Yemeni Journal of Agriculture & Veterinary Sciences ((2015) 1(3):1-15) ISSN:2311-7788

Faculty of Agriculture & Veterinary Medicine, Thamar University

Yemeni Journal of Agriculture & Veterinary Sciences

Available online at; WWW.YJAVS.COM

عزل وتعريف ودراسة الخصائص الامراضية والمكافحة الحيوية لمسببات تقرح الموالح وتبقع اوراق الطماطم البكتيري

شوقي ناشر سيف العريقي[1]، عبير صالح عبد الله احمد[1]، أحمد عبد الله حسن [1]و معمر الجبوبي[٢]

١. قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة صنعاء، صنعاء، اليمن dr.ariqi@yahoo.com

٢. قسم الإنتاج النباتي، كلية الزراعة والطب البيطري، جامعة ذمار، ذمار، اليمن

Article history:

Received

14 January 2015

Accepted

07 February 2015

الملخص

أجري البحث في المختبر وفي البيت الزجاجي التابعين لقسم وقاية النبات /كلية الزراعة/ جامعة صنعاء لدراسة فرط الحساسية وإنتاج البكتريوسين لعزلات تقرح الموالح وعزلة تبقع أوراق الطماطم وتقييم تأثير المكافحة الإحيائية باستخدام (Bacillus coagulans) والمضاد الحيوي الخام المنتج منها ضد البكتيريا الممرضة لكل من الموالح والطماطم. ١٤ عزلة بكتيرية تم الحصول عليها على الوسط الغذائي GNA من شتلة ليمون مصابة بمرض تقرح الموالح أحضرت من منطقة تهامة– محافظة الحديدة. عرفت تلك العزلات على أنها *Xanthomonas campestris pv. citri* وذلك اعتمادا على نتائج القدرة الإمراضية (٦ عزلات فقط استجبت لهذا الاختبار) والخصائص المظهرية والفسيولوجية والحيوية. أظهر اختبار فرط الحساسية (HR) نتائج ايجابية من خلال ردة فعل أصناف التبغ لعزلات تقرح الموالح (٥، ١٠، ١١، ١٢ و ١٤) ذات القدرة الإمراضية العالية وكذلك عزلة تبقع أوراق الطماطم، في حين أظهر نبات العباب حساسية متأخرة من خلال ردت فعله للعزلات تحت الاختبار. لم تظهر عزلات تقرح الموالح وعزلة تبقع أوراق الطماطم أي نتيجة ايجابية لاختبار البكتيريوسين مما يدل على أنها غير منتجة له. أظهرت النتائج أن بكتيريا التضاد *Bacillus coagulans* لها قدرة أبادية عالية على عزلات تقرح الموالح ١٤، ١٢، ٩، ١١، ١٠ وعزلة تبقع أوراق الطماطم بمتوسط قدره ٣٠، ٢٧,٥، ٢٧، ٢٢,٥، ٢٠,٨ و ٢٠,٥ مللي متر، على التوالي، من ناحية أخرى، كان تأثير بكتيريا التضاد ضعيفا على عزلات تقرح الموالح ٥، ٨ و ٢. أظهر تأثير المضاد الحيوي الخام للبكتيريا *Bacillus coagulans* تباينا في تأثيره على عزلة تقرح الموالح (١٢) وعزلة تبقع أوراق الطماطم، فعلى الرغم من تفوق المضاد الحيوي الخام المستخلص بكحول الإيثايل في التأثير على عزلة تقرح الموالح بمتوسط قدره ٢٣ مللي متر إلا أنه لا يوجد فارق معنوي بينه وبين المضاد الحيوي الخام المستخلص بالبنزين في التأثير على البكتيريا الممرضة، أيضا، لا توجد فروق معنوية بين المضاد الحيوي الخام المنتج على الوسطين الغذائيين GNA و SPA في التأثير على البكتيريا الممرضة لنباتي الموالح والطماطم.

