

تشخيص عزلات محلية من بكتيريا *Lactobacillus plantarum* وتقويم كفاءتها في مكافحة مرض ذبول فيوزاريوم على البندورة/الطماطم

عبد الله عبد الكريم حسن¹، عبير رؤوف محمود² ولينة قاسم محمد³

(1) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة تكريت، جمهورية العراق، البريد الإلكتروني: drabdullah.has67@tu.edu.iq

(2) دائرة البحوث الزراعية، وزارة العلوم والتكنولوجيا، جمهورية العراق؛ (3) المديرية العامة للتربية، صلاح الدين، جمهورية العراق

الملخص

حسن، عبد الله عبد الكريم، عبير رؤوف محمود ولينة قاسم محمد. 2020. تشخيص عزلات محلية من بكتيريا *Lactobacillus plantarum* وتقويم كفاءتها في مكافحة مرض ذبول فيوزاريوم على البندورة/الطماطم. مجلة وقاية النبات العربية، 38(2): 149-161.

تم الحصول على ثلاث عزلات من بكتيريا حامض اللبنيك *Lactobacillus plantarum* من المحيط الجذري لنبات الطماطم/البندورة من أحد حقول محطة قسم وقاية النبات، جامعة تكريت، منطقة العلم والدجيل في محافظة صلاح الدين، العراق، شخصت مظهرياً وكيموحيوياً ورمزت بالأرقام 1050، 1051 و 1052. تم التأكد من التشخيص باستخدام تحليل تتابع القواعد النتروجينية للحامض النووي الريبوزي المنزوع الأوكسيجين (DNA) للجين 16S rDNA، وسجلت في البنك الوراثي العالمي بالأرقام MN880156.1، MN880158.1 و MN880160.1، على التوالي. سجلت العزلة 1052 *L. plantarum* أعلى تثبيط لنمو الفطر الممرض *Fusarium* (FOL) *oxysporum* f.sp. *lycopersici* مختبرياً، إذ بلغت منطقة التثبيط 14.06 مم، في حين سجلت العزلة 1050 *L. plantarum* أدنى نسبة تثبيط (7.13 مم). أظهرت النتائج تفوقاً معنوياً في الوزن الجاف للمجموعتين الجذري والخضري ومحتوى الكلوروفيل وارتفاع النبات عند المعاملة بالعزلتين 1052 و 1051 بوجود الفطر الممرض، مقارنة مع معاملة الفطر الممرض فقط. وسجلت أعلى مؤشرات استحاثات مقاومة النبات التي تضمنت انزيمات البيتا - كلوكانيز والكابتيز والبيروكسيداز من قبل عزلة البكتيريا 1052، إذ بلغت الفعالية النوعية لهذه الأنزيمات 2.87، 4.13 و 5.84 وحدة/مغ بروتين، على التوالي، في حين بلغت هذه المؤشرات أدنى مستوياتها في معاملة النباتات السليمة إذ بلغت 0.71، 1.33 و 1.02 وحدة/مغ بروتين، على التوالي. أثبتت عزلة البكتيريا 1052 كفاءتها في كبح الإصابة بالفطر FOL من خلال تسجيله لأدنى نسبة وشدة إصابة لنباتات البندورة/الطماطم (صنف سان) إذ بلغت 18.62 و 15.44%، على التوالي، وبتفوق معنوي مقارنة مع جميع المعاملات الأخرى وبضمنها معاملة مبيد النيشجارين، في حين سجلت أعلى نسبة وشدة إصابة في معاملة الفطر الممرض فقط إذ بلغت 82.87 و 79.43%، على التوالي. كما وسجل تفوق معنوي في انتاجية النبات المعامل بعزلة البكتيريا 1052 والتي بلغت 4981.26 غ/نبات، مقارنة بأدنى إنتاجية سجلت في معاملة الفطر الممرض فقط (716.56 غ/نبات).

كلمات مفتاحية: بكتيريا، *Lactobacillus plantarum*، مرض ذبول فيوزاريوم، المكافحة الأحيائية، استحاثات مقاومة النبات.

المقدمة

إن ملاءمة ظروف نمو الفطر FOL مع موسم زراعة نبات البندورة/الطماطم فضلاً عن تكوينه الأبواغ الكلاميدية المقاومة للظروف غير المناسبة عند غياب العائل مع وجود سلالات ضارية (Cha et al., 2016)، تعد عوامل خطيرة لإصابة البندورة/الطماطم بهذا المرض وهي المسؤولة عن تكرار الإصابة من موسم إلى آخر (Khan et al., 2017). لا تقتصر خطورة مرض ذبول فيوزاريوم على الخسائر الكبيرة في حاصل البندورة/الطماطم وإنما هناك خطورة إنتاج الفطر FOL للعديد من السموم الفطرية مثل fusaric acid، lycorin، dehydrofusaric acid و fuminosin، إذ وجدت نسب من هذه السموم في نباتات وثمار البندورة/الطماطم المصابة بهذا الفطر (Nirmaladevi et al., 2016). في العراق، تعد أمراض ذبول

يتعرض محصول الطماطم/البندورة (*Lycopersicon esculentum*) إلى العديد من مسببات المرضية النيماتودية، الفطرية، البكتيرية والفيروسية، ويعد الفطر الممرض *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL) من أهم مسببات المرضية الرئيسية حيث يسبب مرض الذبول لنباتات البندورة/الطماطم مسبباً مرض ذبول فيوزاريوم المتخصص لإصابة هذا المحصول (Borisade et al., 2017). يخترق هذا الفطر خلايا بشرة العائل ميكانيكياً وبيوكيميائياً وينتشر في الأنسجة الوعائية وعادة ما يستوطن اوعية الخشب مسبباً انسدادها محدثاً حالة الذبول النمطية للنبات (Singh et al., 2017).

التقليدية لهذه الإختبارات والتي ذكرت من قبل في الدراسات السابقة (Kandler & Weiss, 1989؛ Mohan & Murugalath, 2012).

استخلاص الـ DNA الجينومي

لاستخلاص الـ DNA الجينومي، استخدمت مسحة من مستعمرة نقية حديثة النمو (عمر 24 ساعة)، وتم الإستخلاص باستخدام العدة (Kit) الجاهزة نوع ZR Fungal/Bacterial/Yeast DNA MiniPrep™ (ZYMO RESEARCH، أمريكا، رقم الكاتلوك D6005). تم تضاعف الجين 16S RNA باستخدام تفاعل البوليمراز المتسلسل PCR مع استخدام زوج البادئات (Miller et al., 2013):

1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'
27F: 5'-AGAGTTTGTATCTGGCTCAG-3'

تم تحضير البادئات من قبل شركة Integrated DNA Technologies company (كندا)، وأنجز تفاعل البوليمراز المتسلسل بحجم 25 مايكروليتر كما يلي: 1.5 مايكروليتر DNA، 5 مايكروليتر Taq PCR PreMix (Intron, Korea)، 1 مايكروليتر من كل بادئ (10 بيكومول)، ثم اضيف الماء المقطر لاكمال الحجم لـ 25 مايكروليتر. أما برنامج التفاعل فشمّل 40 دورة، وكل دورة شملت ما يلي: (أ) مرحلة الفصل الأولي عند حرارة 95 °س لمدة 3 دقائق، (ب) مرحلة الفصل 2 عند حرارة 95 °س لمدة 45 ثانية، (ج) مرحلة الإلتحام عند حرارة 52 °س لمدة 45 ثانية، (د) مرحلة الإمتداد 1 عند حرارة 72 °س لمدة 50 ثانية، (هـ) مرحلة الإمتداد 2 عند حرارة 72 °س لمدة 10 دقائق.

استخدام جهاز اللمرة الحراري (Gene Amp، PCR system، Applied Biosystem، 9700) في عملية التضاعف. فصل ناتج الـ PCR باستخدام الترحيل الكهربائي، على هلام الأجاروز 1.5%، ثم أظهرت الحزم باستخدام الأشعة فوق البنفسجية (302 nm) بعد تصبيغها بالصبغة (Intron Korea) red stain.

التتابع النيوكليوتيدي والتطابق

انجزت عملية التتابع النيوكليوتيدي في National instrumentation center for environmental management (http://nicem.snu.ac.kr/main/?en_skin=index.html) باستخدام جهاز تتابع الـ DNA (DNA sequencer 3730XL، Applied Biosystem). ولغرض دراسة التطابق للتتابع الناتج ورسم الشجرة الوراثية، فقد اعتمد على برنامج BLAST المتاح في موقع NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) فضلاً عن برنامج Mega X program. تمت المقارنة مع التتابعات النيوكليوتيدية المسجلة في البنك الوراثي GenBank، ثم سجلت العزلات في البنك الوراثي بالأرقام *L. plantarum*-1050، *L. plantarum*-1051 و *L. plantarum*-1052 فضلاً عن تسجيل رقم عالمي لكل عزلة.

