

فاعلية البكتريا *Bacillus licheniformis* B307 في مكافحة الأحيائية لمرض العفن الرمادي في البندورة/الطماطم المتسبب عن الفطر *Botrytis cinerea*

ياسر عقيد¹، فائزة الأطرش¹ ووليد نفاع²

(1) قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية، البريد الإلكتروني: yakeed79@gmail.com؛

(2) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

الملخص

عقيد، ياسر، فائزة الأطرش ووليد نفاع. 2019. فاعلية البكتريا *Bacillus licheniformis* B307 في مكافحة الأحيائية لمرض العفن الرمادي في البندورة/الطماطم المتسبب عن الفطر *Botrytis cinerea*. مجلة وقاية النبات العربية، 37(4): 327-334.

يعد الفطر *Botrytis cinerea* مسبب مرض العفن الرمادي، واحداً من مسببات المرض للعديد من المحاصيل، وقد تم في مرحلة سابقة انتخاب السلالة المحلية *Bacillus licheniformis* B307 كعامل مكافحة للفطر الممرض من خلال إنتاجها لأنزيم الكايتيناز Chitinase. أجريت هذه الدراسة لتوصيف وتنقية جزئية للكايتيناز المنتج من هذه السلالة وتحديد مدى تأثير المستخلص الأنزيمي الخام في كبح نمو الفطر المسبب للعفن الرمادي على نبات البندورة/الطماطم. تم إنتاج الكايتيناز من السلالة *B. licheniformis* B307 بطريقة الزراعة المغمورة، حيث تم الحصول على فعالية أنزيمية مقدارها 14 وحدة/مل. أظهرت نتائج التنقية الجزئية أن الترسب بكميات الأمونيوم المشبعة بنسبة 65% كانت الأفضل، حيث تم الحصول على فعالية نوعية 1.00 وحدة/مغ بالمقارنة مع 0.24 وحدة/مغ للمستخلص الخام. كما أظهرت نتائج ترحيل البروتين وجود حزمتين بوزن جزئي 36 و42 كيلو دالتون تقريباً تراكفاً مع فعالية في تحليل الكيتين. أظهرت نتائج تضخيم الدنا المجيني باستعمال البادنتين CHI4 و CHI0 ظهور حزمة بحجم 1500 زوج قاعدي نيوكليوتيدي. أظهرت نتائج التقويم الحيوي للفعالية التضادية على طرز نبات البندورة المدروسة (روما، مارماند، محلي) انخفاض الإصابة في النباتات المعاملة بالبكتريا بمقدار 48.9-56.9%، وانخفاضها في النباتات المعاملة بالمستخلص الأنزيمي بمقدار 40.66-50.87% مقارنة بمعاملة الشاهد. يمكننا أن نستخلص من هذه الدراسة بأنه من الممكن للسلالة *B. licheniformis* B307 ومستخلصها الأنزيمي أن تسهم بدور فاعل في مكافحة الأحيائية ضد العفن الرمادي بطريقة المعاملة العلاجية، كما أنه يمكن تطبيقها في المعالجة الوقائية، وهذا يعطي البكتريا B307 ومستخلصها الأنزيمي إمكانات واعدة في أن تكون بديلاً محتملاً للحد من استعمال المبيدات الفطرية الكيميائية في مكافحة مرض العفن الرمادي وغيره من الأمراض الفطرية.

كلمات مفتاحية: *Bacillus licheniformis*، *Botrytis cinerea*، مكافحة أحيائية، أنزيم الكايتيناز.

المقدمة

والبندورة/الطماطم والفريز ونباتات الزينة (Ana et al., 2015)؛
(Edwards & Seddon, 2001). تسبب فطور الجنس *Botrytis* تعفنًا للأزهار والثمار والأبصال بشكل رئيس في الحقل أو أثناء التخزين، ولكنها يمكن أن تسبب أيضاً تبقعات مختلفة على الأوراق، وبالأخص في النباتات المتقدمة بالعمر أو الضعيفة أو المتعرضة لجروح (Holz et al., 2007). اقتصادياً، يسبب الفطر *Botrytis cinerea* أضراراً كبيرة وخسائر اقتصادية كبيرة على المستوى العالمي، لاسيما لخضروات الزراعة المحمية تتراوح بين 10 و100 مليار دولار أمريكي سنوياً (Boddy, 2016). ونظراً لأهمية هذا الفطر فإنه كان موضوعاً لدراسات عديدة بما فيها دراسات وقاية ومكافحة الأمراض التي تصيب العديد من النباتات المضيفة (Elad et al., 2007).
استخدم العديد من الأحياء الدقيقة في مكافحة الأحيائية لعدد من الأمراض النباتية، حيث تقوم هذه الأحياء بإنتاج مجموعة من المركبات

اعتمد المزارعون في القرن الماضي بشكل كبير على المبيدات والمخصبات الكيميائية لزيادة إنتاجية المحاصيل، وقد نجم عن الاستخدام المفرط وغير المنضبط للمواد الكيميائية الزراعية حدوث تلوث في البيئة مما أثر في صحة الإنسان، وأدى إلى خوف الناس من استخدام المبيدات الزراعية، ودفع الباحثين للعمل على إيجاد بدائل لإدارة ومكافحة الآفات والأمراض للحد من استعمال المكافحة الكيميائية (Paul, 2012)؛ (Pal & Gardener, 2006).

