Some integrated aspects in controlling early blight disease of Tomato plants

بعض اوجه التكامل في مكافحة مرض اللفحة المبكرة على نباتات الطماطة

رجاء غازي عبد المحسن
كلية الزراعة-جامعة كربلاء

ياسر ناصرالحميري
كلية الزراعة-جامعة كربلاء

المستخلص

اجري البحث لدراسة مرض اللفحة المبكرة في الطماطة والحصول على عزلات للفطر *Alternaria solani* واختبار قدرتها الامراضية وتحديد تأثير المعاملة بعزلتين من البكتريا الجذرية المحفزة لنمو النبات PGPR هما *Pseudomonas fluorescens* و*Enterobacter cloacae* والمستحضر الحيوي EM1 في نسبة وشدة الاصابة بمرض اللفحة المبكرة, اذ تم الحصول على عزلات الفطر *A. solani* من العينات التي ظهرت عليهااعراض مرض اللفحة المبكرة والتي جمعت من مناطق مختلفة في محافظات بغداد وكربلاء وبابل .

اظهرت نتائج اختبار القدرة الامراضية لـ 12 عزلة للفطر *A. solani* اختلاف العزلات في قدرتها على اصابة بذور الفجل , اذ احدثت جميع العزلات المختبرة خفضاً معنويا في النسبة المئوية للانبات وبنسبة تراوحت بين 15% - 80% قياسا بمعاملة المقارنة التي كانت نسبة الانبات فيها 90% ,وبناءا على نتيجة هذا الاختباراختيرت العزلة الاكثر امراضية للتجارب اللاحقة ورمز لهاAs5.

أظهرت نتائج اختبار التضاد لعزلتي البكتريا *P. fluorescens* و*En. cloacae* ضد الفطر *A. solani* فاعلية عالية في الوسط الزرعيPDA وادت الى تثبيط الفطر بنسبة83%و56% على التوالي عند استخدامها بتركيز1x10^6خلية/مل.

بينت نتائج اختبار تأثير البكتريا *P. fluorescens* و*En. cloacae* وEM1 والمبيد Beltanol على التوالي زيادة في نسبة انبات بذور الطماطة ولجميع المعاملات بعد اسبوعين من الزراعة تحت الظروف المحمية ,اذ بلغت نسبة الأنبات فيها70.00 % و70.33 % و76.70 % و80.00 % على التوالي قياساً الى معاملة الفطر الممرض والتي بلغت نسبة الأنبات فيها 16.78% اما معاملةالمقارنة بدون اضافة فطر فكانت نسبة الأنبات فيها 80.33 % ,بينما اظهرت معاملة بادرات الطماطة بالبكتريا *P. fluorescens* و *En. cloacae* خفضاً معنوياً لنسبة الإصابة بعد 45 يوم من الزراعة إذ وصلت إلى 13.33% و6.66 % على التوالي, قياساً بمعاملة المقارنة الحاوية على الفطر الممرض و التي بلغت نسبة الإصابة فيها93.33% اما شدة المرض فكانت 6.56 % و 4.42 % على التوالي قياسا بمعاملة المقارنة و التي بلغت شدة المرض فيها 39.21% .

اما معاملة البادرات بالمستحضر الحيوي EM1 فأدت إلى خفض نسبة الإصابة و شدة الأصابة إلى 26.66 % و 6.85على التوالي في حين أدت المعاملة بالمبيد الكيميائي Beltanol إلى كبح المسبب المرضي بشكل كامل.

Abstract

The present this study was carried out in 2012 at the College of Agriculture ,Kerbala,Iraq to estimate tomato early blight disease and to test the efficacy of some methods for controlling it. Isolates of the pathogenic fungus *Alternaria solani* were obtained and their pathogenicity was tested. The effect of two isolates of plant – growth promoting bacteria, *Enterobacter cloacae* , *Pseudomonas fluorescens*, the biological fungicide EMI on the disease persentage and intensity was tested as well .The isolates of *A. solani* were collected from plants bearing disease symptoms in different regions of Baghdad,Kerbala and Babylon provinces . The pathogenesity of 12 isolates of *A. solani* showed different levels of infection on raddish seed . The germination rates of these seed infacted by these isolates varied from 15% to 80% compared with 90% in control treatment. According to this test , the most infective isolate was given the symbol As5 and then used later in all following experiments. The results of antagonism test showed high effect of *P. fluorescens* and *E. cloacae* isolates against *A.solani* in acultural medium of potato dextrose agar (PDA) . The rates of fungus growth inhibition caused by these isolates reached 83% and 56% , respectively these isolates were used at the concentration of 1x^{6}10 . The use of *P. fluorescens* , *E. cloacae* , EMI and Beltanol causded increase in tomato seed germination rates after two weeks under protetive culture condition . The use *of P. fluorescens* and *E.cloacae* caused significant reduction in percentage disease infection in tomato seedling after 45 days of

planting . these percentages reached 13.33%and 6.66% in those treatments ,respectively compared with 93.33% in treatment of pathogenic fungus. The infection intensity rates of the disease reach 6.56%,4.42% and 39.21% in the aforementioned treatments , respectively . The use of the biological fungicide EMI reduced the disease infection percentage in tomato seedlings whereas the use of the synthetic fungicide Beltanol resulted in complete inhibition of the disease pathogen

