دراسة امكانية استحثاث المقاومة الجهازية باستخدام البكتريا المحفزة للنمو(PGPR) في نباتات الطماطة في السيطرة على مرض تعقد الجذور المتسبب عن***Meloidogyne*** **spp**

استبرق محمد عبد الرضا **فرقد عبد الرحيم عبد الفتاح**

كلية الزراعة \ جامعة كربلاء **كلية الزراعة \ جامعة بغداد**

المستخلص

اجريت هذه الدراسة لتحديد امكانية تحفيز المقاومة الجهازية في نبات الطماطة ضد مرض تعقد الجذور المتسبب عن *Meloidogyne* spp .باستعمال نوعي البكتريا *Pseudomonas fluorescens* و *Bacillus subtilis* المعزولة جذور الادغال . شملت الدراسة قدرة الخليط الحيوي في تثبيط اختراق يافعات الطور الثاني لجذور النباتات المعاملة قياسا بالنباتات غير المعاملة اذ بلغت اقل عدد لليافعات المخترقة في الخليط الحيوي بنسبة تثبيط بلغت 74.6 % تلتها معاملة البكتريا *Pseudomonas fluorescens* وبنسبة تثبيط 71.2% تليها معاملة البكتريا *Bacillus subtilis* ونسبة تثبيط 68.1%. دلت المؤشرات الانزيمية على وجود زيادة في نشاط انزيم البيروكسيديزوتراكم الفينولات لكل من المعاملات المنفردة والتطبيق المشتركا معاملة نباتات الطماطة باجناس البكتريا قيد الدراسة زيا دة في كمية الفينولات الكلية حيث بلغت اقصاها في 4 ايام الاولى وانخفضت في اليوم ال 12 وقد ابدت النتائج تفوق الخليط الحيوي على تحفيز تركيز المركبات الفينولية تلته البكتريا *Pseudomonas fluorescens* تلته *Bacillus subtilis*. ادت جميع الاحياء المجهرية المستخدمة في هذه الدراسة الى استحثاث المقاومة الجهازية في نباتات الطماطة ضد ديدان تعقد الجذور وزيادة في معايير النمو الامر الذي شجع في استعمال هذه الاحياء في مكافحة ديدان تعقد الجذور كمبيد احيائي خاصة اذا مزجت بخليط حيوي.

البحث مستل من اطروحة دكتوراه للباحث الاول

The Induction of systemic Resistance in plants by UsingPlant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) to control the root knot disease on tamato caused by *Meloidogyne* spp

Estabraq M. Abdulridha Farqad A. Abdulfattah*

Kerbala University /College of Agriculture

Baghdad University / College of Agriculture*

Abstract

This study was conducted to determine the possibility of inducing a systemic resistance against the root knot disease caused by *Meloidogyne* spp. Two biological agents *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* isolated from weeds in previous study were evaluated their efficiency separately or mixed in inducing the systemic resistance. The results showed that all treatments were able in reducing the penetration percentage of the second stage of *Meloidogyne* Larva to the roots of tomato plants comparing with the control. The biological mixture was the best with decreas-

ing percentage reached 74.6% followed by *P. fluorescens* only with 71.2% and *B. subtilis* with 68.1%. Additionally, application of the biological factors in soil and rhizosphere of tomato plants was better than spaying them on the foliage of plants. As well as, the enzymatic parameters indicated to increase in activity of peroxide enzyme and accumulation of phenolic compounds in plants treated with the biological agents separately or mixed. The highest phenolic concentration was found in plants treated with the biological mixture followed by *P. fluorescens* only and *B. subtilis* only. Clearly, the data demonstrated that all treatments used in this study were able in inducing the systemic resistance in tomato plants against the root knot nematode and increasing of growth parameters thus it is encouraging in applied these biological agents particularly the mixture as biocide to control the root knot disease.

المقدمة

مرض تعقد الجذور

تعد ديدان تعقد الجذور *Meloidogyne* spp من اهم اجناس الديدان الثعبانية المتطفلة على النبات انتشارا في العالم يعرف لحد الان اكثر من 80 نوعاً من أنواع ديدان تعقد الجذور منتشرة في جميع انحاء العالم وتعد الانواع . *M . ,M .javanica , M . incognta . arenaria* من اكثر الأنواع شيوعا اذ تشكل اكثر من 97 % من مجموع ألانواع ومنتشرة في معظم المناطق الزراعية في العالم والتي تتميز بسعة العوائل النباتية التي تصيبها والتي تقترب من 2500 عائل نباتي [1] ، تمتاز هذه الافة بقدرتها التكاثرية العالية ومداها العائلي الواسع مما جعلها صعبة المكافحة وتكمن خطورة هذه الآفة بتداخلها مع مسببات مرضية اخرى محدثة معقدات مرضية فضلا عن كسر صفة المقاومة للنبات[33][24] أجريت عدة بحوث ودراسات حولها خلال السنوات الاخيرة، وأقيمت حولها مشاريع بحثية كبيرة دولية أهمها المشروع الدولي (IMP) International Meloidogyne Project في الولايات المتحدة الامريكية [37]. تركزت جهود الباحثين في الأونة الأخيرة بالكشف عن أستحثاث الدفاعات الذاتية في النباتات الحساسة ضد العديد من مسببات أمراض النبات لما لهذا الأتجاه من أهمية بيئية وأقتصادية ، ولحث النبات ضد مرض معين يتم معاملته مسبقاً بمختلف العوامل كالعوامل الفيزياوية والكيمياوية والأحيائية [8] . تستعمر منطقة الجذور و حول الجذور(Rhizosphere) عدد من الانواع البكتيرية والفطريات والتي لها دور في نمو وتطور اشجار الغابات والخضر والمحاصيل الاخرى فضلا عن احداثها تاثيرات في تحسين انبات البذور والحصول على بادرات نشطة وزيادة معايير النمو والتزهير وزيادة محتوى النبات من البروتينات والكلوروفيل فضلا عن دورها في تجهيز النبات بالعناصر الضرورية كالفسفور والكبريت وانتاج الهرمونات النباتية [38] [3]. أذ اظهرت عدة انواع من البكتريا المحفزة لنمو النبات (PGPR) Plant Growth Promoting Rhizobacteria كفاءة عالية ضد ممرضات التربة [13] تبرز المقاومة الجهازية المستحثة(ISR) Induced Systemic Resistance عادة من خلال تلقيح النبات بأستخدام انواع غير ممرضة ضد مسببات الأمراض ودراسة موقعها على النبات[7] .توجد سلالات من البكتريا *Pseudomonas fluorescens* تنتج المضاد الحيوي (DAPG) Diacetyl phloroglucinol – 2,4 والذي له المقدرة على كبح نشاط مختلف الفطريات المسببة لامراض الجذور [20].اشارت الدراسات

