المكافحة الاحيائية لديدان تعقد الجذور *Meloidogyne* SP على نبات الطماطة ببعض الانواع البكتيرية *Pseudomonas fluorescens,* و *Azotobacter chroococcum* *Streptomyces sp*

استبرق محمد عبد الرضا كنعان فرقد عبد الرحيم عبد الفتاح
جامعة كربلاء / كلية الزراعة / قسم وقاية النبات جامعة بغداد / كلية الزراعة / قسم وقاية

المستخلص

هدفت هذه الدراسة الى عزل و تشخيص بعض انواع البكتريا المفيدة من التربة المحيطة بجذور بعض الادغال و اختبار كفاءتها في تثبيط فقس البيض و حيوية اليافعات لديدان تعقد جذور *Meoidogyne* spاضافة الى كفاءتها في نسبة انبات البذور و و دليل تعقد جذور نباتات الطماطة. اظهرت الدراسة امكانية عزل البكتريا *Pseudomonas fluorescense* و*Azotobacter chroococcum* و *Streptomyces sp* من الترب المحيطة بجذور الادغال المتمثلة (الشوفان البري *Avena fatua L* وام الحليب L *Raphanus raphanistrum*) و التي شخصت بالاعتماد على الصفات المظهرية والمجهرية و شكل الخلايا و تفاعلها مع صبغة كرام فضلا عن ا لاختبارات البايوكيمياوية.

بينت النتائج امكانية البكتريا المعزولة على اذابة الفسفور و انتاج انزيمي الاوكسيديز و الكايتنيز و كذلك مقدرتها على تحمل الملوحة و اسالة الجيلاتين اضافة الى قابليتها على الحركة الانتقالية. كما اظهرت هذه الانواع و*Pseudomonas fluorescense* *Streptomyces* sp. و *Azotobacter. chroococcum* كفاءة في تثبيط بيوض الديدان مختبريا، اذ بلغ معدل النسبة المئوية لفقس البيوض خلال 72 ساعة 58.88 ، 37.46 و 45.5 %، على التوالي. اما بالنسبة لمعاملة الخليط الحيوي، فقد بلغت النسبة المئوية لفقس البيوض 64.07% و التي اختلفت بفارق معنوي عن معاملة المقارنة التي بلغت 0.00%. اوضحت نتائج التجارب الحقلية ان معاملة البذور بالانواع البكتيرية ادت الى رفع نسبة الانبات في جميع المعاملات قياسا بمعاملة المقارنة اذ بلغت نسبة الأنبات المعاملة ..*P fluorescense* 85.0 % تلتها معاملة الخليط الحيوي (83.3 %)، كما لم يلاحظ وجود فرق معنوي بين معاملة الـ *Pseudomonas fluorescens* و معاملة الخليط الحيوي.

اعطت المعاملة بالبكتريا *Pseudomonas fluorescens* اقل دليل لتعقد الجذور وصل 1.9% تلتها المعاملة ' Bio-mixture الخليط الحيوي (2.27) والبكتريا *Streptomyces* ، في حين كان اعلاها عند المعاملة بالبكتريا *Azotobacter chroococcum* و الذي بلغ 3.59 اما المقارنة فقد بلغت4.66 .اشارت النتائج هذه الدراسة الى امكانية استعمال الانواع البكتيرية الانفة الذكر في المقاومة الاحيائية و ادخالها في برامج المكافحة المتكاملة لمقاومة مرض تعقد الجذور على الطماطة.

The biological control on root-knot nematode *meloidogyne* spp on tomato by using some specis of bacteria *Pseudomonas fluorescens , Azotobacter. chroococcum and Streptomyce sp*

Abstract

This study was conducted to isolate and identify some bacterial species from the soil surrounding the roots of some weeds *Avena fatua L* . and *Raphanus raphanistrum* L. and to test their antagonistic efficiency in the inhibition of egg hatching and the vitality of juveniles of root knot nematode *Meloidogyne* spp. in addition to their efficiency in some of growth parameters, severity of infection and root gall index in tomato plants.

Results showed the possibility of isolated bacteria to dissolve phosphorus and production of oxidase and chitinase enzymes as well as its ability to tolerate the salinity and liquefy gelatin in addition to its ability for transition movement. Laboratory results were indicated that *P. flurescens, Azotobacter .chroococcum* and *Streptomyces* spp. were effective in reducing the percentages of hatched nematode eggs, during 72 hours, that were 58.88, 37.46 and 45.50%, respectively.

It was also found that the percentage of egg hatching reached 64.07% upon using the bio-mixture that significantly differed from the control treatment that was 0.00%. The results of field trials showed that the treatment of seed witht the genaus of bacteria led to raise the percentage of germination in all treatments compared to the contro ltreatment that gave germination percentage of *P. flurescens* 85.0%, followed by treatment of the bio-mixture (83.3%), however no significant difference were observed between the *P. flurescens* treatment and the treatment of bio-mixture.