1: المقدمة

يعد مرض اللفحة المبكرة المتسبب من الفطر *Alternaria solani* من الأمراض الفطرية المهمة في نباتات الطماطة على المستوى العالمي , اذ يصيب الاوراق وحواملها والاغصان والثمار ويؤدي الى تعفنها ويعد من العوامل المهمة المحددة للحاصل في الفصول الممطرة , يصيب المرض نباتات العائلة الباذنجانية بشكل عام (1). يعد من الامراض المهمة في المناطق الرطبة وشبه الجافة وتعد الرطوبة النسبية والندى والامطار من العوامل الاساسية لحدوث الاصابة وتطور المرض , وان افضل درجة حرارة لاحداث الاصابة تقع بين 21 - 25ْم مع مدة بلل للاوراق لاتقل عن ثلاث ساعات . وتعد أفضل درجة الحرارة لتطور المرض بعد حدوث الاصابة 16ْم. في حين ان الفطر ينمو على مدى واسع من درجات الحرارة 1-40ْم و pH 1-10 . ان الدرجة الحرارية المثلى لنمو الخيوط الفطرية وانبات الابواغ الكونيدية هي 28ْم .يبقى الفطر *A. solani* عند انتهاء مدة نمو العائل في التربة او مع بقايا العائل على شكل خيوط فطرية او ابواغ كلاميدية Chlamydospore او ابواغ كونيدية التي تعد مصدراً للاصابة الاولية في موسم النمو القادم (2).

اعتمدت مكافحة هذا المرض بصورة رئيسية على استعمال المبيدات الفطرية امالتوجهات الحديثة في العالم هو ايجاد طرائق بديلة عن المبيدات الكيميائية تكون امينة للبيئة ومن هذه الطرائق استعمال الفطريات والبكتريا الموجودة في منطقة حول الجذور والتي تؤثر في حدوث وتطور الامراض وخاصة التي تكون مسبباتها المرضية من احياء التربة, اذ اظهرت العديد من اجناس وانواع البكتريا الجذرية المحفزة لنمو النبات Promoting Rhizobacteria Plant Growth(PGPR) كفاءة ضد فطريات التربة الممرضة للنبات , فضلاً عن دورها في تحفيز نمو النبات (3) , وفي دراسة اخرى بينت عزلات من البكتيريا الجذرية وهي *Enterobacter cloacae , P. putida , Pseudomonas fluorescens* فعالية عالية في مكافحة مسببات الامراض في الطماطة , وزيادة في حيوية ونشاط النبات . اذ تمتلك البكتريا الجذرية *Enterobacter cloacae* كفاءة تضادية عالية مع الكثير من المسببات المرضية , وتزيد من قابلة التربة على كبح الممرضات خاصة الفطر *Alternaria solani* (4).

ومن الإستراتيجيات الحديثة للحصول على وقاية وإنتاج مثاليين والسيطرة على أحياء التربة استعمال المستحضرات الحيوية ومنها Effective Microorganisms (EM) إذ تستغل تأثيراته المضادة ضد المسببات المرضية , وتحسين نمو النبات والحاصل إذ تنتج الأحياء المجهرية المكونة له هرمونات مثل Gibberellin و Auxin و Cytockinin وإنزيمات وفيتامينات ومضادات حياتية , وقد تم انتاج هذه العوامل الإحيائية بشكل مخصبات حيوية Biofertilizer كما أعطت هذه المنتجات نتائج مشجعة في كبح الأمراض الفطرية المنقولة بالتربة وطورت أيضا من ناحية المكونات وتراكيز الأحياء المجهرية التي تحويها ومن هذه المنتجات المستحضر الحيوي EM1 الذي يشير إلى الأحياء المجهرية الفعالة Effective Microorganisms , الذي اكتشفه العالم الياباني Tero Higa في بداية الثمانينيات وهو خليط متخمر متكون من مجموعة مختارة من الأحياء الدقيقة تعود لعدة أجناس متوافقة مع بعضها موجودة طبيعياً في البيئة ومنها بكتريا حامض اللاكتيك Lactic acid bacteria و بكتريا التمثيل الضوئي . *Rodopseudomonas spp* التي تفرز مواداً مختلفة مثل الأحماض الأمينية والكربوهيدرات المشجعة لنمو النبات وتنشط مجموعة أجناس أخرى من الأحياء الدقيقة فتزيد من خصوبة التربة مثل Mycorrhiza وRhizobium وAzotobacter وخمائرYeasts و Actinomycetes وفطريات *Penicillum* spp. ,*Aspergillus* spp ,*Mucor* spp. التي تساعد في تحلل المواد العضوية وتفرز مضادات للممرضات النباتية (5).

2: المواد وطرائق العمل :

2-1: جمع العينات

تم جمع العينات من نباتات الطماطة المصابة بمرض اللفحة المبكرة من بعض محافظات المنطقة الوسطى من العراق (كربلاء و بغداد و بابل) , اذ عد النبات مصاباً بمرض اللفحة المبكرة على ضوء الاعراض الظاهرة والمتمثلة باصفرار وموت حواف الاوراق وظهور بقع مستديرة او غير منتظمة على الاوراق ذات لون بني داكن الى اسود وقد تتخللها حلقات متداخلة وتحاط البقع بهالة صفراء اللون وعلى الساق تظهر بقع بنية الى سوداء غائرة او تقرحات وعلى الثمار بشكل بقع بنية او سوداء منخفضة قليلاً ومغطاة بنمو قطني تظهر فيه حلقات متداخلة . جمعت العينات ووضعت في أكياس بولي اثلين لغرض المحافظة عليها مع تسجيل مكان وتاريخ جمع العينة ونوع الزراعة (الجدول 1)، وحفظت بالثلاجة على درجة حرارة (4 م°) في المختبر لغرض اجراء فحوصات عزل وتشخيص الفطر الممرض *Alternaria solani* .

