Iraqi Journal of Science

تشخيص عزلات الفطر *Fusarium oxysporum* وتقييم كفاءة البكتريا *Bacillus subtilis* وفوسفات البوتاسيوم في تثبيط الفطرين الممرضين *F. oxysporum* f.sp. *melonis* , *F.oxysporum* f.sp. *cucumerinum*

محسن هاشم رسن
Mrisan@yahoo.com
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. بغداد-العراق

الخلاصة

هدفت الدراسة الى عزل وتشخيص أنواع الفطر *Fusarium oxysporum* من جذور نباتات الخيار والبطيخ المصابة من حقول مناطق الصويرة والنعمانية والحي في محافظة واسط ، وإمكانية مكافحته باستعمال البكتريا *Bacillus subtilis* وفوسفات البوتاسيوم بتركيز (٥٠٠) ملغم / لتر ماء .

تم الحصول على (١٩) عزلة نقية من الفطر *F.oxysporum* f.sp. *cucumerinum* و (١١) عزلة نقية من الفطر *F. oxysporum* f.sp. *melonis* ، وأظهرت أقوى العزلة (FOS 9) ضراوة عالية أكثر من باقي عزلات الفطر *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* ، بينما أظهرت العزلة (FOM 2) ضراوة عالية أكثر من باقي عزلات الفطر *F.oxysporum* f.sp. *melonis* . أظهرت البكتريا *B. subtilis* فعالية تضادية عالية في الظروف المختبرية ضد العزلتين (FOS 9) f.sp. *cucumerinum* و *F.oxysporum* (FOM 2) f.sp. *melonis* وقد سجلت ٨٧.٠ % و ٩٢.٥ % على التوالي .

DIAGNOSIS OF *Fusarium oxysporum* FUNGUS ISOLATIONS AND EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF THE BACTERIA *Bacillus subtilis* AND POTASSIUM PHOSPHATE IN THE INHIBITION OF FUNGI *F.oxysporum* f.sp. *cucumerinum* and *F.oxysporum* f.sp. *melonis*

Mohsen Hashem Risan
Ministry of Higher Education and Scientific Research. Baghdad-Iraq

Abstract

The study aimed to isolate and diagnose types of *Fusarium oxysporum* from the roots of cucumbers and melons plants infected , from the fields of Al- Ssaouira, Al-Numaniya and Al-Hai in Wasit Governorate , and the possibility to control it by using the bacteria *Bacillus subtilis* and potassium phosphate concentration (500) mg / liter of water. Were obtained on (19) pure isolates of fungus *F.oxysporum* f.sp. *cucumerinum* and (11) pure isolates of *F.oxysporum* f.sp. *melonis* . The isolate *F.oxysporum* f.sp. *cucumerinum* (FOS 9) showed a high virulence than the rest isolates , white the isolates *F.oxysporum* f.sp. *melonis* (FOM 2) showed a high virulence than the rest isolates . The bacteria *B.subtilis* showed high antibiosis

activity against *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* and *F.oxysporum* f.sp. *melonis* and recorded (87.0%) and (92.5%) respectively.

Keywords:Fusarium oxysporum, Bacillus subtilis subtenolin , bacillomycen bacitracin , [16,15,14,13,12,11] toximycin , mycosubtilin ,

المقدمة

أصبحت الإمراض المتسببة عن الفطريات من اهم العوامل التي تسبب خسائر كبيرة للمحاصيل الزراعية ، وتعد الفطريات الناقصة (Deuteromycetes) من اكبر الفطريات إصابة لنباتات [1] ويعد الفطر (*Fusarium*) من الفطريات التي تصيب مجموعة كبيرة من المحاصيل الزراعية [2]. ينتشر الفطر في اغلب دول العالم ويعتبر من أكثر الفطريات المعزولة من المحاصيل الزراعية الاقتصادية او التربة ، ويعد النوع *Fusarium oxysporum* المسبب الرئيسي لأمراض الذبول [3] ويصنف الفطر *Fusarium oxysporum* بالاعتماد على العائل النباتي المتخصص [4] ، والفطر *Fusarium oxysporum* المسبب الرئيسي لأمراض الذبول والتعفن في أكثر من ١٠٠ من النباتات المهمة اقتصاديا [5] وتتأثر العائلة القرعية بعدة من المسببات للذبول الوعائي والمتسببة عن مختلف السلالات الفسلوجية للفطر *Fusarium oxysporum* ومنها الأنواع التي تصيب نباتات الخيار والمتسببة عن الفطر *F. oxysporum* . f.sp. *cucumerinum* ونباتات البطيخ المتسببة عن الفطر *F. oxysporum* f.sp. *melonis* [7,6] . وصف مرض الذبول الفيوزاريومي (Fusarium wilt) لأول مرة على نباتات الخيار عام 1955 [6] يصيب الفطر المجموع الجذري مسبباً الذبول وانخفاض بالحاصل [9,8] فضلاً عن موت النباتات بالكامل عند الإصابات الشديدة [6] ، اما الفطر *F.oxysporum* f.sp. *melonis* فسجل لأول مرة في عام ١٩٣٠ ويسبب الفطر أضرار كبيرة على نباتات البطيخ [10] . ونظرا لكون استعمال المبيدات الفطرية تعد من الملوثات للبيئة فضلا عن خطورتها على صحة الإنسان ، لذلك كان الاتجاه في الوقت الحاضر الى الحد من انتشار الفطريات المسببة للإمراض باستعمال طرق المكافحة البايولوجية (الحيوية Biocontrol) والإضافات السمادية كونها ذات أهمية كبيرة وعدم أضرارها بالبيئة [5]، وقد بدء الباحثون الى توظيف بكتريا *Bacillus spp* في الحد من الإضرار المتسببة عن المسببات الممرضة للنبات لكون هذه البكتريا قادرة على انتاج المضاد الحيوي Zwittermicin A فضلاً عن انتاجها لإنزيم Chitinaseوالمضادات الحياتية , bacillin, cerexine