الى أن البكتريا *Bacillus subtilis* تعمل على اذابة بعض المواد غير الجاهزة والتي لا يستطيع النبات الاستفادة منها مثل الصخر الفوسفاتي ليصبح جاهزا للنبات كما انها تعمل على انتاج انزيم Urease الذي يعمل على تحلل اليوريا وتحرير الامونيا ، كما ان لها دورا في تحفيز المقاومة الجهازية (Induced Systemic Resistance) (ISR) وانتاج مركبات الـ phytoalexins، [39][2] اما في المجالات التطبيقية فقد احتلت هذه البكتريا حيزا مهما في مجال انتاج الانزيمات والمضادات الحياتية [18] ا شار [35] الى وجود 17 مجموعة من البروتينات المتعلقة بالامراضية في عدد من النباتات التي خضعت للمعاملة بعوامل استحثاث للمقاومة الجهازية اذ يستحث النبات على المستوى المظهري كاستجابة فرط الحساسية (Hypersensitive Reaction) وتثخن جدر الخلايا النباتية وتكوين التايلوسات واتضح على المستوى الجزيئي وجود مجموعة مماثلة من الجينات القادرة على الاستحثاث وتسمى هذة الجينات بجينات المقاومة المكتسبة [17] شمل تحفيز المقاومة في النبات ضد الديدان الممرضة تنشيط مسارات تصنيع الفايتوالكسين و زيادة نشاط بعض الانزيمات مثل phenylalanine Ammonia Lyase (PAL) ، وتكوين الكالس و اللكنين و تراكم المركبات الفينولية ، و انزيم Peroxidase و Polyphenol oxidase و Superoxid dismutase و Chitinase و مثبطات الانزيمات **[**27].

اشارت دراسات عديدة على ان رش الطماطة بـ ASM قبل العدوى بالديدان نوع*.M.incognita* يتداخل مع تكوين الخلايا العملاقة من خلال تأثيره في البروتين المسؤول عن تكوينها مما يؤثر في عملية تكاثرها [29][30] , اوضح [28] كفاءة حامض الساليسيلك والبكتريا *Bacillus cereus* كلاً على حده أو التداخل بينهما في استحثاث مقاومة نبات الخيار يالجذور، فضلاً عن زيادة تركيز بيروكسيد الهيدروجين وانزيمPeroxidase في النباتات المعاملة ولاسيما عند إضافة العاملين سقياً وحصلت زيادة بيروكسيد الهيدروجين وأنزيم Peroxidase حتى اليوم الرابع والخامس اوضح[1] كفاءة حامض السالسليك وبكتريا *Pseudomonas fluorescence* بأستخدام تقنية الجذر المجزأ Split – root في تحفيز المقاومة الجهازية لنباتات الباذنجان ضد *M . incognita* و رافقها زيادة في نشاط انزيمات POX وChitinase و Polyphenol oxidase مما أدى إلى تقليل أعداد العقد واكياس البيض في الجذور المعاملة قياساً بنباتات المقارنة .. ان بعض انواع البكتريا *Pseudomonas ,Bucillus , Rhizobium , Azatobacter* لها القدرة على استحثاث المقاومة في العائل ضد المسببات الممرضة خلال تعرضه لها كما تلاحظ زيادة في نشاط االنزيم البيروكسيديز الذي يرتبط ارتباطا طرديا مع المقاومة المستحثة وعادة تؤثر PGPR على نمو النبات بالطريق المباشرة وغير المباشرة اذ تشمل التاثيرات المباشرة قدرتها على تحفيز النبات من خلال جاهزية العناصر الغذائية ، اما الطرق غير المباشرة فتكون بانتاجها مواد ايضية مثل المضادات الحيوية والمواد المخلبية او انتاج سيانيد الهيدروجين والتي تعمل على تثبيط نمو المسببات الممرضة للنبات والكائنات الدقيقة الضارة[6] . توصل [31] الى ان مقاومة نبات القهوة لديدان تعقد الجذور M. exigua عند معاملتها بالسليكون رافقها انتاج اللكنين و زيادة في فعالية انزيمات Peroxidase (POX) و Polyphenol oxidase (PPO) و phenylalanine ammonialyase (PAL) ولاسيما في الاصناف الحساسة .