الجدول 1: يبين اسم ورمز العينة وجميع مواصفات الجمع .

ت	مكان جمع العينة	رمز العينة	تاريخ الجمع	الصنف	نوع الزراعة
1	كربلاء – كلية الزراعة	K 1	6 / 10	اليسا	محمية
2	كربلاء – كلية الزراعة	K 2	6 / 12	اليسا	محمية
3	بغداد – كلية الزراعة	B 1	6 / 11	وجدان	محمية
4	بغداد – كلية الزراعة	B 2	6 / 11	وجدان	محمية
5	بغداد – كلية الزراعة	B 3	6 / 12	وجدان	محمية
6	بغداد – كلية الزراعة	B 4	6 / 12	دنى	مكشوفة
7	بغداد – كلية الزراعة	B 5	6 / 12	دنى	مكشوفة
8	بغداد – كلية الزراعة	B 6	6 / 12	دنى	مكشوفة
9	بغداد – مركز إباء	B 7	6 / 19	وجدان	محمية
10	بغداد – مركز إباء	B 8	6 / 19	وجدان	محمية
11	بغداد – كلية الزراعة	B 9	6 / 19	شهيرة	محمية
12	بغداد – كلية الزراعة	B 10	6 /19	شهيرة	محمية
13	بابل – مشروع المسيب	H 1	6 / 25	وجدان	محمية
14	بابل – مشروع المسيب	H 2	6 / 25	وجدان	محمية
15	بابل – قضاء المحاويل	H 3	6 / 25	غنى	محمية
16	بابل – قضاء المحاويل	H 4	6 / 25	غنى	محمية

2-2: عزل وتشخيص الفطر *Alternaria solani* :

جرى عزل الفطر من الاجزاء النباتية (اوراق و سيقان) التي ظهرت عليها اعراض وعلامات المرض في اليوم التالي لعملية الجمع، اذ تم فحص البقع المصابة تحت المجهر والتأكد من وجود الابواغ الكونيدية للفطر *A. solani* , اخذت قطع صغيرة من حافات البقع وعقمت سطحياً بمحلول هيبوكلورات الصوديوم (1% كلور) لمدة دقيقتين . غسلت القطع بالماء المقطر المعقم لمدة دقيقتين للتخلص من بقايا المادة المطهرة وجففت بورق نشاف معقم. زرعت 4 قطع في كل طبق بتري قطر 9 سم حاوي على الوسط الزرعي اكر البطاطا والدكستروز Potato Dextrose Agar (PDA)(200 غم بطاطا ، 20 غم سكر الدكستروز ، 20 غم اكر ولتر ماء) وحضنت الاطباق في درجة حرارة 25 ± 2ْم وبعد 3-5 ايام نقيت عزلات الفطر بزراعتها على وسط اكر البطاطا والسكروز Potato Sucrose Agar (PSA) (200 غم بطاطا ، 10 غم سكر السكروز ، 20 غم اكر ولتر ماء) بطريقة زراعة طرف الخيط الفطري Hyphal tip وحضنت في درجة 25 ± 2ْم لمدة سبعة ايام وشخصت اعتماداً على على المفاتيح التصنيفية(6).

3-2:اختبار المقدرة الأمراضية لعزلات الفطر *Alternaria solani* باستعمال بـــذور الفجل الاحمر

تم اختبار المقدرة الامراضية لعزلات الفطر *Alternaria solani* (12 عزلة)التي تم الحصول عليها من خلال عملية العزل. وذلك حسب طريقة (7)والمحورة باستخدام بذور الفجل الاحمر بدلاً من بذور اللهانة , حضرت أطباق بتري قطرها 9 سم تحوي على 15 – 20 مل مـــن الوسط الزرعي الاكر والماء المعقم (20 غم اكر،1 لتر ماء مقطر) والمضاف له المضاد الحيوي لقحت الاطباق في مركزها بقرص (0.5 سم) من مزارع عزلات الفطر المنماة على الوسط الزرعي PSA بعمر 7 ايام كل على انفراد. وحضنت الأطباق في درجة حرارة 25±2 مº ولمدة 3 ثلاثة أيام، بعدها زرعت بذور الفجل الاحمر محلية معقمة سطحياً بمحلول هايبوكلورات الصوديوم وبصورة دائرية قرب حافة الطبق وبمعدل 20 بذرة / طبق. كررت المعاملات ثلاث مرات فضلاً عن معاملة المقارنة (من دون الفطر) وحضنت بدرجة حرارة 25±2 مº وبعد 7 ايام جرى حساب النسبة المئوية للأنبات .

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

وانتخبت العزلة الفطرية التي اظهرت قدرة امراضية مرتفعة ورمز لها بالرمز As5 .

