مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية
المجلد 41 العدد 1 (2025): 139 - 150

Damascus University Journal of Agricultural Sciences
Vo 41 No.1 (2025): 139 - 150

القدرة التضادية لعزلات محلية من بكتيريا المحيط الجذري تجاه الفطر Fusarium solani المسبب لذبول البندورة في الزجاج

ريم عبود الخليف [1*]، محمد فواز العظمه [2]، محمود أبو غرة [3]

[1] طالبة ماجستير، جامعة دمشق، كلية الزراعة ، قسم علوم وقاية النبات، مهندسة زراعية، مخبر التنوع الحيوي، الهيئة العامة للتقانة الحيوية، البريد الالكتروني: reem.alkhlif@damascusuniversity.edu.sy

[2] أستاذ، جامعة دمشق، كلية الزراعة، قسم علوم وقاية النبات البريد الالكتروني: fawaz.azmeh@gmail.com

[3] أستاذ، جامعة دمشق، كلية الزراعة، قسم علوم وقاية النبات البريد الالكتروني: mghoorrah@windowslive.com

الملخص:

نُفذ البحث في مخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية في دمشق وكلية الزراعة في جامعة دمشق خلال عامي 2021 و2022 ,بهدف تحديد القدرة التضادية في الزجاج لعزلات بكتيرية من المحيط الجذري لنباتات البندورة في الزراعة المحمية في الساحل السوري تجاه فطر Fusarium solani المسبب لذبول البندورة. تم الحصول على ست عزلات بكتيرية (A12, B22, C33, F63, I91, J02) من جذور البندورة السليمة، وعزلة واحدة (K11) من التربة، وعزلة واحدة (RIZN) من محيط العقد الجذرية لجذور نبات النفل الارجواني البري Trifolium purpureum. تم تعريف العزلات وفق عدة اختبارات بيوكيميائية فاتضح أن أربعة منها (A12, B22, C33, F63) تنتمي للنوع Pseudomonas fluorescens وأربعة أخرى (I91, J02, K11, RIZN) تنتمي للنوع Bacillus cereus. تم اختبار القدرة التضادية لهذه العزلات البكتيرية مع الفطر Fusarium solani مخبرياً بطريقتين، طريقة القطاعات باستخدام معلقات بكتيرية وطريقة التضاد بالحفرة باستخدام الراشح البكتيري. في كلا الطريقتين أعطت العزلات البكتيرية التابعة لـ Bacillus cereus أفضل قدرة تضادية وتفوقت العزلة RIZN بنسبة تثبيط 43.8% ومسافة تضاد فاصلة بين النمو الفطري وحفرة الراشح البكتيري 36.3 مم.

الكلمات المفتاحية: ذبول فوزاريوم، Fusarium Solani، Pseudomonas Fluorescens، Bacillus Cereus، تضاد، سورية.

تاريخ الايداع2023/7/3
تاريخ القبول2023/8/29

حقوق النشر: جامعة دمشق – سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب
CC BY-NC-SA

Antagonist capacity of local rhizobacterial isolates against Fusarium solani causing Tomato wilt in vitro

Reem Aboud Alkhlif [1*], Mohammad Fawaz Azmeh [2], Mahmoud abu Ghoura [3]

[*1] Master student, Damascus University, Faculty of Agriculture, Plant Protection department, Agriculture Engineer in Laboratory of Biodiversity, Syrian National Comission for Biotechnology, Email: reem.alkhlif@damascusuniversity.edu.sy

[2] Professor, Damascus University, Faculty of Agriculture, Plant Protection department, Email: fawaz.azmeh@gmail.com

[3] Professor, Damascus University, Faculty of Agriculture, Plant Protection department, Email: mghoor-rah@windowslive.com

Received: 3/7/2023
Accepted:29/8/2023

Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a
CC BY- NC-SA

Abstract:

The research was conducted in Laboratories of Syrian National Commission for Biotechnology in Damascus and Faculty of Agricultrue at Damascus University during the years 2021 and 2022 with the aim of determination of the in vitro antagonistic ability of bacterial isolates from the rhizosphere of tomato plants in protected cultivation in the Syrian coast against Fusarium solani causing Tomato wilt. Six bacterial isolates (A12, B22, C33, F63, I91, J02) were obtained from healthy tomato roots, one isolate (K11) from the soil, and one isolate (RIZN) from the periphery of the root nodules of Trifolium purpureum.

The isolates were identified according to several biochemical tests, and it turned out that four of them (A12, B22, C33, F63) belong to the species Pseudomonas fluorescens and the other four (I91, J02, K11, RIZN) belong to the Bacillus cereus. The antigenicity of these bacterial isolates was tested with Fusarium solani in the laboratory by two methods, the Sectors method using bacterial suspensions and Well-Plate Assay method using bacterial filtrate.

In both methods, the bacterial isolates belonging to the Bacillus cereus gave the best antagonistic ability, and the RIZN isolate excelled, giving an 43.8% inhibition rate, and The antagonistic distance between the fungal growth and the well was 36.3 mm.