كلمات مفتاحية: الموالح، الطماطم، البكتيريوسين، فرط الحساسية، المكافحة الحيوية و Xanthomonas.

المقدمة INTRODUCTION

تأخذ البكتريا التابعة للـ xanthomonads الشكل العصوي، تتحرك بواسطة سوط واحد قطبي ولا تكون جراثيماً داخلية، هوائية أجباراً وسالبة لجرام (Mehrotra, 1980، Fahy and Persley, 1983 و محمد عبد الرحمن الوكيل،١٩٨٥). يتسبب مرض تبقع أوراق الطماطم عن البكتيريا *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* (*syn. Xanthomonas* euvesicatoria Jones, et al., 2004)، وبالرغم من أن المرض لا يقلل من أعداد الثمار المنتجة ولكنه يؤثر على الناتج الاقتصادي من خلال تشوه الثمار فيستحيل تسويقها وعرضها على مشتريها مما ينتج عنه إعادتها إلى منتجيها فيعود عليهم بالخسارة الاقتصادية، وإذا ما صاحبت الإصابة الأولية سقوط الأمطار فأن المرض يشتد ويصبح وبائياً لا يرجى من النباتات ثمرة . ويتسبب مرض تقرح الموالح عن البكتيريا *Xanthomonas campestris pv. citri* (Sahi, et al., 2007)، وعلى الرغم من إصابة الموالح بمسببات مرضية أخرى (فطرية، فيروسية وأخرى) إلا أن التقرح البكتيري يكون الأشد ضراوة على نباتات الموالح في اليمن وخصوصاً في منطقة تهامة نظراً لتلازم ارتفاع درجتي الحرارة والرطوبة واللتين ترقى بالحالة المرضية لدرجة الوباء. تظهر أعراض البكتيريا *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* على أوراق الطماطم بشكل تبقعات صغيرة غير منتظمة رمادية أو مسودة لا يزيد قطرها عن ٣مم، ربما يحاط بالتبقعات هالة صفراء، يظهر على الثمار الخضراء المصابة بقع مائية مرتفعة قليلاً عن سطح الثمرة تكبر في الحجم ليتراوح قطرها ٣ – ٦ مم، يتحول لون هذه البقع إلى اللون البني ثم الأسود وتصبح غائرة صلبة خشنة الملمس (عبد الله وشوقي،٢٠٠٩ و شوقي وآخرون، ٢٠١٠). يظهر مرض التقرح البكتيري في الموالح بانتظام في العديد من أصناف الموالح وبدرجات مختلفة معتمداً على الظروف الجوية ففي شدة الإصابة تتساقط الأوراق وتموت الأطراف وتتساقط الثمار غير الناضجة وتتشوه فينخفض الإنتاج وتقل القيمة التسويقية (Stall and Senymour, 1983). تظهر البكتيريا *Xanthomonas campestris pv. citri* أعراضاً مختلفة تتمثل في البثرات، التقرحات (عبارة عن أنسجة فلينية) محاطة بأنسجة مشبعة بالماء (Water soaked)والهالات الصفراء على الأوراق والسيقان والثمار (Bergamin-Filho, et al.,2000، Burning and Gabriel, 2003، Das, 2003، Schubert and Sun,2003، Graham,et al.,2004 و عبد الله وشوقي،٢٠٠٩).

يمثل تفاعل فرط الحساسية Hypersensitive Reaction(HR) ردة فعل سريعة للنباتات ضد الكائنات الدقيقة الممرضة تظهر من خلال الموت السريع للخلية النباتية المصابة أو تقرح للأنسجة بحيث يتم حصر الكائن الممرض في الخلايا المصابة فقط ومنع انتشاره للخلايا المجاورة (Fahy and Persley, 1983 و Klement, et al., 1990). معظم البكتيريا الممرضة للنبات قادرة على إحداث تفاعل فرط الحساسية HR كالبكتيريا التابعة للـ xanthomonads والتي عادة ما تسبب تبقعات للأوراق وتقرحات لأنسجة عوائلها النباتية (Klement, et al., 1990). تحتاج البكتيريا التابعة للـ xanthomonads لزمن يتراوح من ١٠ – ٢٤ ساعة لإظهار تفاعل الـ HR، وفي حال ظهور تفاعل الـ HR بعد ٢٤ ساعة أو تحول المناطق المحقونة بالمعلق البكتيري للون الأصفر ربما كان ذلك بسبب السمية غير المتخصصة من الخلايا البكتيرية والتي لم تستجيب

