تأثير السلالة البكتيرية *Bacillus subtillis* FZB27 في تحفيز المقاومة الجهازية في نبات الفليفلة إزاء فيروس موزاييك الخيار (CMV) تحت ظروف الزراعة المحمية

مي معلا*[1] وأحمد أحمد[2] وعمر حمودي[3] وعماد دأود اسماعيل[1]

(1). قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.
(2). مركز البحوث الزراعية بطرطوس، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، دمشق، سورية.
(3) مركز البحوث الزراعية باللاذقية، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، دمشق، سورية.
(*للمراسلة: م. مي معلا. البريد الإلكتروني: maimoalla92@gmail.com).

تاريخ الاستلام: 2019/11/28 تاريخ القبول: 2019/12/31

الملخص

هدفت هذه الدراسة إلى تقييم كفاءة السلالة البكترية *Bacillus subtillis* FZB27 في تحفيز المقاومة الجهازية في نباتات الفليفلة ضد فيروس موزاييك الخيار في الزراعة المحمية باستخدام ثلاث طرائق من المعاملة (معاملة البذور، وري الشتول ومعاملة البذور + ري الشتول)، حيث نفذت التجربة في مركز البحوث الزراعية في طرطوس، وفق تصميم القطاعات العشوائية الكاملة. نقعت البذور 12 ساعة في المعلق البكتيري ذي التركيز 9×10^9 خلية مشكلة للمستعمرات(cfu)/ مل، كما تم ري الشتول بإضافة 20 مل من المعلق البكتيري السابق بعد أسبوع من التشتيل، وأجريت العدوى الميكانيكية بفيروس موزاييك الخيار بعد أسبوع من معاملة ري الشتول. أشارت النتائج إلى انخفاض نسبة الإصابة بشكل معنوي في النباتات المعاملة بالبكتيريا مقارنة بالشاهد المعدى حيث تراوحت ما بين (50.72– 57.16)% للنباتات المعاملة بالبكتريا مقارنة بالنسبة 93.33% للشاهد المعدى، وكان أعلى انخفاض في نسبة الإصابة في النباتات المعاملة بطريقة بذور+ري، دون وجود فروق معنوية بين طرائق المعاملات الثلاث. كما بينت النتائج انخفاض شدة الإصابة بشكل معنوي في النباتات المعاملة بالبكتيريا مقارنة بالشاهد المعدى حيث تراوحت ما بين (48.2–60.17)% للنباتات المعاملة بالبكتيريا مقارنة بالنسبة 83.66% للشاهد المعدى، وكان أعلى انخفاض في شدة الإصابة في طريقة معاملة البذور وري الشتول دون وجود فروق معنوية بين المعاملات البكتيرية. بينت نتائج تقدير نشاط أنزيم البيروكسيداز في نهاية التجربة بعد أربعة أشهر من الزراعة ارتفاع معنوي في نشاط هذا الأنزيم في النباتات المعداة والمعاملة بالبكتيريا بالطرائق الثلاث (4.4–6.4 نانومول) مقارنة بالشاهد المعدى (2.5 نانومول)، وكان أعلى نشاط أنزيمي في طريقة (بذور+ري) المعداة بالفيروس (6.4)، مع عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات البكتيرية المعداة بالفيروس. كما كان هناك ارتفاع معنوي لنشاط الأنزيم في النباتات المعاملة بالبكتيريا غير المعداة بالفيروس بالطرائق الثلاث (4.76–7.41) مقارنةً بالشاهد السليم (2.10 نانومول). وتفوقت معنوياً طريقة (بذور+ري) على باقي الطرائق، وكانت أعلى نسبة زيادة في نشاط أنزيم البيروكسيداز في النباتات المعاملة بالبكتريا بطريقة معاملة بذور وري التربة والمعداة (154.9) قياساً بالشاهد المعدى.

الكلمات المفتاحية: مقاومة جهازية مستحثة، فيروس موزاييك الخيار، *Bacillus subtillis* FZB27، أنزيم البيروكسيداز، نبات الفليفلة.

المقدمة:

يعد محصول الفليفلة من المحاصيل الأساسية في سورية ذا لقيمة غذائية عالية، حيث زرع في بلدان عديدة من العالم كنبات طبي أو نبات زينة بالإضافة لاستخدامها في التغذية، وتستعمل الثمار الحمراء كتوابل، وفي إنتاج الزيوت العطرية والصبغات الملونة، كما تجفف الثمار الحمراء وتطحن لتصبح مسحوقاً ناعماً يمكن إضافته للوجبات الغذائية لتحسين نكهتها، ويستخدم طبياً لعلاج أمراض المفاصل والجهاز العصبي (Govindarajan and Salzer, 1985).

وتعد الفليفلة من محاصيل الخضار الهامة المنتشرة في العالم، وهي ثالث أهم محاصيل العائلة الباذنجانية بعد كل من البندورة والبطاطا (حسن، 2001)، كما تطورت زراعة الفليفلة تطوراً كبيراً في بلدان الحوض المتوسط ومنها سورية. حيث بلغت المساحة المزروعة بالفليفلة 4603 هكتاراً بإنتاج قدره 52280 طناً (وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، 2017). وكغيره من محاصيل العائلة الباذنجانية يتعرض محصول الفليفلة للإصابة بعدد من الأمراض الفيروسية، ومن أهم هذه الفيروسات فيروس موزاييك الخيار (Laemmlen , 2004).