Key Words: Fusarium Wilt, Fusarium Solani, Pseudomonas Fluorescens, Bacillus Cereus, Antagonist, Syria

1-المقدمة Introduction :

يعد ذبول البندورة (Fusarium wilt) أحد أهم أمراض البندورة في كل من البندورة الحقلية والبندورة المزروعة بالبيوت البلاستيكية في جميع أنحاء العالم (Amini *et al*., 2010,175). ومن أحد أهم الأنواع التي تسبب ذبول فوزاريوم على البندورة النوع ***F.*** solani وينتشر على نطاق واسع في التربة في جميع أنحاء العالم، ويسبب تعفن الجذر والساق ويشمل هذا النوع **50** تحت نوع على الأقل (Schollenberger *et al*., 2005,317). ويمثل استخدام الكائنات الدقيقة المضادة استراتيجية بديلة لإدارة الأمراض (Lugtenberg *et al*., 2009,541) كما تم استخدام العوامل الحيوية بشكل فعال لمكافحة مرض ذبول فوزاريوم على البندورة (Freeman *et al*., 2002,164). ونتيجة ازدياد الوعي والرغبة بالحصول على غذاء خالٍ من الأثر المتبقي للمبيدات وتأثيرها في الصحة ظهرت أهمية استخدام الكائنات الحية الدقيقة الموجودة في منطقة المحيط الجذري و/أو منتجاتها في مكافحة أمراض النبات. يمكن أن تكون الآليات التي تعتمدها عوامل المكافحة الحيوية مباشرة أو غير مباشرة أو مختلطة (Pal *et al*., 2006,1).

2-الدراسة المرجعية Literature review:

هناك العديد من الأجناس البكتيرية التي تملك صفة التضاد للأمراض الفطرية التي تصيب النبات وهي: Lactobacillus، Bacillus، Burkholderia، Pseudomonas، Serratia، Enterobacter، Azotobacter، Agrobacterium (Kerr *et al*,1999,385). وفي دراسة لعزل بكتيريا من جذور بعض النباتات والأجسام الحجرية والتربة ذات تأثير مضاد في الفطر **Sclerotinia sclerotiorum** المسبب لمرض عفن سكليروتينيا (عزام وآخرون،2006،257) حيث جمعت عينات من جذور نبات الخس والجزر والأجسام الحجرية للفطر الممرض **Sclerotinia sclerotiorum** والتربة من المنطقة الجنوبية من دمشق خلال عام 2001، وعزلت 82 عزلة بكتيرية ثم اختبرت صفة التضاد لهذه العزلات البكتيرية اتجاه المسبب الممرض للعفن الأبيض في المخبر ***in vitro***. حيث وجد أن 7 عزلات بكتيرية كان لها تأثير مضاد في نمو الفطر الممرض وأمكن تعريف ثلاث عزلات بكتيرية منها وهي تنتمي إلى جنس.**Bacillus spp** . في دراسة لـ **Ajilogba** وآخرين (2013) تم اختبار نشاط أربعة أنواع من **Bacillus spp** وهي **B. amyloliquefaciens** و **B. cereus** و **B. pumilus** و **B. subtilis** في المكافحة الحيوية في المخبر **in vitro** بقياس منطقة التثبيط فأظهرت نتائج التحليل المخبري أن **B. amyloliquefaciens** يمنع نمو **F. solani** (205). كما أجريت دراسة من قبل الناصر وآخرين (2015) أُختبرت من خلالها قدرة عزلات بكتيرية تم الحصول عليها من المحيط الجذري لنبات الحمص على تثبيط الفطر الممرض، حيث عزلت 18عزلة فطرية من النوع **F. oxysporum** من عدة مناطق في سورية. وقد تم اختبار القدرة الإمراضية للعزلات الفطرية على صنف الحمص القابل للإصابة. تم اختيار 3 عزلات فطرية شرسة لإجراء التضاد الحيوي، ولوحظ بعد اختبار 100 عزلة بكتيرية أن ست عزلات تابعة للجنس **Proteus sp.** أعطت نسب تضاد عالية بالمقارنة مع بقية العزلات البكتيرية(59). تم تنفيذ عدد من طرق المكافحة الحيوية في مكافحة **Fusarium solani** المسبب لتعفن جذور نبات الفاصولياء في إيران والحد منه باستخدام البكتيريا ذات الاستعمار الداخلي **Endophytic Bacteria** من قبل **Mohamadpoor** وآخرين **(2022)** حيث تم دراسة التأثير التثبيطي لكل من **Pseudomonas fluorescens** و **Bacillus subtilis** في المخبر **in vitro**. تم إجراء التجربة باستخدام الوسط المختلط ودراسة تأثير المركبات المتطايرة المضادة للفطريات وتأثير المضادات الحيوية التي تنتجها البكتيريا. أظهرت عزلات **P. fluorescens** و**B. subtilis** تثبيطاً أعلى من **52**٪ و**55**٪ على التوالي. وفي اختبار إنتاج المركبات المتطايرة المضادة للفطر، أظهرت **P. fluorescens** و**B. subtilis** تثبيط **27**٪ و**29**٪