على الرغم من تنوع الاحياء المستخدمة في برامج المكافحة الاحيائية الان اساس عملها هو تقليل كمية اللقاح الاولي والثانوي الذي تنتجه المسببات المرضية وتثبيط اومنع اختراق العائل النباتي فضلا عن زيادة نمو النبات وزيادة مقاومة المرض النباتي [11] هناك العديد من الاليات للبكتريا المحفزة للنمو للسيطرة على الممرضات من خلال تاثيرها في الحالة التغذوية وتشجيع النبات على تصنيع المواد المنظمة للنمو ومقدرتها على الحد من انتشار المسببات المرضية المتواجدة في التربة من خلال انتاج بعض منظمات النمو مثل الجبرلين والسايتوكاينين والاوكسينات والاندول استك اسد [19] او انتاج المضادات الحيوية اذ تعد من الاليات المعول عليها في السيطرة على الممرضات اذ لها القدرةعلى انتاج انواع عديدة من المضادات الحيوية PyrrolntrinوPyocyanin , Phenazinestropolone Pyoluteorin Oomycinو84 Agrocin اذ امكن انتاجه بشكل تجاري[15] كما تقوم هذه البكتريا بخلب الحديد الثلاثي من خلال افراز مواد ذات اوزان جزيئية مخفضة تسمى الSidrophores تعمل على منافسة الممرضات على عنصر الحديد [7] كما تسهم هذه البكتريا في تثبيط نمو المسببات المرضية من خلال انتاج سيانيد الهيدروجين(HCN) [15] او انتاج الانزيمات التي لها دور كبير في تحليل المخلفات العضوية وجعلها جاهزة للنبات مثل انزيم الاميليز والسيليز والاستيريزوالكاتيليز والاوكسيديز والفوسفوتيزوالتي تسهم في تحفيز الدفاعات الطبيعية للنبات ضد المسببات المرضية بانتاج حامض السالسيليك اسد الذي يلعب دورا مهما في تحفيز المقاومة من خلال زيادة تراكيز انزيمات الاكسدة في النبات [21] من الاليات الاخرى للبكتريا المحفزة للنموهي المنافسة على المواد الغذائية واماكن الاصابة اذ لوحظ ن وجود هذه البكتريا يعمل على خفض لقاح المسبب من خلال منافستها في مناطق التاثير ومنع المسبب المرضي من الوصول الى هذه المناطق والتمركزفيها [15] اختبر [10] المنتجات التجارية للفطر *Pacilomyces lilacinus* والبكتريا *P.fluorescens* والفطر *Trichoderma album* والبكتريا *B.megaterium* ضد ديدان تعقد الجذور *M.incognita* على نبات البنجر السكري في البيت البلاستيكي اظهرت النتائج ان البكتريا *B.megaterium* ادت الى انخفاض كبير في عدد العقد والاناث وكتل البيض في جذور البنجر السكري يتبعها , *B Bacillus subtilis P.fluorescens* ، *Trichoderma* على التوالي كل المعاملات حققت زيادة في طول الساق والوزن الطري والجذور والنسبة الكلية للمواد القابلة للذوبان في نبات البنجر السكري في الحقل فضلا عن ان كل المعاملات حققت تخفيض الى حد كبير من اعداد يافعات الطور الثاني في التربة وعدد العقد والاناث وكتل البيض بنفس الجرعة الموصى بها..درس [5] امكانية حث انزيمات الفينول والبيروكسديز والفينول اكسيديز والسوبر اوكسديز والكايتنيز بواسطة عزلة . *Psudomonas fluorescens* ضد *M . graminicola* على الرز وجد ان نشاط الانزيمات اعلى في النباتات المعاملة بالبكتريا كما اشارت البيانات الى تأثير هذه الانزيمات في التقليل بالاصابة بالديدان بشكل ملحوظ . تستعمل بعض انواع هذه البكتريا في المكافحة الاحيائية للعديد من المسببات المرضية من خلال قدرتها على انتاج عدد من المضادات الحيوية وتحفيز المقاومة الجهازية للنبات وانتاج الفايتوالكسين[2] .

المواد وطرائق العمل

اختبار القدرة التضادية لنوعي البكتيرية

حضرت اطباق بتري حاوية على الوسط N.Aالمعقم اخذ مسحة من البكتريا وعمل خط في مركزنصف الطبق والنصف الاخر عمل خط لنوع اخر من البكتريا وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 30 م° لمدة 24 ساعة.