فيوزاريوم على مختلف محاصيل الخضر من الأمراض المستوطنة لكثير من الحقول الزراعية (ناصر وحسن، 2014)، ولتجنب الإعتماد التام على المبيدات الكيميائية الباهظة والمؤثرة سلباً في صحة الإنسان وبيئته فقد دأبت الأبحاث العلمية نحو المقاومة الأحيائية باستخدام مختلف الأحياء المجهرية، وتعد بكتيريا حامض اللبنيك (LAB) *Lactic acid bacteria* جنس *Lactobacillus sp.* من الأحياء التي اثبتت فعاليتها المضادة للفطور (Hamed et al., 2011؛ Lutz et al., 2012)، وهذا يفسر دور هذه البكتيريا الفعال المضاد للميكروبات استخدامها كعامل لحفظ الأغذية وبديلة عن المواد الحافظة الكيميائية (Bourdichon et al., 2012).

ذكر Canpolat et al. (2018) أنه بالرغم من اثبات فعالية بكتيريا LAB المضادة للفطور مختبرياً (*in vitro*) إلا أن هناك معلومات محدودة على علاقتها مع ممرضات النبات. ونتيجة لأهمية الطرائق الأحيائية للسيطرة على أمراض النبات من نواحي الأمان وسلامة الحاصل وعدم تأثيرها في الأحياء النافعة الطبيعية، فقد هدفت الدراسة الحالية إلى تقويم كفاءة ثلاث عزلات محلية من بكتيريا *L. plantarum* في مكافحة مرض ذبول فيوزاريوم على البندورة/الطماطم من خلال تثبيط الفطر الممرض واستحاثاة مقاومة العائل.

مواد البحث وطرائقه

عزل المجتمع البكتيري من المحيط الجذري لنبات البندورة/الطماطم من ثلاث مناطق شملت: حقول محطة أبحاث قسم وقاية النبات، جامعة تكريت، منطقة العلم ومنطقة الدجيل في محافظة صلاح الدين خلال الموسم 2018/2019، باستخدام طريقة التخفيف العشرية ووسط الأجار المغذي (Nutrient Agar)، ثم انتخبت بكتيريا *Lactobacillus* حسب الإختبارات البيوكيميائية الأولية والنمو على مستنبت Man Rogosa Sharpe (MRS) المزود بـ 0.5% من كاربونات الكالسيوم وتتكون الهالة بفعل تحلل الكاربونات بفعل الأحماض العضوية التي تنتجها هذه البكتيريا (Teusink & Molenaar, 2017)، ومن ثم تم التأكيد من تشخيص هذه البكتيريا باستخدام التشخيص الجزيئي المعتمد على التتابع النيوكليوتيدي للجين 16S rDNA.

الإختبارات المظهرية والبيوكيميائية

اجريت الإختبارات المظهرية التي شملت شكل الخلية البكتيرية وقوام سطح المستعمرة ولون المستعمرة فضلاً عن بعض الإختبارات البيوكيميائية التي تضمنت النمو عند درجات حرارة 10-50 °س، وتكوين الأبوغ الداخلية، وإنتاج الأندول، وإنزيمات اليوريز، والجلاتينيز، والكاتاليز، والاكسيديز، وتخمر السكريات وذلك باتباع الطرائق

التوصيات الزراعية) والري (باستخدام منظومة التقيط) وعزق الأدغال/الأعشاب حسب حاجة الحقل.

مؤشرات المقاومة الجهازية

قدرت مؤشرات المقاومة المقاومة الجهازية والتي شملت تقدير بعض البروتينات المتعلقة بالمرض (PRPs) Pathogen Related Proteins وهي البيروكسيداز (Peroxidase) والبيتا-كلوكانيز (β -glucanase) والكايتينيز (Chitinase).

تحضير المستخلص الأنزيمي

وزن 1 غ من جذور كل معاملة وغسل جيداً بالماء الجاري ثم بالماء المقطر ثم جففت بورق الترشيح وقطع إلى قطع صغيرة، تم سحقها في هاون خزفي داخل حمام ثلجي، وضيف إليه 10 مل من محلول الفوسفيت المنظم ذي الرقم الهيدروجيني 5.6 ورشح بورق الترشيح، ثم نذب في جهاز الطرد المركزي المبرد إلى درجة 4 °س بواقع 10.000 دورة /دقيقة لمدة 20 دقيقة، أهمل الراسب وجمع الراشح النباتي الذي يمثل المستخلص الأنزيمي الخام (حسن وآخرون، 2011) ثم قدرت بعض البروتينات المرتبطة بالإمراضية.

تقدير انزيم الكايتينيز (Chitinase) - اضيف 0.5 مل من محلول الكايتين (1%) الممضر حسب Mahadevan & Sridhar (1986) إلى 0.5 مل من المستخلص الأنزيمي لكل معاملة على حدة ثم حضنت لمدة ساعتين في حمام مائي عند 37 °س، بعدها نقلت العينات إلى جهاز الطرد المركزي بسرعة 2000 دورة/دقيقة لمدة دقيقتين للتخلص من الشوائب، بعدها أخذ 1 مل من الراشح وضيف إليه 1 مل من محلول ثنائي نايترو حامض السالسليك (DNS) Dinitro salysalic acid وبعد دقيقة واحدة ادخلت العينات إلى حمام مائي بدرجة 100 °س لمدة خمس دقائق ثم بردت العينات وقيست الامتصاصية باستخدام جهاز المطياف الضوئي بطول موجة 540 نانوميتر ولاستخراج الفعالية الأنزيمية وحدة/مل اعتمد المنحني القياسي لسكر N-acetyl glucoseamine من ثم استخرجت الفعالية النوعية للإنزيم (Tweddell et al., 1994).

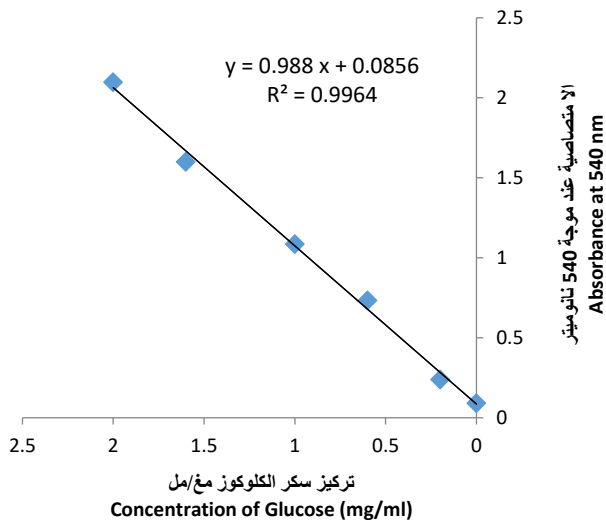
المنحني القياسي لسكر ن- أستايل كلوكوز أمين N-Acetyl Glucose amine standard curve - أضيف 1 مل من محلول DNS إلى 1 مل من التراكيز الآتية لسكر ن- أستايل كلوكوز أمين (0.0، 0.6، 1.0، 1.6 و 2.0 مغ/مل) وأغلقت الأنابيب ووضعت في حمام مائي عند 100 °س لمدة 5 دقائق ثم بردت وقيست الامتصاصية بجهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer وعند طول موجة 540

الكفاءة التضادية لعزلات بكتيريا *L. plantarum* ضد الفطر FOL
نفذت هذه التجربة في أطباق بتري تحتوي على مستنبت PDA المعقم، لفتح مركز كل طبق بقرص من الفطر FOL قطره (0.5 سم) اخذ من حافة مستعمرة الفطر بعمر 4-5 أيام بوساطة ثاقب فليني ثم أضيف لقاح البكتيريا النامية على مستنبت MRS السائل وبعمر 48 ساعة إلى الأطباق بواقع 0.1 مل بشكل خط طوله 3 سم يبعد 4 سم عن قرص الفطر الممرض وبثلاثة مكررات مع ترك طبق بدون اضافة اللقاح البكتيري واطرافه مستنبت MRS السائل (غير الملقح) بالطريقة اعلاه نفسها كمعاملة مقارنة، حضنت جميع الأطباق عند 27±1 °س لمدة 48 ساعة. عند وصول النمو الفطري إلى خط الوسط MRS (الشاهد) حسبت منطقة التثبيط بين حافة نمو الفطر الممرض وخط النمو البكتيري باستخدام المسطرة (حسن وآخرون، 2017).