تتعرض النباتات للإصابة بعدد من مسببات المرضية ومنها الفطر *B. cinerea*، حيث يظهر بشكل عفن رمادي gray mold على الأنسجة المصابة نتيجة لتشكله أبواغاً كونيديّة غزيرة يميل لونها للرمادي. يصيب هذا الفطر أكثر من 200 نوع نباتي مثل العنب

تحضير المعلق البوغي بغمر المستنبت بالماء المقطر المعقم الحاوي على 0.1% (حجم/حجم) من مركب التريتون X100، حيث تم تحرير الأبواغ من حواملها بوساطة الماسحة الزجاجية المعقمة، بعد ذلك تم تجميع المعلق في أنبوب معقم ثم رجّ بشكل قوي وجرى ترشيح المعلق الناتج باستعمال شاش معقم لإزالة أي بقايا لخيوط المشيجة، وأجري تعداد للأبواغ في المعلق الناتج باستعمال شريحة العد Neubauer improved وضبط التعداد عند 10^5 بوغة/مل بالتخفيف بالماء المقطر المعقم (Mónaco et al., 2009).

استخدمت السلالة *B. licheniformis* B307 التي تم عزلها وانتخابها من التربة السورية، حيث أظهرت كفاءة في تحليل الكيتين وفعالية تضادية اتجاه الفطر *B. cinerea* (Akeed et al., 2019). حفظت هذه السلالة على الأغار المغذي عند حرارة 4 °س وفي الغليسيرول 20% عند حرارة -20 °س. تم تحضير المعلق البكتيري من خلال تلقح حجم 20 مل من المرق المغذي (NB) في دورق 100 مل بمسحة من المستنبت النقي للسلالة *B. licheniformis* B307 وحضن مدة 18 ساعة عند حرارة 30 °س وسرعة دوران 200 دورة/الدقيقة حتى الوصول إلى كثافة ضوئية 0.15 عند طول موجة 600 نانومتر والتي تعادل $10 \times 2 \times 10^8$ وحدة مكونة للمستعمرة/مل (Ammoneh et al., 2014).

إنتاج الكايتنيز وتحضير المستخلص الأنزيمي الخام

تم إنتاج أنزيم الكايتنيز من السلالة *B. licheniformis* B307 بطريقة التخمير المغمور (SmF) Submerged Fermentation ضمن شروط الإنتاج المثلى التي تم الوصول إليها في مرحلة سابقة من البحث، حيث تكون وسط التخمير من (غ/ل): تريتون 10، ومستخلص الخميرة 5، وكلوريد الصوديوم 5، و 0.5% كيتين غروي. ضبطت درجة الحموضة عند 6 pH، وحرارة الحضانة 30 °س، ومدة حضانة 14 يوماً، وسرعة دوران 150 دورة/الدقيقة.

تم تحضير المستخلص الأنزيمي الخام بعد انتهاء مدة الحضانة، حيث تم تنقيط المستنبت بسرعة 8000 دورة/الدقيقة لمدة 10 دقائق، وجمع الجزء الطافي الحاوي على الأنزيم.

تحديد فعالية الكايتنيز في المستخلص الأنزيمي

تم تقدير الفعالية لأنزيم الكايتنيز بطريقة حمض دينيتروساليسيليك dinitrosalicylic acid (DNS) واستعمال الكيتين الغروي كركيزة وفق طريقة Sadfi et al. (2001) مع بعض التعديل. تكون وسط التفاعل من: 0.5 مل من ركيزة الكيتين الغروي 1% في وقاء (محلول منظم) أسيتات الصوديوم 0.1 مولار بدرجة حموضة 6 pH، و 0.4 مل من محلول الأنزيم. حضن مزيج التفاعل عند حرارة 60 °س مدة 30 دقيقة. تم إيقاف التفاعل بإضافة 1 مل من محلول DNS المكون من (غ/ل):

المتنوعة ذات الفعالية الأحيائية (Sihem et al., 2011). لذا تم التحري عن أحياء دقيقة جديدة ذات كفاءة أكبر ضد الأحياء الدقيقة وعزلها من أنواع مختلفة من التربة والأنظمة البيئية (Errakhi et al., 2007؛ Gupte et al., 2002؛ Mellouli et al., 2003). تعد أنواع الجنس *Bacillus* من بين عوامل المكافحة الأحيائية التي درست على نطاق واسع، والتي تعد مصدراً كبيراً للعديد من المنتجات الطبيعية الفعالة أحياناً، حيث أثبتت فعاليتها المضادة للعديد من الميكروبات (Yuan et al., 2006؛ Cukurovali et al., 2006؛ Nayak et al., 2017). تمتلك أنواع الجنس *Bacillus* القدرة على تشكل أبواغ داخلية وطيف واسع من المستقلبات، وتعتبر عادة مفيدة وآمنة لكل من النبات والنظام البيئي (Shoda, 2000). يمكن أن يعود التأثير المضاد للفطور الممرضة الذي تمتلكه بعض أنواع الجنس *Bacillus* إلى عدة مركبات مثل: المضادات الحيوية، والمواد الطيارة، والأنزيمات الحالة للكيتين. ينتج العديد من أنواع الجنس *Bacillus* أنزيمات الكايتنيز التي تحلل الكيتين الذي يعد المركب الرئيس في تركيب الجدار الخلوي لمعظم الفطور (Sadfi et al., 2001)، لذلك ازداد الاهتمام بأنزيمات الكايتنيز كعوامل مكافحة أحيائية للعديد من الفطور المسببة لأمراض النبات من خلال تحليل الكيتين والحد من نمو وتطور الفطر الممرض (Gomaa, 2012). وفي هذا الإطار، تم غرلة عدد من العزلات التي تعود للجنس *Bacillus* (عزلة 378) عزلت من تربة محلية من مناطق مختلفة في سورية، حيث أظهرت السلالة *B. licheniformis* B307 أعلى كفاءة في إنتاج الكايتنيز والذي ترافق مع فعالية تضادية عالية اتجاه الفطر *B. cinerea* بين العزلات المختبرة، وقد جرت هذه الاختبارات على الأوساط الصناعية (Akeed et al., 2019).

هدفت هذه الدراسة إلى توصيف الكايتنيز المنتج من السلالة *B. licheniformis* B307 على المستوى الجيني والجزيئي، ودراسة تأثيره المضاد اتجاه الفطر الممرض *B. cinerea* على أوراق نبات البندورة/الطماطم.