لتفاعل الـ HR (Klement , et al., 1990). ظهور تفاعل الـ HR للبكتيريا التابعة للـ xanthomonads مقيد بمدى حراري وإضاءة مناسبة لإظهاره على عكس الكائنات الدقيقة الأخرى مثل تلك التابعة للـ pseudomonads والتي تظهر تفاعل الـ HR تحت أي ظرف (Fahy and Persley, 1983)،وغالباً ما تجرى اختبارات إظهار تفاعل الـ HR للمسببات المرضية البكتيرية على نباتي التبغ والفلفل.

دراسات المكافحة الحيوية للأمراض المتسببة عن .Xanthomonas spp من خلال استخدام البكتيريا الرمية الطبيعية محدودة مقارنةً بتلك المستخدمة في مكافحة كل من البكتيريا *Pseudomonas syringae* بجميع سلالتها والبكتيريا *Erwinia amylovora*، ومن أمثلة الدراسات لمكافحة أمراض الجنس Xanthomonas حيوياً: مكافحة البكتيريا المسببة *Xanthomonas axonopodis pv. allii* لمرض لفحة أوراق البصل (Gent and Schwartz, 2005)، وكذلك *Xanthomonas campestris pv. campestris* المسببة لمرض العرق السود في الصليبيات (Assis, et al., 1996، Wulff, et al., 2002 و Massomo, et al., 2004)، وأيضاً تم مكافحة البكتيريا *Xanthomonas campestris pv. phaseoli* المسببة لمرض اللفحة العادية في الفاصوليا حيوياً (Romeiro, et al., 2005)، والعديد من البكتيرات الأخرى التابعة للجنس Xanthomonas. كما تم مكافحة البكتيريا *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* تحت ظروف البيت الزجاجي (Dianese, et al.,2003 و El-Hendawy, et al., 2005)، وتحت ظروف الحقل (Byrne, et al., 2005 و Ji, et al., 2006). وجد شوقي (٢٠١١) أن البكتيريا *Bacillus coagulans* كانت الأقوى تأثيراً على البكتيريا *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* من بكتيريا التضاد التابعة للـ *Pseudomonas fluorescens* وذلك في اختبار التضاد على الأطباق، كما أظهر المركب coffee المضاف له بكتيريا التضاد *Bacillus coagulans* خفضاً معنوياً في متوسط أعداد المستعمرات لبكتيريا تبقع أوراق الطماطم على صنف الطماطم Ti 2 ar بمتوسط قدره صفر في جميع القراءات. أظهرت نتائج مكافحة مسبب مرض التقرح البكتيري للموالح باستخدام سلالات البكتيريا Pseudomonas(fluorescent و putida) في المعمل تثبيط كبير ضد البكتيريا Xanthomonas citri ، كما لوحظ انخفاض المرض في البيت الزجاجي من خلال مكافحته حيويا بسلالات الـ Pseudomonas بنسب ٢٣,٨% و ٦٤% (Khodakaramian, et al., 2008 و Khalid, et al., 2010). وقد لاحظ Montakhabi, et al., (2011) أن ٢٦ سلالة تابعة للجنسين البكتيريين Pseudomonas و Bacillus من مجموع ٤٥٣ سلالة قد أظهروا تثبيطاً لنمو البكتيريا *Xanthomonas axonopodis pv. citri* على الأطباق.