المكافحة الحيوية لمرض ذبول فيوزاريوم المتسبب عن الفطر FOL
نفذت التجربة في جامعة تكريت - حقول كلية الزراعة وفق تصميم القطاعات العشوائية الكاملة، إذ تم تنظيف تربة الحقل وحرثها وتسويتها وعقمت بالفورمالين بتركيز 2% من المحلول التجاري (37%)، وغطيت بالنابليون لمدة سبعة أيام ثم أجريت التهوية لتبخر الفورمالين، قسم الحقل إلى 3 قطاعات المسافة بين القطاع والآخر 2 م كل قطاع يحتوي 6 معاملات بمسافات متساوية، بواقع 6 معاملات لكل قطاع وبذلك يكون مجموع الوحدات التجريبية الكلية 18 وحدة تجريبية بأبعاد 1.2×3.5 م (لكل وحدة تجريبية) مع ترك مسافة 60 سم بين الوحدات التجريبية وذلك بعمل كتف ترابي ارتفاعه 25-30 سم. قسمت كل وحدة تجريبية إلى ثلاثة خطوط كل خط يحتوي 5 نباتات والمسافة بين الخط والآخر 1.75 م وما بين النبات والآخر 30 سم. شملت التجربة زراعة صنف البندورة/الطماطم (سان) وتضمنت المعاملات التالية: النباتات السليمة (بدون إصابة)، الفطر الممرض FOL + *L. plantarum*-1050، FOL + *L. plantarum*-1051، FOL + *L. plantarum*-1052، و FOL+ Tachegarín.

أضيف لقاح الفطر الممرض FOL المحمل على بذور الدخن ($10^{12} \times 1.6$) وحدة تكوين مستعمرة/غ) إلى المعاملات المقرر تلويثها بمعدل 1 غ لقاح لكل شتلة كذلك اضيف لقاح البكتيريا بواقع 2 مل/شتلة (بتركيز $10^9 \times 2.3$ خلية بكتيريا/مل) بعد 7 أيام من إضافة الفطر الممرض، كما أضيف المبيد تشيجارين (30% Hymexazol) والذي أختير بناء لتجارب مختبرية سابقة (Hassan & Aldoury, 2018)، إذ اضيف المبيد (10 مل/10 لتر ماء) بواقع 100 مل لكل شتلة بعد سبعة أيام من إضافة الفطر الممرض، وأجريت عمليات التسميد (حسب

استخرج المنحنى القياسي لتركيز الكلوكوز مع قيمة الإمتصاصية (شكل 2). (Mahadevan & Sridhar, 1986).



شكل 2. المنحنى القياسي لامتصاص الضوء عند موجة 540 نانومتر لتركيز مختلفة من سكر الكلوكوز.

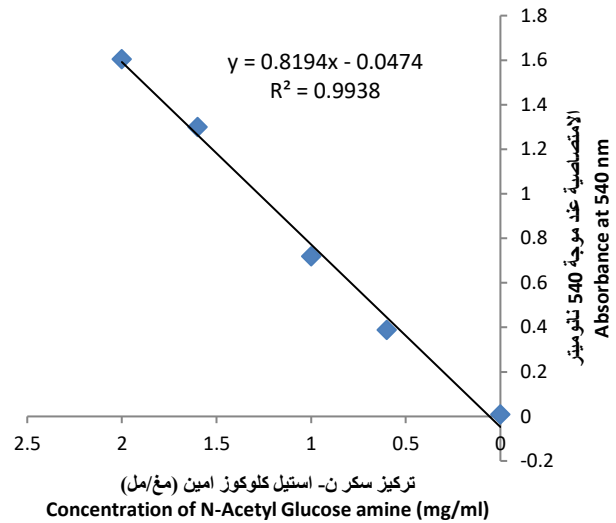
Figure 2. Standard curve of light absorbance at 540 wavelength of different glucose concentrations.

تقدير انزيم البيروكسيداز (Peroxidase) - قدر أنزيم البيروكسيداز حسب طريقة Hammerschmidt *et al.* (1982) من خلال قياس الإمتصاصية عند طول الموجة 470 نانومتر لخليط التفاعل المكون من 2.5 مل محلول بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 أو 0.1 مل من المستخلص الأنزيمي لكل معاملة وعرفت الوحدة الأنزيمية بالتغير في الإمتصاصية بمقدار 0.01 لكل دقيقة ثم قدرت فاعلية الأنزيم (وحدة/مل)، بعدها قدرت فاعلية الأنزيم النوعية (وحدة/مغ بروتين).

تقدير البروتين - قدر البروتين اعتماداً على طريقة Cooper (1977)، وذلك عن طريق قياس الإمتصاصية عند طول الموجة 540 نانومتر لمزيج التفاعل المؤلف من 1 مل من العينة و 4 مل من كاشف بايوريث بعد التحضين لمدة 20 دقيقة عند 37 °س، قدر تركيز البروتين (مغ/مل) باستخدام المنحنى القياسي لألبومين مصل البقر.

المنحنى القياسي لتقدير البروتين - حضرت 10 أنابيب تحتوي تراكيز مختلفة من البومين المصل البقري (albumin bovine serum) شملت 0، 1، 2، 3، 4، 5، 6، 7، 8، 9 و 10 مغ/مل، وأضيف لكل أنبوبة 4 مل من محلول بايوريث مزجت جيداً وحضنت الأنابيب لمدة 20 دقيقة عند 37 °س وقيست الإمتصاصية عند طول موجة 540 نانومتر ثم تم رسم المنحنى القياسي لتركيز البروتين مع قيمة الإمتصاصية (شكل 3).

نانوميتر وأستخرج المنحنى القياسي لتركيز الكلوكوز مع قيمة الإمتصاصية (شكل 1). (Mahadevan & Sridhar, 1986).



شكل 1. المنحنى القياسي لامتصاص الضوء عند موجة 540 نانومتر لتركيز مختلفة من سكر الكلوكوز N-Acetyl Glucoseamine.

Figure 1. Standard curve of light absorbance at 540 nm wavelength of different N-Acetyl Glucose amine concentrations.

تقدير انزيم بيتا - كلوكانيز β -1,3 glucanase - قدرت فاعلية هذا الأنزيم حسب طريقة Tweddell *et al.* (1994) وذلك بإضافة 1 مل من محلول β -glucan (تركيز 5%) إلى 1 مل من المستخلص الأنزيمي وحضن المزيج عند 35 °س في حمام مائي لمدة 60 دقيقة ثم اخذ 1 مل من المزيج واضيف اليه 1 مل من محلول الـ DNS وسخن بالحمام المائي إلى حرارة 100 °س لمدة 5 دقائق وتم تبريد الأنابيب بسرعة واضيف إليها 2 مل ماء مقطر وقيست الإمتصاصية بجهاز المطياف الضوئي عند طول موجة 540 نانوميتر. واستخرجت فاعلية الأنزيم (وحدة/مل) بإعتماد المنحنى القياسي لسكر الكلوكوز ثم قدرت الفاعلية النوعية للأنزيم (وحدة/مغ بروتين) (Mahadevan & Sridhar, 1986).

المنحنى القياسي لسكر الكلوكوز (Glucose standard curve) - حضرت تراكيز المنحنى القياسي لسكر الكلوكوز (0.0، 0.2، 0.6، 1.0، 1.6 و 2.0 مغ/مل) واضيف 1 مل من محلول الـ DNS لكل تركيز، ثم غلفت الأنابيب بورق الألمنيوم ووضعته في حمام مائي عند 100 °س لمدة 5 دقائق بعدها بردت الأنابيب واضيف إليها 5 مل ماء مقطر مزجت جيداً وتم قياس الإمتصاصية بجهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer) وعند طول موجة 540 نانوميتر ثم

Chlorophyll Content Meter (CCM-200 Plus) ذي المنشأ الأمريكي (الشركة المصنعة OPTI-SCIENCES).

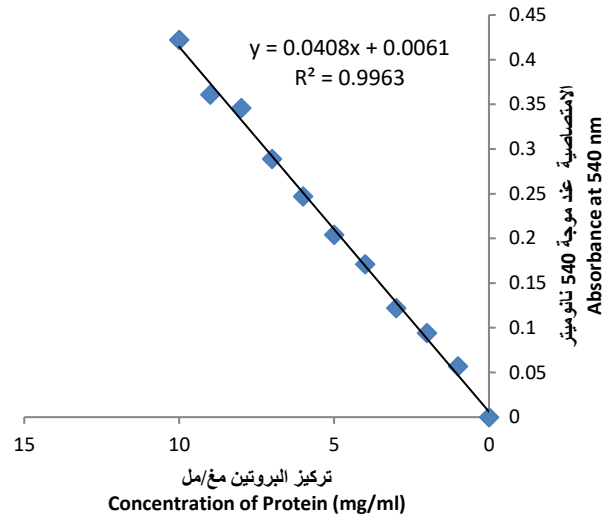
انتاجية النبات - تم حساب أوزان الحاصل لجميع معاملات التجربة ومكرراتها بواقع أربع جنيات بوساطة ميزان ميكانيكي ثم استخرج معدل انتاج النبات الواحد (غ).

التحليل الإحصائي - نفذت التجربة حسب تصميم القطاعات العشوائية الكاملة (RCBD) وتمت المقارنة بين المتوسطات حسب اختبار أقل فرق معنوي (LSD) عند مستوى احتمالية 0.05. (الراوي وخلف الله، 1980).