4-2: تاثير العزلات البكترية في نمو عزلة الفطر As5 على الوسط الزرعي PSA

اختبرت القابلية التضادية لعزلتين من البكتيريا *Pseudomonas fluorescens* و *Enterobacter cloacae* التي تم الحصول عليها من قسم وقاية النبات في كلية الزراعة جامعة بغداد , ضد عزلة الفطر As5 على الوسط الزرعي PSA اذ تضمنت الطريقة اضافة 1 مل من عالق كل عزلة من العزلات البكتيرية المنماه على وسط KB (King B medium)السائل عمر 3 أيام الى طبق بتري حاو على الوسط الزرعي PSA وتحريك الطبق بحركة رحوية لنشر العالق البكتيري , ثم وضع قرص قطر 0.5 سم من مزرعة الفطر الممرض عمر 7 ايام بمركز كل الطبق، استعملت 4 اطباق للمعاملة وتركت 4 أطباق من دون إضافة البكتريا كمقارنة. حضنت الأطباق (25±2 مº لمدة 7 أيام) , وتم حساب معدل نمو الفــطريات الممرضة والنسبة الئوية للتثبيط حسب المعادلة الآتية:

$$\%\text{للتثبيط} = \frac{\text{معدل نمو الفطر في معاملة المقارنة} - \text{معدل النمو في المعاملة}}{\text{معدل نمو الفطر في معاملة المقارنة}} \times 100$$

2-5: تأثير المستحضر EM1 في نمو الفطر *As5* مختبرياً

حضرت مزارع نقية من الممرض As5 على وسط PDA وبعمر 7 أيام ، حضر الوسط الغذائي بطاطا دكستروز اكر (PDA) في دوارق زجاجية سعة 250 مل. عقم الوسط المؤصده بدرجة 121ْس وضغط 1.5 كغم/سم2 لمدة 20 دقيقة. أضيفت الكميات المناسبة من المستحضر EM1 إلى الوسط الزرعي PDA في الدوارق للحصول على التراكيز 3و 6و 10% باستعمال ماصات معقمة، حُرك الوسط جيداً حتى التجانس وصب في أطباق بتري معقمة بقطر 9 سم كطبقة أولى وتركت لليوم الثاني. صبت طبقة ثانية من الوسط PDA فقط الخالي من أي إضافات حسب طريقة (8) لقحت الأطباق بقرص من اللقاح الفطري قطر 0.5 سم وضع في مركز الطبق . صب الوسط PDA في أطباق أخرى خالية من المستحضر الحيوي للمقارنة,حضنت جميع الأطباق بدرجة 25 ± 2ْس توبعت يومياً لقياس الأقطار المتعامدة بعد أكتمال النمو بمعاملة السيطرة , حسبت بقياس متوسط قطريين متعامدين لمستعمرة الفطر و النسبة المئوية للتثبيط على أساس معاملة المقارنة لتقييم كفاءة المستحضر لمقاومة المسبب المرضي .

2-6: تحضير اللقاح الفطري للعزلة As5

نميت عزلة الفطرAs5 في 100مل من الوسطCzapex dox السائل في دوارق حجم 250مل (معقم مسبقا بالمؤصدة بدرجة 121مْوضغط 1.5كغم/سم^2 لمدة 20دقيقة)وبواقع ثلاثة اقراص قطر 5ملم من نموات الفطر وبعد 7ايام من الحضن مزجت محتويات كل دورق في خلاط كهربائي لمدة 3-4 دقائق على سرعات مختلفة بعدها رشح العالق بأمراره خلال الياف الزجاج وخفف بماء معقم وضبط الراشح على تركيز 10^4X2 جزء فطري /مل (9).

2-7: تأثير البكتريا *P. fluorescens* و *En.cloacae* وEM1 والمبيد Beltanol في خفض نسبة وشدة مرض اللفحة المبكرة في الطماطة تحت الظروف المحمية .

نفذت ثلاث تجارب في البيت البلاستيكي (كلية الزراعة/ جامعة كربلاء) , التجربة الاولى اجريت للكشف عن تاثير *P. fluorescens* و *En.cloacae* وEM1 والمبيد Beltanol في انبات بذور الطماطة, والتجربة الثانية والثالثة اجريتا للكشف عن تاثير كل من العوامل المذكورة في نسبة وشدة المرض على بادرات الطماطة , اذ اضيف العالق الفطري الى التربة وبواقع 50 مل /اصيص في التجربة الثانية , في حين التجربة الثالثة اضيف لها العالق الفطري بواقع 10^4x2(جزء فطري/مل) رشا على الاوراق . استخدم في التجربة خليط من تربة مزيجية وبتموس بنسبة 2 : 1 معقمة على درجة حرارة 121 مْ وضغط 1.5 كغم / سم2 لمدة ساعة , كررت عملية التعقيم بعد 24 ساعة والموزعة في أصص بلاستيكية سعة 1 كغم وبنسبة 1%(وزن / وزن) .

في التجربة الاولى زرع بكل اصيص عشرة بذور طماطة معقمة سطحياً بمحلول هايبوكلوريدات الصوديوم، وبثلاث مكررات اضيف اللقاح الفطري بواقع 50 مل / اصيص و تركت 3 مكررات من دون إضافة لقاح الفطر الممرض ولكن اضيف 50 مل لكل اصيص من الوسط الزرعيCzapex dox كمقارنة وسقيت الأصص بانتظام ، حسبت النسبة المئوية لإنبات البذور بعد 10 أيام من الزراعة بعد اكتمال إنبات بذور معاملة المقارنة، تمت إضافة معاملات التجربة عند زراعة البذور حسب تركيز وكميات كل معاملة (الجدول 2) .في حين اضيفت نفس المعاملات في التجربة الثانية والثالثة باختلاف اللقاح الفطري , عند نقل البادرات بعمر اربعة اوراق حقيقية الى الاصص (بعد خمسة اسابيع من الزراعة) خمسة نباتات لكل اصيص , وتمت متابعة التجربة وسقيها كلما دعت الحاجة , أخذت النتائج بحساب نسبة وشدة إصابة النباتات , وجرى قياس الوزن الجاف للنباتات, بعد خمسة اسابيع من اضافة اللقاح الفطري الى الاصص (10)وقدرت شدة المرض وفق الدليل المرضي الآتي:

0=لاتوجد اصابة 1=جفاف وموت1-25%من مساحة الوريقة 2=جفاف وموت 26-50%من مساحة الوريقة
3= جفاف وموت 51-75%من مساحة الوريقة 4=جفاف وموت الوريقة بكاملها(11) وتم حساب شدة المرض بمعادلة(12).

$$\%\text{لشدة المرض} = \frac{\text{مجموع(عدد النباتات في كل فئةxرقم الفئة)}}{\text{العدد الكلي للنباتات xاعلى فئة}} 100x$$

الجدول 2: تراكيز وكميات العوامل المستخدمة في خفض نسبة وشدة مرض اللفحة المبكرة في الطماطة تحت ظروف البيت الزجاجي .

ت	عوامل التجربة	التركيز	الكمية المضافة
1	العالق الفطري للممرض As5	2×10^4 جزءفطري/مل	50 مل / اصيص
2	عالق البكتريا *P. fluorescens*	1×10^6 وحدة تكوين مستعمرة/مل	50مل / اصيص
3	عالق البكتيريا*E . cloacae*	1×10^6 وحدة تكوين مستعمرة/مل	50 مل / اصيص
4	المستحضر الحيوي EM1	% 6	50 مل / اصيص
5	المبيد الكيميائي Beltanol	% 0.1	50 مل / اصيص

3- النتائج والمناقشة:

3-1: اختبار المقدرة الامراضية لعزلات الفطر *A. solani* على بذور الفجل الاحمر

اظهرت النتائج (جدول 4) ان جميع العزلات المختبرة احدثت خفضاً في النسبة المئوية لانبات بذور الفجل وبشكل معنوي قياساً بمعاملة المقارنة التي بلغت نسبة الانبات في معاملتها 90% . وقد اختلفت معظم العزلات معنوياً فيما بينها في خفض نسبة الانبات . وسجلت العزلة As5 اقل معدل للنسبة المئوية للانبات وكانت 15% وهذا يعني ان النسبة المئوية لتثبيط الانبات بلغت 83 % لهذه العزلة , في حين كانت النسبة المئوية للانبات في معاملات بقية العزلات بين 25- 80% . وقد يعزى هذا الاختلاف في القدرة الامراضية الى الاختلاف الوراثي بين العزلات التي عزلت من مناطق مختلفة والتي اظهرت اختلافاً كبيراً في الصفات المظهرية كلون المستعمرة وانتاج الصبغات على الوسط الزرعي PDA وسرعة النمو وكثافة الخيوط الفطرية (13) .

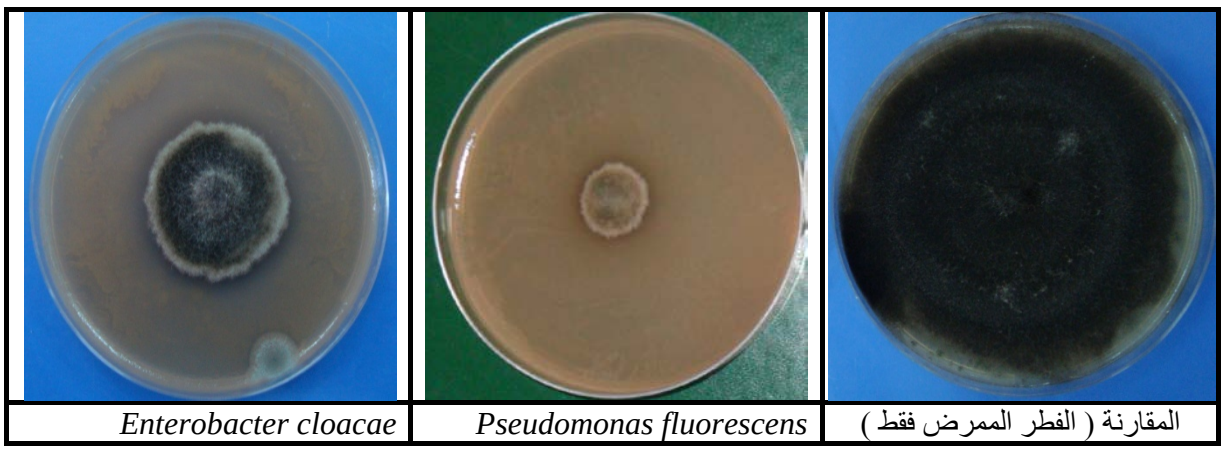
الجدول 3: اختبار المقدرة الامراضية لعزلات الفطر *A. solani* على بذور الفجل الاحمر

ت	رمز العزلة	% للانبات	% للتثبيط
1	As 1	25	72
2	A s 3	55	39
3	A s 4	35	71
4	A s 5	15	83
5	A s 7	35	71
6	A s 8	80	11
7	A s 10	30	67
8	A s 11	75	17
9	A s 13	70	22
10	A s 14	35	61
11	A s 15	70	22
12	A s 16	55	39
13	Control	90	0

L.S.D.0.05: 3.496

3-2: اختبار التضاد البكتيري لعزلتي البكتريا ضد عزلة الفطر الممرض As 5

بينت نتائج هذا الاختبار (شكل1 والجدول 5)إلى أن استعمال بكتريا *Pseudomonas fluorescens* و *En.cloacae* كعامل مكافحة إحيائية أدى إلى تثبيط نمو الفطر الممرض *A.solani* في الوسط الزرعي PDA بنسبة كبيرة قياسا بمعاملة المقارنة ضمن التركيز $10x2^{4}$. إن التأثير الذي يسببه استعمال هذه البكتريا في تثبيط نمو الفطر الممرض قد يعود إلى مقدرة هذه البكتريا على إنتاج مواد أيضية ومركبات عضوية وبعض الإنزيمات والمضادات الحيوية(14) .