ينتمي فيروس موزاييك الخيار *Cucumber mosaic virus* (CMV) إلى الجنس *Cucumovirus*، فصيلة Bromoviridae، جسيمات الفيروس كروية متناظرة غير مغلفة، قطرها 29 نانومتر (Felga, 1971)، وللفيروس عدة سلالات تختلف فيما بينها من حيث العوائل وأعراض الإصابة وطرق الانتقال (Agrios, 2005). يعد فيروس موزاييك الخيار ذو مدى عوائلي واسع يصيب عدة محاصيل من بينها الخيار والفليفلة والقرعيات والبندورة (Chabbouh and Cherif, 1990). ويعد فيروس موزاييك الخيار Cucumber mosaic virus (CMV) واحداً من أهم أمراض الفليفلة الفيروسية (Zitter and Florini, 1984)، وبشكل عام تبلغ نسبة إصابة الفليفلة بالفيروس بين 20–30% وقد تصل إلى 50%، أما في أصناف الفليفلة الحساسة فقد وصلت إلى 100% (Sutic *et al.*, 1999)، محدثة خسائر اقتصادية تتراوح بين (60–100)% تبعاً للصنف والسلالة ووقت حدوث الإصابة (Sutic, 1999).

تظهر أعراض الإصابة بالفيروس على جميع أجزاء المجموع الخضري لنبات الفليفلة المصاب، وتختلف شدتها تبعاً لحساسية أصناف الفليفلة، وشراسة سلالات الفيروس، وعمر النبات عند الإصابة بالفيروس، والظروف البيئية المحيطة (Zitter and Florini, 1984)، وقد تتشوه الأوراق والأزهار والثمار المتشكلة على النباتات المصابة (Laemmlen, 2004) وتسبب بعض سلالات الفيروس استطالة غير طبيعية لكأس الزهرة، كما لوحظ عند إصابة بعض الأصناف الحساسة بالفيروس تماوتا جزئياً على شكل خطوط بنية على طول الساق والفروع، وقد تظهر أعراض موزاييك (معتدل وخفيف) على نبات الفليفلة المتاخم للنبات المصاب Zitter and Florini, (1984).

استخدمت أساليب مكافحة مختلفة لحماية نباتات الفليفلة من الأمراض المختلفة، متضمنة طرق المكافحة الكيميائية لنواقل الفيروس، طرق مكافحة زراعية، إضافة لتطبيق عوامل المكافحة الحيوية (Lee *et al.*, 2005; chung *et al.*, 2006). أكد Ryu *et al.*, (2007) أن تحفيز المقاومة في النبات باستخدام البكتريا المحسنة للنمو ليس له أي تأثير سلبي على النمو على خلاف المحرضات الكيميائية التي لا تساهم في زيادة نمو النبات، لعدم توفيرها للمواد الغذائية والأملاح المعدنية اللازمة لنمو النبات بالإضافة لارتفاع تكاليفها. درس العديد من الباحثين عوامل المكافحة الحيوية باستخدام البكتريا المحسنة لنمو النبات (Promoting Growth Plant

(Rhizobacteria (PGPR)) مع مسببات أمراض مختلفة على العديد من المحاصيل مثل البندورة والخيار والفليفلة والقمح وغيرها... (Mathre and Johnston, 1995; Wei *et al*., 1996; Raupach and Kloepper., 2000; Jetiyanon *et al*., 2002; Ryo *et al*., 2006).

وهذه البكتريا عبارة عن كائنات حية دقيقة متواجدة في منطقة رايزوسفير النبات، تعمل على تحفيز كمي ونوعي لنمو النبات وتسهل امتصاص النبات للعناصر الغذائية الموجودة في التربة (Abdel ghany *et al*., 2013; Singh, 2013; Saharan and Nehra, 2011; Bouizagarne, 2013)، وهي بكتريا حرة المعيشة أو مرتبطة بالجذور، والتي تقلل من شدة أمراض النبات كما تعمل على زيادة نمو النبات (Park *et al*., 1988; Arora *et al*., 2001;Ryo *et al*., 2006).

تعمل البكتريا على تحسين نمو النبات بآليات مختلفة مباشرة وغير مباشرة حيث تؤثر ال PGPR بشكل مباشر على نمو النبات عن طريق إنتاج الهرمونات النباتية ومنشطات نباتية أخرى بالإضافة إلى تحسين امتصاص العناصر الغذائية الأساسية (Lee *et al*., 2005; Hameeda *et al*., 2006). وبشكل غير مباشر عن طريق كبح مسببات الأمراض النباتية إلى جانب الكبح المباشر للمسببات المرضية عن طريق إنتاج المضادات الحيوية من قبل PGPR.

حيث تثير هذه البكتريا دفاعات ذاتية في النبات والتي يشار إليها كمقاومة جهازية مستحثة (Induced Systematic Resistance (ISR)) ضد مجموعة واسعة من مسببات الأمراض تتضمن الفيروسات، الفطريات، النيماتودا، الحشرات (Ramamoorthy *et al*., 2002; Jetiyanon and Kloepper, 2002; Murphy *et al*., 2003; Ryo *et al*., 2003b).

وجد Chittoor *et al*., (1999) و Ebrahim *et al*., (2011) أن زيادة الأنزيمات النباتية ومنها أنزيم البيروكسيداز يمكن أن تترافق مباشرة بالقدرة المتزايدة على حماية الأنسجة جهازياً باللغننة عند مهاجمة النباتات بالممرضات النباتية. كما أنها تزيد من الاستجابة الدفاعية مؤدية إلى مقاومة جهازية قبل إدخال المسببات المرضية (Jetiyanon and Kloepper, 2002; Ryo *et al*., 2003b).