It was also noticed that the treatment with *P. fluorescens* gave less disease index (1.9%) followed by the treatment with bio-mixture (2.27) and then the bacteria *Streptomyces* spp., whereas the highest disease index (3.59%) was found when treating with the bacteria *Azotobacter . chroococcum*.. Results obtained in this study indicate the possibility of the use of aforementioned bacteria in integrated pest management programs to control the root gall disease in tomato.

المقدمة

يعد العراق بيئة مناسبة لانتشار نيماتودا تعقد الجذور لتوفر المناخ المعتدل والعائل المناسب خلال فصول السنة ، وتزداد أعداد و أضرار النيماتود تحت ظروف الزراعة المحمية لما توفرها هذه الطريقة الزراعية من ظروف ملائمة لنشاط ا نيماتودا تعقد الجذور Root knot nematode (RKN) اذ تسبب خسائر أقتصادية عالية في الطماطةو تمتاز هذه الافة بمداها العائلي الواسع وبكفاءتها التناسلية العالية مما جعلها من الافات صعبة المكافحة (1) استخدمت وسائل كثيرة ومتنوعة للحد من ضرر هذه الافة مثل تعديل التربة والتعقيم الشمسي والدورات الزراعيةلكن الضرر يزداد بسبب الزراعة المتكررة في نفس التربة

ونتيجة لتزايد المخاوف البيئية والصحية من أستخدام المبيدات المتخصصة على الديدان الممرضة للنبات ، وكذلك أرتفاع تكلفتها و طول فترة بقاءها في التربة (19) فقد حظر أستعمال مبيدات ديدان النبات في الدول.

كل هذه الأسباب حثت العاملين الى استنباط انماط جديدة وامنة للسيطرة على نيماتود تعقد الجذور ان التوجه الجديد في العالم هو ايجاد طرائق واساليب اخرى بديلة ومرادفة للمبيدات تكون امينة على الانسان والبيئة منها استعمال البكتريا والفطريات الموجودة حول جذور النباتات والتي لها دور مضاد لكثير من المسببات المرضية ولاسيما المستوطنة في التربة اذ اثبتت كفاءة في المكافحة الاحيائية ولنجاح العامل الحيوي بهذا الاتجاه لابد أن يمتلك بعض المقومات كونه امينا على الانسان والبيئة وسهل الاكثار ومتخصص على الافة وقدرته على تحمل الظروف البيئة فضلا عن قدرته على البقاء فترة طويلة نسبية في البيئة فضلا عن قدرته على ان يحلل جدار خلايا المسبب المرضي (9) . اذ يحاط النبات بطيف واسع من الأحياء بعضه له اهمية كبيرة في حماية النبات من الممرضات وخاصة التي تكون مسبباتها المرضية من احياء التربة كالفطريات والبكتريا والديدان الممرضة للنبات والتي يمكن استخدامها في خفض نشاط الديدان وتقليل الاصابة بهذه الافة وتكون خالية من الاثار الجانبية ولا تحتوي على متبقيات سامة اذ اثبتت المكافحة الاحيائية باستعمال العديد من اجناس البكتريا المحفزة للنمو (Plant Growth PromotingRhizobacteria) كفاءة عالية ضد العديد من المسببات المرضة للنبات اذا تعمل (PGPR) على استعمار الجذور وما حولها 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 (23) ان اساس عمل هذه الاحياء رغم تنوعها هو تقليل كمية اللقاح الاولي والثانوي للمسبب المرضي ومنع اختراقة للعائل وتقوية النبات وبالتالي زيادة المقاومة المرض والمتضمنة الفطريات والبكتريا (9) اذتمتلك هذه الكائنات الدقيقة قدرة تضادية عالية تتواجد بكثرة في الترب الكابحة او ما تعرف بالترب ذات الاعاقة الذاتية لممرضات التربة (suppressive soil) اما (5) استخدم البكتريا المحفزة للنمو (PGPR) (*P.*SP *B.*.SP) لتعزيز النمو في النباتات التابعة للعائلة البقولية حيث احدثت تخفيض كبير بنسبة العدوى *M.incognita* على العدس وأثرت على معايير النمو من حيث طول الساق ووزن المجموع الخضري الطري والجاف وكذلك وزن الجذور الطري والجاف وعدد العقد لكل نبات مقارنةً مع النباتات غير المعاملة كما ادت الى خفض العقد الجذرية بنسبة 42.79 في النباتات الملقحة بـ. *M.incognita*. كما ابدت انواع من الجنس *Pseudumonas* فعالية عالية في مكافحة الديدان الثعبانية اذ ادت معامله شتلات الطماطه ببكتريا *P.fluorescens* و*P.putida* الى خفض اعداد اليافعات والاناث وكتل بيض *M.incognita* والعقد في جذور الطماطة فضلا عن زياده معايير النمو (6).