Enterobacter cloacae | *Pseudomonas fluorescens* | المقارنة (الفطر الممرض فقط)

الشكل 1: اختبار التضاد البكتيري لعزلتي البكتريا *P. fluorescens* و*En.cloacae* ضد عزلة الفطر الممرض As5

الجدول 4: اختبار التضاد البكتيري لعزلتي البكتريا *P. fluorescens* و*En.cloacae* ضد عزلة الفطر الممرض As5

ت	رمز العزلة	التركيز(خلية/مل)	قطرالمستعمرة /9 سم	% للتثبيط
1	Pseudomonas fluorescens	10×1^{6}	1.5	83
2	Pseudomonas fluorescens	10×1^{7}	1.9	79
3	Enterobacter cloacae	10×1^{6}	4	56
4	Enterobacter cloacae	10×1^{7}	5	44
5	Control	-----	9	0

0.1276 : L.S.D.0.05

3-3:اختبار تضاد المستحضر الحيوي EM1 ضد عزلة الفطر الممرض As 5

أظهرت التراكيز المختلفة للمستحضر الحيويEM1كفاءة عالية في تثبيط نمو عزلة المختبرة بعد سبعة أيام من التحضين(الجدول 5) إذ أزداد بزيادة التركيز فقد أحدث التركيز 10 % أعلى نسبة تثبيط ضد نمو العزلة (As 5) إذ بلغت في معاملته 86 % أما التركيز 6 % و 4% فقد تماثل فيهما التأثير التثبيطي لنمو الممرض (As 5) إذ كانت نسب التثبيط 56 , 50% على التتابع .

إن زيادة التثبيط بزيادة التركيز تتفق مع عدة دراسات فقد وجد (5) أن التراكيز 0.2 ، 0.5 و 1 % من المستحضر EM1 في الوسط ألزرعي PDA سببت تثبيط نمو الفطـــر الممـــــرض مقارنة بمعاملة السيطرة .وقد يعزى آلية التثبيط إلى المركبات السامة التي تفرزها الأحياء المكونة للمستحضر والتي تشابه تأثيرها تأثير المضادات الحياتية , وقد يعزى التأثير عندما استعمل المستحضر بتركيز 10 % على الوسط ألزرعي PDA ضد مسببات الامراض إلى بكتريا حامض اللاكتيك *Lactobacillus spp.* وهي احدمكونات هذا المستحضرإذ تقوم البكتريا بإفراز حامض اللاكتيك Lactic acid ومادة Reuterin المثبطة لنمو الفطر وذات القدرة على اختزال سمومه (15)

الجدول 5:اختبار تضاد المستحضر الحيوي EM1 ضد عزلة الفطر الممرض As 5

ت	عامل التجربة	% للتثبيط
1	المستحضر الحيوي EM1 3%	50
2	المستحضر الحيوي EM1 6%	56
3	المستحضر الحيوي EM1 10%	86
5	Control	0

1.384 : L.S.D.o.o5

3-4: اختبار تأثير البكتريا *P. fluorescens* و *En. cloacae* وEM1 والمبيد Beltanol في نسبة انبات بذور الطماطة تحت الظروف المحمية .

أظهرت نتائج دراسة تأثير عوامل المقاومة الاحيائية في انبات بذور الطماطة في وسط التربة والبتموس المعامل بالفطر A.s 5. (الجدول 6) تبايناً في نسب إصابة البذور بعد أسبوعين من الزراعة، وقد أدت جميع المعاملات إلى خفض النسبة المئوية للإصابة بالفطر الممرض معنويا وزيادة في نسبة إنبات البذور قياسا بمعاملة المقارنة (16.78 %). بلغت النسب المئوية لإنبات البذور للمعاملة البكتريا *P. fluorescens* و *E. cloacae* وEM1 والمبيد Beltanol هي 70.00 % و70.33 % و76.70 % و80.00 % على التوالي وبالمقارنة بدون فطر ممرض (80.33 %)

إن نتائج هذه الدراسة تؤكد أن لهذه البكتريا مقدرة تنافسية عالية مع الفطر الممرض مما يعطي المجال للتوسع باستعمالها في برامج الإدارة المتكاملة لإمراض النبات. ومن الصفات التي مكنت هذه البكتريا من السيطرة على الفطريات الممرضة هي امتلاكها خاصية النمو السريع في الوسط الذي تعيش فيه ومقدرتها التنافسية العالية التي تمكنها من الاستيطان في منطقة نمو الجذور Rhizosphere واستغلال المصادر الغذائية المتوفرة .وبذلك اظهرت دوراً فاعلاً في زيادة النسبة المئوية للإنبات من خلال التأثير على المسببات المرضية , أدت معاملة البذور بالمبيد الكيميائي بلتانول إلى حدوث زيادة معنوية في النسبة المئوية لإنبات البذور مقارنة بمعاملة السيطرة , ومن الجدير بالذكر أن المبيد الكيميائي قد أعطى حماية كافية للبذور مما يؤثر على المسبب المرضي ويمنعه من مهاجمة البذور. يعد إدخال المبيد الكيميائي في هذه التجربة كمعاملة مقارنة وقد لوحظ أن المبيد المستعمل كان فعالاً في السيطرة على الفطر *A. solani* المسبب لمرض اللفحة المبكرة على الطماطة .