ولقد بينت دراسات عديدة أهمية المكافحة البايولوجية باستخدام البكتريا وبخاصة الجنس *Bacillus sp* في مقاومة مسببات الإمراض النباتية [17] فقد أوضحت الأبحاث قدرة البكتريا *Bacillus subtilis* على تثبيط الفطريات المستوطنة في التربة وتحفيزها نمو النباتات وزيادة وزن الثمار [18] فقد اختبرت بكتريا *B.subtilis* لتثبيط الفطر *F. oxysporum* f.sp. *lentis* وأدت الى تثبيط نمو سبورات والغزل الفطري للفطر وخفض الذبول الى ٧٠% بعد ٧٣ يوم من الزراعة [19] وأثبتت بعض عزلات البكتريا *Bacillus* فعالية عالية في تثبيط النشاطات الايضية للكائنات التنافسية وخفض مرض تعفن الجذور المتسبب عن الفطريات *F.solani* و *Rhizoctonia solani* الى ٨٠% وشدته الى ٣٩% وزيادة ارتفاع النبات [20] ، كما تم عزل خمسة عزلات من بكتريا *Bacillus spp* واختبارها في خفض الذبول وشدته على نباتات Paragus beanالمتسبب عن الفطر *F.oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* الى ٢٩% وزيادة الوزن للمجموعين الخضري والجذري [21] ، وأثبتت التجارب فعالية العزلة (E121) لبكتريا *B.subtilis* في مقاومة الفطر *F oxysporum* f.sp. *dianthi* وذلك بتثبيطها نمو الغزل الفطري ، وقدرة العزلات (٥٣) و(٧١) لبكتريا *B.subtilis* على تشجيع نمو النباتات وزيادة الإنتاجية وتكوين مستعمرات حول جذور المحاصيل النباتية [22] ، وقام الباحثان [23] باستخدم بكتريا *B. subtilis* بنجاح لمقاومة الذبول الفيوزاريومي على نباتات الطماطا وزيادة الحاصل وانخفاض مجتمع الفطر *F.oxysporum f.sp. lycopersic* في منطقة الرايزوسفير . كما أوضحت الأبحاث دور العناصر الغذائية في كبح الممرضات النباتية فقد ذكر [24] ان لفوسفات البوتاسيوم الدور الفعال في تحفيز المقاومة الجهازية في نباتات الشعير ضد البياض الدقيقي في الشعير المتسبب عن الفطر *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* وانخفاض الاصابة الى ٨٩ %. لذلك أتت هذه الدراسة الى تشخيص أنواع الفطر *Fusarium oxysporum* وإمكانية استعمال البكتريا (*Bacillus subtilis*) وفوسفات البوتاسيوم للحد من نمو الفطرين f.sp .

F. oxysporum cucumerinum و *F. oxysporum* f.sp . *melonis* .

مواد وطرائق العمل

جمعت نباتات من محصول نباتي الخيار والبطيخ خلال عام ٢٠٠٩ في مناطق الصويرة والنعمانية والحي التابعة لمحافظة واسط وبواقع ثلاث حقول لكل منطقة ، اختيرت الحقول في مواقع متعددة من كل منطقة وبشكل عشوائي لتمثيل عينة تجانسيه للمنطقة وتم تحديد النسبة المئوية للإصابة لكل ١٠٠ نبات ، وشخصت النباتات المصابة بالذبول بالاعتماد على الأعراض النباتية كاصفرار الأوراق وموت بعض الأفرع مع ملاحظة لون الحزم الوعائية في الساق والجذر بلون بني عند قطعها طولياً بسكين ، وحسبت النسبة المئوية للإصابة لكل منطقة وحسب المعادلة الآتية :

النسبة المئوية للإصابة = (عدد النباتات المصابة / العدد الكلي للنباتات) × ١٠٠ .

تم جلب عينات من النباتات المصابة من كل منطقة ووضعت في اكياس من البولي اثيلين مع تعليمها برقم العينة وتاريخ الجمع والمنطقة لغرض تحديد العزلات ، بعد ذلك حفظت العينات في الثلاجة عند درجة حرارة ٤ م لحين الاستعمال .

عزل وتشخيص الفطرين *F.oxysporum* f.sp. *cucumerinum* و *F. oxysporum* f.sp. *melonis*

لغرض عزل الفطريات من جذور نباتات الخيار والبطيخ التي ظهرت عليها الإعراض المرضية ، تم غسل الجذور غسلا جيدا بالماء الجاري ثم قطعت طوليا الى قطع صغيرة بطول ٠.٥ – ١ سم ، ثم عقمت بمحلول هايبوكلورايت الصوديوم ١٠% من المستحضر التجاري لمدة ثلاثة دقائق ، بعدها غسلت بماء مقطر معقم عدة مرات وجففت على ورق ترشيح ثم زرعت في أطباق بتري حاوية على أكار مستخلص البطاطا الدكستروز (PDA) مع إضافة ١٢٥ ملغرام / لتر كلورامفينيكول لمنع نمو البكتريا ، وبواقع أربع قطع لكل طبق وبخمس مكررات وحضنت الإطباق على درجة حرارة ٢٧ مْ ± ٢ لمدة خمس أيام ، ثم نقيت العزلات بطريقة البوغ المفرد وشخصت عزلات الفطر *F.oxysporum* بالاعتماد على الصفات التي ورد ذكرها لدى [27,26,25]

الكائنات الدقيقة تم اختيار البكتريا (*Bacillus subtilis*) والتي تم الحصول عليها من مختبر الفطريات / قسم علوم الحياة – كلية العلوم / جامعة الكوفة .

المواد الكيمياوية

استخدم سماد فوسفات البوتاسيوم رياً على المجموع الجذري حيث اعتمد التركيز ٥٠٠ ملغم لكل لتر ماء نفذت التجارب المختبرية في القسم اعلاه .

اختبار القدرة الامراضية لعزلات الفطرين الممرضين *F.oxysporum* f.sp. *cucumerinum* و *F. oxysporum* f.sp. *melonis* .