تاثير االانواع البكتيرية على الاختراق وبعض معايير النمو

جمعت كتل البيض egg mass من احد البيوت البلاستيكية في محافظه كربلاء –كلية الزراعة من نباتات والباذنجان والطماطة حسب طريقة [16]اختيار النباتات ذات الاعراض الشديدة للاصابة .جمعت الجذور الحاوية على العقد ووضعت في اكياس نايلون وجلبت الى المختبر . تم التقاط كتل البيض ذات اللون البني وجمعت في اطباق .عوملت كتل البيوض بمحلول الهيبوكلورات 0.5 % لاذابة الكتل الجيلاتينية والحصول على البيض ثم وضعت في مناخل تحت مصدر للماء الجاري للتخلص من اثار القاصر واليرقات الفاقسة جمع الراشح في المنخل الاخير200 مش جهزت تربة مزبجية من الرمل والبتموس بنسبة 2:1 عقمت بجهاز الموصدة Autoclave في درجة حرارة 121 م° وضغط 1جو لمدة ساعة وليومين متتالين نقلت التربة الى البيت اللاستيكي عبئت الاصص زنة 1كغم نقعت بذور الطماطة المعقمة سطحيا بهايبوكلورات الصوديوم تركيز 6% لمدة دقيقتين ثم غسلت بالماء المعقم لازالة اثار المادة المعقمة وضعت على ورق نشاف لازالة اثار الرطوبة لمدة 5 دقائق في معلق البكتريا المحضنة في درجة حرارة 30 م° ولمدة 24 ساعة وبتركيز 10^7 وطبقت المعاملات الاتية :-

1- نباتات طماطة في تربة ملوثة بلقاح الديدان + *Pseudomon a fluorescens*
2- نباتات طماطة في تربة ملوثة بلقاح الديدان+*Bacillus subtilis*
3- نباتات طماطة في تربة ملوثة بلقاح الديدان + خليط البكتريا
4- نباتات طماطة في تربة ملوثة بلقاح الديدان + ماء
5- نباتات طماطة فقط (المقارنة)

وجرى متابعة ا لنباتات وتسجيل البيانات طول مدة التجربة

تم معاملة النباتات بعمر 4-3 اوراق حقيقية بمعلق يرقات الطور الثاني حديثة الفقس و بعد التاكد من حيوية اليافعات بواقع 500 يافعة مل بعمل 5 حفر حول الجذوروباسطة ماصة وبعد مرور 72ساعة تم حساب عدداليرقات المخترقة وبعد40 يوما تم حساب معايير النمو للنباتات المعاملةاجريت التجربة في تربة تم تعقيمها بالموصدة تم متابعة التجربة والسقي عند الحاجة والتسميد تم حساب عدد اليرقات المخترقة للجذور بعد تصبيغها حسب طريقة[9] بصبغة Fuchsin acid جرى تحضيرها بأستخدام 0.35 غرام من مسحوق الصبغة وإضافتها إلى 25 مل من حامض الخليك الثلجي أكمل الحجم بالماء المقطر إلى 1 لتر حضر

الكليسرول الحامضي بإضافة 2 مل HCL إلى 300 مل ماء مقطر و 700مل كليسرول) وتتلخص هذه الطريقة ب

1- غسل الجذور بالماء جيدا لازالة الأتربة.

2- وضعت الجذور في محلول هيبوكلورات الصوديوم لمدة خمس دقائق وبتركيز 1.5%.

3- غسلت الجذور بالماء الجاري لازالة أثار المحلول القاصر.

4- غمرت الجذور في محلول حامض الخليك 1% لمدة 5 دقائق لثبات الصبغة.

5- أخذ 1مل المحلول الأساس وأضيف له 30 مل من الماء المقطر توضع الجذور في المحلول لمدة 30 ثانية على مصدر حراري تترك حتى تبرد.

6- غسلت الجذور إزالة الصبغة ووضعت في 20 مل من الكليسيرول الحامضي سخنت حتى الغليان وتركت لتبرد في طبق يحوي ماء.

7- جرى فحص الجذور على شرائح زجاجية لغرض الفحص تحت المجهر اذ تلون الديدان باللون الأحمر ويبقى نسيج الجذر شفافاً.

حسبت النسبة المئوية للاختراق وفق المعادلة

النسبة المئوية لتثبيط الفقس= البيض المثبط في المعاملة- البيض المثبط في المقارنة/ 100- البيض المثبط في المقارنة × 100.

تقدير فعالية انزيم البيروكسيديز (PO) :

أخذ .0 .1 غم من (المجموع الخضري والجذري) النباتات المعاملة للبكتريا ولمدة ثلاثة ايام وسبعة ايام وعشرة ايام وجلبت للمختبر في ص ثلجي ووضعت في المجمدة لحين اجراء الاختبار

1-غسلت النباتات بماء مقطر ووضعت على ورق نشاف وقطعت الى قطع صغيرة مع مراعاة التعقيم طيلة فترة التجربة وسحقت ب 2 مل من دارئ الفوسفات و 0.2 مولاري pH 7.2 في هاون خزفي معقم نقل المستخلص الى انبوب زجاجي معقم .

2-اخضع المستخلص لعملية طرد مركزي بأستعمال جهاز الطرد المركزي المبرد بدرجة حرارة 4 م° وبسرعة 6000 دورة / دقيقة ولمدة 10 دقائق .

3-اخذ 0.2 مل من الطافي واضيف اليه 3 مل من مزيج التفاعل في Cuvette الخاصة بجهاز المطياف الضوئي قدر امتصاص الضوء (O.D.) Optical Density على طول موجي 420 نانوميتر أخذت القراءات كل 30 ثانية ولمدة 3 دقائق.