مواد البحث وطرائقه

الكائنات الحية الدقيقة وظروف الزراعة

تم عزل الفطر الممرض *B. cinerea* من ثمار الفريز (Akeed et al., 2019)، وحفظ على وسط البطاطا ديكستروز آغار (PDA) عند حرارة 4 °س وفي الغليسيرول 20% عند حرارة -20 °س. وللحصول على المعلق البوغي للفطر جرى زرعه على وسط PDA وحضنه عند حرارة 25 °س لمدة 15 يوماً ومدة إضاءة متناوبة، 12 ساعة إضاءة و12 ساعة ظلام، لتحريض تشكيل الأبواغ الكونيدية. بعد ذلك تم

التقنية الجزئية للكايتنيز المنتج من السلالة *B. licheniformis* B307
تم إجراء تقوية جزئية للأنزيم الخام المنتج في وسط التخمر من السلالة *B. licheniformis* B307 باستعمال الترسيب بكبريتات الأمونيوم المشبعة. أجري الترسيب لطافي مستخلص الزراعة على وسط الإنتاج عند حرارة 4 °س مع التحريك باستعمال نسب مختلفة من الترسيب بكبريتات الأمونيوم مثل: 45%، 55%، 65%، 75% و 85%. تم جمع الراسب من خلال التثقيل بسرعة 10000 دورة/الدقيقة لمدة 10 دقائق عند حرارة 4 °س، ثم أعيد إذابة الراسب في محلول خلات الصوديوم بدرجة حموضة 6 pH، حجمه مماثل لحجم المستخلص الأنزيمي الخام الذي جرى ترسيبه. تم تحديد تركيز البروتين في نواتج الترسيب وفقاً لطريقة Bradford *et al.* (1976) باستعمال البيومين مصل البقر في السلسلة المعيارية. كما جرى تقدير فعالية الكايتنيز وفق الطريقة الموصوفة سابقاً. أشارت الفعالية النوعية المثلى للكايتنيز التي تم الحصول عليها باستعمال تركيز معين من سلفات الأمونيوم المشبعة إلى التركيز الأمثل للحصول على أفضل فعالية أنزيمية. تم أخذ الجزء الذي أظهر أعلى فعالية نوعية للكايتنيز باستعمال نسبة محددة من سلفات الأمونيوم المشبعة إلى مرحلة ثانية من التقوية الجزئية والتي استعمل فيها أنابيب تركيز (sartorius, vivaspin 2) بمسامات مختلفة MWCO تمرر أوزاناً جزئية مختلفة من البروتينات: 10kDa، 30 kDa، 50 kDa. تم تحديد تركيز البروتين وفعالية الكايتنيز لكل جزء، وتم إجراء ترحيل للأجزاء الناتجة على هلامه 12% بولي أكريلاميد. تم تلوين الجل بعد انتهاء الترحيل باستعمال صباغ أزرق الكوماسي (Coomassie brilliant blue R250, Sigma).

تقويم الفعالية التضادية للسلالة *B. licheniformis* B307 اتجاه الفطر *B. cinerea* على نبات البندورة/الطماطم

أجريت اختبارات التضادية ضمن ظروف غرفة النمو باستخدام 3 أصناف من البندورة من السوق المحلية من إنتاج شركة بذور غوطة الشام هي: روما ومارماند ومحلي. ظهرت البذور سطحياً باستعمال محلول هيبوكلووريت الصوديوم تركيز 5% لمدة خمس دقائق، ثم غسلت ثلاث مرات بالماء المقطر المعقم، ثم زرعت في أحواض بلاستيكية (60 × 40 × 10 سم) تحتوي على التورب المعقم ضمن تصميم قطاعات من 3 خطوط في كل حوض. حضنت الأحواض ضمن غرفة نمو عند حرارة 25 °س وفترة إضاءة 16 ساعة ورطوبة نسبية 80-90%.

تم إعداء النباتات بعمر شهر، حيث رش كامل النبات بالمعلق البوغي للفطر (10⁵ بوغة/مل) وتغطية الأحواض بالبلاستيك لتأمين الظلام والرطوبة لنمو الفطر وذلك مدة 48 ساعة قبل المعاملة بالبكتريا والمستخلص الأنزيمي. أجريت بعد ذلك المعاملة بالبكتريا

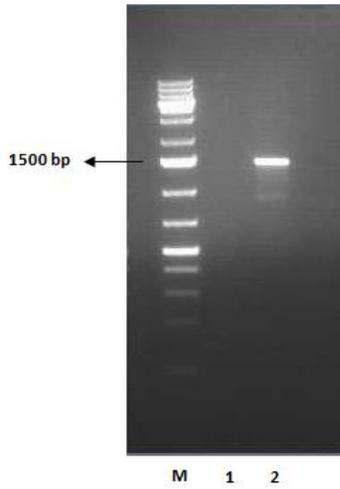
هيدروكسيد الصوديوم 10، وحمض دينتروساليسيليك 10، والفينول 2، وعند الاستعمال أضيف لكل 100 مل: كبريتيت الصوديوم 0.05 غ وترترات البوتاسيوم والصوديوم 20 غ. ثم حضن المزيج عند حرارة الغليان لمدة 10 دقائق، وتم تثقيل ناتج التفاعل 4000 دورة/الدقيقة مدة 10 دقائق وأخذ الجزء الطافي وقيست امتصاصيته عند طول موجة 540 نانومتر. تم تحضير المنحنى المعياري باستعمال محاليل معلومة التركيز من N-acetylglucosamine (NAG, Sigma). تعرف الوحدة الأنزيمية بأنها كمية الأنزيم التي تحرر 1 ميكرومول N-acetylglucosamine من ركيزة الكيتين الغروي ضمن شروط التفاعل.