اختبرت القدرة الامراضية لعزلات الفطرين الممرضين *F.oxysporum* f.sp. *cucumerinum* والفطر *F. oxysporum* f.sp. *melonis* ، وتم اختبار ستة عزلات لكل فطر لاختبار قدرتها الامراضية ومعرفة أشدها امراضية ، حيث تم تحضير لقاح العزلات المختلفة لكل فطر على حدة باستعمال ٥٠ غم من بيئة الشعير والرمل بنسبة (١:٢) مع إضافة ٢٠ مل ماء مقطر معقم ، ثم عقمت لمدة نصف ساعة ، بعدها بردت وتم تلقيح كل دورق بثلاث اقراص بقطر 0.5 سم من مستعمرات الفطرين *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* و *F. oxysporum* f.sp. *melonis* كلا على انفراد والمنماة على وسط (P.D.A) وبعمر خمس ايام وحضنت الدوارق بدرجة حرارة ٢٧ مْ ± ٢ لمدة عشرة ايام [28] . ولغرض اختبار القدرة الامراضية لعزلات الفطرين أعلاه أضيف اللقاح المحمل بالفطر الى تربة معقمة بالفورمالين ٢% بمعدل ٥غم من اللقاح الملقح بالفطر لكل ١ كغم تربة ، ثم وضعت التربة واللقاح في كيس من البولي اثلين ورجت جيدا لتجانس اللقاح مع التربة ، ثم قسمت التربة الملوثة باللقاح لكل عزلة الى ثلاث مكررات ووزعت بمعدل ١ كغم تربة ملوثة بالفطر لكل اصص ذات قطر ١٥ سم مع وجود معاملة مقارنة ، زرع في كل اص ٥ بذور من نباتات الخيار والبطيخ غير معفرة كلٌ على انفراد وحسبت النسبة المئوية لموت البادرات بعد مرور ثلاث اسابيع .

اختبار قدرة البكتريا *Bacillus subtilis* في تثبيط العزلتين (FOS9) *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* و(FOM2) *F.oxysporum* f.sp. *melonis* على الوسط الزراعي PDA

حضر وسط PDA وبعد التعقيم صب في اطباق بتري معقمة قطرها 9 سم وتم تلقيح الاطباق بـ 0.1 مل من المعلق البكتيري لبكتريا *B.subtilis* وبتركيز 1.9×10^9 خلية لكل مل على شكل بقع spotting وعلى بعد 1 سم من حافة الطبق وبواقع خمسة بقع لكل طبق وبخمس مكررات ثم حضنت الإطباق لمدة ٤٨ ساعة بدرجة حرارة ٢٧ مْ ± ٢ ، بعدها قسمت الاطباق الى مجموعتين احدهما لقحت بقرص قطره (0.5) سم من الفطر الممرض *F.oxysporum* f.sp. *cucumerinum* والمجموعة الثانية لقحت بقرص قطره (0.5) من الفطر الممرض *F. oxysporum* f .sp *melonis* ووضعت الاقراص في وسط الطبق وحضنت الإطباق جميعها في درجة حرارة ٢٧ مْ ± ٢ لمدة خمسة أيام [17] ، بعدها تم حساب التثبيط في النمو الشعاعي بأخذ معدل قطرين متعامدين للمستعمرات النامية عند وصول النمو لكل فطر الى حافة الطبق في معاملة السيطرة ثم حسب مقدار التثبيط حسب المعادلة [29] .

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

حيث أنR1- أقصى نمو شعاعي لمستعمرة الفطر الممرض في معاملة المقارنة

R2- أقصى نمو شعاعي لمستعمرة الفطر الممرض في الاطباق الحاوية على اللقاح البكتيري

تأثير البكتريا *Bacillus subtilis* وفوسفات البوتاسيوم على نمو نباتي الخيار والبطيخ .

نفذت التجربة في الظروف المختبرية ، عقمت التربة بالفورمالين ٢ % بعدها قسمت التربة الى جزئين ، جزء لوث بلقاح الفطر الممرض *F.oxysporum* f. sp. (FOS9) *cucumerinum* والجزء الثاني لوث بلقاح الفطر الممرض *F.oxysporum* f.sp. *melonis* (FOM2) وبمعدل ٥ غم من اللقاح الملقح بالفطر لكل ١ كغم تربة ، وزعت التربة الملوثة في اصص بقطر ١٥ سم مع مراعاة ترطيب لقاح الفطرين قبل الزراعة بعد ٢٤ ساعة وتم زراعة بذور الخيار والبطيخ ونفذت التجارب بثلاث مكررات لكل معاملة ولكلا الفطرين وكالاتي :

١- معاملة البكتريا *Bacillus subtilis*

نقعت بذور الخيار والبطيخ بمعلق البكتريا *B. subtilis* (بتركيز 1.9×10^9 خلية لكل مل) بمعدل ١٠مل / غم بذور لمدة ٢٠ دقيقة ، بعدها جففت على ورق ترشيح وقسمت الى جزءين احدهما زرع في تربة ملوثة بالفطر الممرض *F.oxysporum* f.sp. *cucumerinum* والأخر في التربة الملوثة بالفطر الممرض *F.oxysporum* f.sp. *melonis* وبواقع خمسة بذور من نباتات الخيار والبطيخ لكل اص .

٢- معاملة فوسفات البوتاسيوم

تم اعتماد تركيز ٥٠٠ ملغم لكل لتر ماء من فوسفات البوتاسيوم وتم استخدام طريقة الري للمجموع الجذري وبمعدل ١٠٠ مل لكل اص بعد سبعة ايام من الإنبات ولثلاثة مرات .

٣- معاملة البكتريا *Bacillus subtilis* وفوسفات البوتاسيوم

نفذت هذة المعاملة باستخدام البكتريا *B. subtilis* وفوسفات البوتاسيوم واتبعت نفس الخطوات في فقرة (١) و (٢)

٤- معاملة السيطرة (A)

تم زراعة بذور الخيار والبطيخ على انفراد في تربة خالية من لقاح الفطرين الممرضين وغير معاملة بالبكتريا وفوسفات البوتاسيوم .

٥- معاملة السيطرة (B)

تم زراعة بذور الخيار والبطيخ على انفراد في تربة ملوثة بلقاح الفطرين الممرضين .

وخلال اجراء التجربة تم تسجيل المعايير الآتية :

١. **النسبة المئوية لإنبات البذور** – حسبت النسبة المئوية لإنبات البذور بعد سبعة أيام من الزراعة

٢. **النسبة المئوية لموت البادرات** – حسبت النسبة المئوية لموت النباتات بعد أربعة أسابيع من الزراعة ووفق المعادلة الآتية :

$$\% \text{ لموت البادرات} = \frac{\text{عدد النباتات الميتة}}{\text{العدد الكلي لنباتات لكل المعاملة}} \times 100$$

٣- حساب المساحة الورقية (سم٢)

تم قياس مساحة (٥) أوراق لكل من نباتي الخيار والبطيخ ولكل معاملة وأخذ المعدل مقدراً بالسنتيمتر المربع وحسب المعادلة [30] .