تقدير المحتوى الكلي من الفينولات :

Total phenolic compouneds

لتقدير محتوى النباتات المعاملة بالمسحثات (البكتريا) من الفينولات بأخذ 1غم من العينات النباتية (المجموع الجذري والخضري) سحقت العينة بواسطة الخلاط الكهربائي مع 10مل ميثانول 80% رشح المستخلص عبر طبقتين من الململ ونقل الى حمام مائي بدرجة 70 م° لمدة 15 دقيقة مع

التحريك المستمر أخذ 1مل من الطافي وأضيف له 5مل من الماء المقطر المعقم و250 من كاشف فولين في انبوبة زجاجية معقمة حضن المحلول بدرجة حرارة 25 م° لمدة 30 دقيقة وترك المزيج لحين تطور اللون الازرق وقدر الامتصاص الضوئي بواسطة جهاز المطياف الضوئي عند الطول الموجي 725 نانوميتر واستعملت مادة الكاتيكول مادة قياسية . حسبت كمية الفينول على اساس $g.g^{-1}$ نسيج طري [23]

التحليل الاحصائي

حللت بيانات التجارب المختبرية احصائيا باستخدام التصميم العشوائي الكامل Randomized Design Ceomplete (CRD)، في حين نفذت التجارب الحقلية ضمن برنامج القطاعات العشوائية الكاملة Randomized Complete(RCBD) واختبرت المتوسطات عند مستوى احتمال 0.05 باستخدام برنامج Genstate.

النتائج والمناقشة

نتائج اختبار القدرة التضادية بين البكتريا *P.fluorescens*و*B. subtilis.*

لم يظهر اي تضاد بين انواع البكتريا المختبرةعلى الوسط الزرعي N.A ويطريقة الزرع المزدوج وهذا يفسر النتائج اللاحقة من تفوق معاملة الخليط الحيوي على المعاملات المنفردة كما بين [13] ان البكتريا PGPR المعزولة من محيط الجذور اكثرها سيادة تابعة للجنسين *Pseudomonas* و , *Bucillus* واثبتت فعالية عالية ضد عدد من المسببات المرضية على الاوساط الزرعية وتحت الظروف الحقلية

جدول رقم (1) تاثير العوامل الاحيائيةعلى اختراق الجذور

المعاملات	معدل عدد اليافعات المخترقة	النسبة المئوية للتثبيط الاختراق%
P.fluorescens	**30.7**	**71.2**
B. subtilis.	**34.0**	**68.1**
Boimixtur	**27.0**	**74.6**
control	**106.7**	**00**
L.S.D α. 0.05	**11.10**	**3.34**

كل رقم في الجدول يمثل معدل ثلاث مكررات عوملت النباتات بعمر 3–4–أوراق حقيقة بعالق البكتريا بالتطبيق المنفرد والمشترك تم حساب عدد اليرقات المخترقة للجذر بتصبيغ الجذور المعاملة بديدان تعقد الجذور *M.eloidogyne spp* بواقع 500 يافعة/مل بعمل 5 حفر حول الجذور وبواسطة ماصة وبعد مرور 72 ساعة تم حساب النسبة المئوية لتثبيط الاختراق بتصبيغ الجذور المصابة.

النسبة المئوية لتثبيط الاختراق = عدد اليافعات المخترقة في المقارنة – عدد اليافعات المخترقة في المعاملة / عدد اليافعات المخترقة في المقارنة × 100.

تبين نتائج الجدول (1) كفاءة الانواع البكتيرية المستعملة في تثبيط اختراق يافعات الطور الثاني لجذور الطماطة ، اذ تفوقت معاملة الخليط الحيوي باقل عدد اليافعات المخترقة بلغت 27.0يافعة بنسبة تثبيط بلغت 74,6% تليها البكتريا*P. fluorescens* و *B. subtilis.* وبعدد يافعات مخترقة ، 34.0، يافعة على التوالي وبنسبة تثبيط بلغت 71.2 %،70.0 % ، 68.1 % يعزى تفوق الخليط الحيوي الى قدرة الانواع البكتيرية في استعمار منطقة الجذور وما تحدثة من تحويرات في منطقة الجذور عند اضافتها الى التربة قبل اللقاح و تهيئة للنبات اذ تحفز الجذور على افراز مواد سامة وطاردة للديدان [33] ويعزى هذا التفوق الى قدرة الانواع البكتيرية مجتمعة على تحفيز النمو من خلال الياتها المختلفة في تجهيز العناصر الغذائية المرتبطه وجعلها قابلة للامتصاص من قبل النبات فضلا على قدرتها تحفيز المقاومة الجهازية للنبات وبالتالي تقليل اصابة الجذور بالعقد وعلى تكاثر الديدان من الملاحظ قلة عدد اليرقات المخترقة في معاملة الخليط الحيوي لكلا المعاملتين ربما يعود السبب للدورالمشترك لهذه الاحياء المكونة لهذا الخليط تؤثر بشكل مباشر من خلال التنافس او افراز المضادات الحيوية والانزيمات المحللة لجدران المسببات المرضية اذ اشار [22] الى ان البكتريا PGPR تعمل كعامل مقاومة احيائي سواء بصورة مباشرة او غير مباشرة اذ تعمل على منع التاثيرات الضارة للمسببات المرضية كالفطريات والفايروسات والنيماتود اذ تنتج مواد ضارة ومثبطة لنمو هذه المسببات وليست ضارة للنبات من خلال خلب المواد الضرورية لنموها كالحديد وانتاج المضادات الحيوية هناك استجابتان للمقاومة بين ديدان تعقد الجذور والعائل النباتي الأولى تتمييز بتطور الخلايا العملاقة في مواقع الاصابة والثانية هي تفاعل النبات مع المسبب المرضي ويحدث بعد أيام من الاصابة