يوجد أجناس متنوعة من PGPR تتضمن:

pseudomonas، *Azospirillum*، *Azobacter*، *Bacilllus*، *Enterobacter*، *Klebsiella*، *Arthrobacter*، *Serratia* و *Burkholderia* (Sahran and Nehra, 2011).

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم دور السلالة البكتيرية *Bacillus subtillis* FZB27 في تأخير تكشف أعراض الإصابة بفيروس موزاييك الخيار وخفض نسبة الإصابة والشدة الإمراضية ودراسة نشاط أنزيم البيروكسيداز على نباتات الفليفلة.

مواد البحث وطرائقه:

موقع تنفيذ البحث:

نفذ البحث في مركز البحوث العلمية الزراعية في طرطوس في منطقة عمريت على الساحل السوري ضمن بيت زجاجي في تجارب نصف حقلية ضمن أصص بلاستيكية سعة 2 كغ.

المادة النباتية:

تم استخدام هجين الفليفلة روبر (Robur F1) مصدره هولندا نسبة نقاوته 98%. هذا الهجين من أصناف الفليفلة الحلوة المعروف بإنتاجيته العالية وقيمته التسويقية العالية.

العزلة الفيروسية:

تم الحصول على عزلة محلية لفيروس موزاييك الخيار معرفة مسبقاً من قبل ICARDA، ومحفوظة في مخبر الأمراض الفيروسية في كلية الزراعة في جامعة تشرين. حفظت العزلة الفيروسية على نباتات التبغ، ومن ثم نقلت إلى عدد من نباتات البندورة والفليفلة وذلك لتأمين حاجة التجربة من اللقاح الفيروسي، وتم الحفاظ عليها ضمن تغطية شبكية بعيداً عن الحشرات.

السلالة البكتيرية *Bacillus subtillis* FZB27:

استخدمت السلالة البكتيرية *Bacillus subtilis FZB27* المحتفظ بها في مخبر الأمراض البكتيرية في مركز البحوث العلمية الزراعية في اللاذقية في المجمدة على درجة حرارة (−80) °C ضمن غليسرين 15% .

حضرت البيئة السائلة Tryptic soy broth (TSB) بإضافة 30غ بودرة TSB إلى 1 ليتر ماء معقم وخلطت بشكل جيد في جو معقم، ومن ثم عقمت بالأوتوكلاف لمدة 20 دقيقة على درجة حرارة 121 °C. وحضرت البيئة الصلبة Tryptic soy agar (TSA) بإضافة 20غ بودرة بيئة TSA إلى 1 ليتر ماء معقم وخلطت بشكل جيد في جو معقم، ثم عقمت بالأوتوكلاف لمدة 20 دقيقة على درجة حرارة 121 °C، ثم سكبت في أطباق بتري وتركت لتبرد في درجة حرارة الغرفة. نُشطت السلالة البكتيرية *Bacillus subtillis* FZB27 المستخدمة في الدراسة على بيئة صلبة أغار تريبتون الصويا (TSA) Tryptic soy agar وحضنت على حرارة 28 °C لمدة 24 ساعة. لقحت بها بيئة سائلة Tryptic soy broth (TSB) معقمة الأوتوكلاف (حضرت بإضافة 1.5 غ بودرة بيئة TSB إلى 50 مل ماء معقم ورجت بشكل جيد ثم وضع كل 20 مل منها في دورق سعة 100 مل. حضنت البكتيريا على حرارة المخبر (27−30 °C) ضمن البيئة السائلة السابقة على هزاز ديجيتال 180 دورة/دقيقة لمدة 24 ساعة. أخذ 2 مل من المستنبت السابق ولقح بها 200 مل من مستنبت سائل من TSB بالشروط السابقة أعلاه. ثم عُرضت لطرد مركزي 4000 دورة/دقيقة وتم استبعاد الجزء الطافي وخلطت البذور مع الراسب البكتيري بمعدل 30 بذرة في كل Eppendorf ولضمان التصاق البكتيريا على البذور أخضعت لهزاز ميكانيكي على سرعة 180 دورة/دقيقة لمدة 4 ساعات عند درجة حرارة 25− 30 °C(Hammoudii, 2007).

حضرت عدة تخفيفات من المزرعة البكتيرية السائلة وزرع 10 ميكروليتر من كل تخفيف على مستنبت غذائي (TSA) الصلب في أطباق بتري قطرها 9 سم، ثم حضنت عند درجة حرارة 28±2 س° مدة 48 ساعة، وتم حساب كثافة البكتريا(Colony forming units(CFU) وهو عدد المستعمرات المتشكلة مضروبا بمقلوب التخفيف مع التحويل من ميكروليتر إلى مل وقد بلغ 9×10^{9} في المحلول الأم. ولحساب CFU في البذرة تم سحق 10 بذور من كل من البذور المعاملة بالسلالة البكتيرية في جفنة بورسلان مع 1 مل من محلول NaCl 0.085%، ومن ثم زرعت على بيئة صلبة، وقدر تركيز البكتيريا في هذا المحلول من خلال عد المستعمرات البكتيرية عند التخفيف الممكن عد المستعمرات عنده وضربه بمقلوب التخفيف والتحويل من ميكرولتر إلى مل، والتقسيم على 10 لحساب التركيز في البذرة الواحدة وقد بلغ 10^{6} في البذرة الواحدة (Hammoudii, 2007).

زراعة البذور والشتول:

زرعت البذور المعاملة والبذور غير المعاملة كلا على حدة ضمن صواني فلينية ووضعت ضمن البيت الزجاجي وقدمت لها عمليات الخدمة الزراعية اللازمة لحين التشتيل في الأصص، نقلت النباتات بعد 30 يوماً من زراعة البذور إلى الأصص البلاستيكية التي تحوي الخلطة الترابية المعقمة شمسياً لمدة شهرين مع التورب المعقم بنسبة (2تربة معقمة:1تورب).