على التوالي. وفي اختبار إنتاج المضادات الحيوية، تم تثبيط الفطر بنسبة **90**٪ عن طريق كلتا العزلتين. كما أثبتت عزلات **P. fluorescens** و**B. subtilis** فعاليتها في تثبيط الفطر بنسبة **29**٪ و**36**٪ على التوالي (3). تم تقييم الفعالية التضادية لكل من البكتيريا **Bacillus cereus** و**Pseudomonas fluorescens** ضد **Fusarium solani** في مخبر الأمراض النباتية، في مديرية زراعة ديالى من قبل **Salim** وآخرين **(2021)** فأظهرت النتائج أن البكتيريا **P. fluorescens** و**B. cereus** تمنع نمو الفطر **Fusarium solani** بنسبة تثبيط **22.4**٪ و**18.3**٪ على التوالي (78). كما أُختبر تأثير عوامل المكافحة الحيوية **B. subtilis** و **P. fluorescens** في تثبيط النمو الفطري للفطر **Fusarium solani** المسبب لسقوط البادرات وتعفن جذور نبات البندورة في الزجاج **in vitro** من قبل **Haggag** وآخرين **(2012)**، كشفت النتائج أن البكتيريا **B. subtilis** خفضت نمو الفطر بنسبة **21** ٪، في حين أن **P. fluorescens** قللت نمو الفطر بنسبة **20.9**٪ **(16)**.

3-مواد البحث وطرائقه Materials and Methods :

عزل مسبب المرض Fusarium solani وتحضير المعلق البوغي للفطر:

جُمعت عينات بندورة ظهرت عليها أعراض الإصابة بذبول فوزاريوم من البيوت البلاستيكية في محافظتي طرطوس واللاذقية خلال موسم 2020-2021 وبعد عزل الفطر الممرض من هذه النباتات وتنقيته وتصنيفه شكلياً بناءً على الصفات الزرعية والمجهرية وإجراء اختبار الإمراضية لعزلات الفطر الممرض على صنف البندورة القابل للإصابة "سمرتيترا" تم الحصول على العزلة الشرسة **FU6 (Alkhlif *et al.*,2023)**، قُبِل النشر) ثم حُضِر منها معلق بوغي بزرع الفطر على وسط أغار البطاطا والدكستروز **PDA** وتحضينه في الظلام لمدة 10 أيام حتى تتشكل الابواغ، يوضع 10 مل ماء مقطر معقم فوق مشيجة الفطر ويحرك باستخدام ابرة معقمة. تم ضبط تركيز المعلق البوغي باستخدام شريحة عد الكريات **Hemacytometer** عند تركيز 10^8 بوغة/مل.

عزل البكتريا من الجذور والتربة المحيطة بها:

جُمعت 21 عينة من نباتات بندورة سليمة ظاهرياً (جذور النبات والتربة المحيطة بها) من نفس البيوت البلاستكية التي كانت فيها الإصابة بذبول فوزاريوم منتشرة وعينة من جذور نبات النفل الأرجواني البري **Trifolium purpureum** بهدف عزل بكتيريا المحيط الجذري ونُقلت إلى مخبر التنوع الحيوي في الهيئة العامة للتقانة الحيوية، دمشق. عزلت البكتيريا من جذور نبات البندورة السليمة، حيث قطعت الجذور ووضعت في انابيب معقمة (كل جذر في أنبوب) تحوي ماء مقطر معقم لمدة 10 دقائق للتخلص من حبيبات التربة العالقة عليها، ثم وضعت في أنبوب اختبار يحوي 4.5 مل ماء مقطر معقم ورج جيداً مدة 1 دقيقة لفصل البكتريا العالقة على الجذور، ومدد وسط الزرع السائل (المعلق البكتيري) ثلاثة تمديدات بمعدل 10/1، $10/1^2$، $10/1^3$، ومن التمديد الثالث أخذ 50 ميكروليتر من كل عينة وزرع في أطباق بتري تحوي وسط الآغار المغذي **Nutrient Agar (NA)**، زُرعت ثلاثة مكررات لكل عينة. كما وضع 5غرام من التربة المحيطة بالجذور من كل عينة في أنبوب اختبار يحوي 100مل ماء مقطر معقم وتم رج الانبوب لمدة 5 دقائق على رجاج كهربائي. مددت كل عينة 6 تمديدات (10/1 ،$10/1^2$، $10/1^3$، $10/1^4$، $10/1^5$، $10/1^6$) حيث يضاف كل مرة 1 مل من المعلق الى انبوب اختبار يحتوي 9 مل ماء مقطر معقم ويرج جيدا. نشر 50 ميكروليتر من التمديد السادس ($10/1^6$) على طبق بتري يحوي الوسط المغذي **NA** على كامل سطح الطبق وكررت العملية لكل عينة ثلاث مرات. حضنت الأطباق على درجة حرارة 25±3 °س بعد مرور 48 ساعة من التحضين أخذت القراءات على كل

طبق وأُعطيت كل مستعمرة رمزاً محدداً، ثم نقلت إلى طبق بتري يحوي وسط مغذي **NA** لتنقيتها وبعد ذلك تم حفظ هذه البكتريا بالتجميد (−20 °س) باستخدام وسط **LB Broth 70%** + غليسرول30%.