جدول رقم (2) التغيير في فعالية انزيم البيروكسيديز (fw −1g−1 min) في نباتات الطماطة

المعاملات	التغيير بالامتصاص ($min^{-1}g^{-1}$ fw)			
	بعد 3 ايام	بعد 7 ايام	بعد 12 يوم	المتوسط
Psudomonas fluorescens.	18.7	20.2	16.1	18.3
Bucillus .subtilis	17.6	19.5	14.1	17.06
الخليط الحيوي	22.3	24.1	20.3	22.2
N+P. fluorescens	20.3	25.7	18.5	21.5
N + B .subtilis	19.7	24.3	17.9	21.6
الخليط الحيوي +N	24.2	26.7	20.1	23.6
بادرات طماطة + N	12.2	15.3	15.7	14.4
CONTROL	2.13	2.91	1.95	2.72
P(0.05) = L.S.D	0.32	1.23	0,25	0,15

كل رقم في لجدول يمثل معدل ثلاث مكررات

جدول رقم 3 تراكم الفينولات (مايكروغرام /غم وزن طري) في نباتات الطماطة

المعاملات	تراكم الفينولات (مايكروغرام /غم وزن طري)			
	بعد 3 ايام	بعد 7 ايام	بعد 12 يوم	المتوسط
Psudomonas.fiuorescens	114,4	120.2	125.2	119.9
Bucillus .subtilis	124.6	123.2	137.1	128.3
الخليط الحيوي	231.4	250.2	256.3	245.9
N+Psudomonas .s	238.4	244.1	249	243.8
N+ Bucillus .subtilis	232.2	238.2	243.2	237.8
الخليط الحيوي *+N*	260.3	266.2	271.3	265.9
N +plant	105.3	108.9	115.2	109.8
CON	75.3	80.5	85.2	80.3
P(0.05) = L.S.D	0.034	0,026	0,087	0.129

اظهرت نتائج الجدول رقم 3 مقدرة العوامل المدروسة في تحفيز المقاومة الجهازية في نباتات الطماطة بزيادة انزيم البيروكسيديزاذ تفوقت معاملة الخليط الحيوي عن باقي المعاملات ب 22.3بعد ثلاثة ايام و24.3في السابع وبدات بالانخفاض في اليوم الثاني عشر اذ بلغت 20.3وقد يعزى ذلك الى ان عوامل المكافحة الاحيائية تحث النبات في بادئ الامر لانتاج الاثلين و Jasmunic acid وفق مسار المقاومة المستحثة [36] اظهرت النتائج زيادة في فعالية انزيم البيروكسيديز في النباتات المعاملة بالديدان والعوامل الاحيائية عن النباتات المعاملة بالانواع البكتيرية ويعزى ذلك الى ان الديدان عند اصابتها للجذور خلال الايام الاولى من الاصابة تحفز النبات على انتاج انزيم البيروكسيديز فضلا على تكوين جذور جانبية مما يزيد في كفاءةامتصاص امتصاص الماء والعناصر المغذية من قبل الجذور مما يؤدي الى قوة الجدران وتقليل الاختراق من قبل الممرضات [4]، درس [5] امكانية حث انزيمات الفينول والبيروكسديز والفينول اكسيديز والسوبر اوكسديز والكايتنيز بواسطة عزلة *Psudomonas fluorescens* ضد *M . graminicola* على الرز وجد ان نشاط الانزيمات اعلى في النباتات المعاملة بالبكتريا كما اشارت البيانات الى تأثير هذه الانزيمات في التقليل بالاصابة بالديدان بشكل ملحوظ ان بعض اجناس *Pseudomonas ,Bucillus , Rhizobium , Azatobacter* لها القدرة على استحثاث المقاومة في العائل ضد المسببات الممرضة خلال تعرضه لها كما يلاحظ زيادة في نشاط االنزيم البيروكسيديز الذي يرتبط ارتابطا طرديا مع المقاومة المستحثة وعادة تؤثر PGPR على نمو النبات بطريقة مباشرة وغير مباشرة حيث تشمل التاثيرات المباشرة قدرتها على تحفيز النبات من خلال جاهزية العناصر الغذائية اما الطريقة الغير مباشرة من خلال انتاجها مواد ايضية مثل المضادات الحيوية والمواد المخلبية او انتاج سيانيد الهيدروجين والتي تعمل على تثبيط نمو المسببات الممرضة للنبات والكائنات الدقيقة