اشار (21) الى ان البكتريا *P.f* سلالة CHAO تنتج سيانيد الهيدروجين (HCN) كأحد نواتج الايض الثانوي الذي له دور في المكافحة البايولوجية لهذه السلالة حيث اوضحت دور سيانيد الهيدروجين كعامل تضاد في المكافحة البايولوجية ضد ديدان (*M.javanica*) حيث تم فلترة (HCN) واضافتها الى N.B معدل مع الجلاتين ادى الى تثبيط فقس البيض وموت يرقات الطور الثاني في المختبر حيث ان تنمية البكتيريا تحت ظروف الاوكسجين والضغط العالي اعطت افضل تثبيط للنيماتود مقارنة تحت ظروف الاوكسجين الزائد .في

دراسة لايجاد تقنيات بديلة وادخالها في برامج المكافحة الاحيائية وتحفيز نمو النباتات ،ان الاستفادة من البكتريا *A . chroococcum* . في برامج المكافحة الأحيائية لا تنحصر فقط في تثبيت النتروجين الجوي الذي يزيد من خصوبة التربة ، فقد اشارت العديد من الدراسات الى أهمية هذه البكتريا في انتاج العديد من المركبات التي لها اهمية كبيرة في مكافحة الامراض النباتية ومنها منظمات النمو Indole Acetic Acid (IAA) و Gibberellins وCytokinins ومركبات Siderophores وكذلك تستطيع انتاج مجموعة فيتامين B مثل Biotin و Riboflavin وThiamine و Pantothenic acid و Niacin بالاضافة الى انتاج العديد من الانزيمات ومن اهمها Hydrolytic Enzymes التي لها القدرة على تحليل جدران خلايا الفطر الممرض ولا تؤثر في جدران خلايا النبات ومن هذه الانزيمات انزيم Chitinase و Laminarinase وبالتالي فانها تسبب زيادة في نمو النبات وحاصله اذ وجد (10) ان للبكتريا *A. chroococcum* دورا كبيرا في افراز بعض الاحماض الامينية مثل Arginine و Tryptophan glutamic acid و Methionine من خلال نموها في الوسط الزرعي عند استخدام مصادر مختلفة من الكاربون تحت الظروف الهوائية وفي دراسة اخرى وجد ان هذه البكتريا تنتج مركبات تخلب الحديد Siderophores وهي مواد ذات وزن جزيئي واطئ تنتجها الخلية البكتيرية تحت ظروف نقص عنصر الحديد في التربة او الوسط الزرعي وهذه المواد لها قدرة عالية للأرتباط بأيون الحديديك مكونة معه معقدات ترتبط هذه المعقدات بالغشاء الخارجي للبكتريا بوساطة مستلمات بروتينية تقوم بسحب المعقدات الى داخل الخلية ليتم فصل الحديد عن siderophore ليتحرر الاخير للارتباط مع الحديد مرة اخرى، وهذه العملية تؤدي الى زيادة جاهزية عنصر الحديد للنبات ومن ثم زيادة نموه وانتاجيته (4) , شخص (22) 6 عزلات للبكتريا *Streptomyces* واختبر كفاءتها في انتاج الانزيم extracellular وحامض ال IAA وقابلية العزلات على اذابة الفسفورواستعمار الجذور تحت ظروف ال Ph المختلفة وتحملها لمستويات ملحية مختلفة اذ ابدت جميع العزلات قابلية على انتاج amaylas catalase,lipase, IAA ماعدا العزلة (AC-92) ابدت جميع العزلات قدرة عالية على وتحليل الكايتين والسليلوز اظهرت اربعة غزلات القابلية على انتاج الsiderophores في حين ابدت جميع العزلات القدرة على استعمار الجذور اذ اعتبر الجنس *Streptomyces*عامل مقاومة حيوية فضلا على انها عامل محفز للنمو

المواد وطرق العمل

جمع عينات التربة لعزل الاحياء البكترية المرافقة لجذور الادغال :

تم اختيار نوعين من الادغال (الشوفان البري وام الحليب) من حقول كلية الزراعة / جامعه بغداد (ابو غريب) اخذت التربة المحيطة بالجذور لسبع عينات للتربة بصورة عشوائية ثم مزجت التربة جيدا باليد لتتجانس اذ اخذ 10 غم من مسحوق التربة واضيف اليها 90 مل pepton water والمكون من 5 غم pepton و5 غم treptone و 5 غم sodium chloried وحسب طريقة (18) وضعت في رجاج كهربائي بسرعة 120 دورة / دقيقة لمدة نصف ساعة اخذ 1 مل من الرائق واضيف الى 9 مل من محلول ملحي بتركيز 0.85 % الى حين الوصول الى التخفيف المطلوب واخذ1 مل من التخفيف العشري الثاني ونشر على وسط المرق المغذي الصلب Nutrient agar المعقم والمصبوب في اطباق بتري معقمة وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 30^{o}مئوية

لعزل البكتيريا واتبعت الطريق نفسها لعزل البكتيريا*Streptomyces , Azotobacter*, على الاوساط الزرعية الانتخابية لكل منها تم تشخيص الاجناس البكتيرية في مختبر الاحياء المجهرية التابع لوزارة العلوم والتكنلوجيا اعتمادا على الصفات الزرعية للمستعمرات البكتيرية النامية على اوساطها الانتخابية مثل اللون والشكل ولمعان ولزوجتها وشكل الخلايا واستجابتها لصبغة كرام وطريقة تشكلها وتجمعها تحت المجهر .