تحضير اللقاح الفيروسي وإجراء العدوى الميكانيكية:

تم سحق أوراق البندورة والفليفلة المصابة بفيروس موزاييك الخيار في جفنة بورسلان بعد إضافة الماء المقطر بنسبة (5:1). أجريت العدوى الميكانيكية بعد اسبوع من معاملة ري الشتول بالبكتريا، وتمت العدوى من خلال نثر مادة كربيد السيليكون (مادة مخرشة) على الأوراق العلوية ومن ثم مسح الأوراق بقطعة شاش مبللة باللقاح الفيروسي وباتجاه واحد. ومن ثم غسلت الأوراق بالماء للتخلص من الكمية الزائدة من اللقاح الفيروسي وكربيد السيليكون.

معاملات التجربة:

– شاهد سليم (غير معدى بالفيروس/غير معامل بالبكتريا) – نباتات معداة بالفيروس فقط– نباتات معاملة بالبكتريا بطريقة معاملة البذور– نباتات معاملة بالبكتريا بطريقة ري الشتول– نباتات معاملة بالبكتريا بطريقة (معاملة بذور+ري الشتول)– نباتات معاملة بالبكتريا بطريقة معاملة البذور معداة بالفيروس– نباتات معاملة بالبكتريا بطريقة ري الشتول معداة بالفيروس– نباتات معاملة بالبكتريا بطريقة (معاملة بذور+ري الشتول) معداة بالفيروس.

بالنسبة لمعاملات بذور+ ري تم إضافة 20 مل من المعلق البكتيري تركيز البكتريا فيه 10^9 إلى كل نبات وذلك بعد أسبوع من زراعة الشتول في الأصص البلاستيكية.

تصميم التجربة والتحليل الإحصائي:

نفذت التجربة خلال خريف وشتاء 2018–2019 ، صممت التجربة وفق تصميم القطاعات العشوائية الكاملة متضمنة 8 معاملات في كل معاملة ثلاث مكررات وكل مكرر يحوي 5 نباتات. عدد النباتات الكلي 8×3×5= 120 نبات. حللت نتائج التجارب إحصائياً باستخدام البرنامج الإحصائي CO–STAT 6.4، اختبرت الفروق بين المتوسطات حسب اختبار اقل فرق معنوي (L.S.D.) Least Significant Difference Test عند مستوى احتمال 0.05، حيث ميزت المتوسطات المختلفة فيما بينها معنوياً بحروف هجائية مختلفة.

استخلاص أنزيم البيروكسيداز وتقدير نشاطه:

استخلص أنزيم البيروكسيداز وفق طريقة Hammer Schmidt, (1999) مع بعض التعديلات من قبل خريبة وآخرون (2015). أخذ 1غ من أوراق كل معاملة على حدة، في نهاية التجربة (بعد 4 أشهر من الزراعة)، وأضيف لها 3 مل محلول فوسفاتي منظم Phosphate buffer PH= 6.5 تركيزه 0.1 مولار عند درجة حرارة 4 °C، ووضعت ضمن جفنة بورسلان وطحنت بالهاون ثم وضع الناتج ضمن أنبوب سعته 1.5 مل ثم ثفلت لمدة 10 دقائق على سرعة 18000 دورة/دقيقة على حرارة 4– °C، أخذت الرشاحة الناتجة عن التثفيل التي تحتوي مكونات العصير الخلوي بما فيها أنزيم البيروكسيداز، وتشكل الرشاحة الناتجة ما يسمى بمستحضر الأنزيم، قدر نشاط أنزيم البيروكسيداز باستخدام جهاز المطياف الضوئيspectrophotometer (V632). احتوى مزيج التفاعل حسب Shahwan, (2010) على 3 مل محلول فوسفات البوتاسيوم تركيز 0.1 مولار، pH=6.5 و200 ميكروليتر من

مستخلص العينة و6.2 ميكروليتر Guaiacol عيارية 124.14 غ/مول، وضعت الأنابيب في حمام مائي على حرارة 28–30 °C لمدة 5 دقائق، وقبل وضع العينات بجهاز المطياف الضوئي مباشرة تم إضافة 12 ميكروليتر من الماء الأوكسجيني H_2O_2 عيارية 34.01 غ/مول إلى كل أنبوب من أنابيب الاختبار الحاوية على المستخلص الأنزيمي ثم وضع 3 مل من مزيج المستحضر الأنزيمي السابق في خلية المطياف الضوئي Spectrophotometer، أخذت قراءة الجهاز عند طول موجة 430 نانومتر مرة كل 30 ثانية لمدة 3–5 دقائق.

حسبت نسب الزيادة في نشاط أنزيم البيروكسيداز للمعاملات المدروسة وفق معامل التصحيح:

معامل التصحيح= قيمة المعيار للمعاملة ×100/قيمة المعيار للشاهد المصحح.

يتمثل نشاط أنزيم البيروكسيداز بعدد ميكرومولات الماء الأوكسجيني التي تتفكك بواسطة 100 ملغ من النسيج النباتي الداخل في تشكيل المستخلص الأنزيمي في الدقيقة الواحدة عند حرارة 25 °C.

حسب النشاط وفق معادلة الشركة المصنعة للمادة القياسية للأنزيم (Technical bulletin):

Peroxidase activity = B×Sample Dilution Factor/ Reaction time ×V

B: كمية الماء الأوكسجيني H_2O_2 المنخفضة بين الزمن الأولي و الزمن النهائي مقدرة بـ نانومول (nmol).

