دراسة على بكتيريا *Agrobacterium tumefaciens* المسببة لمرض التدرن التاجى على اللوزيات ومكافحتها حيويا تحت الظروف المعملية

فوزية مفتاح بونصيره

قسم النبات – كلية العلوم – جامعة عمر المختار

الملخص

تتعرض أشجار اللوزيات للعديد من الأمراض الفطرية والفيروسية والبكتيرية .ويعتبر مرض التدرن التاجي الذي تسببه بكتيريا *Agrobacterium tumefaciens* موأحد أهم الأمراض التي تسبب خسائر واضحة في إنتاج الأشجار المصابة وقد تم أختبار تأثير بعض الطرق الحيوية على نمو البكتيريا، ووجد أن المضاد الحيوى استربتوميسين كان أعلى تأثيرا عن الجنتاميسين. وبأختبار المستخلصات المائية لفصوص الثوم ولوراق نبات الشيح كان مستخلص الثوم أعلى تأثير من مستخلص الشيح كما استخدم للمكافحة الحيوية فطر *Trichoderma sp* ووجد ان له تأثير واضح على نمو البكتيريا .

1. المقدمة : INTRODUCTION

تعد البكتيريا *Agrobacterium* مسبب رئيسى لمرض التدرن التاجى Crowngall وهو جنس تابع لعائلة *Rhizobiaceae*، وسجل هذا المرض فى معظم انحاء العالم وخاصة على اشجار اللوزيات (تحبسم 1991)، ويتم التعرف عليه من خلال الاختبارات البيوكيميائية والفسيولوجية بعد أن اثبت قدرتها المرضية وتحديد خصائصها الشكلية والوصفية، وتتعدد الطرق فى مكافحة هذا المرض لصعوبة استخدام المكافحة بالمبيدات، وتتجه الدراسات الحديثة الى البدائل منها المكافحة الحيوية مثل استخدام المستخلصات النباتية مثل مستخلص الثوم الذى له فاعلية عاليه فى تثبيط نمو المرض (خليف 2007) كما يستخدم ايضا فى المكافحة فطريات *Trichoderma* (خليف 2007).

تهدف الدراسة الى تعريف المسبب البكتيرى لمرض التدرن التاجى على اللوزيات ومكافحتها معمليا باستخدام وسائل حيوية.

2. مواد وطرق البحث MATERIALS AND METHODS

1.2. عزل و تعريف البكتيريا:

تم أحضار الشتول الغضة بمعمل امراض النبات بقسم الوقاية التابع لكلية الزراعة – جامعة عمر المختار بالبيضاء، ليبيا، وبعد غسلها وتعقيمها سطحيا باستخدام الكحول الايثيلى 70% ثم سحقها فى محلول فوسفاتى M 0.01، وبعد تمام تصلب البيئة تم التخطيط على بيئة الاجار المغذى الموزع باطباق بترى المعقمة وحضنت على درجة 29±1م لمدة 3 ايام (الزيات واخرون معه 1974، محمود زكى 1988)، ولاختبار قدرات العزلات مرضيا تم حقن بمعلق من البكتيريا المعزولة بتركيز 10^{7} خلية/مل فى شتول فاصوليا ذات عمر 10 ايام وبعد ظهور الاعراض عليها، كما اجريت القدرة المرضية على شرائح الجزر بعد غسلها بالماء وتعقيمها ثم وضعها على اوراق ترشيح مبللة بماء مقطر معقم فى اطباق بترى لتلقح بالبكتيريا بتركيز 10^{-6} خلية/مل، كما عوملت شرائح معقمة اخرى بالماء المقطر المعقم (ابوالذهب واخرون 1997) ثم عزل البكتيريا ثانيا كما ذكر سابقا. واجريت الاختبارات الشكلية والبيوكيميائية كما ذكرها (Holt واخرون 1994).

2.2. مكافحة الممرض البكتيرى تحت الظروف المعملية

1.2.2 باستخدام المستخلصات المائية:

تم ضع 5 جم من فصوص الثوم و5 جم من اوراق نبات الشيح فى كيس بلاستيكى فى الثلاجة لمدة لا تقل 12 ساعة (-20م°) على حرارة الغرفة لمدة 20 دقيقة لاذابة الثلج وتعاقبت هذه الخطوات عدة مرات وجمعت الخلاصة خارج الانسجة لتوضع فى قنينات محكمة الإغلاق دلكنة اللون بعد تعقيمها على البارد بواسطة مرشح زايتس لتحفظ فى الثلاجة على درجة -20°م (Daayfوآخرون 1995). لاختبار تأثير المستخلصات على النمو البكتيري، استخدامت اقراص من اوراق الترشيح (1) Whatman قطرها 5 ملم معقمة، وتم غمرها فى المستخلصات النباتية عند التخفيفات الاول والثانى والثالث من المستخلصات المختبرة.