عزل وتنقية البكتريا ا*P.fluorescens* من التربة

استعمل الوسط الغذائي المتخصص Psuseudomonas Agar Base والموصوف من قبل (26) ,1982 والمتكون من Pancreaic digest of gelatin 16 g و Magnesium anhydrous 1.4g chlorideو Casein enymic hydrolysate 10g و Potassium sulphate10g و Agar, 11g Water 500ml لقح الوسط بالبكتريا النامية على الوسط N.A بطريقة التخطيط وحضنت الاطباق لمدة 72ساعة و 30سيليزية وبعد انتهاء مدة الحضن تم اخذ جزء من النمو البكتيري بواسطة ابرة التلقيح (loop) ووضعت على شريحة زجاجية معقمة صبغت بصبغة كرام ،.

الصفات المجهرية

تم تحميل شرائح زجاجية نظيفة بغشاء من البكتريا النقية ثم جرى تصبيغها بصبغة كرام وفحصها بالمجهر الضوئي وملاحظة استجابة البكتريا للصبغة.

عزل البكتريا *A.chroococcum* من التربة وتنقيتها :

اخذ 1مل من خليط التربة المحيطة بجذور الادغال واضيف الى انبوبة ثانية حاوية على 9مل ماء معقم ليصبح التخفيف 10^2 وهكذا للحصول على التخافيف المطلوبة ، وتم تلقيح انابيب اختبار حاوية على 9 مل من الوسط السائل Sucrose Mineral Salts (S.M.S) باضافة 1مل من كل تخفيف من التخافيف المحضرة سابقا وبا ربعة مكررات لكل تخفيف ، ثم حضنت الانابيب على درجة حرارة 28±1مئوية لمدة 2–3ايام بعدها فحصت الانابيب .ويعد وجود الغشاء البني المتكون على سطح الوسط دليلا على نمو بكتريا *Azotobacter* (2) وتحت ظروف معقمة ,تم اخذ لقاح البكتريا بوساطة ابرة التلقيح ذات العقدة (Loop) من سطح الوسط المتكون عليه الغشاء البني ولقح به اطباق بتري حاوية على الوسط Sucrose Mineral Salts Agar (S.M.S.A) بواقع اربعة مكررات لكل انبوب ، حضنت بعدها الاطباق على درجة حرارة 28±1 مئوية لمدة 2–3 يوم ، واعيد الزرع لثلاث مرات متتالية بهدف الحصول على مستعمرات نقية. حفظت العينات في وسط (S.M.S.A) الذي وصفه (25) وا لمتكون من :

المــادة	الكمية (غم / لتر)	المــادة	الكمية (غم / لتر)
K_2HPO_4	0.3	$NaMoO_4.2H_2O$	0.005
KH_2PO_4	0.7	Sucrose	20.0
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	Yeast extract	5.0
$CaCl_2.2H_2O$	0.1	H_2O	1000ml
$FeSO_4.9H_2O$	0,05	Agar	0.02

تشخيص البكتريا *A.chroococcum* :

تم تشخيص جنس ونوع البكتريا بالاعتماد على لصفات المظهرية والمجهرية والاختبارات الكيموحيوية وحسب ما جاء في (13) و (24) وكما يأتي :

الصفات المظهرية :

تضمنت دراسة الصفات المظهرية للعزلات البكتيرية النقية النامية على الوسط (S.M.S.A) في اطباق بتري ، ومنها طبيعة النمو وشكل المستعمرة ولونها وقوامها وشكل الحافة وسرعة النمو وقدرتها على افراز صبغات فضلا عن حجم المستعمرة.

عزل وتشخيص البكتيريا *Streptomyces*

استعمل الوسط الزرعي الموصوف من قبل (17) والذي يتكون من 4 غم Yeastexract peptone5g و20 g Maltextract و4g Glucose و17g Sucrose و10G Agar و 1L Distle water عقم الوسط بالموصدة وصب في اطباق بتري لقح الوسط من المستعمرات البكتيرية النامية على وسط N.A وحضنت على درجة حرارة 25^0 مئوية ولمدة 7 ايام واجريت عليها اختبارات قابليتها على تحمل الملوحة وقابلتها على انتاج انزيم الكتليز والاوكسيديز وقابليتها على الحركة.