مساحة الورقة (سم٢) = وزن الورقة (غم) × مساحة المربع المقطوع (سم٢) / معدل وزن المربع المقطوع (غم)

4- تقدير كمية الكلوروفيل (A و B)

أخذت أوزان بواقع 0.5 غم من الأوراق وقطع الى قطع صغيرة وسحقت بهاون خزفي ولتسهيل عملية الاستخلاص تم إضافة كمية قليلة من كاربونات الكالسيوم ، بعدها أضيف ٢٥ مل الأسيتون 80% ، ثم رشح الخليط وجمع المستخلص ، وكررت الخطوات السابقة نفسها بإضافة 15 مل أسيتون 80% بعدها جمع المستخلص الكلي ورشح عبر ورق ترشيح وأكمل حجم الراشح بعد انتهاء عملية الترشيح الى 10 مل اسيتون 80% [31] ، استخدم جهاز قياس الكثافة الضوئية Spectrophotometer تم تعيير الجهاز بواسطة الاسيتون ثم قدر الكلوروفيل بنوعيه على الطول الموجي 663 و646 وحسب مقدار الكلوروفيل (A , B) و كالأتي :-

Chlor .B L =12.12(AB663) -2.81(AB646) gm/

Chlor. A \L =20.13(AB646) -5.03(AB663) gm

ثم حسبت كمية الكلوروفيل لكل 100 غم من النسيج النباتي وذلك باستخدام المعادلة التالية والموضحة من قبل [32] .

Mg \100gm= Gm/L /1000ml ×100g / sample w(g)

5- تقدير الكثافة العددية للبكتريا *B. subtilis* في المنطقة المتأثرة بالجذور لنباتات الخيار والبطيخ المعاملة بها.

أخذت عينات من نباتات الخيار والبطيخ الملقحة بكتريا *B. subtilis* ومعاملة السيطرة مع التربة العالقة بالجذور ، ثم أخذت عينة عشوائية من جذور النباتات بمقدارها 1 غم وتم سحقها بالهاون الخزفي مع 9 مل من الماء المقطر المعقم ، وعملت سلسلة من التخافيف 10^{-1} - 10^{-9} ، اخذ 1 مل من التخافيف 10^{-7}-10^{-9} ، ووزع في اطباق بتري معقمة وبمعدل ثلاث اطباق لكل تخفيف وعلى وسط Nutrient agar لمعاملات البكتريا *B.subtilis* [14] حضنت الاطباق في درجة حرارة 30 مْ لمدة 48 ساعة ، وتم اختيار الإطباق التي تراوحت عدد المستعمرات فيها مابين 30 - 300 مستعمرة ، تم حساب عدد المستعمرات النامية وحسبت كثافة البكتريا وفق معادلة [33] عدد الخلايا في 1 غم جذور = معدل عدد المستعمرات النامية × مقلوب التخفيف .

التحليل الإحصائي

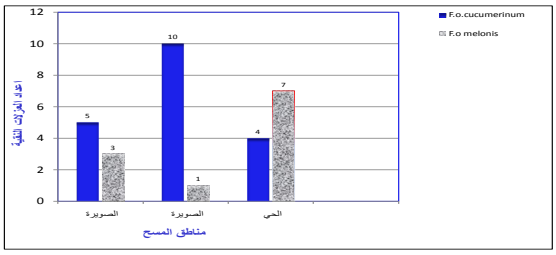
حللت النتائج حسب التصميم تام التعشية C.R.D (Completely Randomized Design) وتم استخدم اختبار أقل فرق معنوي المعدلRLSD (Revised least significant difference test) في تشخيص الفروق المعنوية بين المعاملات وتحت مستوى احتمال ٥% للتجارب المختبرية ، وقد تم تحويل النسب المئوية الى قيم زاوية وجرى التحليل الإحصائي لها .

النتائج والمناقشة

المسح الميداني للعزلات الفطر *Fusarium oxysporum*

بينت نتائج المسح خلال عام ٢٠٠٩ لمناطق زراعة نباتات الخيار والبطيخ الحصول على عزل (١٩) عزلة نقية للفطر *F. oxysporum* f.sp . *cucumerinum* و (١١) عزلة نقية للفطر *F. oxysporum* f.sp. *melonis* في مناطق زراعة نباتات الخيار والبطيخ من محافظة واسط (النعمانية والصويرة والحي) وكان أكثر العزلات النقية تشخيصاً للفطر *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* في منطقة الصويرة إذ بلغت أعدادها (١٠) عزلات وللفطر *F .oxysporum* f.sp. *melonis* إذ بلغت أعدادها (٧) عزلات والموضحة في (شكل ١) حيث تميزت الصفات المورفولوجية (Morphological) للفطر الممرض بنموه الكثيف والسريع على وسط PDA ، اذ يتراوح قطر المستعمرة إلى حوالي (4.0 - 5.0) سم خلال أربعة أيام عند درجة حرارة 27ْ م ، يكون الفطر عدة أبواغ (conidia) تحمل على حوامل قصيرة جداً متفرعة وغير متفرعة وتنشأ من خلايا مولدة للأبواغ Phialides منها الابواغ الصغيرة (Microconidia) تكون بإعداد كثيرة يكون شكلها شبهَ بيضوية ، والابواغ الكبيرة (Macroconidia) تكون أعدادها قليلة ويكون شكلها مغزلي (fusiform) منحنية بعض الشي ومدببة في أطرافها وبها ثلاثة حواجز غالباً وقد تصل الى خمسة حواجز ، والابواغ الحرشفية (Chlamydospores) والتي تكون أما طرفية أو ما بين الخلايا في سلاسل أو أزواج أو مفردة وتتكون على الخيوط