النتائج

شخصت ثلاث عزلت تعود إلى النوع *L. plantarum* رمزت بالأرقام 1050، 1051 و 1052 من عينات المحيط الجذري لنبات البندورة/الطماطم (من أحد حقول محطة أبحاث قسم وقاية النبات/جامعة تكريت ومنطقتي العلم والدجيل-العراق، على التوالي) وهي العزلات التي استهدفتها هذه الدراسة في حين اهتمت الأنواع الأخرى. توضح نتائج الجدول 1 الصفات المظهرية وبعض الاختبارات البيوكيميائية التي اعتمدت في التشخيص، وتبين هذه النتائج أن البكتيريا المعزولة عصوية الشكل (بشكل سلاسل بالأغلب) وجميعها موجبة لصبغة جرام ونمت بشكل جيد عند حرارة 10-40 °س وكانت سالبة لاختبارات تكوين الأبواغ الداخلية والاندول واليوريز والجلاتينيز والكاتاليز والاكسديز ومخمرة لسكريات الكلوكوز واللاكتوز والسكرورز والفركتوز فيما اختلفت العزلة رقم 1051 عن باقي العزلتين من حيث قوام المستعمرة الأملس وعدم تخميرها لسكر المانيتول، كما اختلفت العزلة رقم 1052 بلون المستعمرة الابيض الكريمي ونموها عند 50 °س.

التشخيص الجزيئي - يوضح شكل 4 الشجرة الوراثية التي تبين تقارب عزلت بكتيريا *L. plantarum* الثلاث مع العزلات العالمية المسجلة في البنك الوراثي العالمي، وعند مقارنة التشابه الوراثي مع أقرب عزلة وهي البكتيريا *L. plantarum* strain CIP 103151 التي تحمل الرقم العالمي NR 104573.1 (من فرنسا) تبين أن نسبة التشابه بلغت 99.16 و 99.06 و 98.91% مع العزلات المدروسة في هذا البحث ذات الأرقام 1050، 1051 و 1052، على التوالي، مما يدل على دقة تشخيص البكتيريا المسجلة في هذه الدراسة مع وجود اختلاف وراثي بنسبة 0.84-1.09%.



شكل 3. المنحنى القياسي لامتصاص الضوء عند موجة 540 نانومتر لتركيز مختلفة من البروتين.

Figure 3. Standard curve for light absorbance at 540 nm wavelength of different protein concentrations.

الفعالية النوعية - الفعالية النوعية (وحدة/مغ بروتين) = الفعالية الأنزيمية (وحدة/مل)/تركيز البروتين (Mahadevan & Sridhar, 1986).

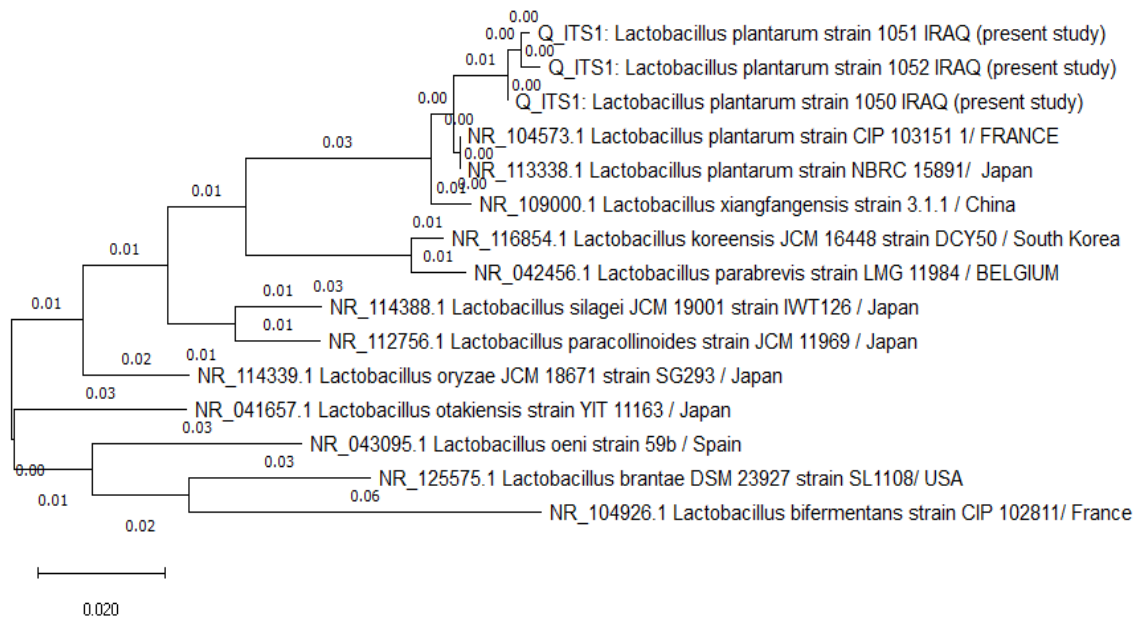
تقدير نسبة الإصابة - قدرت نسبة الإصابة حسب المعادلة التالية: النسبة المئوية للإصابة = عدد النباتات المصابة / عدد النباتات الكلي × 100

تقدير شدة إصابة النباتات - اعتماداً على الدليل المرضي المذكور من قبل Arici *et al.* (2018) المؤلف من خمس درجات (0= النبات سليم والجذور سليمة؛ 1= لا يوجد ذبول على النبات لكن يحدث تلون بسيط في الاوعية واصفرار الأوراق؛ 2= تلون أوعية الجذور بالكامل مع اصفرار شامل للأوراق وحصول ذبول بسيط؛ 3= يمتد تلون الأوعية من الجذور إلى قواعد السوق وحدث الذبول مع موت بعض أجزاء النبات الخضرية؛ 4= موت النبات). قدرت شدة الإصابة حسب معادلة Mckinney (1923) على الشكل التالي: شدة الإصابة = (عدد النباتات في الدرجة 0 × 0 + عدد النباتات في الدرجة 1 × 1 + + عدد النباتات في الدرجة 4 × 4) / مجموع النباتات المفحوصة × أعلى فئة × 100.

تقدير بعض معايير النمو الخضري - حسب ارتفاع 5 نباتات من كل معاملة (لكل قطاع) وبشكل عشوائي بوساطة مسطرة مترية من قاعدة الساق إلى قمة النبات واستخرج منها معدل الارتفاع، كما وقدر الوزن الجاف للمجموعين الجذري والخضري حسب مانكره حسن وآخرون، (2011)، تم تقدير محتوى الكلورفيل وذلك باستخدام جهاز الكلوروفيل

Table 1. Morphological properties and biochemical tests of *Lactobacillus plantarum* isolates.

عزلات <i>L. plantarum</i> Isolates of <i>L. plantarum</i>			الصفات Characters	الصفات
1052	1051	1050		
Bacillus عصوي	Bacillus عصوي	Bacillus عصوي	Bacteria cell morphology	شكل خلية البكتيريا
Curled خشن	Entire ملساء	Curled خشن	Colony surface structure	قوام سطح المستعمرة
White-creamy ابيض-كريمي	White ابيض	White ابيض	Colony color	لون المستعمرة
+	+	+	Gram reaction	تفاعل صبغة جرام
			Growth at Temperature (C°)	النمو بدرجات الحرارة (س°)
+	+	+	10	10
+	+	+	20	20
+	+	+	30	30
+	+	+	40	40
+	-	-	50	50
-	-	-	Endospore formation	تكوين الأبواغ الداخلية
-	-	-	Indole Production	انتاج الاندول
-	-	-	Urease Production	انزيم اليوريز
-	-	-	Gelatinase Production	انزيم الجلاتينيز
-	-	-	Catalase Production	انزيم الكاتاليز
-	-	-	Oxidase Production	انزيم الاوكسيديز
			Carbohydrate fermentation	تخمير السكريات
+	+	+	- Glucose	- كلوكوز
+	+	+	- Lactose	- لاكتوز
+	+	+	- Sucrose	- سكروز
+	-	+	- Mannitol	- مانيتول
+	+	+	- Fructose	- فركتوز



شكل 4. الشجرة الوراثية التي تبين تقارب عزلات بكتيريا *Lactobacillus plantarum* الثلاثة مع العزلات العالمية المسجلة في البنك الوراثي العالمي.

Figure 4. Genetic tree of relationship of the three *Lactobacillus plantarum* isolates compared with world strains.