تحري جينة أنزيم الكايتنيز في الدنا المجيني للسلالة *B. licheniformis* B307

تم استخلاص الدنا DNA المجيني وتثقيته باستخدام عدة (كت) الاستخلاص من شركة Qiagen (Cat. NO. 69104) وفقاً لتعليمات الشركة. أجري تفاعل التضخيم (PCR) في مزيج تفاعل حجمه 25 ميكروليتر مكون من: 10 ميكروليترات من المزيج Hotstar Taq Master Mix المصنع من شركة Qiagen والحاوي على Hotstar Taq بوليميراز والنيوكليوتيدات الأربعة ثلاثية الفوسفات منزوعة الأوكسجين (dNTPs)، والمحلول الموقى الخاص بتفاعل التضخيم PCR مع 3M من MgCl₂، و 2 ميكروليتر من الـ DNA المجيني (100 ng/μl)، و 11 ميكروليتر من الماء المقطر المعقم و 1 ميكروليتر من كل بادئة (10μM). تم استعمال البادئتين: CHI4 و (5'-AAGCTTTTTCCTCCCATACCAA-3') و اللتين (5'-GATGTTTTAATTTTAGACGAACGGAC-3') تتكاملان مع منطقة من الإطار القابل للقراءة (open reading frame:) (ORF) والترجمة لجينة الكايتنيز (Driss *et al.*, 2005).

تم تفاعل التضخيم PCR باستعمال جهاز التضخيم PCR وفق البرنامج التالي: دورة واحدة لمدة 2 دقيقة عند حرارة 94 °س، 35 دورة كل منها: 45 ثانية عند حرارة 94 °س لفصل سلاسل الـ DNA، و 50 ثانية عند حرارة 50 °س لتشفع البادئات ثم 50 ثانية عند حرارة 72 °س، وأخيراً دورة واحدة لمدة 5 دقائق عند حرارة 72 °س لاستطالة السلاسل. تم ترحيل منتجات تفاعل الـ PCR على هلامه الأغاروز 1.5%.

تم استعمال شاهد سلبي هو مستخلص الدنا لإحدى عزلات الباسيللوس *Bacillus* التي لم تظهر قدرة على تحليل الكيتين على أطباق التحري خلال مرحلة الغريلة وانتخاب العزلات التي لها قدرة على تحليل الكيتين.



شكل 1. ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام البادئتين CHI4 و CHI10 اللتين تضخمان جينة الكايتنيز. حيث: M= سلم الدنا الجزيئي، 1= مستخلص الدنا للشاهد السليبي، 2= مستخلص الدنا للسلالة *B. licheniformis* B307

Figure 1. PCR products using CHI10 and CHI4 primers that amplify the chitinase gene. M= DNA molecular ladder, 1= DNA extract from the negative control. 2= DNA extract of *B. licheniformis* B307 strain.

التنقية الجزيئية للكايتنيز

في الخطوة الأولى، تم بنجاح إجراء تنقية جزيئية باستخدام الترسيب بنسب مختلفة من محلول كبريتات الأمونيوم المشبع، حيث تم ملاحظة أعلى فعالية نوعية للأنزيم (0.97 وحدة/مغ) في الجزء الناجم عن الترسيب بـ 65% من محلول سلفات الأمونيوم المشبع، بينما كانت الفعالية النوعية في المستخلص الخام 0.24 وحدة/مغ (شكل 2)، ووجد زيادة في فعالية الأنزيم بمقدار 3.96 ضعف وغلة بمقدار 67.52% بعد الترسيب بـ 65% من كبريتات الأمونيوم المشبع بالمقارنة مع المستخلص الخام. في الخطوة الثانية من التنقية الجزيئية للكايتنيز المنتج من السلالة *B. licheniformis* B307، تم تركيز الجزء الناجم عن الترسيب بنسبة 65% من SAS والذي أعطى أعلى فعالية نوعية للأنزيم بأنابيب التركيز المختلفة. أظهر الجزء الحاوي على طافي الأنوب MWCO 50kDa أعلى فعالية نوعية بمقدار 2 وحدة/مغ بزيادة قدرها 2.08 ضعف وغلة 169% بالمقارنة مع الجزء الحاوي على ناتج الترسيب بنسبة 65% من محلول سلفات الأمونيوم المشبع (شكل 3). أظهر ناتج الترحيل على هلام SDS-PAGE عصابة بوزن جزيئي يقارب 36kDa و 42kDa (شكل 4). سجل عدد من الباحثين عزل وتنقية أنزيم كايتنيز منتج من الجنس *Bacillus* بأوزان جزيئية مختلفة منها: 66، 72، 76، 89، 62، 59، 53، 49، 42، 36 كيلو دالتون (Kudan & Pichyangkura, 2009؛ Liu et al., 2010؛ Takayanagi et al., 1991؛ Trachuk et al., 1996).

B. licheniformis B307 (معلق جرثومي يحتوي على 2×10^8 وحدة مكونة للمستعمرة/مل) والمستخلص الأنزيمي الحاوي على الكايتنيز (10 وحدة/مل) كلاً على حدة. تم استعمال المعاملة بالماء المقطر كشاهد. حوت كل معاملة على 30 نباتاً، وتم تسجيل النسبة المئوية لتطور العفن الرمادي وشدة الإصابة على الأوراق من خلال التقدير العيني، وذلك بعد 7 أيام من المعاملة، حيث تم تصنيف مؤشر شدة المرض باستعمال مقياس من 0-4 (0= لا توجد أعراض للمرض، 1= 0.1-5%، 2= 5.1-20%، 3= 20.1-40%، 4= 40.1-100%) وفقاً لما ذكره Gao et al. (2018). تم حساب قيمة شدة المرض باستخدام المعادلة التالية:

$$\text{النسبة المئوية لشدة الإصابة} = \frac{\text{مجموع عدد الأوراق المصابة} \times \text{مؤشر شدة المرض}}{\text{عدد الأوراق الكلي} \times 4} \times 100$$

التحليل الإحصائي

أجري التحليل الإحصائي باستخدام برنامج Statistic program version 6 (Statsoft, Inc. 2003)، حيث تم تحليل البيانات وحساب المتوسطات والانحرافات المعيارية وتحديد وجود فروق معنوية عند مستوى 5% بين المعاملات.