تهدف هذه الدراسة إلى عزل وتعريف البكتيريا المسببة لمرض تقرح الموالح ودراسة بعض الفروق بينها وبين البكتيريا المسببة لتبقع أوراق الطماطم وكيفية مكافحتهما حيوياً كطريقة آمنة و بديلة للمبيدات الكيماوية الضارة

مواد و طرائق العمل :

MATERIALS AND METHODS

١. العزلات البكتيرية

جرى عزل البكتيريا المسببة للتقرح البكتيري من ثمار وشتلة ليمون أحضرت من تهامة بدت عليهما الأعراض المرضية لتقرح الموالح على الوسط الغذائي 1 Glucose,)% Glucose nutrient agar (GNA)

1 g; Beef extract, 0.1 g; Yeast extract, 0.2 g; Peptone, 0.5 g; Sodium chloride (NaCl) 0.5 g; Agar, 2 g; D.W., 100 ml; pH 7.2 – 7.4) وكذلك على الوسطين الغذائيين SPA و YPGA (شوقي وآخرون،٢٠١٠، Fahy and Persley, 1983 وKlement, et al. 1990) وحضنت عند درجة حرارة ٢٧±١ س لمدة ٤٨ ساعة. شخصت البكتيريا وفقاً لاختبار القدرة المرضية والصفات الظاهرية والفسيولوجية والكيماوية الحيوية المعتمدة (Bergey, 1977، Fahy and Persley, 1983، Schaad, 1988 و Klement, et al., 1990)، فيما أخذت بكتيريا تبقع أوراق الطماطم شكل (١: أ و ب) من دراسة سابقة على هذا المرض (شوقي وآخرون،٢٠١٠) وتحصل على بكتيريا التضاد Bacillus coagulans من معمل الميكروبيولوجي، قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة صنعاء.

٢. اختبار فرط الحساسية (HR):

زرعت ثلاثة أصناف من نبات التبغ(*Nicotiana glutinosa*، *Nicotiana rustica*، *Nicotiana tobacum*) وكذلك نبات العباب(*Withinia sominefora*) في أصص بالبيت الزجاجي، تم استخدام معلق بكتيري يحتوي على٧١٠ وحدة خلية بكتيرية/ مل من مزرعة حديثة النمو (٤٨ ساعة) لعزلات تقرح الموالح التي أعطت نتيجة إيجابية عالية في اختبار القدرة المرضية وعزلة تبقع أوراق الطماطم لتقييم فرط الحساسية لأصناف نبات التبغ ونبات العباب. حقن المعلق البكتيري لكل عزلة بواسطة إبرة معقمه بالقرب من العرق الوسطي من الجهة السفلى للأوراق المعاملة حتى سرى المعلق مابين البشرة العليا والسفلى للأوراق الغضة في أصناف نبات التبغ وفي أوراق نبات العباب التي تعتبر جلدية الملمس مقارنتها بأوراق أصناف نبات التبغ (Fahy and Persley, 1983)، ثم أخذت النتائج بعد مرور ٢٤ ساعة من عملية الحقن.

٣. اختبار إنتاج البكتيريوسين :

استخدم في هذا الاختبار البكتريا المسببة لتبقع أوراق الطماطم وعزلة واحده من البكتيريا المسببة لتقرح الموالح العزلة رقم (١٢) لمعرفة قدرتهما على إنتاج البكتيريوسين. نميت البكتيريتين كل على حده على الوسط الغذائي GNA على هيئة بقعة واحدة في منتصف كل طبق، حضنت الأطباق على درجة حرارة المعمل ولمدت ٤ أيام، عرضت المستعمرات البكتيرية النامية لأبخرة الكلوروفورم باستخدام ورق الترشيح المشبع بمحلول الكلوروفورم الذي وضع على أغطية الأطباق المقلوبة لمدة ٤٥ دقيقة ومن ثم تركت الأطباق مفتوحة لمده ١٥ دقيقه للتخلص من أبخرة الكلوروفورم ثم صب الوسط الغذائي Malt agar (Fahy and Persley, 1983، و Klement, et al., 1990) الممزوج ببكتيريا تبقع أوراق الطماطم على ثلاثة أطباق نميت فيها بكتيريا الطماطم وثلاثة أطباق أخرى نميت فيها بكتيريا الموالح، نفس الإجراء تم مع الـ Malt agar الممزوج فيه بكتيريا تقرح الموالح ثم حضنت الأطباق على درجة ٢٧±١ لمدة ٤٨ ساعة للكشف عن هالات البكتيريوسين.

