاملة بفيروس موزاييك الخيار. مجلة جامعة دمشق. (قيد النشر).

وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي (2014). قسم الإحصاء، مديرية الإحصاء والتخطيط، وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، دمشق، الجمهورية العربية السورية.

حماد، ياسر و رامز الشامي (2017). توصيف بعض أنواع بكتريا الرايزوسفير المحفزة لنمو النبات من بعض الأسمدة الحيوية والتربة. مجلة جامعة البعث. سورية. 39:25.

خليل، حسن (2007). التحري عن الأمراض الفيروسية على البندورة في المنطقة الوسطى والساحلية. مجلة جامعة البعث. سورية. 29(2): 231–246.

سلومي، علي كريم (2014). تأثير استخدام الخليط البكتيري (*Bacillus,Azospirillum,Pseudomonas*) و*Saccharomyces cerevisiae* على بعض الصفات الخضرية لصنفي الطماطة Sakata و NR تحت ظروف البيت البلاستيكي. مجلة الفرات للعلوم الزراعية.6 (1): 208-215.

Agrios, G.N. (2005). Plant pathology. 5thED. Elsevier. 922p.

Arnon, D.I. (1949). Plant Physiology. University of California, Berkeley. : 241.

Bouizgarne. B. (2013). Bacteria for plant growth promotion and disease management. Springer 454p 40 illus. Hardcover.

Brunt, A.; K. Carbtree; M. Dallwitz; A. Gibbs and L. Watson (Ed.) (1996). Viruses of plants: descriptions and lists from the VIDE database. CAB. International. Printed and bound in the UK at the University press, Cambridge.1484pp.

Cerkauskas, R. (2004). Cucumber mosaic virus (CMV). Published by AVRDC- The World Vegetable Center, P.O. Box 42. Shanhua, Taiwan 741, ROC.

Damayanti, D. ; H. Pardede ; and N.R. Mubarik (2007). Utilization of root-colonizing bacteria to protect hot-pepper against *Tobacco Mosaic Tobamovirus.* HAYATI Journal of Biosciences. 14(3):105-109.

Dashti, N.H.; M.S. Montasser; N.Y. Ali; R.G. Bhardwaj; and D.L. Smith (2007). Nitrogen biofixing bacteria compensate for the yield loss caused by viral satellite RNA associated with *Cucumber Mosaic Virus* in tomato. Plant Pathology Joural. 23(2) : 90-96.

Dashti, N.; H. Magdy; S. Montasser; N.Y.A. Ali; and V.M. Cherian (2014). Influence of plant growth promoting rhizobacteria on fruit yield, pomologicalcharateristics and chemical content in *cucumber mosaic virus*-infected tomato plants. Kuwait Journal Science. 41(2):205-220.

Diyansah, B. L.Q. Aini; and T. Hadiastono. (2013). The effect of PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* on leaf mustard plant (*Brassica juncea* L.) infected by TuMV (*Turnip mosaic virus*). Jornal of Tropical Plant Protection. 1 (1): 30- 38.

El-Borollosy, A.M.; And M.M. Oraby (2012). Induced systemic resistance against *Cucumber mosaic cucumovirus* and promotion of cucumber growth by some plant growth-promoting rhizobacteria. Faculty of Agriculture, Ain Shams University, Annals of Agricultural Science 57(2):91–97.

Francki, R.I.B. (1985). The viruses and their taxonomy. In: Polyhedron virions with tripartite genomes Plenum Press (R.I.B. Francki, Ed.), The plant viruses, New York. 1-18.

Jacobsen, B.; N. Zidack; P. Hamm; and S. Rondon (2013). Western region ipm- integrated management of PVY- Year 1 Report. HAREC Potato Field Day. P29.

Jee, H.J. (2007). Current status of bio-fertilizers and bio-pesticides development, farmer's acceptance and their utilization In Korea. Rural Development Administration, Suwon 441-707. Korea.

Jeffries, C.J. (1998). Potato. FAO/IPGRI technical guidelines forthe safe movement of germplasm. 19, 62–63.

Kacjan, M.N.; L. Gasperlin; V. Abram; M. Budic; and R. Vidridh (2011) Quality parameters and total phenolic content in tomato fruits regarding cultivvae and microclimatic conditions. Turkish Journal of Agriculure. 35: 185-194.

Kalaivani, M.; A. Jebaesan; S. Maragathavalli; B. Annadurai; and S.K. Gangwar (2013). Studies on chlorophyll content, soluble protein, carbohydrates and moisture content of *Morus alba Linn.* International Jornal of Science and Nature. 4(1):131- 137.

Kawas, H. (2006). Studies on tomato viral diseases in southern Syria, and screening cultivars for resistance to infection with viruses. Ninth Arab Congress of Plant Protection, Damascus, Syria. 19-23 November, 2006, Damascus. Syria.

Lancioni, P. (2008). Studies on biotic and abiotic elicitors inducing defense responses in tomato. Ph.D. Thesis, Phytopathology Department, Faculty of Agriculture, University of Bologna, Italy. 125 pp.

Lisdiyanti, P.; Y. Yamada; T. Uchimura; and K. Komagata (2003). Identification of frateuriaaurantia strains isolated from Indonesian sources. Microbiol.Cult. Coll. 19(2):81-90.

Martelli, G.P.; and A. Quacquarelli (1983). The present status of tomato and pepper viruses. Acta Horticulturae. (ISHS). 127: 39-64.