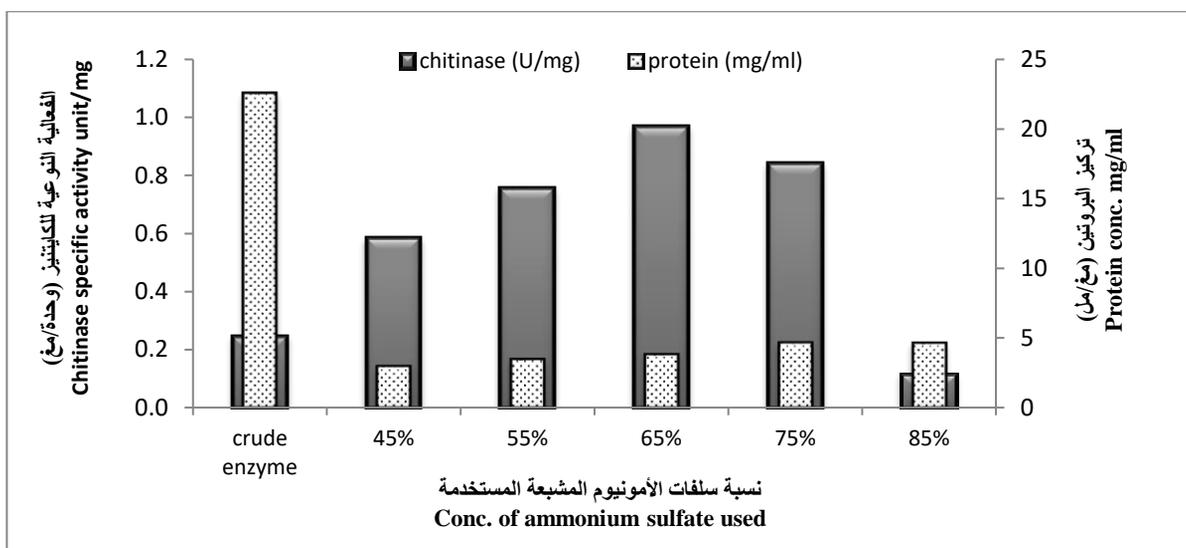
النتائج والمناقشة

إنتاج الكايتنيز وتحضير المستخلص الأنزيمي الخام

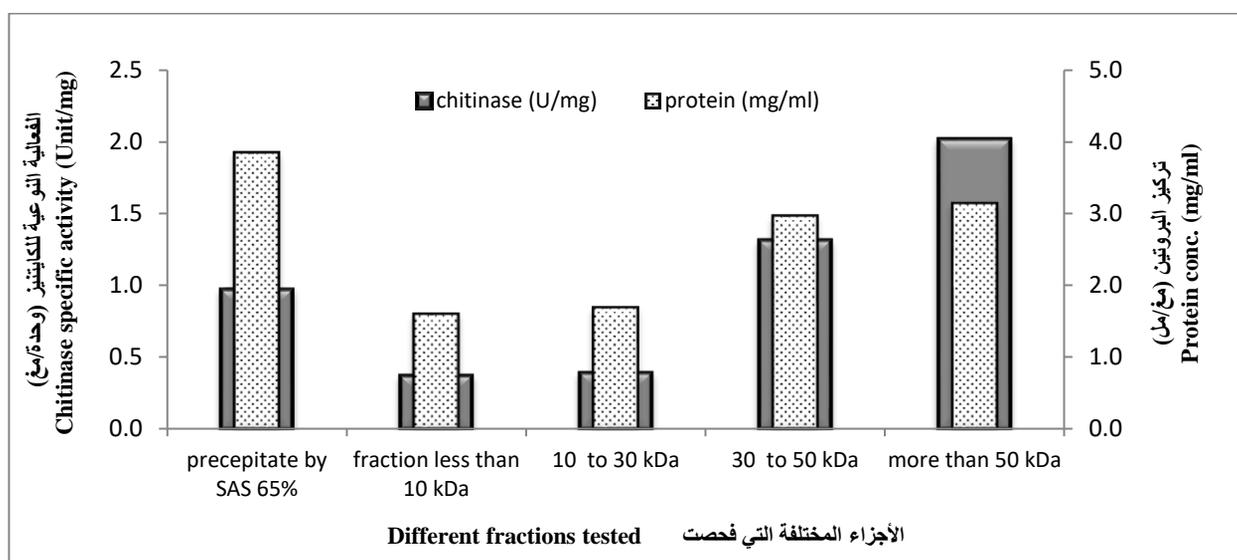
تم إنتاج الكايتنيز وفق الظروف المثلى المذكورة، حيث أظهرت نتيجة المعايرة للأنزيم في المستخلص الخام وجود فعالية أنزيمية مقدارها 14 وحدة/مل. حفظ المستخلص في المجمدة، واستخدم في اختبارات التنقية الجزيئية وتقدير الفعالية التضادية اتجاه الفطر *B. cinerea*.

تحري جينة أنزيم الكايتنيز في الدنا المجيني للسلالة *B. licheniformis* B307

تم استخلاص الـ DNA المجيني للسلالة *B. licheniformis* B307، وأجري تفاعل البلمرة التسلسلي PCR باستخدام البادئتين CHI10 و CHI4، وتم ترحيل ناتج التفاعل على هلامه الآجاروز. يلاحظ من الشكل 1 ظهور حزمة بحجم 1500 زوج قاعدي، بينما لم تظهر أي حزمة في المسار الخاص بالشاهد السليبي العائد لإحدى عزلات بكتريا الباسيلوس غير المنتجة للكايتنيز، مما يؤكد وجود جينة على الأقل فعالة في إنتاج أنزيم الكايتنيز لدى السلالة *B. licheniformis* B307، مما يسمح في دراسة لاحقة من تسهيل هذه المورثة والتعبير عنها باستخدام تقانة الهندسة الوراثية.