لقاح الديدان

جمعت كتل البيض egg mass من احد البيوت البلاستيكية في جامعة كربلاء –كلية الزراعة من نباتات الفلفل والباذنجان والطماطة حسب طريق (14) 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 هيبوكلورات 0.5 % لاذابة الكتل الجيلاتينية والحصول على البيض ثم وضعت في مناخل تحت مصدر للماء الجاري للتخلص من اثار المعقم واليرقات الفاقسة جمع الراشح في المنخل الاخير 200 مش تم سحب نصف مل من الراشح الحاوي على 500 بيضة بواسطة ماصة ووضعت في اطباق بتري بواقع 3 مكررات لكل معامله ثم تم تحريك الطبق للتخلص من ماء الراشح تم حضرتركيز 10^7 لكل نوع من انواع البكتريا مع معاملة الخليط Mix واضيف بمقدار 5 مل لكل طبق

،اما معاملة المقارنة اضيف لهاالماء المقطر المعقم حضنت في درجة حرارة 30مئوية ثم عد البيض الفاقس بعد 1,2,3 ايام وحسبتالنسبة المئوية لتثبيط فقس البيض وفق المعادلة التالية حسب المعادلة التالية :-

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

تاثير البكتريا على حيوية اليافعات

وضعت 250 يافعة في طبق بتري اضيف لها 5 مل من كل نوع من انواع البكتريا ومعاملة الخليط من الانواع البكتيرية الثلاثة وبتركيز 10^7وبواقع ثلاث مكررات لكل معاملة وضعت الاطباق بالحاصنة ثم تم حساب اليرقات بعد 1,2,5 ايا م مع تزويدها بالاوكسجين بواسطة القصبة. حيث عدت اليرقات ميتة بعد لمسها بالابرة واستقامة اليافعات الميتة ويغير لونها الى اللون البني وعدم حركتها عند اخراجها ووضعها في الماء لمدة ثلاث ساعات استعملت 3 مكررات لكل معاملة اضافة الى معامله MIX اما معاملة المقارنة فقد استخدم الماء المعقم المقطر وتم حساب حيوية اليرقات 1,2,3 يوم

$$\text{النسبة المئوية للموت} = \frac{\text{عدد الافراد الميتة}}{\text{العدد الكلي للافراد}} \times 100$$

تم اختيار نبات الطماطة لاهميته في العراق وكثرة زراعته في البيوت المحمية ولحساسيته العالية لهذا المرض اعتمد صنف سوبر ميريموند لحساسيته العالية من انتاج شركة (Clous,Ffraixe) .

التجربة الحقلية

جهزت تربة مزيجية من الرمل والبتموس بنسبة 2:1 عقمت بجهاز الموصدة Autoclave في درجة حرارة 121سيليزية وضغط 1جو لمدة ساعتين وليومين متتاليين نقلت التربة الى البيت اللاستيكي عبئت الاصص زنة 1كغم نقعت بذور الطماطة المعقمة سطحيا بهايبوكلورات الصوديوم تركيز6% 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 مئوية ولمدة 24 ساعة وبتركيز 10^7 وب 20 بذرة لكل مكرر وطبقت المعاملات الاتية :-

1- بذور طماطة + ***P.fluorescens*** .

2- بذور طماطة + ***A. chroococcum***

3- بذور طماطة + ***Streptomyces*** **sp**,

4- بذور طماطة + خليط الانواع البكتيرية

5- بذور طماطة + ماء

وجرى متابعة الانبات وتسجيل البيانات طول مدة التجربة واخذت المعايير الاتية :

النسبة المئوية للانبات كما في المعادلة التالية :-

$$\text{النسبة المئوية للانبات} = \frac{\text{عدد البذور النابتة}}{\text{العدد الكلي للبذور}} \times 100$$

دليل الحيوية vigour Index وكما في المعادلة التالية :-

دليل الحيوية = طول البادرة الكلي (طول الساق + طول الجذر) × النسبة المئوية للانبات

كفاءة الاحياء في معايير النمو

خفت النباتات في التجربة السابقة الى نباتيين في كل مكرر وبعد اسبوعين قلعت النباتات وجلبت الى المختبر غسلت جيدا لازالة الاتربة تم فصل المجموع الجذري عن الخضري وقيست اوزانهم كلا على حدة فضلا عن قياس طول الساق لكل المعاملات وضعت النباتات على ورق نشاف في درجة حرارة المختبر و تعليمها وبعد ثبات الوزن تم اخذ الوزن الجاف لكل من المجموع الخضري والمجموع الجذري كلا على حدا (غم/ نبات) وحيوية الساق وهي حاصل ضرب(طول النبات× النسبة المئوية)

تاثير معاملة نباتات الطماطة بالاحياء الدقيقة في دليل تعقد الجذور وبعض معايير النمو

تم معاملة النباتات بعمر 4-3 اوراق حقيقية بمعلق يرقات الطور الثاني بعد التاكد من حيوية اليافعات بواقع 500 يافعة مل بعمل 5 حفر حول الجذورو بوساطة ماصة وبعد مرور 24ساعة تم حساب عدد اليرقات المخترقة وبعد 40 يوما تم حساب معايير النمو للنباتات المعاملة فضلا عن حساب شدة الاصابة ودليل تعقد الجذوراجريت التجربة في تربة تم تعقيمها بلموصدة وتربة غير معقمة تم متابعة التجربة والري عند الحاجة والتسميد

اتبع دليل (10)

1- لاتوجد عقد على الجذ ر
2- العقد اكثرمن1%-25%من مساحة الجذر
3- العقد اكثر من 26%-50 % من مساحة الجذر
4- العقد اكثرمن 51%-75%من مساحة الجذر
5- العقد من 76%-100% من مساحة الجذر تم حساب دليل تعقد الجذور بعد مرور 45 يوما من التلقيح (عقدة لكل نبات)

النتائج والمناقشة

جدول (1) الاختبارات البايوكيميائية والتفريقية للأجناس البكتيرية .