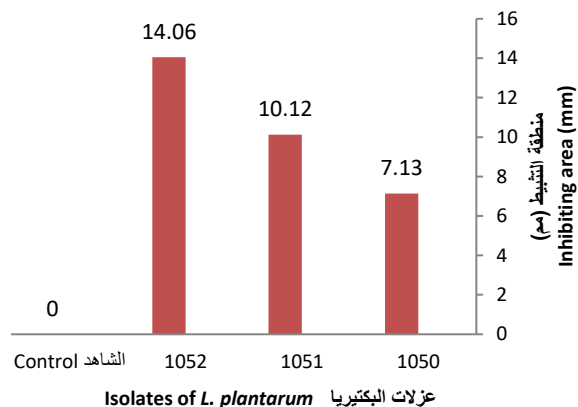
و 1051 في جميع صفات النمو الخضري مقارنة مع معاملات العزلة 1050 والنباتات السليمة والنباتات المصابة إلا أنها لم تسجل فروقات معنوية مقارنة مع معاملة المبيد تشجارين.

تأثير عزلات بكتيريا *L. plantarum* في نسبة الإصابة وشدتها في نباتات البندورة/الطماطم تحت تأثير الإصابة بالفطر الممرض FOL
 اثبتت عزلة البكتيريا 1052 كفاءتها في تثبيط نمو الفطر الممرض FOL من خلال تسجيله لأدنى نسبة وشدة إصابة لنباتات البندورة/الطماطم (صنف سان) إذ بلغت 18.62 و 15.44%، على التوالي، ويتفوق معنوي مقارنة مع جميع المعاملات الأخرى وبضمنها معاملة مبيد التشجارين في حين سجلت أعلى نسبة وشدة إصابة في معاملة لفطر الممرض فقط إذ بلغت 82.87 و 79.43%، على التوالي (جدول 3).

تأثير عزلات بكتيريا *L. plantarum* في استحثاث مقاومة نباتات البندورة/الطماطم تحت تأثير الإصابة بالفطر الممرض FOL
 يبين جدول 4 دور عزلات البكتيريا *L. plantarum* في استحثاث بعض مؤشرات مقاومة النبات والتي شملت بعض البروتينات المرتبطة بالإمراضية PRP_s إذ اوضحت النتائج تسجيل استحثاث لمقاومة النبات لجميع معاملات الدراسة عدا معاملة النباتات السليمة، وسجلت اعلى المؤشرات التي تضمنت انزيمات البيتا - كلوكانيز والكابتينيز والبيروكسيداز من قبل عزلة البكتيريا 1052 إذ بلغت الفعالية النوعية لهذه الانزيمات الثلاثة 2.87، 4.13 و 5.84 وحدة/مغ بروتين، على التوالي. كما واستحثت معاملة الفطر الممرض فقط مقاومة النبات أيضاً إذ بلغت قيم المؤشرات أعلاه 2.133، 2.76 و 4.23 وحدة/مغ بروتين، على التوالي، في حين بلغت هذه المؤشرات ادنى مستوياتها في معاملة النباتات السليمة إذ بلغت 0.71، 1.33 و 1.02 وحدة/مغ بروتين، على التوالي.

تأثير عزلات بكتيريا *L. plantarum* في انتاجية نباتات البندورة/الطماطم تحت تأثير الإصابة بالفطر الممرض FOL
 يشير شكل 6 إلى انتاجية نباتات البندورة/الطماطم (وزن الثمار/النبات) تحت تأثير الإصابة بالفطر الممرض والمعامل بعزلات البكتيريا *L. plantarum* مقارنة بالمبيد تشجارين، إذ اوضحت النتائج تفوقاً معنوياً في انتاجية النبات المعامل بعزلة البكتيريا 1052 والتي بلغت 4981.26 غ/النبات مقارنة مع المعاملات الأخرى. تليها معاملي عزلة البكتيريا 1051 والمبيد تشجارين إذ بلغت 3894.17 و 3887.55 غ/النبات، على التوالي (بدون وجود فروق معنوية بينهما) مقارنة بادنى انتاجية سجلت في معاملة الفطر الممرض فقط والتي بلغت 716.56 غ/النبات.

الكفاءة التضادية لعزلات بكتيريا *L. plantarum* ضد الفطر FOL
 اوضحت النتائج (شكل 5) تبايناً في تثبيط الفطر الممرض FOL باختلاف عزلة البكتيريا مع تسجيل فروق معنوية في تثبيط نمو الفطر الممرض بين العزلات الثلاثة المدروسة، وسجلت العزلة البكتيرية رقم 1052 أعلى تثبيط لنمو الفطر الممرض، إذ بلغت منطقة التثبيط 14.06 مم تلتها العزلة البكتيرية رقم 1051 والتي بلغت منطقة تثبيط نمو الفطر الممرض فيها 10.12 مم في حين سجلت العزلة البكتيرية 1052 أدنى نسبة تثبيط والتي بلغت 7.13 مم.



شكل 5. تأثير ثلاث عزلات من بكتيريا *Lactobacillus plantarum* في تثبيط نمو الفطر الممرض *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (LSD_{0.05} = 2.36).

Figure 2. Effect of three *L. plantarum* isolates on growth inhibition of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (LSD_{0.05}=2.36).

تأثير عزلات بكتيريا *L. plantarum* في بعض معايير النمو الخضري لنباتات البندورة/الطماطم تحت تأثير الإصابة بالفطر الممرض FOL
 يبين الجدول 2 تأثير عزلات البكتيريا *L. plantarum* المدروسة في بعض معايير النمو الخضري لنبات الطماطم (صنف سان) تحت تأثير الإصابة بالفطر الممرض، إذ اوضحت النتائج تفوقاً معنوياً في الوزن الجاف للمجموعين الجذري والخضري عند المعاملة بالعزلتين 1052 و 1051 بوجود الفطر الممرض إذ بلغ 51.16، 188.04، 48.39 و 181.03 غ، على التوالي، مقارنة بـ 47.15 و 91.40 غ، على التوالي، في معاملة الفطر الممرض فقط. كما وتفوق محتوى الكلوروفيل معنوياً في نباتات البندورة/الطماطم المعاملة بالعزلتين 1052 و 1051 إذ بلغ 44.47 و 44.05 سباد، على التوالي مقارنة بـ 23.56 سباد، في معاملة الفطر الممرض فقط. واكدت العزلة 1052 كفاءتها كذلك في ارتفاع النبات إذ سجلت أعلى ارتفاع بلغ 68.98 سم ويتفوق معنوي مقارنة مع المعاملات الأخرى، في حين سجلت معاملة الفطر الممرض فقط أدنى ارتفاع للنبات بلغ 42.33 سم. وبالرغم من تفوق عزلتا البكتيريا 1052

جدول 2. تأثير ثلاث عزلات من بكتيريا *Lactobacillus plantarum* في بعض المعايير الخضرية لنباتات البندورة/الطماطم (صنف سان) تحت تأثير الإصابة بالفطر الممرض *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

Table 2. Effect of three *Lactobacillus plantarum* isolates on some tomato (sun cultivar) growth parameters following infection with the pathogenic fungus *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

ارتفاع النبات (سم) Plant height (cm)	محتوى الكلوروفيل (سباد) Chlorophyll content (SPAD)	الوزن الجاف للمجموع الخضري (غ) Dry weight of shoot system	الوزن الجاف للمجموع الجذري (غ) Dry weight of root system (gm)	المعاملات Treatment
65.68	41.45	178.52	48.48	النباتات السليمة Healthy plants
42.33	23.56	91.40	47.15	الفطر الممرض <i>F. o. lycopersici</i> Fungal pathogen <i>F. o. lycopersici</i>
62.39	40.51	174.22	47.13	الفطر الممرض <i>L. plantarum</i> -1050 + <i>F. o. lycopersici</i> Fungal pathogen <i>F. o. lycopersici</i> + <i>L. plantarum</i> -1050
66.13	44.05	181.03	48.39	الفطر الممرض <i>L. plantarum</i> -1051 + <i>F. o. lycopersici</i> Fungal pathogen <i>F. o. lycopersici</i> + <i>L. plantarum</i> -1051
68.98	44.47	188.04	51.16	الفطر الممرض <i>L. plantarum</i> -1052 + <i>F. o. lycopersici</i> Fungal pathogen <i>F. o. lycopersici</i> + <i>L. plantarum</i> -1052
68.11	44.40	181.67	50.91	الفطر الممرض Tachegarín + <i>F. o. lycopersici</i> Fungal pathogen <i>F. o. lycopersici</i> + Tachegarín
0.81	2.67	9.93	0.68	أقل فرق معنوي عند مستوى احتمال 5% LSD at P=0.05

جدول 3. تأثير ثلاث عزلات من بكتيريا *Lactobacillus plantarum* في نسب وشدة الإصابة (%) بمرض ذبول فيوزاريوم على البندورة/الطماطم (صنف سان) المتسبب عن الفطر الممرض *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