الضارة. حيث تستعمر منطقة الجذور و حول الجذور(Rhizosphere)العديد من الانواع البكتيرية والفطريات والتي لها دور في نمو وتطور اشجار الغابات والخضر والمحاصيل الاخرى فضلا عن احداثها تاثيرات في تحسين انبات البذور والحصول على بادرات نشطة وزيادة معايير النمو والتزهير وزيادة محتوى النبات من البروتينات والكلوروفيل فضلا عن دورها في تجهيز النبات بالعناصر الضرورية كالفسفور والكبريت وانتاج الهرمونات النباتية [38] و [26] تبين نتائج الجدول رقم 3 ان معاملة نباتات الطماطة با نواع البكتريا قيد الدراسة زيا دة في كمية الفينولات الكلية حيث بلغت اقصاها في 7 ايام ثم بدأت بالانخفاض باليوم ال 2 وقد ابدت النتائج تفوق الخليط الحيوي على تحفيز تركيز المركبات الفينولية. و تباينت الا نواع البكتيرية في كمية الفينولات المتراكمة ويرجع هذا التباين في مقدرة البكتريا على التحفيز ربما يعود الى كمية المركبات الايضية الثانوية التي تفرزها البكتريا حيث ان هذه المركبات تعمل على تنشيط آليات الدفاع في النبات وهذا ما اشارت اليه دراسات عديدة من ان كثيراً من الاجناس البكتيرية المعزولة من محيط الجذور تمتلك المقدرة على استحثاث مقاومة جهازية في النبات يرافقها تراكم المركبات الفينولية وارتفاع نشاط انزيمات البيروكسيديز وبروتينات الامراضية يبرزدور انزيم البيروكسيديز في مقاومة النبات ضد الممرضات من خلال الاتحاد مع بيروكسيد الهيدروجين لتحطيم انزيم البكتينيز في جدار الخلية الفطرية [36] ،يلعب انزيم البيروكسيديز دورا في العديد من العمليات الفسلجية في حياة النبات من البذرة وحتى الشيخوخة من خلال تحفيز تفاعلات الاكسدة والاختزال وله نظائر عديدةحيث يعمل هذا الانزيم على تحفيز التفاعلات النهائية في تصنيع اللكنين وبيروكسيد الهيدروجين الضرورية في اعاقة وكبح نشاط المسببات المرضية،حيث يقوم بتحفيز اكسدة المواد المانعه للهيدروجين بوجود بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 لانتاج جذور حرة تكون سامة للمسببات المرضية فضلا عن دوره في اكسدة الفينولات وتحويلها الى مواد اكثر سمية تدعى الكيتونات [2][34] .

المصادر

1- ابو غربية ،وليد ابراهيم . 2010.نيمانودا النبات في البلدان العربية . الجامعة الاردنية – دار وائل للنشر .ص. 1242

2- الدليمي ، اسماعيل عباس جديع .2000. تقويم كفاءة البكتريا *Pseudomonas fluorescense* في استحثاث مقاومة جهازية في نبات الخيار ضد الفطرين الممرضين *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitz والـ *Pseudoperonospora cubehis* (Berk & Curt) Rostow اطروحة دكتوراه . كلية الزراعة . جامعة بغداد.

3- ذياب،نعيم سعيد .2012.استخدام صخر الفوسفات والسوبر فوسفات واضافة المخصبات الفطرية والبكتيرية في نمو وحاصل البطاطا .اطروحة دكتوراه.كلية الزراعة .جامعة بغداد .

4- مطلوب ،عهد عبد علي. 2012 . تحديد مسببات تعفن. جذور وقواعد سيقان الفاصوليا وتقويم فعالية بعض عوا مل المكافحة الاحيائية في مقاومتها . اطروحة دكتوراه –جامعة – بغداد كلية الزراعة .182 ص.

5- Anita, B. and Samiyappan, R. (2012) Induction of systemic resistance in rice by *Pseudomonas fluorescens* against rice root knot nematode *Meloidogyne graminicola*. J. of biopesticide. 5: 53-59.

6- Anwar-ul-Haq, M., Anwar, S. A., Shahid, M., Javed, N., Khan, S. A. and Mehamood, K. (2011). Management of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by plant growth promoting rhizobacteria on tomato. Pakistan J. Zool. 43(6):1027-1031.

7- Bakker , P. A. H. M. ; C. M. J. Pieterse and L. C. Van Loon . 2007 Induced systemic resistance by *Pseudomonas fluorescent.* Phytopathology. 97:239-243.

8- Bakker,P .A. H.M.; L.X,Ran ; C.M.J. Pieter s and Van Loon L.C., 2003. Understanding the involvement of rhizosphere bacteria mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases . Can. Journal Plant Pathology. 25-5-9.8-

9- Byrd, D.W., T. Kirkpatrick, and K.R. Barker,1983. An improved technique for clearingand staining plant tissues for detecting of nematodes. J. Nematol. 15, 142–143

10- EI-Nagdi, W.M.A.E. and M.M.A. Youssef, 2013 . Comparative efficacy of garlic clove and castor seed aqueous extracts against the root – knot nematode , *Meloidogyne incognita* infecting tomato plants . Journal of plant protection research 53(3)285-288

11- Fokkema , N. J. .1995. Strategies for biocontrol of foliar fungal diseases. Environmental biotic factors in integrated plant disease control (Ed. by M. Manka) Polish phytopathological society.P69-79.

12- Francis, I., M.Holsters, and D .Vereecke. 2010. The Gram-positive side of plant-microbe interactions. Environmental Microbiology. Vol. 12, No. 1: 1-12

13- Glick, B. R.;, Todorovic, B. ; Czarny, J. ; Cheng , Z.; Duan,J.and. McConkey, B . (2007). Promotion of plant growth by bacterial Acc deminase. Crit. Rev. Plant.

14- Higa, T. 1998. Effective Microorganisms for more sustainable agriculture , environment and society. Proceeding of the 4th international. conf. on kyusei Nature farming Paris-France.

15- Hillel , D. .2005. Plant Growth Promoting Bacteria. Elsevier. Oxford. U.K. P 103-115

16- Hussey, R. and Barker, K. (1973) A comparison of methods of collecting inocula of Meloidogyne spp., including a new technique. Pl. Dis. Rep., 57:1025–1028.