الجدول 6: اختبار تأثير البكتريا *P. fluorescens* و *En. cloacae* وEM1 والمبيد Beltanol في نسبة انبات بذور الطماطة تحت الظروف المحمية

ت	عامل التجربة	%لانبات البذور	% للتثبيط
1	Control (بدون اي اضافة)	80.33	0
2	الممرض(As5) + البكتريا *P. fluorescens*	70.00	12.85
3	الممرض(As5) + البكتريا *En. cloacae*	70.33	13
4	الممرض(As5) + المستحضر الحيوي EM1	76.70	4.51
5	الممرض(As5) + مبيد البلتانول	80.00	0.41
6	الممرض (As5) فقط (المقارنة 2)	16.78	79.11

LSD0.05 = 2.335

3- 5: اختبار تأثير البكتريا *P. fluorescens* و *En. cloacae* وEM1 والمبيد Beltanol في خفض نسبة وشدة مرض اللفحة المبكرة في الطماطة تحت الظروف المحمية .

أظهرت نتائج دراسة تأثير عوامل التجربة تبايناً في نسبة وشدة الإصابة في نباتات الطماطة (الجدول 7)، وقد أدت جميع المعاملات إلى خفض النسبة المئوية للإصابة بالفطر الممرض معنويا قياسا بمعاملة المقارنة , أدت معاملة بادرات الطماطة بالبكتريا *P. fluorescens* و*En.cloacae* إلى زيادة خفض نسبة الإصابة بعد45 يوم من الزراعة إلى حيث وصلت إلى 13.33%و6.66 % على التتابع قياسا بمعاملة المقارنة المشتملة على الفطر الممرض التي بلغت نسبة الإصابة فيها93.33% بينما شدة المرض في هذه المعاملتين بلغت 6.56 4.42,% %على التتابع مقارنة بمعاملة السيطرة التي بلغت شدة المرض فيها 39.21%,مما يشجع لاستعمال هذه البكتريا كعامل مقاومة إحيائي لكونها قد تمتلك قدرة تنافسية عالية مع الإحياء المجهرية الأخرى،ومن الصفات التي مكنت هذه البكتريا من السيطرة على الفطريات الممرضة هي امتلاكها خاصية النموالسريع في الوسط الذي تعيش فيه ومقدرتها التنافسية العالية التي تمكنها من الاستيطان في منطقة نموالجذورRhizosphereواستغلال المصادر الغذائية المتوفرة.أن لهذه البكتريا دوراً في زيادة النسبة المئوية للإنبات من خلال التأثيرعلى المسببات المرضية,(4) ,بينما اظهرت معاملة البادرات بالمستحضر الحيوي EM1 إلى زيادة خفض نسبة الإصابة إلى 26.66 % قياسا لمعاملة المقارنة المشتملة على الفطر الممرض التي بلغت نسبة الإصابة فيها93.33% بينما شدة المرض في هذه المعاملة بلغت 6.85% مقارنة بمعاملة السيطرة التي بلغت شدة المرض فيها 39.21% . وهذا ماكدته الدراسات السابقة إذ تستغل تأثيراته المضادة ضد المسببات المرضية , وتحسين نمو النبات والحاصل إذ تنتج الأحياء المجهرية المكونة له هرمونات مثل Gibberellin و Auxin و Cytockinin وإنزيمات وفيتامينات ومضادات حياتية ,إذ أعطت هذه المنتجات نتائج مشجعة في كبح الأمراض الفطرية المنقولة بالتربة (5).

أدت المعاملة بالمبيد الكيميائي البلتانول إلى كبح المسبب المرضي بشكل كامل حيث لم تظهر اي اصابة للمرض, ومن الجدير بالذكر أن المبيد الكيميائي قد أعطى حماية كافية للبادرات

الجدول 7: اختبار تأثير البكتريا *P .fluorescens* و *E. cloacae* وEM1 والمبيد Beltanol في خفض نسبة وشدةمرض اللفحة المبكرة في الطماطة تحت الظروف المحمية .

ت	عامل التجربة	% نسبة المرض	% شدة المرض
1	Control (بدون اي اضافة)	0	0
2	الممرض(As5) + البكتريا *P. fluorescens*	13.33	6.56
3	الممرض(As5) + البكتريا *En. cloacae*	6.66	4.42
4	الممرض(As5) + المستحضر الحيوي EM1	26.66	6.85
5	الممرض(As5) + مبيد البلتانول	0	0
6	الممرض (As5) فقط	93.33	39.21

LSD0.05=1.51

كل رقم في الجدول يمثل معدل اربعة مكررات

3-6: اختبار تأثير البكتريا *P. fluorescens* و *En. cloacae* وEM1 والمبيد Beltanol في ارتفاع النبات والوزن الجاف للمجموع الخضري لنباتات الطماطة تحت الظروف المحمية .

بينت النتائج وجود فروقا معنوية في ارتفاع النبات والوزن الجاف بينالمجموع الخضري لنباتات الطماطة التي تم معاملة بادراتها عند الزراعة بالبكتريا *P. fluorescens* و*En. cloacae* والمستحضر الحيوي EM1 والمبيد Beltanol (الجدول 8), واختلفت جميع هذه المعاملات معنوياً عن معاملة المقارنة بوجود الفطر الممرض *A.solani*.