الفطرية او على الابواغ ، وتمتاز بجدار أملس أو خشن ويكون شكلها شبهَ كروية [25 , 26 , 34 , 27 , 35] ويمتاز الفطر الممرض *F. oxysporum* بأن له سلالات فسلوجية وهي مشابهة بالمظهر الخارجي ولكل منها عائل متخصص ومعظمها تكون مهمة اقتصادياً لمهاجمتها جذور عدة أنواع من النباتات [7,4]



شكل ١: أعداد العزلات النقية للفطر *F. oxysporum* في محافظة واسط

اختبار القدرة الامراضية

أوضح (الجدول ١) تفوق العزلة (FOS9) للفطر *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* في امراضيتها على نباتات الخيار ، إذ بلغت النسبة المئوية لموت البادرات ٩٢% واقلها امراضية العزلة (FOS12) ، اذ بلغت النسبة المئوية لها ١٨ % ، وكانت العزلة (FOM2) للفطر *F. oxysporum* f.sp. *melonis* أشدها امراضية ، إذ بلغت النسبة المئوية لموت البادرات ٨٧% وكانت اقلها امراضية العزلة (FOM7) اذ بلغت النسبة المئوية لها ٣١% ، وتطابق هذه النتائج مع النتائج التي حصل عليها كلاً من [9,2] بان الفطر *F.oxysporum* هو المسبب الرئيسي لإمراض موت البادرات والذبول وإصابته للكثير من المحاصيل الاقتصادية ، وان الفطر *F.oxysporum* f.sp. *cucumerinum* المسبب الرئيسي لذبول في نباتات الخيار ويسبب الموت الكامل للنباتات عند الإصابات الشديدة ، ووجد أن عزلات الفطر *F.oxysporum* تختلف في القدرة الامراضية فمنها الممرضة والقوية الامراضية والضعيفة الأمراضية [37,36]، وتعمل العزلات القوية على انتاج الإنزيمات التي تحلل مادة البكتين مثل أنزيم Polygalactornase(PG)[38].

جدول ١: القدرة الامراضية لعزلات الفطرين *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* و *F. oxysporum* f.sp. *melonis*

العزلة	الفطر	المنطقة	النسبة المئوية للإصابة %	RLSD
FOS 9	*F. o. cucumerinum*	الصويرة	٩٢	٦.٤١
FOS11	*F. o. cucumerinum*	الصويرة	٤٦	
FOS 7	*F. o. cucumerinum*	الحي	٢٩	
FOS 5	*F. o. cucumerinum*	الحي	٥٨	
FOS 7	*F. o. cucumerinum*	النعمانية	٧٩	
FOS12	*F. o. cucumerinum*	النعمانية	١٨	
FOM 2	*F.o . melonis*	النعمانية	٨٧	٨.٧٧
FOM 1	*F. o. melonis*	الحي	٥٤	
FOM 4	*F. o. melonis*	الحي	٧١	
FOM 8	*F. o. melonis*	الصويرة	٣٨	
FOM11	*F. o. melonis*	الصويرة	٣٣	
FOM 7	*F. o. melonis*	الصويرة	٣١	

كفاءة البكتريا *B.subtilis* في تثبيط النمو الشعاعي للفطرين الممرضين في الوسط الزرعي PDA .

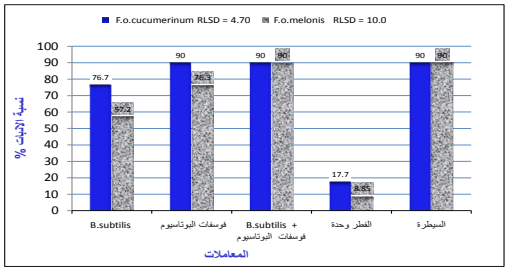
أوضحت النتائج في (جدول ٢) كفاءة البكتريا *B.subtilis* في تثبيط النمو الشعاعي للفطرين الممرضين *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* العزلة F.O.S9 و *F.oxysporum* f.sp. *melonis* العزلة F.O.M2 في الوسط الزرعي ، إذ بلغت نسبة التثبيط للفطرين ٨٧ % و ٩٢.٥ % على التوالي ، وقد تطابقت النتائج مع ما توصل أليه [39,38]بفعالية البكتريا *B.subtilis* في تثبيط أنواع الفطر *F.oxysporum* في الوسط الزرعي ، كما لوحظ ان البكتريا *B.subtilis* سببت تشويه للغزل الفطري للممرض *F. oxysporum* وخلل في عملية الايض وخفض معدل انتاج السبورات [22] . وقد تعزى فعالية *B.subtilis* إلى قابليتها على إنتاج المضادات الحيوية مثل Bacillomycin D والمضاد الحيوي Zwittermicin A bacillin , cerexine , subtenolin, , bacitracin , toximycin , mycosubtilin , فضلا عن إنتاجها للأنزيمات ( ) Chitinase المحطمة لمادة الكايتين والمؤلفة لأغلب جدران الخلايا الفطرية[١١,١٢,١٣ ,16,15,14]

جدول 2 :كفاءة البكتريا *B.subtilis* في تثبيط الفطرين *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* العزلة F.O.S9 و *F. oxysporum* f.sp. *melonis* العزلة F.O.M2 في الوسط الزرعي PDA

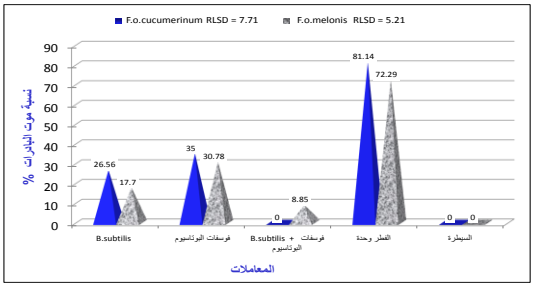
البكتريا	النسبة المئوية للتثبيط	
	F. oxysporum f.sp. *cucumerinum*	*F .oxysporum* f.sp. *melonis*
B.subtilis	٨٧.٠	92.5
Control	٠.٠	٠.٠
RLSD	٧.٣٣	٦.٥٢

تأثير البكتريا *Bacillus subtilis* وفوسفات البوتاسيوم على نمو نباتي الخيار والبطيخ .