شكل 2. فعالية الكايتينيز وتركيز البروتين للأجزاء المختلفة الناجمة عن ترسيب المستخلص الأنزيمي الخام بنسب مختلفة من كبريتات الأمونيوم المشبعة. **Figure 2.** Chitinase activity and protein concentration of various fractions after precipitation of crude enzyme with different concentration of saturated ammonium sulfate.



شكل 3. فعالية الكايتينيز وتركيز البروتين للأجزاء المختلفة الحجم الناجمة مقارنة بالجزء الناجم عن الترسيب بـ 65% من كبريتات الأمونيوم المشبعة. **Figure 3.** Chitinase activity and protein concentration of various fractions compared with the fraction obtained following precipitation with 65% saturated ammonium sulfate.

أن نسبة حدوث الإصابة للأصناف محلي ومارماند وروما للشاهد كانت: 30.00%، 41.66% و 57.66%، على التوالي. بينما انخفضت نسبة الإصابة عند المعاملة بالبكتريا إلى 15.33%، 17.16% و 25.16% للأصناف الثلاثة، على التوالي، أي بانخفاض تراوح مقداره ما بين 48.9-56.9% بالمقارنة مع الشاهد. كما انخفضت نسبة الإصابة عند المعاملة

التقويم الحيوي للفعالية التضادية للسلالة *B. licheniformis* B307 والمستخلص الأنزيمي اتجاه مرض العفن الرمادي المتسبب عن الفطر *B. cinerea* على نبات البندورة/الطماطم أظهرت نتائج التقويم بعد 7 أيام من إجراء العدوى بالفطر والمعاملة بالبكتريا والمستخلص الأنزيمي على نباتات البندورة المدروسة (جدول 1)

و75%، بينما سجل Leila *et al.* (2015) كفاءة السلالة *Bacillus* sp. S7LiBe في كبح هذا المرض بنسبة 57% على أوراق الخس. كما سجل Gao *et al.* (2018) انخفاضاً في شدة الإصابة بالعفن الرمادي على نبات البندورة/الطماطم عند المعاملة العلاجية بالمستخلص الخالي من الخلايا إلى 31.49%.

جدول 1. تأثير المعاملة بالبكتيريا والمستخلص الأنزيمي في كبح الإصابة بالفطر *B. cinerea* على نبات البندورة/الطماطم.

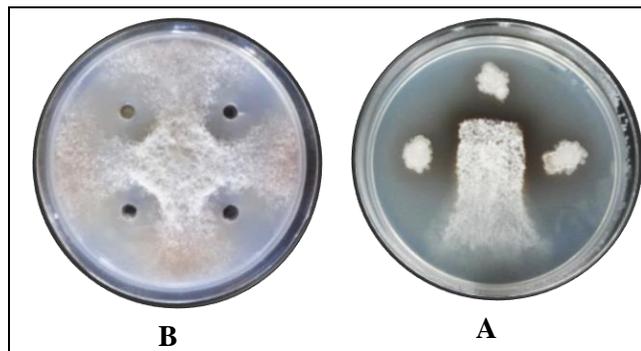
Table 1. Effect of treatment by bacteria and enzyme extract on the inhibition of *Botrytis cinerea* growth on tomato plant.

متوسط النسبة المئوية للإصابة*	المعاملة	الصفة	الصفة
Average infection rate (%)*	Treatment	Cultivar	
41.66±1.08 Ab	Control	الشاهد	Marmand
24.33±0.7 Bd	Enzyme	الأنزيم	
17.16±0.57 Ce	Bacteria	بكتيريا	
57.66±1.7 Aa	Control	الشاهد	Roma
28.33±1.15 Bc	Enzyme	الأنزيم	
25.16±1.3 Cd	Bacteria	بكتيريا	
30.00±1.15 Ac	Control	الشاهد	Local
17.80±0.6 Be	Enzyme	الأنزيم	
15.33±0.7 Be	Bacteria	بكتيريا	

* يرمز الحرف الكبير للمقارنة بين معاملات الصنف الواحد، ويرمز الحرف الصغير لمقارنة المعاملات بين الأصناف (DF= 8, F=158,208, P>0.001).

القيم التي يتبعها أحرف متشابهة لا يوجد بينها فرق معنوي عند احتمال 5%.

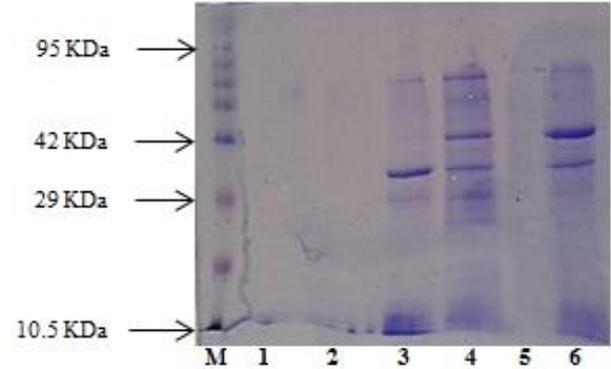
* The capital letter is used to compare treatments within a single tomato variety, and the small letter is used to compare the treatments of different varieties (DF = 8, F = 158,208, P> 0.001). Values followed by the same letters do not have a significant difference at P=0.05.



شكل 5. التأثير المثبط لكل من السلالة *B. licheniformis* B307 (a) ومستخلصها الأنزيمي (b) في نمو الفطر *B. cinerea*.

Figure 5. The inhibitory effect of *B. licheniformis* B307 (a) and its enzymatic extract (b) on *B. cinerea* growth.