اختبار قدرة البكتيريا المعزولة على تثبيط نمو الفطر الممرض في الزجاج:

نُشطت العزلات البكتيرية المحفوظة بالتجميد بزرعها في وسط المرق المغذي السائل **Nutrient broth (NB)** ، بعد ذلك وضع في كل طبق بتري (قطر 9 سم) يحوي الوسط المختلط **PDA+NA** بنسبة 1:1 حجماً، 4 عزلات بكتيرية وزعت على محيط الطبق بشكل خط مستقيم على بعد 1 سم من حافة الطبق ووضع في مركز الطبق قرص 1 سم من المشيجة الفطرية النامية واستخدمت 3 مكررات لكل عزلة بكتيرية ثم حضنت الأطباق على درجة حرارة 25 ±3 °س وبعد 96 ساعة من التحضين تم قياس المسافة الفاصلة بين نهاية النمو الفطري والنهاية المقابلة من النمو البكتيري باستخدام مسطرة ميليمتريه (**Ajilogba *et al*,2013,205**). كما تم اختبار العزلات البكتيرية التي أعطت تأثيراً مضاداً للفطر الممرض بطريقة التضاد بالحفرة **Well-Plate Assay (Kerr *et al*.,1999,385)** وذلك باستخدام نفس الوسط المغذي **PDA+NA**. حيث حضر معلق بوغي للفطر الممرض بتركيز 10^{8} بوغة/مل وتم تحضير معلقات للبكتريا التي أبدت صفة التضاد للفطر الممرض وتم ضبط تراكيز المعلقات البكتيرية على المطياف الضوئي **Spectrophotometer** بقياس الامتصاصية عند طول موجة **600 nm** عند التركيز 0.5 ثم تم حساب عدد الوحدات المشكلة لمستعمرة **CFU (Colony forming unit)** بطريقة انابيب التخفيف للعزلات البكتيرية كافة وتم ضبطه عند 10^{10} **CFU** /مل لكافة العزلات ثم تم ترشيحها بمرشحات بكتيرية للحصول على الراشح. زرع 100 ميكروليتر من المعلق البوغي للفطر الممرض على كامل الوسط المغذي ثم صُنعت حفرة بقطر 0.7 سم وسط الطبق ووُضع 50 ميكروليتر من الراشح البكتيري في هذه الحفرة الوسطية بمعدل 3 مكررات لكل عزلة بكتيرية ويترك شاهد عبارة عن مستعمرات فطرية نقية لقياس قطرها. حضنت الاطباق على درجة حرارة 25 ± 3 ° س لمدة 96 ساعة ثم قيس متوسط نصفي قطرين متعامدين للمستعمرة الفطرية المعاملة باستخدام مسطرة ميليمتريه وتم حساب نسبة تثبيط النمو الفطري من المعادلة التالية:

نسبة التثبيط % = **[**(قطر مستعمرة الفطر الشاهد−قطر مستعمرة الفطر المعاملة)/ قطر مستعمرة الفطر الشاهد**]** ×100

سجلت النتائج وتم انتخاب أفضل العزلات البكتيرية من حيث قدرتها على تثبيط نمو الفطر في المخبر وجرى تعريفها بيوكيميائياً

تعريف العزلات البكتيرية التي قامت بتثبيط نمو مسبب ذبول فوزاريوم بيوكيميائياً :

عرفت العزلات البكتيرية اعتماداً على الاختبارات البيوكيميائية التالية الذكر: اختبار صبغة غرام **Gram stain test** (**Colwell *et al*., ,1987,1**)، اختبار اكسيداز Oxidase Test (Win *et al*.2006,1736)، اختبار كاتلاز **Catalase Test** (**Facklam *et al*.,1995,479**)، اختبار التنفس Oxidation -Fermentation Test (Murray *et al*., 2007,2488)، اختبار غرام بطريقة **RYV** RYV GRAM reaction (Suslow *et al* 1982,917)، اختبار قدرة البكتريا على تشكيل الجراثيم الداخلية (التبوغ) Endospore formation (Vries,2011,128)، اختبار تحلل النشاء **Starch hydrolysis** (**Tille P.M.2014,3251**)، اختبار تحلل الجيلاتين **Gelatin hydrolysis** (**Dela cruz,2012,1**)، اختبار تحلل البكتين أو تعفن شرائح البطاطا **Potato slice rot Test** (**Lelliot *et al*., 1966,70**)، اختبار تحمل البكتريا لتركيز **2% Growth on medium containing 2% Sodium chloride NaCl** (**Barra *et al*, .2016,80**)، انتاج البكتريا للصبغات الوميضية على وسط **King B Bacterial fluorescence production Test** (**King *et al*,1954,301**)، اختبار فرط الحساسية على التبغ **Hypersensitivity Test on Tobacco leaf** (**Klement**

et al., 1967,17)، اختبار احمر الميتيل Mythel red Test (MR) (Crown *et al.*,1998,101)، اختبار اليورياز **Urease** Test (Bailey *et al.*,1974,1)، اختبار حركة البكتيرية Motility of bacteria (Shields *et al.*,2011,1) ، اختبار حلمهة الدم Hemolytic test (Ruoff *et al.*,1999,1)، اختبار (VP) voges-proscaver (Barry *et al.*,1967,1138)، اختبار صبغ بروتين الكريستالات **s**taining of the crystal protein test (Sharif *et al.*,1988,227**)**. وبمقارنة نتائج الاختبارات البيوكيميائية السابقة مع دليل تصنيف البكتيريا BERGEY´S MANUAL® OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY تم تعريف العزلات البكتيرية (Bergey *et al.*,1986,965).