الاجناس البكتيرية	صبغة كرام	Nacl 7.5%	Motility	Oxidize	تحلل النشأ	تحلل الجيلاتين	كايتين	الكاتيليز	الحرارة 24C°
Psudomonas . flurescenas	_	+	+	+	+	+	+	+	+
Streptomyces sp	+	+	–	–	+	+	+	+	_
Azotobacter chroococcum	–	–	+	+	+	+	+	+	+

أظهرت. البكتريا ***P. flurescenas*** على الوسط المتخصص مستعمرات لماعة متالقة ويعزى التالق لانتاجها صبغة Pyoverdin لونها كريمي مائل الى اللون الاصفر سالبة لصبغة كرام وبناءا على هذه النتائج فقد شخصت على انها النوع *P .fluorescens*. هذه النتائج مطابقة لما ذكره كل من(8) و (18) .

تشخيص البكتريا *Azotobacter* sp :

الصفات المجهرية والمظهرية

اظهرت البكتريا المنمات على وسط S.M.S.A مستعمرات لزجة كبيرة الحجم غير شفافة ولماعة وتتحول الى مستعمرات بنية مع مرور الوقت كما اشكال البكتريا تكون بيضوية الى عصوية متحركة باسواط محيطية وهذا يتفق مع (3) و (8) تبين نتائج الجدول ان العزلة البكتيرية قيد الدراسة عائدة للنوع *A.chroococcum*

تشخيص البكتريا *Streptomyces* sp :

اظهر الفحص المجهري لهذه البكتريا على الوسط الزرعي مستعمرات ذات لون احمر مائل للوردي تكون هذه البكتريا هايفات تشبه الخيوط الفطرية وتحمل سلاسل من الابواغ ويعد اللون الوردي المائل الى الاحمرصفة تشخيصية رئيسية لهذه البكتريا كما انها موجبة لصبغة كرام ليس لها القدرة على الحركة وليس لها القابلية على انتاج انزيم الاوكسيديز وعدم قدرتها على النمو بدرجات الحرارة اكثر من 25مئوية (19) و (20)

تأثير معاملة الاحياء على تثبيط فقس البيض .

جدول (2) تأثير البكتريا على بيض ديدان تعقد الجذور

المعامـــــلات	%لتثبيط فقس البيض			المتوسط
	24 ساعة	48ساعة	72ساعة	
P.fluorescens	52.80	67.93	55.90	58.88
A. chroococcum	36.73	53.67	35.07	41.82
Sterptomyces sp	47.82	70.83	61.13	56.59
Biomixtur	75	74.27	60.43	64.07
Control	0.00	0.00	0.00	0.00
L.S.D α 0.05	8.139	6.893	4.335	6.45

كل رقم في الجدول يمثل معدل ثلاثة مكررات . معدل البيض في كل معاملة 250 بيضة في كل مكرر استخدم التركيز 10^7 ، اما في معاملة المقارنة فقد استخدم الماء المقطر المعقم حضنت الاطباق في درجة حرارة 25 سليزية وقورنت النتائج تحت مستوىاحتمال 0.05 .

جدول (3) تأثير البكتريا على موت يافعات الطور الثاني

المعامـــــلات	النسبة المئوية للموت يافعة / يوم			النسبة المئوية للموت التراكمي
	24ساعة	48 ساعة	72ساعة	
P.fluorescens	32.50	45.97	3.3	76.7
A. chroococcum	12.50	27.17	5.8	45.5
Sterptomyces sp	24.47	33.67	6.5	56.3
Biomixtur	32.17	39.17	9.5	79.0
Control	2.17	7.33	2.1	12.5
L.S.D α 0.05	6.30	6.49	1.9	11.55

كل رقم في الجدول يمثل معدل ثلاثة مكررات . معدل البيض في كل معاملة 250 يافعة في كل مكرر

اوضحت نتائج الدراسة في الجدول رقم 2الى ان جميع الانواع البكتيرية اظهر ت كفاءة عالية في تثبيط فقس البيض وازداد هذا التأثير بعد 48 ساعة وبدأ بالأنخفاض بعد 72 ساعة وان تأثير تثبيط فقس البيض ازداد بزيادة فترة التعريض للبكتريا . اذ بلغت اعلى نسبة مئوية للتثبيط في معاملة الخليط الحيوي بلغت 64.07% تلتها معاملة ***P . fluorescen*** . تلتها المعاملة ***sterptomyces*** تلتها المعاملة ***Azotobacter*** على التوالي وبنسبة تثبيط بلغت 58.88%, 56.59% , 41.82 % وقد يعزى التثاثير التثبيطي للبكتريا