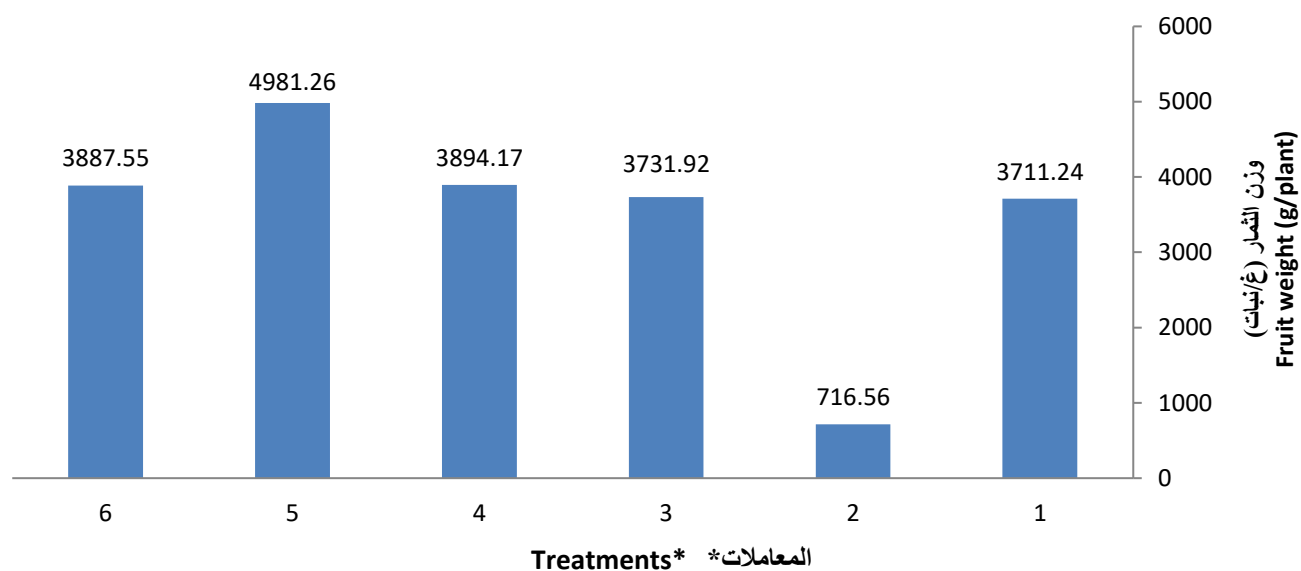
Table 3. Effect of three *Lactobacillus plantarum* isolates on the infection rate and severity of infection (%) with tomato wilt disease caused by the pathogenic fungus *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici*.

شدة الإصابة (%) Severity of infection (%)	نسبة الإصابة (%) Infection rate (%)	المعاملات Treatment
0.00	0.00	النباتات السليمة Healthy plants
79.43	82.87	الفطر الممرض <i>F. o. lycopersici</i> Fungal pathogen <i>F. o. lycopersici</i>
30.11	33.50	الفطر الممرض <i>L. plantarum</i> -1050 + <i>F. o. lycopersici</i> Fungal pathogen <i>F. o. lycopersici</i> + <i>L. plantarum</i> -1050
22.03	25.49	الفطر الممرض <i>L. plantarum</i> -1051 + <i>F. o. lycopersici</i> Fungal pathogen <i>F. o. lycopersici</i> + <i>L. plantarum</i> -1051
15.44	18.62	الفطر الممرض <i>L. plantarum</i> -1052 + <i>F. o. lycopersici</i> Fungal pathogen <i>F. o. lycopersici</i> + <i>L. plantarum</i> -1052
17.20	24.06	الفطر الممرض Techagarín + <i>F. o. lycopersici</i> Fungal pathogen <i>F. o. lycopersici</i> + Techagarín
2.03	3.56	أقل فرق معنوي عند مستوى احتمال 5% LSD at P=0.05

جدول 4. تأثير ثلاث عزلات من بكتيريا *Lactobacillus plantarum* في استحثاث مقاومة نباتات البندورة/الطماطم (صنف سان) تحت تأثير الإصابة بالفطر الممرض *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

Table 4. Effect of three *Lactobacillus plantarum* isolates on induction of resistance in tomato (sun cultivar) following infection with the pathogenic fungus *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

بيروكسيداز وحدة/مغ بروتين Peroxidase Unit/mg protein	كايتيناز وحدة/مغ بروتين Chitinase Unit/mg protein	β - كلوكانيز وحدة/مغ بروتين β -glucanase Unit/mg protein	المعاملات Treatment
1.02	1.33	0.71	النباتات السليمة Healthy plants
4.23	2.76	2.13	الفطر الممرض <i>F. o. lycopersici</i> <i>F. o. lycopersici</i> fungal pathogen
4.19	3.06	2.01	الفطر الممرض <i>L. plantarum</i> -1050 + <i>F. o. lycopersici</i> Fungal pathogen <i>F. o. lycopersici</i> + <i>L. plantarum</i> -1050
5.11	3.45	2.30	الفطر الممرض <i>L. plantarum</i> -1051 + <i>F. o. lycopersici</i> Fungal pathogen <i>F. o. lycopersici</i> + <i>L. plantarum</i> -1051
5.84	4.13	2.87	الفطر الممرض <i>L. plantarum</i> -1052 + <i>F. o. lycopersici</i> Fungal pathogen <i>F. o. lycopersici</i> + <i>L. plantarum</i> -1052
3.76	1.96	1.81	الفطر الممرض Techagarin + <i>F. o. lycopersici</i> Fungal pathogen <i>F. o. lycopersici</i> + Techagarin
0.32	0.37	0.21	أقل فرق معنوي عند احتمال 5% 0.05=LSD at P



شكل 6. تأثير ثلاث عزلات من بكتيريا *Lactobacillus plantarum* في انتاجية نباتات البندورة/الطماطم (صنف سان) تحت تأثير الإصابة بالفطر الممرض *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (LSD_{0.05} = 23.36). *المعاملات: 1= النباتات السليمة، 2= الفطر الممرض *F. o. f.sp. lycopersici*؛ 3= *L. plantarum* -1050 + *F. o. f.sp. lycopersici*؛ 4= *L. plantarum* -1051 + *F. o. f.sp. lycopersici*؛ 5= *L. plantarum*-1052 + *F. o. f.sp. lycopersici*؛ 6= Techagarin+ *F. o. f.sp. lycopersici*.

Figure 6. Effect of three *Lactobacillus plantarum* isolates on the productivity of tomato (sun cultivar) under infection conditions with the pathogenic fungus *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (LSD_{0.05}= 23.36). *Treatments: 1= Healthy plants; 2= *F. o. f.sp. lycopersici*; 3= *F. o. f.sp. lycopersici* + *L. plantarum*-1050; 4= *F. o. f.sp. lycopersici* + *L. plantarum*-1051; 5= *F. o. f.sp. lycopersici* + *L. plantarum*-1052; 6= *F. o. f.sp. lycopersici* + Techagarin.

الفطر وبدرجة أقل الفطر *F. oxysporum* على البندورة/الطماطم. كان لمعاملات العزلات الثلاث لبكتيريا *L. plantarum* التأثير الواضح في تحسين النمو الخضري لنبات البندورة/الطماطم تحت ظروف الإصابة بالفطر الممرض (حقلياً) وهذا ربما يعود إلى دور هذه البكتيريا في تثبيط نمو الفطر الممرض فضلاً عن دور الأحماض العضوية التي تنتجها في زيادة ذائبية المركبات وتحرير العناصر الضرورية للنمو وتدعم دراسة Lutz et al. (2012) هذا الإتجاه وذلك من خلال استخدام بكتيريا حامض اللبنيك في مكافحة الأحيائية للفطر *Pythium ultimum* على الخيار وذكرت الدراسة تشجيع نمو النباتات وعدم تسجيل أي تأثير سلبي لهذه البكتيريا في النباتات السليمة في حين فقدت النباتات المصابة 85% من وزنها الطري.