التحليل الإحصائي:

تم تحليل البيانات إحصائياً بطريقة تحليل التباين ANOVA باستخدام برنامج IBM SPSS الإصدار 25 وقورنت المتوسطات باستخدام اختبار أقل فرق معنوي LSD (Least Significant Difference) على مستوى معنوية 1% واختبار دنكن متعدد الحدود DMRT (Duncan's Multiple Range Test)

4–**النتائج Results:**

عزل البكتيريا من جذور نبات البندورة ومن التربة المحيطة بها:

عُزلت 30 عزلة بكتيرية من جذور نباتات البندورة السليمة و18 عزلة بكتيرية من التربة الموجودة في منطقة المحيط الجذري التي تم جمعها عامي 2020 و2021 من البيوت المحمية في محافظتي طرطوس واللاذقية وعزلة من جذور نبات النفل الأرجواني والتي كانت فيها الإصابة منتشرة تدرج لون المستعمرات من الأبيض الى القشدي أو المصفر أو البرتقالي وبعضها تنشر صبغة خضراء مصفرة أو تميل للون البني في وسط الزرع. ملساء شفافة أو عاتمة قليلاً، محدبة المركز أو ذات حفرة تشبه فوهة البركان، مسطحة منتظمة الحواف أو غير منتظمة، مستديرة إلى بيضاوية الشكل وتراوحت أقطار المستعمرات النقية النامية على وسط **NA** بعد 48 ساعة من التحضين بين 0.5 و5 مم.

اختبار قدرة البكتيريا المعزولة في تثبيط نمو الفطر الممرض في الزجاج:

أظهرت نتائج التجربة الأولى (تجربة التضاد بالقطاعات) في اختبار صفة التضاد للعزلات البكتيرية المعزولة من جذور نبات البندورة والتربة المحيطة بها ومن جذور النفل ضد مسبب ذبول فوزاريوم F. solani في الزجاج in vitro على الوسط المغذي **(PDA+ NA)** ان هناك 10 عزلات أبدت صفة التضاد ضد النوع F. solani من أصل 49 عزلة بكتيرية أما باقي العزلات فلم تؤثر في النمو الفطري حيث غطت مشيجة الفطر كامل سطح الوسط حتى فوق النمو البكتيري ولم يكن هناك أي فاصل او مسافة تضاد تفصل بين النمو الفطري والبكتيري.

ويوضح الجدول (1) مسافات التضاد Antagonistic distance بين نهايات نمو العزلات البكتيرية والفطرية. كما تفوقت العزلات البكتيرية I91 **و**J02 **و**RIZN **و**K11 على باقي العزلات في تثبيط النمو للنوع F. solani بمتوسط مسافة تضاد 10 و7.67 و6 و5.33 مم على التوالي، وكانت قيمة $LSD_{0.01}$ تساوي 5.66.

ويبين الجدول (1) من خلال التحليل الإحصائي ومقارنة المتوسطات باستخدام اختبار **LSD** واختبار دانكن على مستوى معنوية 1%، تفوق العزلات البكتيرية I91 **و**J02 **و**RIZN **و**K11 على باقي العزلات في تثبيط النمو الفطري للنوع **F. solani** بمتوسط نسبة تثبيط Inhibition (%) 55.57 و52.97 و51 و50.4 على التوالي، وكانت قيمة $LSD_{0.01}$ تساوي 6.255.

الجدول (1) مسافة التضاد Antagonistic distance ونسبة التثبيط Inhibition بين فطر الذبول F. solani **والعزلات البكتيرية التي ثبطت نمو الفطر مخبرياً في تجربة القطاعات**

رمز العزلة البكتيرية المضادة	مصدر العزلة	أقرب مسافة نمو فاصلة بين العزلة البكتيرية والفطر الممرض /مم				متوسط نسبة التثبيط (%) Inhibition
		المكرر 1	المكرر 2	المكرر 3	المتوسط	
A12	جذور البندورة	2	5	3	3.3^{b}	48.17^{b}
B22	جذور البندورة	2	5	2	3^{b}	47.8^{b}
C33	جذور البندورة	3	5	2	3.3^{b}	48.17^{b}
F63	جذور البندورة	3	4	3	3.3^{b}	48.17^{b}
G73	جذور البندورة	3	2	2	2.3^{b}	47.07^{b}
I91	جذور البندورة	10	5	15	10^{a}	55.57^{a}
J02	جذور البندورة	10	8	5	7.7^{ab}	52.97^{ab}
K11	التربة	3	3	10	5.3^{ab}	50.4^{ab}
P63	التربة	2	2	3	2.3^{b}	47.07^{b}
RIZN	جذور النفل الارجواني	5	8	5	6^{ab}	51^{ab}