P . fluorescen . لانتاجها مجموعة من المضادات الحيوية وخاصةً Extracelluler protease الذي يؤدي الى تثبيط فقس البيوض وهذا يتفق مع ما ذكره [20] او يعود السبب الى افراز البكتريا للمادة 2,4 – diacetylphloroglucinel التي تؤدي الى قتل الديدان الثعبانية اشار (21) الى ان البكتريا *P fluorescen* . سلالة (CHAO) تنتج سيانيد (HCN) كأحد نواتج الايض الثانوي الذي له دور في المكافحة البايولوجية لهذه السلالة حيث اوضحت دور سيانيد الهيدروجين كعامل تضاد في المكافحة البايولوجية لديدان (*M.javanica*) اذ تم فلترة (HCN) واضافتها الى الوسط N.B معدل مع الجلاتين ادى الى تثبيط فقس البيض وموت يرقات الطور الثاني في المختبر (20) واعطت معاملة زراعة البكتريا تحت ظروف الاوكسجين والضغط العالي افضل تثبيط للنيماتود مقارنة تحت ظروف الاوكسجين الزائد

جدول (4) تأثير الانواع البكتيرية في معايير النمو لنباتات الطماطة صنف ميرموند

المعاملات	الوزن الطري/غم		الوزن الجاف/غم		نسبة الانبات %	معدل طول الساق/سم	معدل حيوية الساق
	الخضري	الجذري	الخضري	الجذري			
P.fluorescens	3.24	1.79	1.74	0.70	76.7	14.37	1092.1
A chroococcum	2.85	2.32	1.55	1.00	68.3	11.73	803
Sterptomyces sp	2.38	2.00	1.15	1.0 8	66.7	9.60	642
Biomixtur	3.58	3.25	2.04	1.78	75.0	15.10	1133
Control	1.97	1.77	1.34	0.943	60.0	8.43	507
L.S.D 0.05	1.104	1.385	0.440	0.640	11.99	2.021	227.6

كل رقم في الجدول يمثل معدل ثلاث مكررات حسبت نسبة الانبات خلال 10ايام من الزراعة بعد معاملتها بعالق الانواع البكتيرية لمدة 5 دقائق قلعت النباتات بعمر ثلاثة اسابيع لحساب معايير النمو

تشير نتائج الجدول رقم 4 الى كفاءة الأجناس البكتيرية في التأثير في معايير النمو اذ أدت معاملة النباتات بالبكتريا الى زيادة ملحوظة في معايير النمو قياسا بمعاملة المقارنة اذ بلغت اعلى نسبة لحيوية الساق في معاملة الخليط الحيوي ب1133 , اما اقل معدل لحيوية الساق بلغت في معاملة *Streptomyces* ب642 وقد يرجع السبب الى قدرة الأجناس البكتيرية مجتمعة على تجهيز العناصر الضرورية للنبات من خلال تحلل المواد العضوية في التربة (6) وهذا ما اكدته ا الابحاث على اهمية البكتريا كمخصبات حيوية لما لها من دور في تحسين نمو النبات من خلال جاهزية العناصر الضروريةا للازمة للنمو كالنتروجين الذي تثبته البكتريا والفسفور الذي تجهزه فضلا عن خفضها لرقم pH مما يزيد من جاهزية العناصر الصغرى وانتاجها

لهرمونات النمو كالاوكسينات والسايتوكاينينات والجبرلينات وافرازها للسموم والمضادات الحيوية لمقاومة المسببات المرضية وهذا ما جعلها احد العوامل المكافحة الحيوية ضمن الادارة المتكاملة للافات (21)

جدول (5) تأثير البكتريا في دليل تعقد الجذور وبعض معايير النمو

لمعاملات	الوزن الطري / غم		الوزن الجاف / غم		دليل تعقد الجذور
	الخضري	الجذري	الخضري	الجذري	
P.fluorescens	3.24	1.79	1.74	0.80	1.95
A .chroococcumr	2.85	2.32	1.55	1.00	3.59
Streptomyces sp	2.38	2.00	1.15	1.78	2.44
Biomixtur	3.58	3.25	3.04	1.78	2.27
N+plant .	23.1	2.15	1.3	1.53	4.66
Control	1.97	1.77	0.989	0.943	0.00
L.S.D α 0.05	1.10	1.38	0.44	o.64	0.533

كل رقم في الجدول يمثل معدل ثلاثة مكررات وبواقع نباتين لكل مكرر ، عوملت البذور بالبكتريا بتركيز 10^7)
اخذت البيانات بعمر 4–3 اوراق حقيقية .

يلاحظ من الجدول رقم 5 ان البكتريا ***P.fluorescens*** تميزت باقل دليل لتعقد الجذور1.95 تلتها معاملة الخليط الحيوي Biomixtur ربما يعود السبب لقدرة هذه البكتريا العالية على افراز الهرمونات النباتية ومجموعة من المضادات الحيوية والتي تكون سامة لاغلب مسببات الجذور وخصوصا Extracelluler protease الذي يؤدي الى تثبيط وقتل اليرقات ومنع اختراقه وحث النبات على زيادة ميكانيكية الدفاع ضد الامراض وترسيب مادة اللكنين وتثخن خلايا النبات وزيادة تحصينها ضد المسببات الممرضة الغازية للنبات مما يجعلها صعبة الاختراق (11).