أظهر معاملة مزيج البكتريا *B.subtilis* مع فوسفات البوتاسيوم زيادة واضحة في نسبة الإنبات لبذور نباتي الخيار والبطيخ ، إذ بلغت نسبة الإنبات ٩٠ % لبذور النباتين أعلاه ، مع انخفاض نسبة موت البادرات حيث سجلت (صفر) في معاملات الفطر *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* (FOS 9) ، بينما سجلت ٨.٨٥% لمعاملات الفطر *F.oxysporum* f.sp. *melonis* (FOM2) مقارنة مع معاملة السيطرة ، كما موضح في (الشكلين ٢, ٣) ، وقد يعزى فعالية البكتريا *B.subtilis* في حماية البذور وتقليل موت البادرات الى أنتاجها لمنظمات النمو مثل الجبرلين و Indol Acetic acid (IAA) الذي يلعب دور هام في أنبات البذور ، كذلك اثر الجبرلين في تحفيز الإنزيمات المحللة داخل البذور والتي بدورها تقوم بتحليل مواد الكاربوهيدرات والبروتينات والمواد الدهنية الى مواد ابسط يحتاجها الجنين للإنبات ، وقد يكون السبب في انخفاض موت البادرات الى قدرة البكتريا على أنتاج المضادات الحيوية مثل Mycosubtilin و Zwittermicin A الفعالة في تثبيط سبورات الفطر *F.oxysporum* ، فضلا عن دور فوسفات البوتاسيوم في تنظيم الضغط الازموزي داخل الخلايا وتراكم السكريات والكاربوهيدرات والتي بدورها تقلل من الإصابات الفطرية ورفع مستوى مقاومة النبات للإمراض الفطرية المختلفة والمسماة بالمقاومة الجهازية المكتسبة بالنبات Systemic acquired resistance (S) . A R [12,11] 44 , 43 , 41 , 42 , 40 , 24 , 19,18,17

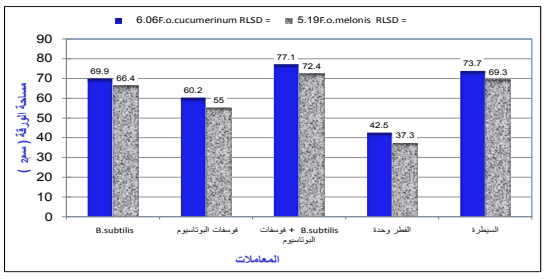


شكل ٢: النسبة المئوية لإنبات بذور نباتي الخيار والبطيخ باستخدام البكتريا B.subtilis وفوسفات البوتاسيوم



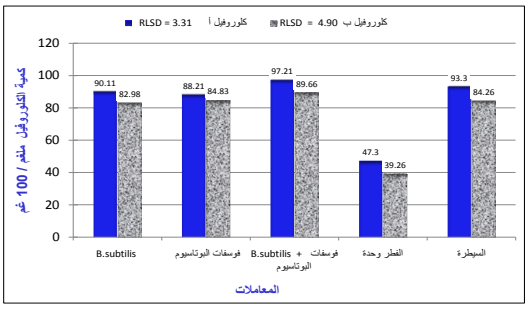
شكل ٣: النسبة المئوية لموت بادرات نباتي الخيار والبطيخ باستخدام البكتريا B.subtilis وفوسفات البوتاسيوم

كما أوضحت النتائج في (شكل ٤) زيادة المساحة الورقية لنباتي الخيار والبطيخ ، وقد وجد [43,23,22] بان البكتريا *B.subtilis* أدت الى زيادة الكتلة الحية وزيادة مؤشرات النمو ، وقد يرجع السبب الى قدرة البكتريا على إفراز بعض المواد المشجعة لنمو النبات مما ادى الى زيادة المساحة الورقية وزيادة محتوى النبات وزيادة امتصاص عنصر البوتاسيوم وزيادة محتوى المواد الغذائية وبالتالي زيادة مؤشرات النمو [47,46,45]

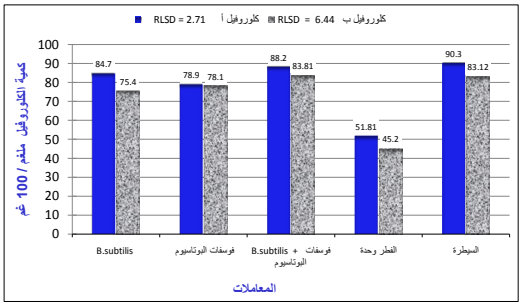


الشكل ٤ : تأثير المعاملة بالبكتريا *B.subtilis* وفوسفات البوتاسيوم على المساحة الورقية لنباتي الخيار والبطيخ

وبينت النتائج في (الشكلين ٦،٥) ان معاملة نباتي الخيار والبطيخ بالبكتريا *B.subtilis* وفوسفات البوتاسيوم أدت الى زيادة نسبة الكلوروفيل (أ ، ب) وهذا اتفق مع ما سجله كلاً من [43] مقارنة مع نسبة الكلوروفيل في معاملة الفطر وحدة وقد يعزى السبب الى تحفيز مقاومة النباتات للفطر الممرض نتيجة تحفيزها من قبل البكتريا *B.subtilis* وإفرازها لأنزيمات فضلا عن امتصاص النباتات لعنصر البوتاسيوم وبخاصة عند استعمال طريقة الإضافة لفوسفات البوتاسيوم سقياً لنباتات [47,46] .

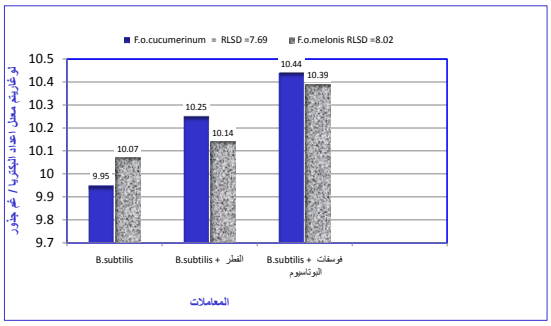


شكل ٥: كمية الكلوروفيل (أ ، ب) في نبات الخيار المعامل بالبكتريا B.subtilis وفوسفات البوتاسيوم



شكل ٦: كمية الكلوروفيل (أ ، ب) في نبات البطيخ المعامل بالبكتريا B.subtilis وفوسفات البوتاسيوم

وأشارت النتائج في (شكل ٧) زيادة واضحة في أعداد المستعمرات في المنطقة المحيطة بالجذور في معاملة مزيج B.subtilis وفوسفات البوتاسيوم ، وهذا يتفق مع ما أكده [48] بان زيادة نمو ومحتوى النباتات قد يعزى الى قدرة البكتريا على تكون مستعمرات في المنطقة المحيطة بالجذور وتنشيط نمو النباتات وتقليل التأثير الضار للفطر الممرض والسبب قد يعود الى إفراز المواد المفرزة منها بصورة سريعة في منطقة الجذور مما يؤدي الى امتصاص العناصر الغذائية ومنها البوتاسيوم وتثبيط الفطر الممرض [45]



شكل ٧: كثافة البكتريا B. subtilis في منطقة الـ Rhizosphere في معاملات الفطرين الممرضين .