بالمستخلص الأنزيمي إلى 17.8%، و24.33% و28.33% للأصناف الثلاثة، على التوالي، أي بانخفاض تراوح مقداره بين 40.66 و50.87%. وهذه النتيجة تتوافق مع الكفاءة التضادية التي تم تسجيلها من قبل Akeed *et al.* (2019) لكل من السلالة *B. licheniformis* B307 ومستخلصها الأنزيمي الحاوي على أنزيم الكايتيناز (شكل 5).



شكل 4. ناتج الترحيل على هلامة SDS-PAGE للأجزاء الناجمة عن التنقية الجزئية للمستخلص الخام الحاوي على أنزيم الكايتيناز المنتج من السلالة *B. licheniformis* B307. M = سلم للأوزان الجزيئية، =1 الجزء الذي مر من مسام الأنبوب 10kDa، =2 الجزء بين 10kDa و30kDa، =3 الجزء بين 30kDa و50kDa، =4 الجزء الطافي باستعمال الأنبوب 50kDa، =5 ماء مقطر، =6 الجزء الناجم عن الترسيب بنسبة 65% من سلفات الأمونيوم المشبع.

Figure 4. SDS-PAGE analysis for partial purification of chitinase from *B. licheniformis* B307. M= molecular weight ladder, 1= Fraction which passed through MWCO 10kDa tube, 2= fraction which passed through 10-30 KDa tube, 3= fraction which passed through 30-50 KDa tube, 4= supernatant of MWCO 50 KDa tube, 5= distilled water, 6= product of precipitation with 65% saturated ammonium sulfate.

وقد أشارت هذه النتائج إلى أن الصنف محلي كان الأفضل مقاومة للإصابة بالعفن الرمادي وأن تطور الإصابة على نباتات البندورة تم تثبيطه بواسطة البكتيريا ومستخلصها الأنزيمي الخالي من الخلايا باستعمال الرش العلاجي، كلاً منهما على حدة. كما أشارت النتائج إلى أن المعاملة بالبكتيريا كانت أفضل من المعاملة بالمستخلص الأنزيمي، وهذا ربما يعود إلى وجود تركيز أعلى من أنزيم الكايتيناز في حالة استعمال البكتيريا نتيجة إنتاجه المستمر منه، غير أنه من الممكن الحصول على نتيجة أفضل باستعمال المستخلص الأنزيمي في حال تم الحصول على تراكيز أعلى للأنزيم من التركيز المستعمل في هذه الدراسة. وقد سجل Wang (2018) كفاءة السلالة *B. subtilis* WXCDD105 في مكافحة مرض العفن الرمادي على نبات البندورة بنسبة تتراوح بين 72

Abstract

Akeed, Y., F. Atrash and W. Naffaa. 2019. Efficacy of the bacterium *Bacillus licheniformis* B307 as a biocontrol agent against tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. Arab Journal of Plant Protection, 37(4): 327-334.

Botrytis cinerea, the causal agent of gray mold, is a pathogen that attacks many crops. The local strain *B. licheniformis* B307 was previously selected as a possible control agent for this fungus through its chitinase production. The current study was conducted to characterize and purify chitinase produced from this strain, and determine the extract enzymatic antifungal inhibitory activity against gray mold fungus on tomato plant. Chitinase enzyme was produced from the *B. licheniformis* B307 strain by the submerged fermentation method, with an enzyme activity of 14 U/ml. The results of the partial purification showed that enzyme precipitation with 65% saturated ammonium sulfate was the best, since specific activity reached 1 U/mg compared to 0.24 U/mg for the raw extract. The results of the precipitated proteins electrophoresis showed that there were two fragments with a molecular weight of approximately 36 and 42 kDa associated with chitinolytic activity. The results of genomic DNA amplification using CHI0 and CHI4 primers amplified a 1500bp band. The bio-assay results of antagonistic activity against *B. cinerea* on the three tomato varieties (Rome, Marmande, local) showed a reduction in disease incidence of 48.9-56.9% in the bacteria-treated plants and 40.66-50.87% in plants treated with enzymatic extracts, compared to the control. It can be concluded from this study that the bacterial strain *B. licheniformis* B307 and its enzymatic extract can be an effective biocontrol treatment against gray mold, which makes this bacterial strain a potential alternative to chemical fungicides for the control of gray mold and possibly other pathogens.

Keywords: *B. licheniformis*, *B. cinerea*, biocontrol, chitinase.

Corresponding author: Yasser Akeed, Department of Plant Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria, email: yakeed79@gmail.com