Mishra, S.; S.A.J. Kavi; U.K. Palliath; and P. Sagar (2014). Biocontrol of *tomato leaf curl virus* (ToLCV) in tomato with chitosan supplemented formulations of *Pseudomonas sp*. under field conditions. AJCS 8(3):347-355. ISSN:1835-2707.

Murphy, J.F.; M.S. Reddy; Ch.M. Ryu; J.W. Kloepper; and R. Li (2003). Rhizobacteria-mediated growth promotion of tomato leads to protection against cucumber mosaic virus. Phytopathology. 93:1301-1307.

Park, K.; D. Paul; K.R. Ryu; E.Y. Kim; and Y.K. Kim (2006). Bacillus vallismortis Strain EXTN-1 Mediated Systemic Resistance against *Potato virus Y* and X in the Field. Plant Pathology Journal. 22(4) : 360 – 363.

Rajinimala, N.; R. Rabindran; and M. Ramaiah (2007). Management of *Bittergourd yellow mosaic virus* (BGYMV) by using virus inhibiting chemical, biocontrol agents, antiviral principles (AVP) and insecticide. Archives of Phytopathology and Plant Protection. Publisher Taylor and Francis. P 1-13.

Saharan, B.S.; and V. Nehra (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: A Critical Review. Life Sciences and Medicine Research. Volume: LSMR-21.

Shahwan, E.Sh.M.E. (2010). Inducing systemic resistance against some tomato virus diseases. DISSERTATION Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for The Degree of DOCTOR OF PHILOSOPHY in PLANT PATHOLOGY (Viral Diseases). Pp: 256.

Singh, J.S. (2013). Plant growth promoting rhizobacteria potential microbes for sustainable agriculture. (Central) University, Raibarely Road, Lucknow 226025 Uttar Pradesh, India. 2013.pp7.

Singleton, V.L. and J.A.Jr. Rossi **(**1965). Colorunetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents.Amerecan Journa Enology Viticulture. 16:144-58.

Soleimani, P. ; G. Mosahebi ; and M.K. Habibi (20110. Identification of some viruses causing mosaic on lettuce and characterization of *Lettuce mosaic virus* from Tehran Province in Iran. Afr. J. Agric. Res., 6 (13) : 3029–3035.

Sutic, P.; D.D. For; and R.E Osic (1999). M.T. Hand book of plant virus diseases. CRC prees,.553pp.

Technical Data. (2011). Pikovskayas Agar M520. HiMedia Laboratories. P2.

Technical Data. (2011).AshbysMannitol Agar M706. HiMedia Laboratories.. P3.

Van Loon, L.C.; C.M.J. Bakker; and P.A.H.M. Pieterse (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annual Review of Phytopathology. 36: 453-483.

Witing, D.A. (2000). Natural Phenolic Compounds 1900-2000: A Bird's Eye View of a Century's Chemistry. Natural Production Report. 18:583-606.

Zehnder, G.W.; C. Yao; J.F. Murphy; E.R. Sikora; and J.W. Klopper (2000). Inducttion of resistance in tomato against *Cucumber mosaic virus* by plant growth- promoting rhizobacteria. Printed in the Netherlands Biocontrol. 45:127-137.

Zehnder, G.W.; J.F. Murphy; J.S. Edward; and J.W. Kloepper (2001). Application of rhizobacteria for induced resistance. European Journal of Plant Pathology. 107: P 39-50.

Effect of Three Species of Rhizobacteria (PGPR) in of Stimulating Systemic Resistance Against *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) of Tomato Plants

Ramez M. Al Shami*(1) Imad D. Ismail(1) and Yaser Hammad(2)

(1). Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Latakia, Syria.
(2). Soil and Water Department, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Latakia, Syria.
(*Corresponding author: Eng. Ramez M. Al Shami. E-Mail: ramezalshami924@gemail.com).

Received: 30/06/2017 Accepted: 03/10/2017

Abstract

This experiment aimed to study the effect of three species of plant growth promoting rhizobacteria (*Frateuria aurantia, Bacillus megaterium and Azotobacter chroococcum*) by inoculated seeds or seedlings of tomato plants on suppressed the effect of *Cucumber mosaic virus* (CMV) in greenhouse in Tartus. Total phenols and photosynthesis pigments (chlorophyll A, B and carotenoids) were observed in fresh leaves of tomato plant after 30 Days of infection. Results showed, that treatment with single bacteria *Frateuria aurantia*was was significantly higher in total phenol compared with *Bacillus megateriumor*, *Azotobacter chroococcum*, compared with the control healthy or infected. However, the bacteria *Azotobacter chroococcum* gave a significant increase in photosynthesis pigments compared with *Bacillus megaterium* or *Frateuria aurantia*. On the other hand, the mixed treatment of ABF+CMV (seeds and seedlings) showed highest increase in total phenol (37.75 and 47.09 mg/100g) consequently, photosynthesis pigments (chlorophyll A 0.973 and 1.065 mg/g), (chlorophyll B 0.872 and 0.903mg/g) and (carotenoids 0.972 and 0.995 mg/g) respectively. The increase in total phenols and photosynthesis pigments leads to the ability ofrhizobacterto stimulate systemic resistance and reduce the effect of the virus on tomato plants.

Keywords: CMV, PGPR, Tomato, Total phenols, Photosynthesis pigments.