من النتائج أعلاه يمكن التوصل والاستنتاج الى ان المعاملات بالبكتريا *B.subtilis* وفوسفات البوتاسيوم كان له الأثر الكبير في مكافحة الفطرين الممرضين *F.oxysporum* f.sp. *cucumerinum* و *F.oxysporum* f.sp. *melonis* وزيادة مؤشرات النمو مقارنة مع معاملة السيطرة والمعاملات المفردة .

References

1. Agrios ,G.N. **(2005)**.Plant Pathology,5th Ed Academic Press NewYork,9225 pp.
2. Groenewald , S **. (2006)** Biology Pathogencity and diversity of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, MSc.thesis,Faculty of Natural and Agriculture Science Univ.of Pretoria, Pretoria. 158 pp.
3. Muthukumar , A.karthikenyan, G. and Prabakar,K.**(2005)** Biological control turber rot (*Fusarium oxysporum)* in tuberose (*Polianthes tuberose* L) Madras Agric .J.**92** (10-12) : 742-744 .
4. Naiki,T.(**1986**)Quantitative comparison of nuclear DNA content among formae speciales of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* research Bulletin of the faculty of agriculture - Gifu University , No:51 p. 29-33.
5. Swift,C.E.,WickiffeE.R.,and Schwartz H.F., **(2002)** *Vegetative compatibility groups of Fusarium oxysporum f.sp cepae from onion in Colorado*. Plant Dis**. 86:**606 -610.

6. Zittter,T.A.; Hopkins, D.L.; Thomas ,C.E**.(1996)** Compendium of cucurbit diseases Aps press ,st. Panl.MN., p.11-17.
7. Egel,D.S. and Martyn,R.D**.(2007)** Fusarium wilt of watermelon and other cucurbite the plant health instructor , DOI: 10: 1094,PHI-I-2007-0122-01.
8. Jenkins , S. F. J and Wehner,T. C**.(1983)** Occurrence of *Fusarium oxysporum* f.sp.*cucumerinum* on greenhouse grown *cucumis sativus* seed stocks in north Carolina plant disease ,**69**: 1024-1025.
9. Srinon ,W.; Chuncheen , K.; Jirattiwarutkul,K.; Soytong,K. and Kanokmedhakul, S **(2006)** Efficacies of antagonistic fungi against Fusarium wilt disease of cucumber and tomato and assay of its enzyme activity.J.Agri.Tech.**2**(2):191-201. .
10. Feeman,S.,Zveibil,A.,Vintal,H. and Maymon, M**. (2002)** Isolation of nonpathogenic mutants of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* for biological control of Fusarium wilt in cucurbits. Phytopathology.**92**:164-168.
11. Freira,J.H.S. ; Mathee , F .N. ; Thomas,A.C**.(1991)**Biological control of Eutypalota on grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis* Phytopathology.,**81**:283-87.
12. Laura,A.S. and Eric,V.S**.(1998)** Target range of Zwittermicin A,an aminpolyol antibiotic from *Bacillus cereus*,current Microbiology.,**37:**6 -11.
13. Kazmar, R .E .and Obert, M. G. **(2000).** Regression analyses for evaluating the influence of *Bacillus cereus* on Alfalfa Yield under variable disease intensity .the American Journal of plant pathology.,**90:**657- 665.
14. Muhammad S.A. and Amusa, N.A**.(2003)** In – vitro inhibition of growth of some seedling blight inducing pathogens by compost - soil inhabiting microbes , African J.Biotech., **2 :** 161-164 .
15. Rini , C.R and Sulochana , K.K. **(2007)** Usefulness of *Trichoderma* and *Pseudomonas* against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* infecting tomato, Journal of Tropical Agriculture **45** (1-2): 21–28.
16. Akhtar,M.S.;Shakeel,U.Siddiqui,Z**.**A **(2010)** Biocontrol of Fusarium wilt by *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas alcaligenes* and *Rhizobium* sp on Lentil .Turk.J.Biol.**34:**1-7.
17. Ghazadeh,A.K.;ALIzadeh,A.and N. Safaie **(2008)** Biological control of Fusarium wilt of potato using , antagonistic strains of of bacteria , Iran. J. Plant Path. Vol. **44.**
18. Taweel, M . ; Alrahban B. and Abdulrahman,G. **(2003)** Biological control of soil–Borne fungi in greenhouse , Eighth Arab Congress of Plant Protection, 12-16 October 2003, El-Beida, Libya.
19. El-Hassan ,S. ; Gowen,S. and Bayaa, B **(2003)** *IN-VITRO* and *IN-VIVO* studies on the use of *Bacillus subtilis* to control *Fusarium oxysporum* f.sp *lentis* , the causal organism of lentil vascular wilt , Eighth Arab Congress of Plant Protection, 12-16 October 2003, El-Beida, Libya.
20. Guillen – Cruz,R.;Hernandez-Castillo,F.D.;Gallegos – Morales ,GRodriguez -Herrera, R.Aguilar - Gonzalez, C. N.; Padron – Corral ,E.;Reyes- aldes,M.H.(**2006**)*Bacillus* spp,como biocontrol en un suelo infestado con ,*Fusaium* spp,Rhizoctonia solani y Phytophthora capsici Leonian y su efecto en el Desarrollo y rendimiento del cultivo de chile (Capsicum annuum L) Revista Mexicana de Fitopatogia **24** (2) :105-114 .
21. Ha, M.T. and Huang, J.W**. (2007)** Control of Fusarium wilt of asparagus bean by organic soil amendment and microorganisms Plant Pathol.Bull. **16:**169-180.
22. Karimi, E.; Rouhani, H. ; Zafari, D.; Khodakaramian , Gh .and M Taghinasab(**2007**) Biological Control of Vascular Wilt Disease of Carnation Caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* by *Bacillus* and *Pseudomonas* Strains Isolated from Rhizosphere of Carnation, J. Sci. & Technol. Agric. & Natur.Resour.,Vol.**11,** No. 41 (B).
23. Mujeebur ,R. K. and Shahana , M.K. **(2001)** Biomanagement of Fusarium wilt of tomato by the soil application of certain phosphatesolubilizing ,

microorganisms International Journal of Pest Management **47** (3), 227-231. .