ثم لقحت مزرعة فى لطباق بترى بطريقة التخفيف ووضعت عليها الاقراص المعاملة بالمستخلصات ثم حضنت كما في (ابونصيرة و سعيد 2006).

2.2.2 باستخدام المضادات الحيوية

تم الحصول على المضادات الحيوية من قسم النبات في جامعة عمر المختار البيضاء في صورة أقراص بالتراكيز المعروفة عالميا والمصنعة بشركة (Oxoid) والتي شملت Gentamicin 10 ملجم و Streptomycin . تم استخدم هذه الأقراص مباشرة على البيئة الغذائية لمعرفة تأثيرها على البكتريا المختبرة .

3.2.2. باستخدام فطر الترايكودريما:

تم أختبار التضاد معمليا في أطباق بترى قطرها 8.5 سم تحوى 15 مل من بيئة بطاطس دكستروز أجار(PDA) لبعض العزلات البكتيرية الممرضة المتحصل عليها من اللوزيات وبين الفطريات المضادة وومنها فطر *Trichoderma sp* وذلك باستخدام معلق من النمو البكتيرى الممرض عمره يومين على بعد 2.7 سم من حافة الطبق وعلى بعد 3 سم من هذا القرص ووضع قرص قطره 6 مم من نمو الفطر الممرض عمره 4 أيام من الفطر المضاد وفق طريقة (Johnson وآخرون 1959) بمعدل 5 مكررات لكل معاملة وأعيدت التجربة مرتين متتاليين تحت نفس الظروف التجريبية بالإضافة للشاهد الكونترول (5أطباق) . حضنت الأطباق على درجة حرارة 29م° ± 1 في الظلام ، وتم حساب مسافة التثبيط Inhibition zone.

3.النتائج و المناقشة:

1.3. عزل والتعريف:

اظهرت النتائج ان التدرنات على شتلات اللوزيات هي بكتيريا *Agrobacterium tumefaciens* وذلك بعد ظهور الاعراض على نبات الفاصوليا وعلى شرائح الجزر كما في الشكل (3) المحقونة بمعلق البكتيريا للعزلات المختبرة التى اعطت نمو بكتيرى أخضر زيتونى مستدير صغير لامع ناعم على بيئة D1 كما في الشكل رقم (2) وهى خلايا بكتيرية مفردة ومتحركة بأسواط محيطية وايضا سالبة لصبغة جرام وغير متجرثمة (Schaad واخرون 2001) واكدت الاختبارات الشكلية والبيوكيميائية ان العزلة كانت موجبة للاوكسيديز والكتاليز، مختزله

لنترات ومنتجة لغاز كبريتيد الهيدروجين وكانت سالبة للاسيتون والاندول و، كما اعطت افضل نمو لها عند درخة حرارة 25-35 م° (Bradbury 1986) وملوحة حتى 3% و(ابوالذهب ولخرون 1997) . كما في الجدول رقم (1) .

2.3. تأثير المستخلصات النباتية

من الشكل (4) يتبين أن مستخلص الثوم له تأثير واضح على هذه البكتيريا (2.1) لما يحتوي على زيوت طيارة ومركبات الكبريت ، كما يحتوي على مادة الجلوكونين Gluconin كما كان مستخلص الثوم أعلى تأثير لمنطقة التثبيط من الشيح (1.3) وهذا يتفق مع (أبونصيرة وسعيد ، 2006) .