إن انخفاض نسبة الإصابة وشدها بفعل عزلات بكتيريا *L. plantarum* على نباتات البندورة/الطماطم تحت ظروف الإصابة بالفطر FOL حقلياً، تعد من أهم المؤشرات التي تشير إلى كفاءة بكتيريا حامض اللبنيك في تثبيط الفطر الممرض ومن ثم مقاومة مرض ذبول فيوزاريوم وذلك ربما يعزى إلى المركبات الفعالة التي تنتجها هذه البكتيريا، وقد ذكرت الدراسات السابقة أن الفعالية المضادة للفطور لبكتيريا حامض اللبنيك تكمن في إنتاجها لكثير من المركبات الفعالة مثل حامض الكاربوريك (carporic acid) وحامض الفاليريك (valeric acid)، methylhydantion و mevalonolactone، كما ونقى مركب آخر delta-dodecalactone من *L. plantarum* فعال ضد فطور *A. petrakii*، *A. nidulans*، *A. fumigatus*، *A. flavus* و *A. ochraceus* و *Penicillium roqueforti* إذ بلغ التركيز الأدنى المثبط 350-6250 مايكروغرام/مل (Yang et al., 2011)، فضلاً عن مركبات أخرى مثل الأحماض العضوية مثل حامض اللبنيك وحامض البروبونيك وأحماض phenyllactic acid، hydroxyphenyllactic acid و benzoic acid و fatty acid، ومركبات أخرى مثل الأستون وثنائي الاستيل وبيبتيدات ثنائية حلقيه cyclic dipeptides وبيروكسيد الهيدروجين ومركب reuterin فضلاً عن عدد من المركبات البروتينية ذات التأثير المضاد للفطور (Crowley et al., 2013)؛ Leyva Salas et al., 2018). إن هذه المركبات (والأحماض العضوية منها بشكل خاص) تنتشر خلال الأغشية الخلوية للكائن الممرض في صورة أحماض غير مفككة كارهة للماء ومن ثم تخفض الرقم الهيدروجيني لساييتوبلازم الخلايا مما يعرقل كافة فعاليتها الحيوية (Yang et al., 2011). ولعل تثبيط إنتاج السموم الفطرية له الدور المهم أيضاً بفعل بكتيريا حامض اللبنيك وبالتالي تخفض شدة الإصابة بالمرض وهذا يتفق مع ما ذكره Gerbaldo et al. (2012) بتثبيط البكتيريا *L. fermentum* L23 لنمو الفطر *A. flavus* فضلاً عن منع إنتاج السم الفطري الافلاتوكسين.

تضم بكتيريا حامض اللبنيك (Lactic acid bacteria) مجموعة واسعة من البكتيريا موجبة لصبغة جرام غير مكونة للأبواغ الداخلية وعضوية أو كروية غير متحركة، لها دور في تثبيط الممرضات المايكروبية، وتتواجد في العديد من البيئات مثل التربة والأغذية المخمرة وفي معي اللبائن وغيرها. لذلك كان العزل من منطقة المحيط الجذري لنبات البندورة/الطماطم أهميته كون هذه العزلات متاقمة في هذه البيئات وبالتالي ممكن الاستفادة منها كعامل مكافحة أحيائية. أوضحت كلا من الإختبارات المظهرية لمستعمرات نمو عزلات بكتيريا *Lactobacillus* sp. وبعض الإختبارات المجهرية والبيوكيميائية عائدة هذه العزلات الثلاث إلى النوع *L. plantarum*، وتباينت هذه العزلات في بعض الصفات مثل قوام المستعمرة ولونها والنمو عند 50 °س وتخمر سكر المانيتول مما يدل على وجود بعض الفروقات بين هذه العزلات وربما يعزى ذلك إلى كونها معزولة من مناطق جغرافية مختلفة، فيما تطابقت الصفات الأخرى المدروسة بعائدية العزلات إلى النوع *L. plantarum* وهذا يتوافق مع ما جاءت به دراسات سابقة (Mohan & Kandler & Weiss, 1986)؛ Murugalath, 2012). أكد التشخيص البيوكيميائي لهذه العزلات التشخيص الجزيئي المعتمد على التتابع النيوكليوتيدي للجين 16S RNA وبالرغم من وجود تطابق 98.91-99.16% مع إحدى السلالات المسجلة عالمياً (فرنسا) في البنك الوراثي العالمي، إلا أن هناك تبايناً وراثياً بنسبة 0.84-1.9%. إن ارتفاع النسبة المئوية لتشابه عزلات البكتيريا *L. plantarum* يثبت دقة التشخيص، ومن ناحية أخرى إن الإختلاف الوراثي يدل على كونها عزلات مختلفة.

إن هذا التباين بين العزلات الثلاث انعكس بشكل واضح على الفعالية التثبيطية للفطر الممرض FOL مختبرياً وحقلياً، وتقوق العزلة *L. plantarum*-1052 في تثبيط الفطر الممرض قد يعزى إلى تقوق إنتاجها للأحماض العضوية والمواد الأيضية الأخرى استناداً إلى دراسة Husain et al. (2017). وتتماشى نتائج هذه الدراسة مع دراسة Canpolat et al. (2018) التي بينت التقاوت في تثبيط بعض الفطور الممرضة للنبات مختبرياً من قبل إحدى عزلات البكتيريا *Lactobacillus* sp. وشملت الفطور *Pythium* sp.، *Macrophomina* sp.، *Botrytis*، *Fusarium* sp.، *Rhizoctonia* sp.، *Pestalotiopsis* sp. و *Cylindrocarpon* sp. إذ بلغت مناطق تثبيط نمو هذه الفطور 12.7، 9.7، 9.3، 7.0، 6.0، 4.0 و 1.3 مم، على التوالي. وسجلت دراسة Hamed et al. (2011) تسجيل أعلى تثبيط لنوعي البكتيريا *L. plantarum* و *L. acidophilus* (داخل الجسم الحي) للفطر *Sclerotium rolfsii* على البصل يليه *F. oxysporum* و *R. solani* على

والبيروكسيدز بفعل العزلات المدروسة يشير بوضوح إلى إسهام هذه المؤشرات في تثبيط الفطر الممرض من خلال تحلل مكونات الجذر الخلوية للفطر الممرض المكونة بصورة أساسية من الكايتين والكلوكان، وتتفق هذه النتائج مع دراسة سابقة (Konappa et al., 2016) التي سجلت ارتفاعاً في انزيمات متعدد الفينول اوكسيدز والبيروكسيدز والفينايال النين امونيا ليز والكلوكانيز بفعل بكتيريا حامض اللبنيك وهذا ثبت من الذبول البكتيري المتسبب عن *Ralstonia solanacearum* على البندورة/الطماطم.

يمكن الإستنتاج من هذه الدراسة بأن بكتيريا حامض اللبنيك تعد كعامل مكافحة أحيائي كفوء ضد الفطر الممرض FOL المسبب لمرض الذبول على البندورة/الطماطم بآليات مختلفة مثل انتاجها للمركبات الايضية وتشجيعها لنمو النبات واستحثاث مقاومته الجهازية.

تتماشى نتائج الدراسة الحالية مع بعض الدراسات السابقة، فقد اثبت Zebboudj et al. (2014) وجود فعالية عالية لبكتيريا حامض اللبنيك ورواشحا (الخالية من الخلايا) في تثبيط الفطر *F. oxysporum* f.sp. *albedinis* المسبب لمرض البيوض على نخيل التمر وحقق النوع *Lactococcus lactis* أعلى تثبيط للفطر الممرض على وسط PDA من 13.51-40.29% وعلى الوسط MRS من 41.17-100%، أما Husain et al. (2017) فقد اثبت فعالية عالية لبكتيريا LAB ضد الفطر *Fusarium* sp. الممرض على نباتي الفلفل والورد الجوري. كما منعت بكتيريا *L. fermentum* و *L. plantarum* تسوخ ثمار البندورة/الطماطم بفعل فطور *Rhizopus*, *A.niger* و *Mucor* sp. (Temitope & Oluchi, 2015).

تعد آليات استحثاث مقاومة النبات من الإتجاهات المهمة في كبح أمراض النبات، إن ارتفاع مؤشرات الكايتينيز والبيتا-كلوكانيز

Abstract

Hassan, A.A., A.R. Mahmoud and L.Q. Mohammed. 2020. Isolation and identification of local isolates of *Lactobacillus plantarum* and evaluation of their efficacy in controlling tomato *Fusarium* wilt disease. Arab Journal of Plant Protection, 38(2): 149-161.

Three isolates of lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum* were isolated from tomato rhizosphere of the Plant Protection Department fields (Tikrit University), Al-alam and Al-dejial regions, Salah Aldin Governorate, Iraq. The isolates were identified morphologically and biochemically and were given the code numbers 1050, 1051 and 1052. This identification was confirmed by molecular tests based on 16S rRNA sequencing, and were registered in NCBI as MN880156.1, MN880158.1 and MN880160.1, respectively. The results showed that *L. plantarum* 1052 and *L. plantarum* 1051 in presence of the pathogenic fungus *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* gave maximum shoot and root dry weight, chlorophyll content and plant height, and were significantly superior to other treatments and to the pathogenic fungus treatment alone. The highest resistance induction indicators, including glucanase, chitinase and peroxidase produced by *L. plantarum* 1052, and yielded 2.87, 4.13 and 5.84 units/mg protein, whereas the lowest values were 0.71, 1.33 and 1.02 unit/mg protein in uninfected plants, respectively. *L. plantarum* 1052 showed minimum infection rate and severity of 18.62 and 15.44%, respectively, and plant productivity reached 4981.26 g/plant, as compared to the lowest productivity of 716.56 g/plant in the presence of the pathogenic fungus alone.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*, fusarium wilt disease, Biological control, plant resistance induction.