References

المراجع

- Akeed, Y., F. Atrash and W. Naffaa. 2019. Morphological and molecular identification of *Botrytis cinerea* the causal agent of gray mold isolated from strawberry fruits. Journal of Arid Environment, 15(1) (in press).
- Akeed, Y., F. Atrash and W. Naffaa. 2019. Isolation and identification of *Bacillus* spp. Syrian soils and testing their antifungal activity against *Botrytis cinerea* in vitro. Journal of Arid Environment (in press).
- Ammonah, H., M. Harba, Y. Akeed, M. Al-Halabi and Y. Bakri. 2014. Isolation and identification of local *Bacillus* isolates for xylanase biosynthesis. Iranian Journal of Microbiology, 6: 127-132.
- Ana, E.A., P. Enrique and L. Aurelio. 2015. Antifungal activity of essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*) and/or mustard (*Brassica nigra*) in vapor phase against gray mold (*Botrytis cinerea*) in strawberries. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 32: 181-185.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.09.003>
- Boddy, L. 2016. Chapter 8 - Pathogens of Autotrophs. Pages 245-292. In: The Fungi (3rd Edition). Sarah C. Watkinson, Lynne Boddy and Nicholas P. Money (eds). Academic Press, Boston.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.
<https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Cukurovali, A., I. Yilmaz, S. Gur and C. Kazaz. 2006. Synthesis, antibacterial and antifungal activity of some new thiazolyldiazone derivatives containing 3-substituted cyclobutane ring. European Journal of Medicinal Chemistry, 41: 201-207.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2005.01.013>
- Driss, F., M. Kallassy-Awad, N. Zouari and S. Jaoua 2005. Molecular characterization of a novel chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki. Journal of Applied Microbiology, 99: 945-953.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02639.x>
- Edwards, S.G. and B. Seddon. 2001. Mode of antagonism of *Brevibacillus brevis* against *Botrytis cinerea* in vitro. Journal of Applied Microbiology, 91: 652-659.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01430.x>
- Elad, Y., B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen. 2007. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 392 pp.
- Errakhi, R., F. Bouteau, A. Lebrihi and M. Barakate. 2007. Evidences of biological control capacities of *Streptomyces* spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping-off disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). World Journal of Microbiology and Biotechnology, 23: 1503-1509.
<https://doi.org/10.1007/s11274-007-9394-7>
- Gao, P., J. Qin, D. Li and S. Zhou. 2018. Inhibitory effect and possible mechanism of a *Pseudomonas* strain QBA5 against gray mold on tomato leaves and fruits caused by *Botrytis cinerea*. PloS one. 13(1), e0190932.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190932>
- Gomaa, E.Z. 2012. Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: their potential in antifungal biocontrol. Journal of Microbiology, 50: 103-111.
<https://doi.org/10.1007/s12275-012-1343-y>
- Gupte, M., P. Kulkarni and B.N. Ganguli. 2002. Antifungal Antibiotics. Applied Microbiology and Biotechnology, 58: 46-57.
<https://doi.org/10.1007/s002530100822>

- Holz, G., S. Coertze and B. Williamson.** 2007. The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. Pages 9-27. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen (eds.). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3_2
- Kudan, S. and R. Pichyangkura.** 2009. Purification and characterization of thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* SK-1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157:23-35. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8328-7>
- Leila, B., R. Abdelwahab, T. Nassira, K. Nabila, K. Meriem and N. Elhafid.** 2015. Biological control of *Botrytis cinerea* by *Bacillus* sp. strain S7LiBe under abiotic stress. *International Symposium of Applied Biology CIBA*, 6: 07-14.
- Liu, D., J. Cai, C.C. Xie, C. Liu and Y.H. Chen.** 2010. Purification and partial characterization of a 36-kDa chitinase from *Bacillus thuringiensis* sub sp. *colmeri*, and its biocontrol potential. *Enzyme and Microbial Technology*, 46: 252-256. <https://doi.org/10.1016/j.enzymictec.2009.10.007>
- Mellouli, L., R.B. Mehdi, S. Sioud, M. Salem and S. Bejar.** 2003. Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a newly isolated *Streptomyces* sp. US24 strain. *Research in Microbiology*, 154: 345-352. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00077-9](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00077-9)
- Mónaco, C., G. Dal Bello, M.C. Rollán, L. Ronco, G. Lampugnani, N. Arteta and M. Stocco.** 2009. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato using naturally occurring fungal antagonists. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 42: 729-737. <https://doi.org/10.1080/03235400701390646>
- Nayak, S., C. Limsuwan, N. Chichurd, K.J. Kühlmann and S. Pungpang.** 2017. Antimicrobial activity of partially characterized analytes from *Bacillus pumilus* (B2). *Aquaculture Research*, 48: 5606-5613. <https://doi.org/10.1111/are.13382>
- Pal, K.K. and B.M. Gardener.** 2006. Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*, 2: 1117-1142. <https://doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02>
- Paul, N.C.** 2012. Diversity and biological control activity of endophytes from chili pepper (*Capsicum annuum* L.) in Korea [dissertation]. Daejeon: Chungnam National University, Korea.
- Sadfi, N., M. Cherif, I. Fliss, A. Boudabbous and H. Antoun.** 2001. Evaluation of bacterial isolates from salty soils and *Bacillus thuringiensis* strains for the biocontrol of *Fusarium* dry rot of potato tubers. *Journal of Plant Pathology*, 83: 101-117.
- Shoda, M.** 2000. Bacterial control of plant disease. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89: 515-521. [https://doi.org/10.1016/s1389-1723\(00\)80049-3](https://doi.org/10.1016/s1389-1723(00)80049-3)
- Sihem, B.M., E. Rafik, F. Mathieu, C. Mohamed and A. Lebrihi.** 2011. Identification and partial characterization of antifungal and antibacterial activities of two *Bacillus* sp. strains isolated from salt soil in Tunisia. *African Journal of Microbiology Research*, 5: 1599-1608. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.073>
- Takayanagi, T., K. Ajisaka, Y. Takiguchi and K. Shimahara.** 1991. Isolation and characterization of thermostable chitinases from *Bacillus licheniformis* X-7u. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1078: 404-410. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(91\)90163-t](https://doi.org/10.1016/0167-4838(91)90163-t)
- Trachuk, L.A., L.P. Revina, T.M. Shemyakina, G.G. Chestukhina and V.M. Stepanov.** 1996. Chitinases of *Bacillus licheniformis* B-6839: isolation and properties. *Canadian Journal of Microbiology*, 42: 307-315. <https://doi.org/10.1139/m96-046>
- Wang, H., Y. Shi, D. Wang, Z. Yao, Y. Wang, J. Liu, S. Zhang and A. Wang.** 2018. A Biocontrol strain of *Bacillus subtilis* WXCDD105 used to control Tomato *Botrytis cinerea* and *Cladosporium fulvum* Cooke and promote the growth of seedlings. *International Journal of Molecular Sciences*, 19: 1371. <https://doi.org/10.3390/ijms19051371>
- Yuan, J., W. Raza, Q. Shen and Q. Huang** 2012. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 5942-5944. <https://doi.org/10.1128/AEM.01357-12>

Received: January 1, 2019; Accepted: September 15, 2019

تاريخ الاستلام: 2019/1/22؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2019/9/15