كما اختبر (Reimers وآخرون ، 1993) أن الثوم له تأثير على 17 كائن ممرض من الفطريات والبكتيريا في المعمل بتركيز 2 – 200 ملجم / لتر حسب الكائن وأظهرت نتائج جيدة

جدول (1) نتائج الاختبارات البيوكيميائية والفسيولوجية على بكتيريا معزولة من نبات الخوخ

الاختبارات	التفاعل
صبغة جرام	سالبة لجرام
التجرثم	لا تكون جراثيم
النمو عند 35م	+
النمو على بيئة D1	نمو اخضر زيتونى
النمو على 2% كلوريد الصوديوم	+
الاوكسيديز	+
اختزال النترات	+
الكتاليز	+
كبريتيد الهيدروجين	+
الاسيتون	-
الاندول	-
3- كيتولاكتوز	+

- = سالبة للأختبار

+ = موجبة للأختبار

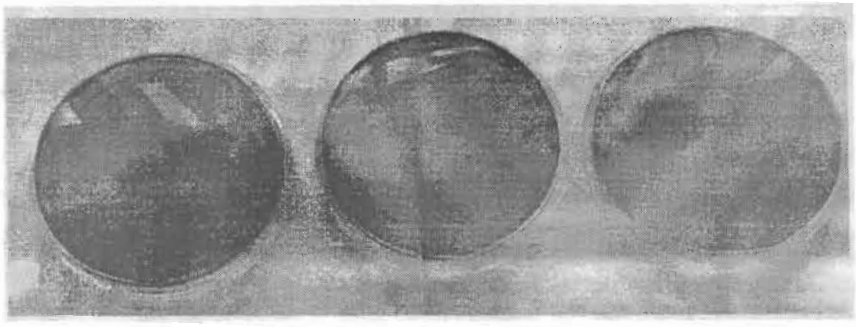
3.3. تأثير المضادات الحيوية المختبرة

تم قياس منطقة التثبيط بالمليمتر mm كما هو مبين بالشكل (5) حيث أعطى الاستربتومايسين أعلى منطقة تثبيط (19) وهذا يتفق مع تأثيره الواسع على العديد من الكائنات الممرضة يليها الجنتاميسين (12.6) .

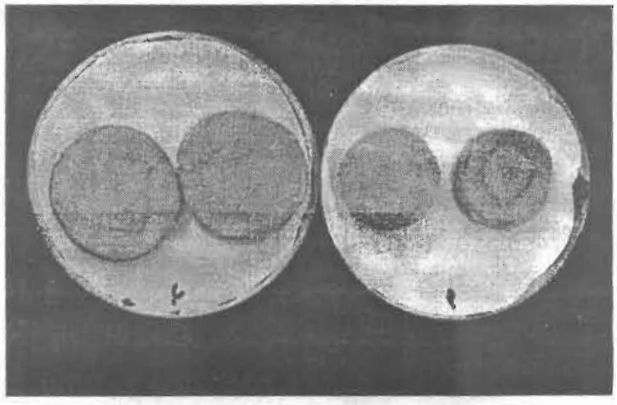
أوضحت النتائج استخدام المضادات الحيوية والمستخلصات النباتية المتداولة في ظروف المعمل أدى الى انخفاض النمو البكتيري وبالتالي زادة منطقة التثبيط حول القرص المضاد أو المستخلص النباتي مقارنة بالشاهد .

ولهذا نوصي باستخدام المستخلصات النباتية نظرا لتواجدها الطبيعي بالمنطقة وعدم تكلفتها وسهولة استعمالها وأكثر أمنا على صحة الإنسان والحيوان وتجنب استعمال المواد الكيماوية نظرا لما تسببه من مشكلة تلوث الغذاء والبيئة وما يترتب عليها من مشاكل صحية ومن ارتفاع سعر المنتج بسبب تكلفة عمليات المكافحة .

شكل (1) يبين اعراض التدرن التاجى على نبات الخوخ



شكل (2) يبين نمو البكتيريى المعزول من نبات الخوخ نامى على بيئة D1 التخصصية



الشكل (3) أختبار القدرة المرضية على شرائح الجزر

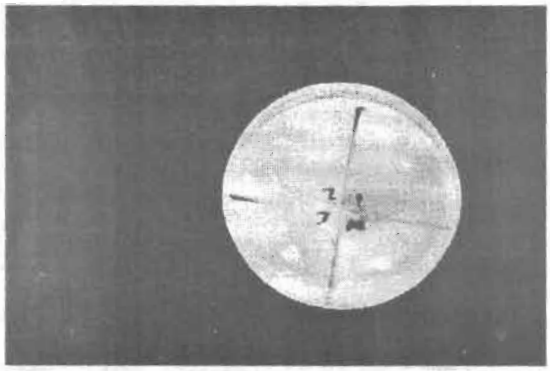
أ- معامل بالماء المقطر المعقم . ب – معامل بالبكتيريا.