المصادر

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

2- الكعبي ، حوراء نعمة حسين .**2013**. فعالية عوامل احيائية و كيميائية ضد الفطر *Fusarium solani* المسبب لمرض تعفن جذور الشليك . رسالة ماجستير . الكلية التقنية–المسيب.

3- مطلوب ،عهد عبد علي هادي .2012.تحديد مسببات تعفن جذور وقواعد سيقان الفاصوليا وتقويم فعالية بعض عوامل المكافحة الاحيائية في مقاومتها .اطروحة دكتوراه;.كلية الزراعة جامعة بغداد.

4-نجيب ، ليث مصلح ؛محمد قيس العاني ؛خلف جاسم محمد . 2007.عزل وتشخيص بكتريا التربة المنتجة للمركبات الخالبة للحديد Siderophores واثر كلوريد الصوديوم في تثبيط بعض انواع البكتريا المرضية . مجلة الانبار للعلوم الزراعية.5:5305–311.

5- **Akhtar, A., Abbasi, H. and Sharf Rushda (2012)** Antagonistic effects of Pseudomonas fluorescens and Bacillus subtilis on Meloidogyne incognita infecting Vigna mungol. International J. of Plant, Animal and Environm Sciences. 2: 55-63.

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- **Dube, B. and G. C. J. Smart, 1987.** Biological control of Meloidogyne incognita by paecilomyces lilacinus and pasturia penetrans. J. Nematol. 9:222- 227.

8- **Forbes , B. A. ; D.F. Sahm and A. S. Weissfeld .2007.** Baily and Scott's Diagnosis Microbiology . 12th ed. . Mosby Elsevier company. USA

9- **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.P69-79soil.

10- **Gonzalez-Lopez,J.; Salmeron V.; Martinez-Toledo M.V.and Ballesteros F. .1986.** Production of ouxins, gibberellins and Cytokinins by Azotobacter vinelandii ATCC 12837 in chemically defined media and daily sed soil media . Soil Biol. Biochem. 18:119-120

11- **Harman,GE.,CR.Howel and A. v iterbo,I.Chet and M.Lorito .2004.**Trichoderma species-opportunistic,avirulent plant symbionts. Nat. Rev.2:43-55

12- **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.

13- **Holt , J. ; N. R. Krieg ; P. H. A. Sneath ; J. T. Staley and S. T. Williams .1994.** Bergey's manual of determinative bacteriology. (9thEd.). Williams and Wilkins. USA.

14- **Kampfer, P.2006.** The family streptomycetaceae ,part l:taxonomy.The Prokaryotes,538-604

15- **Lakshmana , M. .2000**. Azotobacter Inoculation and Crop Productivity. In.2003. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of Rhizoctonia solani in tomato. Electronic J. Biotechnol.

6:155 – 127 Azotobacter in sustainable Agriculture. Ch.(11th ed.) Neeru Narula. India.

16- **Montealegre , J. R. ; Reyes R. ; Perez L. M. ; Herrera R. ; silva P. and Besoalin X. .2003.** Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of Rhizoctonia solani in tomato. Electronic J. Biotechnol. 6:155 – 127

17- **Miyadoh,S. 1993.**Research on antibiotic screening in Japan over the last decade:A Producing microorganisms approach A ctinomyceto-logica. 1993;9100-106

18- **Macfaddin , J. F. .2000.** Biochemical tests for identification of medical bacteria. (3rd.ed.). Williams and WillkiUSA. 912 pp.

19- **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.

20- **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.

21- **Siddiqui, I. A., Shaukat, S. S., Sheikh, I. H. and Khan, A. (2006)** Role of cyanide production by Pseudomonas flourscens CHAO in the suppression of root-knot nematode, Meloidogyne javanica in tomato. World J. of Microbio and Biotechn. 22: 641-650.

22- **Silva, L.H.C.P., J.R. Campos,A.C .Sousa 2008.**Chractererization of streptomyces with tential to promote plant growth and biocontrolV .65,p.55

23- **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.

24- **Shankarappa , T. H. and Madhav Rao A. R. .2007.** Characterization and identification of Azotobacter strains Isolated. from Mulberry rhizosphere soil. In : Handbook of Biofertilizers and Biopesticiders. Deshmukh . A.M. R.M. Khobragade, P.P. Dixit. Oxford Book Company . Jaipur, India. P 140-146.

25- **Thompson , J. P. and V. B. D. Skerman .1979**. Azotobacteraceae the taxonomy and ecology of aerobic nitrogen-fixing bacteria. Academic Press, London. 419 pp.

26- `**Wollum-II,A.G.1982.** Cultural method for soil microorganisms. In:Methods of Soil Analysis :Chemical and M icrobial Properties2ndEdn. Ed Page A.L.Miller, R.H.and Keeny.D.R.pp.718-802.Madison- Wisconson :American Society of Agronomy and Soil Science Society of America.