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

Reaction Time: $T_{final} - T_{initial}$ مقدرا بالدقيقة.

المعايير المستخدمة في تقييم المقاومة الجهازية المستحثة بفعل بكتريا الجذور المحسنة لنمو النبات (PGPR):

- حسبت نسبة وشدة الإصابة بفيروس موزاييك الخيار بعد 30 يوم من العدوى بالفيروس وفق المعادلات:

نسبة الإصابة = عدد النباتات المصابة × 100

العدد الكلي للنباتات

شدة الإصابة% = مجموع (درجة الإصابة × عدد النباتات في كل درجة) × 100

العدد الكلي للنباتات × أعلى درجة إصابة

قدرت درجة الإصابة وفق سلم Murphy *et al.*, (2003) حيث:

0: بدون أعراض. 2: موزاييك خفيف على الأوراق. 4: موزاييك شديد على الأوراق. 6: موزاييك وتشوه أوراق. 8: موزاييك شديد وتشوه شديد على الأوراق. 10: موزاييك شديد وتشوه أوراق مع تقزم.

حسبت نسب الانخفاض في نسبة وشدة الإصابة ونسب الزيادة في نشاط أنزيم البيروكسيداز للمعاملات المدروسة وفق معامل التصحيح:

معامل التصحيح= قيمة المعيار للمعاملة ×100/قيمة المعيار للشاهد المصحح.

النتائج والمناقشة:

أشارت النتائج أن موعد ظهور أعراض الإصابة (الموزاييك وتشوه الأوراق والتقزم) قد تأخر في النباتات المعاملة بالبكتريا مقارنة بالنباتات غير المعاملة حيث تكشفت الأعراض على الأوراق الحديثة غير المعداة بعد 13 يوماً من العدوى في النباتات المعاملة بالبكتريا بطريقة معاملة بذور وري التربة، وبعد 10–11 في النباتات المعاملة بالبذور او الري على التوالي في حين كان ظهور الأعراض سريعاً في نباتات الشاهد غير المعاملة بالبكتيريا (7 أيام بعد العدوى)، وتفوقت طريقة معاملة بذور+ ري التربة على باقي الطرائق في تأخير ظهور أعراض الإصابة وبالتالي إعطاء النبات فرصة للنمو بشكل أفضل (الجدول 1).

كانت نسبة الإصابة بعد 30 يوماً من العدوى في النباتات المعاملة بالبكتريا(بذور+ري) 40%،وفي معاملة البذور ومعاملة ري 46.66 وكانت أقل منها في الشاهد المعدى (93.33%) مع عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات باستثناء الشاهد المعدى.

كما كانت شدة الإصابة بعد 30 يوماً من العدوى في النباتات المعاملة بالبكتريا (بذور+ري) 33.33%، وفي معاملة البذور 43.33 %وفي معاملة ري الشتول 40% وكانت أقل منها في الشاهد المعدى (83.66%) مع عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات باستثناء الشاهد المعدى (الجدول 1).

الجدول 1. يوضح تأثير السلالة البكتيرية على موعد تكشف الأعراض نسبة وشدة الإصابة بفيروس موزاييك الخيار بعد 30 يوم من العدوى

المعاملة	موعد تكشف الأعراض بعد الإعداء بالأيام	نسبة الإصابة بعد 30 يوم من العدوى%	شدة الإصابة بعد 30 يوم من العدوى %
CMV	7	93.33a	83.66a
B27(S+Ir)+ CMV	13	40b	33.33b
B27(Ir))+ CMV	11	46.66b	40b
B27(S)+CMV	10	46.66 b	43.33b
LSD5%	-	**15.37**	**12.34**

القيم التي يتبعها حروف متشابهة في نفس العمود لا يوجد بينها فرق معنوي عند مستوى احتمال 5%.

CMV= Cucumber mosaic virus, B27= *Bacillus subtillis* FZB27,S: seed treatment, ir: irrigation treatment, s+ir: Seed and irrigation treatment.

معدل الانخفاض في نسبة وشدة الإصابة قياسا بالشاهد المعدى:

أشارت النتائج إلى أن معدل الانخفاض في نسبة الإصابة للنباتات المعاملة بالبكتيريا بطريقة معاملة البذور وطريقة ري الشتول كلا على حدا وصلت إلى (50.72) %، وفي طريقة (معاملة البذور+ ري الشتول) كانت (57.16)%.

كما بينت النتائج أن معدل الانخفاض في شدة الإصابة في النباتات المعاملة بالبكتيريا بطريقة معاملة البذور وطريقة ري الشتول وصلت إلى (48.2–52.19)% على التوالي وفي طريقة (معاملة البذور+ ري الشتول) كانت (60.17)% (الجدول 2).

توافقت النتائج مع ما توصلت إليه قواس(2018) عند استخدامها للسلالات البكتيرية *Pseudomonas chlororaphis* MA342 و*Serratia .plymuthica* HRO–C48 و*Bacillus subtillis* B2g و*B. subtillis* FZB27 حيث خفضت المعاملة بالسلالات البكتيرية الأربعة من معايير تحفيز المقاومة سواء بعد 14 أو 30 يوماً، وكانت نسب الخفض بطريقة (بذور+ ري) أعلى منها بطريقة (ري) لكافة السلالات البكتيرية المدروسة، وكانت أعلى نسبة تخفيض للإصابة مع السلالة B27 (57.14%) و(60.36%) بعد 14 و30 يوماً من العدوى على التوالي.