17- Jakab, G., V. Cottier, V. Toquin, G. Rigoli, L. Zimmerli, J. P. Metraux, and B. Mauch–Mani, 2001. β – Aminobutyric acid – induced resistance in plants. Eur. J. plant pathol. 107: 29

18- Jamil , B. .2007. Isolation of *Bacillus subtilis* MH-4 from Soil and its Potential of Polypeptides production. PAK. Jour. Pharm Sci. 20: 26-31

19- Khan, I.U. Haq, and A. Safdar ,2011. Use of plant extracts as bare dip root treatment for the management of *Meloidogyne incognita*. Pak. J. Phytopathol. 23 (1) 9–13.

20- Landa , B. B. ; H. A. E. Dewerd; B.B.Mespadden-Gardener and D.M.Weller .2002. Comparison of three methodes for monitoring populations of different

genotypes of 2,4- diacetylphloroglucinol producing *Pseudomonas fluorescens* in the rhizosphere. Phytopathology. 92:129-137

21- Latha , P. ; T. Anand ; N. Ragupathi ; V. Prakasam and R. Samiyappan .2009. Antimicrobialactivity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and zimmu leaf extract against *Alternaria solani*. Biological Control. 50:85–93.

22- Mali , G. V. and Bodhankar M. G. .2009. Anti fungal and Phyto hormone production potential of *Azotobacter chroococcum* isolates from groundnut(Arachis hypogea) Rhizosphere.Asian J.Exp.Sci.23:293-297.

23- Meena, R.K., V. Patni, and D.K. Arora. 2008. Study on Phenolics and Their Oxidative Enzyme in Capsicum annuum L. infected with Geminivirus. Asian J. Exp. Sci. 22(3): 307-310.

24- Osman, H.A., M.M.A .Youssef, A.Y. El-Gindi, H.H .Ameen, N.A. Abd-Elbary, and A.M.S, Lashein,2012. Effect of salicylic acid and *pseudomonas fluorescens* against the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* in eggplant using split-root technique. Pakistan J. Nematol. 30:101-113.

25- Qiao, K., H. Zhang, H. Duan, H. Wang, X. Xia, D. Wang and K. Wang. 2013. Managing *Meloidogyne incognita* with Calcium Phosphide as an alternative to methyl bromide in tomato Crops. Scientia Horticul turae. 150: 54 – 58.

26- Saharan , B. S. and Nehra V. .2011. Plant growth promoting rhizobacteria: A critical review. Life Sciences and Medicine Research, LSMR-21.30 Pp.

27- Salgado, S.M.L., L.H.C.P. Silva ,2005. Potencial da indução de resistência no controle de fitonematoides. In: Cavalcanti LS, Di Piero RM, Cia P, Pascholati SF, Resende MLV, Romeiro RS. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba: FEALQ, pp. 155-165

28- Siahpoush, S., N. Sahebani, and H. Aminian. 2011. Change of some defense compounds of cucumber treated with *Bacillus cereus* and salicylic acid against Meloidogyne javanica. J. African Journal of Plant Science, 5 (14): 829-834.

29- Silva, L.H.C.P., J.R. Campos, M.R. Dutra , V.P. Campos, 2004 .Aumento da resistência de cultivares de tomate a *Meloidogyne incognita* com aplicação de acibenzolar-S-meltil. Nematol. Bras. 28:199-206.

30- Silva, L.H.C.P., J.R. Campos, V.P. Campos, M.R. Dutra, 2002. Época de aplicação do acibenzolar-S-metil e da abamectina no controle de *Meloidogyne* sp. em tomateiro. Fitopatol. Bras. 27:194.

31- Silva, R.V, R.D.L. Oliveria, K.J.T Nascimento , and F.A. Rodrigues, 2010. Biochemical responses of coffee resistance against *Meloidogyne exigua* mediated by silicone. Plant Pathol. 59:586-593

32- Sikora, R. A. and E. Fernandez (2005) Nematode parasites of vegetables, in: plantNew parasitic nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture, CAB International, York. 319-392 .

33- Siddiqui, Z. A., Iqbal, A. and Mahmood, I. (2005). Effects of *pseudomonas fluorescens* and fertilizers on the reproduction of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. J. of Applied soil Ecology. 16: 179-185.

34- Siddiqui, I. A., Shaukat, S. S., Sheikh, I. H. and Khan, A. (2006). Role of cyanide production by *Pseudomonas flourscens*.

35- Van Loon, L. C., M. Rep, and C. M. J. Pieters.(2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annual Review of J. Phyto pathology, 44: 135-162.

36- VanLoon, L.C.(2001). Systemic induced resistance. In A.J. Slusarenko, R.S.S. Fraser, and L.C. VanLoon (Eds), Mechanisms of resistance to plant disease (pp.521-574) Dordecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

37- Taylor A. L. and J. N. Sasser. (1978). Biology. Identification and control of root – knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) Coop. Pub. Dep. Plant pathol. North Carolina state Univ., and U.S. Agency. In. T. Dev. Raleigh, N. C. PP. 111.

38- Vessey , J. K.(2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil 255:571-586.

39- Yao , A.V. ; S. Karimov ; H. Bochow ; U. Boturov ; S. Sanginboy and A. Sharipov .(2006). Effect of FZB24 Bacillus subtilis as biofertilizer on cotton yields in field test. Archives of Phytopathology and Plant Protection. 39:323-328.