Corresponding author: Abdullah Abdulkareem Hassan, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Tikrit University, Iraq, Email: drabdullah.has67@tu.edu.iq

References

ناصر، مريم حامد ناصر وعبد الله عبد الكريم حسن. 2014. تأثير التداخل بين فطر المقاومة الأحيائي *Trichoderma harziznum* وفطر المايكورايزا *Glomus mossae* في مرض الذبول الفيوزارمي على بعض أصناف الفلفل. مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية، 14: 116-129.

Arici, S.E., O. Caltili and O. Soy. 2018. Screening some tomato seedlings for *Fusarium* f.sp. *lycopersici* (FOL). International Journal of Environmental Trends, 2: 44-52.

Borisade O.A., Y.I. Uwaidem and A.E. Salami. 2017. Preliminary report on *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Sensulato) from some tomato producing Agroecological areas in Southwestern Nigeria and susceptibility of F1-Resistant tomato hybrid (F1-Lindo) to Infection. Annual Research and Review in Biology, 18: 1-9.

<https://doi.org/10.9734/arrb/2017/34626>

المراجع

حسن، عبد الله عبد الكريم، عبد الكريم عريبي الكرطاني، افتخار موسى وخلدون فارس. 2011. تقييم فعالية الفطر *Pleurotus* sp. كمبيد حيوي ضد ممرضات النبات: الديدان الثعبانية وفطريات التربة. المؤتمر العلمي الخامس لكلية الزراعة، جامعة تكريت، 26-27 نيسان/أبريل 2011.

حسن، عبد الله عبد الكريم، عبد الكريم عريبي سيع وهبة محمد يوسف. 2017. عزل وتشخيص المركبات الفعالة المضادة للفطريات من عزلات بكتيريا *Pseudomonas fluorescens* من التربة العراقية وتقييم كفاءتها في تثبيط نمو الفطر الممرض *Macrophomina phaseolina*. مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية، 17: 169-181.

الراوي، خاشع محمود وعبد العزيز محمد خلف الله. 1980. تصميم وتحليل التجارب الزراعية. دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل، العراق.

- Khan, N., M. Maymon and A.M. Hirsch.** 2017. Combating Fusarium Infection using Bacillus based antimicrobials. *Microorganisms*, 5: 75.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms5040075>
- Konappa, M.N., M. Malini, U. Fazilath, K. Soumya, C.N. Siddaiah, R.N. Siddapura and C. Srinivas.** 2016. Lactic acid bacteria mediated induction of defense enzymes to enhance the resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt. *Scientia Horticulturae*, 207: 183-192.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.05.029>
- Leyva Salas, M., A. Thierry, M. Lemaître, G. Garric, M. Harel-Oger, M. Chatel, S. Lê, J. Mounier, F. Valence and E. Coton.** 2018. Antifungal activity of lactic acid bacteria combinations in dairy mimicking models and their potential bioprotective cultures in pilot scale applications. *Frontiers in Microbiology*, 9: 1787. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01787>
- Lutz, M.P., V. Michel, C. Martinez and C. Camps.** 2012. Lactic acid bacteria as biocontrol agents of soil-borne pathogens. *IOBC-WPRS Bulletin*, 78: 285-288.
- Mahadevan, A. and R. Sridhar.** 1986. *Methods in physiological plant pathology* (3rd ed.). Indira Nagar, Chennai, Sivakami Publications. 223 pp.
- McKinney, H.H.** 1923. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedling by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research*, 28: 195-217.
- Miller, C.S., K.M. Handley, K.S. Wrighton, K.R. Frischkorn, B.C. Thomas and J.F. Banfield.** 2013. Short-read assembly of full-length 16S amplicons reveals bacterial diversity in subsurface sediments. *PloS one*, 8: e56018.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056018>
- Mohan, A.K. and N. Murugalath.** 2012. Isolation of *Lactobacillus plantarum* from cow milk and screening for the presence of sugar alcohol producing gene. *Journal of Microbiology and Antimicrobial*, 4: 16-22.
<https://doi.org/10.5897/JMA11.083>
- Nirmaladevi, D., M. Venkataramana, R.K. Srivastava, S.R. Uppalapati, V.K. Gupta, T. Yli-Mattila, K.M. Clement Tsui, C. Srinivas, S.R. Niranjana and N.S. Chandra.** 2016. Molecular phylogeny, pathogenicity and toxigenicity of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Scientific Report*, 6: 21367.
<https://doi.org/10.1038/srep21367>
- Singh, V.K., H.B. Singh and R.S. Upadhyay.** 2017. Role of fusaric acid in the development of 'Fusarium wilt' symptoms in tomato: Physiological, biochemical and proteomic perspectives. *Plant Physiology and Biochemistry*, 118: 320-332.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.06.028>
- Temitope, F.P. and U.E. Oluchi.** 2015. Studies on the antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* on spoilage fungi of tomato fruit. *Journal of Microbiology Research*, 5: 95-100.
<https://doi.org/10.5923/j.microbiology.20150503.03>
- Teusink, B. and D. Molenaar.** 2017. Systems biology of lactic acid bacteria: for food and thought. *Current Opinion in Systems Biology*, 6: 7-13.
<https://doi.org/10.1016/j.coisb.2017.07.005>
- Bourdichon, F., S. Casaregola, C. Farrokh, J.C. Frisvad, M.L. Gerds and W.P. Hammes.** 2012. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology*, 154: 87-97.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030>
- Canpolat, E., M.D. Müzeyyen, D. Sibel and U.S. Çiğdem.** 2018. Antifungal activity of some lactic acid bacteria against several soilborne fungal pathogens isolated from strawberry plants. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 6: 1163-1167.
<https://doi.org/10.24925/turjaf.v6i9.1163-1167.1975>
- Cha, J.Y., S. Han, H.J. Hong, H. Cho, D. Kim, Y. Kwon, S.K. Kwon, M. Crüsemann, Y.B. Lee, J.F. Kim, G. Giaeve, C. Nislow, B.S. Moore, L.S. Thomashow, D.M. Weller and Y.S. Kwak.** 2016. Microbial and biochemical basis of a Fusarium wilt suppressive soil. *ISME Journal*, 10: 119-129.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2015.95>
- Cooper, C.** 1977. *The Tools of Biochemistry*. John Wiley and Sons Inc. USA. 423 pp.
- Crowley, S., J. Mahony and D. van Sinderen.** 2013. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends in Food Science and Technology*, 33: 93-109.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.07.004>
- Gerbaldo, G.A., C. Barberis, L. Pascual, A. Dalcero and L. Barberis.** 2012. Antifungal activity of two *Lactobacillus* strains with potential probiotic properties. *FEMS Microbiology Letters*, 332: 27-33.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02570.x>
- Hamed, H.A., A.Y. Moustafa and S.M. Abdel-Aziz.** 2011. In vivo efficacy of lactic acid bacteria in biological control against *Fusarium oxysporum* for protection of tomato plant. *Life Science Journal*, 8: 462-468.
- Hammerschmidt, R., E.M. Nuckles and J. Kuc.** 1982. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiology and Plant Pathology*, 20: 73-82.
- Hassan, A.A. and K.A. Aldoury.** 2018. Purification and characterization of Chitinase from the local fungus isolate *Aspergillus niger* K17 and evaluation of its efficiency in control of tomato rot diseases. Pages 581-612. In: *Proceedings of the Ninth International Scientific Academic Conference*. 17-18 July 2018, Istanbul, Turkey.
<https://doi.org/10.24897/acn.64.68.168>
- Husain, A., Z. Hassan, N. Huda-Faujan and M.N. Lani.** 2017. Antifungal activity of Lactic acid bacteria isolated from soil rhizosphere on *Fusarium* species infected chilli seeds. *American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences*, 29: 182-202.
- Kandler, O. and N. Weiss.** 1986. Regular, non-sporing gram-positive rods. Pages 1208-1234. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt (eds.). Williams and Wilkins, Baltimore. 1599 pp.
<https://doi.org/10.1002/jobm.3620270714>

Zebboudj, N., W. Yezli, N. Hamini-Kadar, M. Kihal and J.E. Henni. 2014. Antifungal activity of lactic acid bacteria against *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* isolated from diseased date palm in South Algeria. International Journal of Biosciences, 5: 99-106. <https://doi.org/10.12692/ijb/5.9.99-106>

Tweddell, R.J., S.H. Jabaji-Hare and P.M. Charest. 1994. Production of chitinase and β -1,3-glucanase by *Stachybotrys elegans*, a mycoparasite of *Rhizoctonia solani*. Applied Environmental Microbiology, 60: 489-495. <https://doi.org/10.1128/AEM.60.2.489-495.1994>

Yang, E.J., Y.S. Kim and H.C. Chang. 2011. Purification and characterization of antifungal d-Dodecalactone from *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from Kimchi. Journal of Food Protection, 74: 651–657. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-512>

Received: February 6, 2020; Accepted: May 4, 2020

تاريخ الاستلام: 2020/2/6؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2020/5/4