24. Mitchell,A.F.and.Walters,R**.(2004)**. .Potassium phosphate induces systemic protection in barley to powdery mildew infection, Pest Manag Sci. ;**60**(2): 126-34.
25. Booth,C**.(1971)** The genus Fusarium .Commonwealth Mycological Institute kew ,Surrey ,Eastern press ,237 pp.
26. Nelson,P.E. ; Toussoun, T. A.; Cook, R.J**.(1981)** *Fusarium* :Disease ,Biology and Taxonomy .The Pennsylvania state University press , Univ. Park. London,pp:365-390.
27. Huang,J.W. & Sun,S.K. **(1997)** The genus *Fusarium* from Taiwan National Chung Hsing University ,Taichung,R.O.C., pp116.
28. Abada, K. A. M., **(1986)** Studies on root rot of strawberry. Ph.D.Thesis, Fac. of Agric., Cairo Univ .pp 181.
29. Kazempour,M.N.and EL Ahinia,S.A **(2007)** Biological Control of *Fusarium fujikuroi*, the Causal Agent of Bakanae Disease byRice Associated Antagonistic Bacteria, *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, **13**, 393-408.
30. Dovrinic , V. **(1965**) Lacrali practiced ambelo grafie, Ed. Didaticta ,Sipedagica Bucurest . R . S . Romania .
31. Harborne,J.B**.(1973)** Phytochem-ical methods . Chapman and Hall (London) .pp:278.
32. Zaehringer ,M.V; Davis ,K. and Dean , L.(**1974)**.persistent Green color snap beans color –related constituents and quality of cooked fresh beans. Journal of American Science.**99:**89-92.
33. Clark,F.E**.(1965)** Agar-plate method for total Microbial, C.F.Black,1965; Methods of soil analysis part 2 publisher madeson,Wisconsin,U.S.A.,pp 1572.
34. Guarro,J. and Gene, J**.(1992)** *Fusarium* infections.criteria for the identification of the responsible species.Mycoses., **35:**109-114.
35. Pitt,J.I.andHocking ,A.D.(**1997**). Fungi and food spoilage .Blockie academic and professional ,chapman and Hall,Second edition .592 pp.
36. Kilic ,O**.(1997)** Effect of ds RNA-containing and dsRNA hypovirulent isolated of *Fusarium oxysporum* on severity of *Fusarium* seedling disease of Essex soybean.MSc.thesis,Faculty of the Virginia polytechnic institute, Virginia State Univ.60 pp.

37. Di Pietro,A. and Rancero, M. I. **(1998)** Endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*, Purification , Characherization and Production during infection of tomato plant. Phytopathology., **88 :** 1324-1330.
38. Dawar,S. ; Arjumund , S. ; Tariq , M. and Zaki , M.J**.(2007)** Use of sea weed and bacteria in the control of root rot of Mash Bean and Sunflower . Pak.J.Bot.**39(**4):1359-1366.
39. Recep , K. ; Fikrettin, S. ; Erkol , D. and E. Cafer **(2009)** Biological control of the potato dry rot caused by *Fusarium* species using PGPR strains , Biological Control ,Vol. **50** No : 2, 194-198 .
40. Ghonim ,M.I**. (1999)** Induction of systemic resistance against fusarium wilt in tomato by seed treatment with the biocontrol agent *Bacillus subtilis* , Bulletion of facultay of agriculture , University of Cario ,**50:**313-328.
41. Fernando , W.G.D. ; Nakkeeran , S.; Zhang , Y.and S. Savchuk **(2007)** Biological control of Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary by Pseudomonas and Bacillus species on canola petals, Crop Protection **26** : 100–107.
42. Nourozian, J., Etebarian, H.R. and Khodakaramian, G. **(2006)** Biological control of *Fusarium graminearum* on wheat by antagonistic bacteria Songklanakarin J. Sci. Technol., , **28**(Suppl. 1) : 29-38.
43. Atef. M. Nagwa and N. Haikel. **(2008)** Efficacy of Seed Treatment with Microbial Agents And/or Waste Products for the control of Cucumber Damping – off Botany Department, Faculty of Science, Cairo University, Egypt.
44. Gangadara Naik B., Saifulla, Nagaraja, R ., Basavaraja, M. K**.(2010)** Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vanilla* ,the casual agent of stem rot of vanilla IN VITRO,, I.J.S.N., VOL. **1**(2) : 259-261.
45. Boer, M., Bom, P.; Kindt, F.; Keurentjes, J. B.; Sluis,I.V. D.; Van

Loon, L.C. and Bakker, A.M. **(2003)** Control of Fusarium wilt of radish by combinig *Pseudomonas putida* strains that have different disease suppressive mechanisms , The American Phytopathology , **93 :** 5,226-232.

46. Rajendran , L. and R. Samiyappan , **(2008)** Endophytic *Bacillus* species confer increased resistance in cotton against damping off disease caused by *Rhizoctonia solani* . Plant path. Vol:**7:**1:1-12.
47. Morsy,M. , Abdel-Kawi,A. and M. Khalil **(2009)** Efficiency of *Trichoderma viride* and *Bacillus subtilis* as Biocontrol Agents gainst *Fusarium solani* on Tomato Plants , *Egy. J. Phytopathol.*, Vol. **37**, No. 1, pp. 47-57.
48. Siddiqui , Z. A; Shakeel, U.; S. Siddiqui **(2008)** Biocontrol of wilt disease complex of pigeonpea by fluorescent pseudomonads and *Bacillus* Spp under pot and field conditions Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica , 3 (1)pp, 77-92