وتوافقت هذه النتائج مع ما توصل إليه Zehnder *et al.*, (2001) إلى أن معاملة بذور البندورة بالسلالات البكتيرية *Bacillus pumilus* strain SE34, *Kluyvera cryocrescens* strain*IN114, Bacillus amyloliquefaciens* strain IN937a,

and *Bacillus subtilus* strain IN937b. قد خفض من نسبة الإصابة بفيروس موزاييك الخيار مقارنة بالشاهد المعدى. ومعاملة بذور البندورة بالسلالتين البكتيريتين *Pseuodomonas flourescence* 89B27 و*Serratia marcescens* خفض من شدة الإصابة بفيروس موزاييك الخيار في نباتات البندورة المعاملة، ومعاملة بذور البندورة بالسلالتين البكتيريتين بالسلالتين IN937a *B. cryocrescens* و *B. subtilus* IN937b قد خفف من أعراض الإصابة بفيروس تبرقش البندورة ToMoV في النباتات المعاملة.

الجدول 2. معدل الانخفاض في نسبة وشدة الإصابة تحت تأثير العدوى بالفيروس والمعاملة بالبكتريا بعد 30 يوم من إحداث العدوى بالفيروس.

المعاملة	نسبة الإصابة% بعد 30 يوم	معامل التصحيح	معدل الانخفاض قياساً باشاهد المعدى %	شدة الإصابة % بعد 30 يوم	معامل التصحيح	معدل الانخفاض قياساً باشاهد المعدى %
CMV	93.33a	100	-	83.66a	100	-
B27(S)+ CMV	46.66b	49.99	50.72	43.33b	51.8	48.2
B27(Ir)+ CMV	46.66b	49.99	50.72	40b	47.81	52.19
B27(S+Ir) + CMV	40b	42.85	57.15	33.33b	39.83	60.17
LSD5%	**15.37**	-	-	**12.34**	-	-

القيم التي يتبعها حروف متشابهة في نفس العمود لا يوجد بينها فرق معنوي عند مستوى احتمال 5%.

CMV= Cucumber mosaic virus, B27= *Bacillus subtillis* FZB27,S: seed treatment,
ir: irrigation treatment, s+ir: Seed and irrigation treatment.

نشاط أنزيم البيروكسيداز:

بينت نتائج تقدير نشاط أنزيم البيروكسيداز في نهاية التجربة ارتفاعاً معنوياً في نشاط هذا الأنزيم في النباتات المعداة بالفيروس والمعاملة بالبكتيريا بالطرائق الثلاث (4.4–5.9–6.4 نانومول) مقارنة بالشاهد المعدى بالفيروس(2.5نانومول)، كان أعلى نشاط أنزيمي في طريقة (بذور+ري) المعداة بالفيروس(6.4 نانومول). ووجد ارتفاعاً معنوياً لنشاط الأنزيم في النباتات المعاملة بالبكتيريا غير المعداة بالطرائق الثلاث (4.76–7.41) مقارنة بالشاهد السليم (2.10 نانومول). وتفوقت معنويا طريقة (بذور+ري) على باقي الطرائق. وكانت أعلى نسبة زيادة في نشاط أنزيم البيروكسيداز في النباتات المعاملة بالبكتريا بطريقة معاملة بذور وري التربة والملقحة بالفيروس 155 قياساً بالشاهد المعدى حسب الجدول (3).

توافقت النتائج مع ما أشارت إليه قواس (2018) حيث أدت المعاملة بالبكتريا المحسنة لنمو النبات (PGPR) إلى زيادة في نشاط أنزيم البيروكسيداز، وكانت أعلى نسبة زيادة في نشاط أنزيم البيروكسيداز في النباتات المعاملة بالبكتريا فقط 21.7% مع السلالة *Bacillus subtillis* FZB27 قياساً بالشاهد السليم، وأعلى نسبة زيادة في نشاط أنزيم البيروكسيداز في النباتات المعداة والمعاملة بالبكتريا 28.26% مع السلالة *Bacillus subtillis* FZB27 قياساً بالشاهد المعدى. حيث أن أنزيمي البيروكسيداز والفينيل ألانين أمونيلياز يلعبان دوراً في استقلاب المركبات الفينولية التي تؤدي إلى انتاج مركبات مضادة للفيروس حسب ما أشار Young وآخرون (1995).

كما توافقت النتائج مع ما أشار إليه الشامي (2017) إلى أن معاملة بذور البندورة و ري جذورها بسلالة مفردة من البكتريا *Frateuria aurantia* يسبب انخفاضاً معنوياً في شدة الإصابة وارتفاع في مستوى حمض السالسيليك الحر في الأوراق وفي نشاط أنزيم البيروكسيداز مقارنة بالسلالة *Bacillus megaterium* أو *Azotobacter chroococcumin*، ومزج الأنواع البكتيرية الثلاثة أعطى أعلى انخفاض في شدة المرض وأعلى مستوى لحمض السالسيلك الحر ولنشاط أنزيم البيروكسيداز في كل من نباتات البندورة

السليمة والنباتات المعداة بفيروس موزاييك الخيار. إن هذه الزيادة في محتوى السالسيلك الحر ونشاط أنزيم البيروكسيداز أثبت قدرة هذه البكتريا على تحفيز آليات المقاومة الجهازية في نباتات البندورة وتخفيض تأثير الاصابة بفيروس موزاييك الخيار على نباتات البندورة.

الجدول 3. تأثير السلالة البكتيرية *Bacillus subtillis* FZB27 في نشاط أنزيم البيروكسيداز في نباتات الفليفلة الملقحة بفيروس موزاييك الخيار في نهاية التجربة.