جدول (2) تأثير مستخلصى الثوم والشيح على بكتيريا التدرن التاجى المعزولة من نباتا الخوخ

الشاهد ماء مقطر معقم	المستخلص النباتي	الاسم العلمي	قطر المنطقة الخالية من النمو			المتوسط
-	الثوم (فصوص)	*Allium sativum*	2.5	1.5	R	1.3
-	أوراق الشيح	*Artemisiaherbable*	3.2	2.1	1	2.1

المكرر = 4 اطباق / معاملة

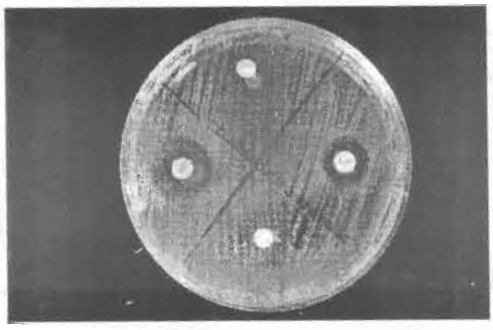
R = تعني أن البكتيريا مقاومة للمستخلص.



الشكل (4) تأثير المستخلصات النباتية على بكتيريا التدرن التاجى

جدول (3) تأثير المضادات الحيوية على بكتيريا التدرن التاجي المعزولة من نبات الخوخ

المضاد الحيوي	التركيز mg	متوسط قطر المنطقة الخالية من النمو mm
Strptomycin	10	19
Gentamycin	10	12.6



شكل (5) تأثير المضادات الحيوية على بكتيريا التدرن التاجى

4.3 تأثير فطر التريكوديرما:

كان لأستخدام فطر التريكودرما تأثير مثبط واضح على نمو البكتيريا.

المراجع العربية:

ابوالذهب، م. ك. الكسير، ح. م. القزاز، س. أ. و شعيب، ع. ع. (1997). علم البكتيريات الجزء الاول: دار المعارف– القاهرة.

ابوتصيرة، ف. م. و سعيد، م. ع. (2006). دراسة تأثير المستخلصات النباتية والمضادات الحيوية على بكتيرية *Xanthomonas campestris* pv. *Pruni* المسببة لمرض التبقع فى اشجار اللوزيات بمنطقة الجبل الاخضر بالجماهيرية العربية الليبية العظمى. المجلة المصرية للعلوم التطبيقية 21 (9): 14– 23.

الزيات، م. م.، مؤمن، س. أ. ابوالذهب، م. ك. (1974). مرض التدرن التاجى فى نباتات الكافور فى ليبيا. مجلة البحوث الزراعية 2: 99– 166.

حامد خليف (2007). مرض التدرن التاجى فى الاردن. مجلة وقاية النبات العربية مجلد 25 (1): 60

تحبسم، اكرم. (1991). التدرن التاجى (*Agrobacterium tumefaciens*) على الدراق (*Prunus peisica*) فى الاردن. مجلة وقاية النبات العربية مجلد 9 (1): 64– 65.

- زكى ، س . ع . (1988).الميكروبيولوجيا التطبيقية المعملية . مكتبة الأنجلو المصرية -القاهرة .

المراجع الأجنبية:

Daayf, F.; Schnitt, A. and Belanger, R. R. (1995). The effect of plant ectracts *of Reynoutria sachalinensis* on powder mildew, development and leaf physiology of long English cucumber. Plant Dis. 79: 580.

Holt ,J.G. Krieg,N.R.Sneath, J.T.and william,S.T.(1994). Bergey'sManual of Determinative Bacteriology . 9th ed ., Williams & Wilkins ., U.S.A.

Johnson, L. F.; Curl, E. A.; Bond, J. H.; and Fribourg, H. A. (1959). Methods studing soil microflora. Plant Diseases relationship. Minneapolis, Burgess Publication Company.

A Study on *Agrobacterium Tumefaciens* Caused Crown Gall Disease on Stone Fruits and its Biological Control under Laboratory Conditions

Fawzia Moftah Bonsera
Botany Dept. – Fac. of Science – Omar Al-mukhtar Univ

ABSTRACT

Stone fruit trees could be infected by many fungal, viral and bacterial diseases. Crown gall disease caused by *Agrobacteriam tumifaciens* is one of the most important disease that affect the infected trees production. The effects of some biological methods were tested on bacterial growth. The antibiotic Streptomycin had a higher effect than Gentamicin, garlic extract gave a higher inhibition effect than leaves. *Tricoderma sp* had an inhibition effect on bacterial growth..