حيث أن: الاحرف الصغيرة المختلفة تدل على وجود فروق معنوية بين العزلات البكتيرية في تثبيط ***F. solani***

وعند اختبار تأثير تضاد الراشح البكتيري تجاه العزلات الفطرية الممرضة بطريقة التضاد بالحفرة فقدت العزلات **G73** و**P63** قدرتها على تثبيط نمو المشيجة الفطرية حيث غطت المشيجة الفطرية كامل سطح الطبق دون وجود مسافة فاصلة. كما أظهر جدول **ANOVA** عدم وجود فروق معنوية بين العزلات البكتيرية في تثبيط نمو الفطر ***F. solani*** وكانت العزلة **RIZN** هي الأقوى في تثبيط نمو الفطر بنسبة تثبيط 8.43 % ومسافة تضاد 3.36 مم (الجدول 2)، وقيمة $LSD_{0.01}$ لمتوسطات نسبة التثبيط ومسافة التضاد 767.19 و435.16 على التوالي.

تعريف البكتيريا المعزولة التي قامت بتثبيط نمو مسبب ذبول فوزاريوم بيوكيميائياً:

عُرِفت العزلات البكتيرية التي أظهرت تأثير مضاد ضد عزلات الفطر الممرض بيوكيميائياً وهي موضحة في الجدول (3)

قسمت العزلات البكتيرية بناءً على نتائج الاختبارات البيوكيميائية الى مجموعتين: الأولى عصويات سالبة غرام هوائية اجبارية متحركة وتقوم بإنتاج الصبغات الوميضية على وسط king B وتنتج إنزيم السيتوكروم اكسيداز والكاتلاز واليورياز ولا تشكل ابواغ في درجات الحرارة المرتفعة ولا تحلمه الدم على درجة الحرارة 37˚س والثانية عصويات موجبة غرام هوائية اختيارياً عدا I91 هوائية اجبارية، متحركة وسالبة في اختبار الوميض وإنتاج انزيم السيتوكروم اكسيداز وإنتاج الكريستالات لكنها تقوم بتشكيل الأبواغ في درجات الحرارة المرتفعة وقامت بإنتاج انزيم الكاتلاز وحللت النشاء، وقادرة على انتاج acetyl-methyl carbinol من تخمير الغلوكوز، كما تحلمه الدم على درجة حرارة 37˚س ذات نمط β hemolytic ويكون لون المستعمرات على الوسط Blood Agar كريمي الى ابيض او رمادي وله مسحة خضراء كما ان جميع العزلات لم تحرض فرط الحساسية على أوراق نبات التبغ وتنتج أنزيم الجيلاتيناز وبمقارنة هذه النتائج مع مرجع تصنيف البكتيريا BERGEY´S MANUAL® OF SYSTEMATIC

BACTERIOLOGY أمكن تصنيفها ، فتكون بذلك المجموعة الأولى تابعة للنوع Pseudomonas fluorescens (4 عزلات) والمجموعة الثانية تابعة للنوع Bacillus cereus (4 عزلات).

الجدول (2) مسافة التضاد ونسبة التثبيط بين فطر الذبول F. solani والعزلات البكتيرية المعزولة من جذور وتربة المحيط الجذري لنبات البندورة ونبات النفل التي ظهرت في تجربة التضاد بالحفرة

رمز العزلة البكتيرية المضادة	مسافة التضاد /مم				متوسط نسبة التثبيط (%) Inhibition
	المكرر 1	المكرر 2	المكرر 3	المتوسط	
A12	33	33	23	29.7^{ab}	35.8^{ab}
B22	13	23	23	19.7^{ab}	23.7^{ab}
C33	23	23	15	20.3^{ab}	24.5^{ab}
F63	23	23	27	24.3^{ab}	29.3^{ab}
I91	19	3	29	17^{b}	20.5^{b}
J02	27	31	35	31^{ab}	37.3^{ab}
K11	13	27	13	17.7^{b}	21.3^{b}
RIZN	33	33	43	36.3^{a}	43.8^{a}

حيث أن: الاحرف الصغيرة المختلفة تدل على وجود فروق معنوية بين العزلات البكتيرية في تثبيط **F. solani**

الجدول (3) نتائج الاختبارات البيوكيميائية لتعريف العزلات البكتيرية

رمز العزلة البكتيرية	A12	B22	C33	F63	I91	J02	K11	RIZN
شكل الخلية	عصوية	عصوية	عصوية	عصوية	عصوية	عصوية	عصوية	عصوية
	ذات توضع عشوائي				مرتبة بشكل سطور			
غرام	–	–	–	–	+	+	+	+
التبوغ	–	–	–	–	+	+	+	+
الاكسيداز	+	+	+	+	–	–	–	–
انتاج الصبغات الوميضية	+	+	+	+	–	–	–	–
فرط الحساسية على التبغ	–	–	–	–	–	–	–	–
التنفس	هوائية اجبارية	هوائية اجبارية	هوائية اجبارية	هوائية اجبارية	هوائية اجبارية	هوائية اختيارية	هوائية اختيارية	هوائية اختيارية
الكاتلاز	+	+	+	+	+	+	+	+
تحمل NaCl 2%	+	+	+	+	+	+	+	+
ميتيل ريد	–	+	–	+	–	–	–	–
اليورياز	+	+	+	+	+	+	–	–
تحلل البكتين	–	–	–	–	+	+	+	+
تحلل الجيلاتين	+	+	+	+	+	+	+	+
تحلل النشاء	–	+	+	–	+	+	+	+
الحركة	+	+	+	+	+	+	+	+
voges-proscaver	–	–	–	–	+	+	+	+
حلمهة الدم	–	–	–	–	+	+	+	+
تكوين الكريستالات	–	–	–	–	–	–	–	–
تعريف العزلة	Pseudomonas fluorescens				Bacillus cereus			