المعاملة	نشاط أنزيم البيروكسيداز/ n mol	معدل الزيادة عن الشاهد السليم %	معدل الزيادة عن الشاهد المعدى %
سليم	2.10d	-	-
CMV	2.51cd	-	-
B27(s+ir)	7.41a	252.85	-
B27(ir+s)+CMV	6.4ab	-	154.9
B27(ir)	6.28ab	199	-
B27(ir)+CMV	5.95ab	-	137
B27(s)	4.76b	126.66	-
B27(s)+CMV	4.40bc	-	75.29
LSD5%	**2.20**	-	-

القيم التي يتبعها حروف متشابهة في نفس العمود لا يوجد بينها فرق معنوي عند مستوى احتمال 5%.

CMV= Cucumber mosaic virus, B27= *Bacillus subtillis* FZB27, S: seed treatment,
ir: irrigation treatment, s+ir: Seed and irrigation treatment.

الاستنتاجات:

- إن تطبيق السلالة البكتيرية *Bacillus subtillis* FZB27 على نباتات الفليفلة أدى إلى تحفيز مقاومة جهازية في النبات إزاء فيروس موزاييك الخيار من خلال تخفيض نسبة وشدة الإصابة.
- كما أدت المعاملة بالبكتريا إلى زيادة نشاط أنزيم البيروكسيداز ولوحظ أنه كلما ارتفع نشاط الأنزيم كلما انخفضت الشدة الإمراضية.
- تفوقت طريقة (معاملة البذور+ ري الشتول) على باقي طرائق التجربة.

المراجع:

الشامي، رامز محمد وياسر علي حماد وعماد داؤد اسماعيل (2017). تقييم فعالية التلقيح بالبكتريا المحفزة لنمو النبات في الحد من تأثير فيروس موزاييك الخيار في بعض معايير نمو نباتات البندورة. مجلة جامعة البعث. 39 (2).

وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي (2017). مديرية الإحصاء والتخطيط، وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، دمشق، الجمهورية العربية السورية.

حسن، أحمد عبد المنعم (2001) . إنتاج الفلفل والباذنجان، الدار العربية للنشر والتوزيع .360.

خريبة محمد عماد وابتسام غزال ومحمد فواز العظمة (2015) . تأثير الميكوريزا الداخلية في مكافحة مرض سقوط بادرات البندورة من خلال تنشيط إفراز بعض الهرمونات والأنزيمات الدفاعية. أطروحة دكتوراه، جامعة تشرين، كلية الزراعة، قسم وقاية النبات تشرين، سورية.

قواس، حنان(2018). دراسة تأثير بعض السلالات من بكتريا الجذور المحسنة لنمو النبات PGPR في تحفيز المقاومة الجهازية ضد فيروس موزاييك الخيار على نبات البندورة في الزراعة المحمية. أطروحة دكتوراه، 103، جامعة تشرين، كلية الزراعة، قسم وقاية النبات، سورية.

Abdel Ghany, T.M.; M.M. Alawlaqi; and M.A. Al Abboud (2013). Role of biofertilizers in agriculture: A Brief Review. Review Article. Mycopath. 11 (2): p 95-101.

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

Arora, N.K.; S.C. Kang; and D.K. Maheshwari (2001). Isolation of siderophore-producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. Curr. Sci,. 81: 673–677.

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

Chabbouh, N.; and C. Cherif (1990). Cucumber mosaic virus in artichoke. FAO plant protection. Bulletin. 38: 52-53.

Chittoor, J.M.; J.E. Leach; and F.F. White (1999). Induction of peroxidase during defense against pathogens. In: Pathogenesis: Related proteins in plants. S.K. Datta, S. Muthukrishnan (eds.). CRC Press, Boca Raton, FL. 291 pp.

Chung, E.; C.M. Ryu; S.K. Oh; R.N Kim; J.M. Park; H.S. Cho; S. Lee; J.S. Moon; S.H. Park; and D.I. Choi (2006). Suppression of pepper SGT1 and SKP1 causes severe retardation of plant growth and compromises basal resistance. Physiol. Plant. 126: 605–617.

Ebrahim, S.; K. Usha; and B. Singh (2011). Pathogenesis related (PR) proteins in plant defense mechanism. Science against microbial pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances. pp12.

Shahwan, E.M.Sh. (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). Agricultural Botany Department.

Fegla, G.I. (1971). Some virus diseases affecting cucurbits in Ukrain. Ph.D thesis. Institute of Microbiology and Virology. Ukrainian academy of science. Keiv. USSR (in Russian).

Govindarajan, V.S.; and U.J. Salzer (1985). Capsicum-production, technology, chemistry, and quality part 1: History, botany, cultivation, and primary processing. Food Science and Nutrition. 22(2): 109-176.

Hameeda, B.; G. Harini; O.P. Rupela; S.P. Wani; and G. Reddy (2006). Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. Microbiol. Res., 163: 234–242.

Hammerschmidt, R. (1999). Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens?. Physiol. Mol. Plant Pathol., 55:77-85.

Hammoudii, O. (2007). Einfluss milkrobieller Antagonisten auf den Befall mit Phoma lingam und Vereticillium dahlia var. longisporum an Raps (*Brassica napus* L. var. napus). Dissertation Univ.Kiel.123 pp.

Jetiyanon, K.; and J.W. Kloepper (2002). Mixtures of plant growth promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. Biological Control. 24: 285-291.

Laemmlen, F. (2004). Viruses in peppers. University of California, Davis, 604pp.