أدت المعاملة بالبكتريا *P. fluorescens* و *En.cloacae* الى تحسين معايير النمو كارتفاع النبات والوزن الجاف وقد تعزى فعالية هذا البكتريا إلى قدرتها على زيادة جاهزية العناصر المعدنية في تعد من البكتريا الجذرية المحفزة لنمو النبات PGPR (4). وقد يعزى تأثير المستحضر الحيوي EM1 إلى قدرته على إنتاج الامونيا والفيتامينات والاوكسينات التي لها أثر مهم في تطور نمو النبات وفي زيادة معايير النمو المختلفة فضلا عن قدرتها على إضافة العناصر المغذية الذائبة وكذلك دورها في تثبيط نشاط الكائنات الممرضة(5) , أما دور المبيد الكيميائي بيلتانول في زيادة معايير النمو المختلفة فهو ناجم عن التأثير في الفطر الممرض *A. solani* حيث وفر حماية كافية للبادرات من محيطها الخارجي.

الجدول 8 : اختبار تأثير البكتريا *P. fluorescens* و *En. cloacae* وEM1 والمبيد Beltanol في ارتفاع النبات والوزن الجاف للمجموع الخضري لنباتات الطماطة تحت الظروف المحمية .

ت	عامل التجربة	ارتفاع النبات /سم	معدل الوزن الجاف/غم
1	Control (بدون اي اضافة)	23.87	2.14
2	الممرض(As5) + البكتريا *P. fluorescens*	22.91	1.92
3	الممرض(As5) + البكتريا *En. cloacae*	21.62	2.21
4	الممرض(As5) + المستحضر الحيوي EM1	27.34	2.42
5	الممرض(As5) + مبيد البلتانول	19.58	1.87
6	الممرض (As5) فقط	16.27	0.93

0.31=LSD0.05

كل رقم في الجدول يمثل معدل اربعة مكررات

المصادر

1-Spletzer, M. E., and A. J. Enyedi, 1999. Salicylic acid induces resistance to *Alternaria solani* in hydroponically grown tomato. Phytopathology 89:722-727.

2-Gleason,M.L.;MacNab,A.A.;Pitbado, R.E. ; Ricker, M.D.; East, D.A. and Latin, R. 1995. Disease worning system for processing tomatoes in eastern North America. Plant Disease. 79 (2) : 113.

3-Brimner, T.A. and G.J. Boland. 2003. A review of the non-target effect of fungi used to biologically control plant diseases. Agriculture, Ecosystem and environment100., 3-16.

4-Van Dijk, K., and E.B.Nelson. 2000. Fatty acid competition as a mechanism by which Enterobacter cloacae suppresses *Pythium ultimum* sporangium germination and damping-off. Appl. Environ. Microbiol. 66:5340–5347.

5-Mckellar , M.E and E.B. Nelson .2003. Compost-induced suppression of pythium damping off is mediated by fatty acid-metaboilzing seed colonizing microbial communities .Applied Environ. Microbial. 69:425-460.

6-Shahbazi , H., H. Aminian, , N. Sahebani, , and D. A. Halterman, 2010. Biochemical evaluation of resistance responses of potato to different isolates of *Alternaria solani*. Phytopathology 100:454-459.

7-Bolkan, H. H., and E. E. Butler . 1974. Studies on heterokaryosis virulence of *Rhizoctonia solani* . Phytopathology 64: 513 – 522.

8-Castro, C. M., S.D. Motta, F. A.kiba and R. L. D. Ribeiro. 1995. Potential use of EM for Control of Phytopathogenic. Fungi and Bacteria.Proc. of 3rd Inter. Con. For kyusei nature farming. USA. 236-238.

9-Bedi,P.S.and Dhiman,J.S.1980.Ontogenic predisposition of tomato foliage to early blight caused by *Alternaria solani*.Indian Phytopathology.33(1):83-86.

10-Ishikawa, R., K. Shirouzu, H. Heitefuss, H.Y.Nakashita, T. Lee, I. Motoyama, Yamaguchi, T.Teraoka and T. Arie, 2005. Foliar spray ofvalidamycin A or validoxylamine A controls tomato Fusarium wilt, Phytopathology, 95:1209–1216.

11-Pound, G. S. and S. A. Stachmann . 1951 . The production of a toxic material by *Alternaria solani* and it's relation to the early blight disease of tomato . Phytopathology 41 : 1104 – 1114 .

12-Jonglaekha , N., W. Pumsatit , and S. Mekamol. 1993. The use of EM for control of Root Rot of strawberry. Second conference on Effective Microorganisms Kyusei nature farming center, Phytopathology, 95:1204–1212

13-Ellis,M.B.1971.Dematiaceous hyphomycetes commonwelth mycological institute kew ,surrey England.

14Andersen,J.B.;B.Koch;T.H.Nielsen;D.Sorensen;M.Hansen;O.Nybroe;C.Christopheren;J.Soren;S.Molin;and M.Gvskove.2003.Surface motility in *Pseudomonas* sp. Dss73 required for sufficient biological containment of root – pathogenic microfungi *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum* . Microbiology . 149:37-46. (Abstract) .

15-Laitila, A., H. Alakomi, L. Raaska, A. Von Wright, A. Haikara and S. T. Mattila. 2002. Antifungal effect of *Lactobacillus plantarum* against *Fusarium* moulds in vitro and in malting of barley. Journal of Applied Microbiology 93: 566–576.