حيث ان: (+) إيجابي positive، (−) سلبي Negative

5-المناقشة Discussion :

توضح النتائج وجود 6 عزلات بكتيرية (A12, B22, C33, F63, I91, J02) معزولة من جذور البندورة السليمة المزروعة في حقول تحوي نباتات بندورة مصابة بذبول فوزاريوم ، وعزلة واحدة (K11) معزولة من التربة المحيطة بجذور البندورة، وعزلة واحدة (RIZN) معزولة من العقد الجذرية لجذور النفل الارجواني، والتي تم تعريفها بناءً على نتائج الاختبارات الكيميائية الحيوية حيث تنتمي العزلات A12, B22, C33, F63 للنوع Pseudomonas fluorescens والعزلات I91, J02, K11, RIZN تنتمي للنوع Bacillus cereus وهذا يتوافق مع نتائج Mohammed وآخرون (2019) والتي اثبتت قدرتها التضادية تجاه الفطر المسبب لذبول فوزاريوم مخبرياً(171). حيث أظهرت النتائج ان العزلات البكتيرية التي أعطت أكبر مسافة تضاد ومتوسط نسبة تثبيط (%) لنمو مسببات ذبول فوزاريوم مخبرياً في تجربة التضاد الأولى تجاه الفطر F.solani تنتمي للنوع Bacillus cereus وهذا يتوافق مع Ajilogba وآخرون(2013)، أدى استخدام الراشح البكتيري في مكافحة مسببات ذبول فوزاريوم، إلى تفوق العزلات التابعة للنوع Bacillus cereus في نسبة تثبيط نمو الفطر، وهذا يتوافق مع نتائج Ben Abdallah وآخرون (2015) والتي وضحت ان نواتج الاستقلاب التي تنتجها Bacillus spp. هي التي أحدثت التثبيط للنمو الفطري(196)

6-الاستنتاجات Conclusions:

1. اتضح نتيجة اختبار التضاد في الزجاج أن العزلات البكتيرية التابعة للنوع **cereus** Bacillus ذات قدرة أعلى في تثبيط نمو مشيجة الفطر **F.solani** بالمقارنة مع العزلات التابعة للنوع Pseudomonas fluorescens.

2. كان تأثير العزلات البكتيرية في تثبيط نمو مشيجة فطر فوزاريوم في الزجاج متبايناً من عزلة لأخرى، ويعود هذا التأثير بالدرجة الأولى الى نواتج الاستقلاب التي تفرزها البكتيريا في وسط الزرع.

التمويل : هذا البحث ممول من جامعة دمشق وفق رقم التمويل (501100020595).

7-المراجع Reference :

1. الناصر، محمود، العظمة، فواز وأبو غرة، محمود. (2016). تأثير عزلات الأجناس Pseudomonas، Proteus وTrichoderma في مكافحة ذبول الحمص Fusarium oxysporum f. sp. Ciceris في البيت الزجاجي والحقل. مجلة جامعة البعث.38 (9).59-83

2. عزام، فراس، أبو غرة، محمود والمملوك، عمر، فاروق. (2006). عزل بكتريا من جذور بعض النباتات والأجسام الحجرية والتربة Sclerotinia sclerotiorum ذات تأثير مضاد في الفطر المسبب لمرض عفن سكليروتينيا. مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية.22 (2). 257-275

3. Ajilogba, F.C., Babalola, O.O. and Ahmad, A. (2013) Antagonistic Effects of Bacillus Species in Biocontrol of Tomato Fusarium Wilt. Ethno Med, 7(3), 205-216

4. Alkhlif, R.A., Azmeh, M.F. and Abu Ghoura, M. (2023) Resistance of some Tomato cultivars and rootstocks against Fusarium wilt pathogens. Damascus University Journal of agriculture sciences.(accepted on 18/7/2023)

5. Amini, J. and Sidovich, D.F. (2010). The effects of fungicides on Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici associated with Fusarium wilt of tomato. Journal of Plant Protection Research. 50 (2), 175

6. Bailey, W. R., Scott, E, G., (1974). Diagnostic microbiology, 4th ed. Mosby, St. Louis, MO.

7. Barra, P. J., Inostroza, N. G., Acuña, J. J., Mora, M. L., Crowley, D. E., and Jorquera, M. A. (2016). Formulation of bacterial consortia from avocado (Persea americana Mill.) and their effect on growth, biomass and superoxide dismutase activity of wheat seedlings under salt stress. Appl. Soil Ecol. 102, 80–91.