Lee, H.J.; K.H. Park; J.H. Shim; R.D. Park; Y.W. Kim; J.Y. Cho; H. Hwangbo; Y.C. Kim; G.S. Cha; H.B. Krishnan; and K.Y. Kim (2005). Quantitative changes of plant defense enzymes in biocontrol of pepper (*Capsicium annuum* L.) late blight by antagonistic *Bacillus subtilis* HJ927. J. Microbiol. Biotechnol., 15:1073-1079.

Mathre, D.E.; and R.H. Johnston (1995). Combined biological and chemical seed treatments for control of two seedling diseases of *Sh2* sweet corn. Plant Dis., 79:1145–1148.

Abdel Ghany, T.M.; M.M. Alawlaqi; and M.A. Al Abboud (2013). Role of bio fertilizers in agriculture: A brief review. Review Article. Mycopath., 11(2): 95-101.

Murphy, J.F.; M.S. Reddy; C.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, C.S.; T.C. Paulitz; and R. Baker (1988). Bio control of *Fusarium* wilt of cucumber resulting from interactions between *Pseudomonas putida* and nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. Phytopathology. 78: 190–194.

Ramamoorthy .V.; T. Raguchander; and R. Samiyappan (2002). Enhancing resistance of tomato and hot pepper to *Pythium* diseases by seed treatment with fluorescent pseudomonads. European Journal of Plant Pathology. 108: 429–441,2002.

Raupach, G.S.; and J.W. Kloepper (2000). Bio control of cucumber diseases in the field by plant growth-promoting *rhizobacteria* with and without methyl bromide fumigation. Plant Dis., 84:1073–1075.

Ryu C.M.; B.R. Kang; S.H. Han; S.M. Cho; J.W. Kloepper; A.J. Anderson; and Y.C. Kim (2007). Tobacco cultivars vary in induction of systemic resistance against cucumber mosaic virus and growth promotion by *Pseudomonas chlororaphis* O6 and its gacS mutant. European Journal of Plant Pathology. 119(4): 383-390.

Ryu, C.M.; C.H. Hu; M.S. Reddy; and J.W. Kloepper (2003a). Different signaling pathways of induced resistance by *rhizobacteria* in Arabidopsis thaliana against two pathovars of *Pseudomonas syringae*. New Phytol., 160: 413-420.

Ryu, C.M.; J.W. Kim; O.H. Choi; S.H. Ki; and C.S. Park (2006). Improvement of biological control capacity of *Paenibacillus polymyxa* E681 by seed pelleting on sesame. Biol. Control. 39:282–289.

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

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

Sutic, D.D.; R.E. Ford; M.T. Tosic (1999). Handbook of plant virus diseases. CRC press, 126_134.

Wei, G.; J.W. Kloeppe; and S. Tuzun (1996). Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting *rhizobacteria* under field conditions.

Young S.A.; A. Guo; J.A. Guikema; F. White; and L.E. Leach (1995). Rice cationic peroxidase accumulation in xylem vessels during incompatible interaction with *Xanthomonas oryzae* pv. Oryzae. Plant Physiol., 107:1333-1341.

Zitter, T.A., and D. Floroni (1984). Virus diseases of pepper. Cornell University. Vegetable MD on line., 3 pages.

The Effect of Bacterial Strain *Bacillus subtillis* FZB27 FZB27 to Induce Systemic Resistance Against *Cucumber mosaic virus* (CMV) in Pepper Plants Under Green House Conditions

Mai Moaalla[*(1)] Ahmad Ahmad[(2)] Omar Hammoudi[(3)] and Imad Daoud Ismaeil[(3)]

(1). Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Latakia, Syria.
(2). Agriculture Research Center in Tartous, General Commission for Scientific Agricultural Research GCSAR, Damascus, Syria.
(3). Agriculture Research Center in Latakia, General Commission for Scientific Agricultural Research GCSAR, Damascus, Syria.
(*Corresponding author: Eng. Mai Moaalla. E-Mail: maimoalla92@gmail.com).

Received: 28/11/2019 Accepted: 31/12/2019

Abstract

This study was conducted to evaluate the effect of bacterial strain *Bacillus subtillis* FZB27 to induce systemic resistance against *cucumber mosaic virus* (CMV) in pepper plants using three kinds of applications (seeds, irrigation and seeds + irrigation). The study was carried out at the Scientific Agriculture Research Center in Tartus using randomized complete blocks design. Pepper seeds were submerged for 12 hours in suspension of *Bacillus subtillis* FZB27 with a concentration of 9×10^9 colony/ml formation unit. After one week after planting the seedlings were irrigated with 20 ml which was the same concentration suspension of *Bacillus subtillis* FZB27, then one week after transplanting, the plants were inoculated with C MV. The results showed that, there was a significant reducing in disease incidence of infected treated plants (50.72-57.16)% compared to the infected control (93.33)%, and the highest reduction was in (seeds+irrigation) application. There was also a significant reducing in disease severity of infected treated plants (48.2-60.17)% compared to the infected control (83.66)%, and the highest reduction was in (seeds+irrigation) application, with no significant differences among the treatment methods. The treatment with Bactria improved peroxidase enzyme activity, and consequently, there was significant increase in infected treated plants which ranged between (4.4-6.4) nmol compared to the infected control (2.5) nmol. The higher activity was with (seeds+irrigation) application. There was also significant increase in uninfected treated plants which ranged between (4.76-7.41) nmol compared to the healthy control (2.10) nmol. The higher activity was with (seeds+irrigation) application.

Key words: Induce systemic resistance, Cucumber mosaic virus, *Bacillus subtillis* FZB27, Pepper plants.