8. Barry AL, Feeney KL.(1967) Two quick methods for Voges-Proskauer test. Appl Microbiol. 15(5):1138-1179.

9. Ben Abdallah, D., Frikha-Gargouri, O.and Tounsi, S. (2015) Bacillus amyloliquefaciens strain 32a as a source of lipopeptides for biocontrol of Agrobacterium tumefaciens strains. J Appl Microbiol. 119(1):196–207

10.Bergey, D.H., Breed, R.S., Murray, E.G.D. and Hitchens, A.P.(1986) BERGEY´S MANUAL® OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. 2 ed. London. Williams and Wilkins, pp. 965–1599.

11.Colwell and Grigorova. (1987). Current methods for classification and identification of microorganisms. Methods in microbiology. 19 .1-67

12.Crown, S.T. and Gen, J., (1998). Micromethod for the methyl red test. Microbiol. 9 p. 101-109.

13.Dela Cruz, T. E. (2012). Gelatin Hydrolysis Test Protocol. Retrieved from American Society for Microbiology. 1-10: http://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.3776

14.Facklam, R., Elliott, J, A., (1995). Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. Clinical Microbiology. 8(4), p. 479.

15.Freeman, S., Zveibel, A., Vintal, H. and Maymon, M. (2002). Isolation of non-pathogenic mutants of Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici for biological control of Fusarium wilts in Cucurbits. Phytopathology. 92:164-168

16.Haggag, K.H.E. and El-Gamal, N.G. (2012). In vitro Study on Fusarium solani and Rhizoctonia solani Isolates Causing the Damping Off and Root Rot Diseases in Tomatoes. Nat Sci .10(11):16-25. (ISSN: 1545-0740). http://www.sciencepub.net/nature

17.Kerr, J.R., Taylor, G.W., Rutman, A., Hoiby, N., Cole, P.J., Wilson, R.(1999) Pyocyanin inhibits yeast growth: a role in the prevention of pulmonary candidiasis. J Clin Pathol. 52: 385–392.

18.King, E. O, M. K. Ward and Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 44:301-307.

19.Klement, A. and R. Goodman (1987). The hypersensitive reaction infection by bacterial plant pathogens. Annual Review of Phytopathology, 5: 17-44.

20.Lelliot RA, Billing E, Hayward AC (1966). A determinative scheme for the Fluorescent Plant Pathogenic Pseudomonads. J. App. Bacteriol. 29. 70-489.

21.Lugtenberg, B. J. J., and Kamilova, F.(2009) Plant growth promoting rhizobacteria. Ann. Rev. Microbiol. 63, 541-556

22.Mohamadpoor, M., Amini, J., Ashengroph, M. and Azizi, A. (2022). Antagonistic activity of endophyte bacteria Bacillus subtilis and Pseudomonas fluorescens against bean root rot fungus (Fusarium solani): in vitro study. 24th Iranian Plant Protection Congress. Tehran, Iranian Research Institute of Plant Protection. 9. 3-6

23.Mohammed, L.B., Hussein, A.R., Toama, N.F.(2019) Biological control of Fusarium wilt in tomato by endophytic rhizobactria . Energy Procedia. 157: 171-179

24.Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L. and Pfaller. M.A.(2007) Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. ASM Press, Washington, D.C.pp.2488

25.Pal, K. K., and Gardener, B. M.(2006) Biological Control of Plant Pathogens. Plant Health Instructor.1-25

26.Ruoff, K.I. Whiley, R.A. and Beighton, D. (1999). In Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C. and Yolken, R.H. (ed.), Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

27.Salim, H.A. and Hassan, A.Y. (2022). Antagonistic effects of Securigera securidaca extracts, Bacillus cereus and Pseudomonas fluorescens against Aspergillus sp., Fusarium solani, and Rhizoctonia sp. in vitro. Euphrates Journal of Agriculture Science-14 (1): 78-85.

28.Schollenberger, M., Muller, H.M., Rufle, M., et al. (2005) Survey of Fusarium toxins in foodstuffs of plant origin marketed in Germany. International Journal of Food Microbiology, 97(3). 317-326

29.Sharif, F.A. and Alaeddinoglu, N.G. (1988) A rapid and simple method for staining of the crystal protein of Bacillus thuringiensis. Jornal of Industrial Microbiology. 3. 227-229

30.Shields, P. and Cathcart, L. (2011) Motility test medium protocol. American Society for Microbiology .1-10

31.Suslow, T. V., Schroth, M. N., and Isaka, M.(1982) Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology. 72: 917 918.

32.Tille, P.M.(2014).Baily and Scott's diagnostic microbiology. thirteen.edition. Mosby, inc.,an affiliate of Elsevier inc.3251 Riverport Lane. st. Louis. Missouri 63043

33.Winn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P., Woods, G., (2006). Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.pp1736

34.Vries, Y.P.de. (2011) Bacillus cereus spore formation, structure, and germination, Ph.D. thesis. Wageningen University, Wageningen, the Netherlands – with summary in Frisian and Dutch – 128 p