٤. اختبار التضاد في المعمل

٤,١. تأثير عزلات التضاد

نفذ اختبار التضاد ضد عزلات تقرح الموالح المعزولة والبكتيريا المحدثة للتبقع الورقي على الطماطم باستخدام البكتيريا *Bacillus coagulans* على الوسطين الغذائيين GNA و Sucrose peptone agar (SPA) (Sucrose, 2 g; Peptone, 0.5 g; K_2HPO_4, 0.05 g; $MgSO_4 \times 7H_2O$, 0.025g; Agar, 1.5 g; D.W., 100 ml; pH,

7.4 – 7.2). خطط ميكروب التضاد أولاً على سطح الأوساط الغذائية المتصلبة أنفة الذكر(المناسبة لنمو بكتيريا التضاد وبكتيريا تبقع أوراق الطماطم وعزلات تقرح الموالح)، حيث عمل خط واحد في وسط كل طبق للبكتيريا *Bacillus coagulans* وحضنت لمدة ٤٨ ساعة عند ٢٧ ± ١ س حتى يسمح للمادة المضادة والمنتجة من بكتيريا التضاد في الانتشار في البيئة داخل كل طبق. نفذت خطوط متعامدة من البكتيريا المسببة لمرض تبقع أوراق الطماطم وعزلات التقرح البكتيري على خطوط بكتيريا التضاد بحيث لا يمس لقاح البكتيريا الممرضة لقاح بكتيريا التضاد وبثلاث مكررات (El-Ariqi, et al., 2008) ثم حضنت الأطباق لمدة ٤٨ ساعة أخرى وعند ذات درجة الحرارة. أخذت القراءات بقياس خط التثبيط للبكتيريا الممرضة للنبات المدروسة. حللت النتائج إحصائياً باستخدام التصميم العشوائي الكامل .C.R.D وبالاستعانة بالحزمة الإحصائية SAS (SAS, 2001) اختبرت المعنوية بين المتغيرات عند مستوى احتمال ٠,٠٥ وفقاً لاختبار L.S.D.

٤,٢. إنتاج المضاد الحيوي الخام واختبار فاعليته:

نميت بكتيريا التضاد Bacillus coagulans في دوارق زجاجية سعة ٢٥٠ مل تحتوي على وسطين غذائيين سائلين هما GN و SP (دورقان لكل وسط غذائي في كل دورق ١٠٠ مل من الوسط الغذائي)، تركت الدوارق الملقحة ببكتيريا التضاد على سطح المقلب (Shaker) وتم تشغيل المقلب على سرعة قدرها ١٢٥ لفة / دقيقة لمدة ٩٦ ساعة تحت ظروف مظلمة وعلى درجة حرارة المعمل. فصلت الخلايا البكتيريا لبكتيريا التضاد عن الأوساط الغذائية النامية فيها بجهاز الطرد المركزي (٤٠٠٠ لفة في الدقيقة) مدة ١٠ دقائق. أخذ المتبقي من الأوساط الغذائية ليتم استخلاص المضاد الحيوي الخام بواسطة مذيبين أولهما كحول الإيثايل (قطبي) والأخر البنزين (غير قطبي)، أضيف ٩٠ مل من كل مذيب لكل ١٠٠ مل وسط غذائي منزوع منه بكتيريا التضاد كل على حده، تركت الدوارق على جهاز التقليب مدة ساعة، أخذ الجزء المفصول من المذيبات كل على حده في برطمانات نظيفة وتركت حتى تطاير المذيبات ليتبقى في قاع البرطمانات مواد لزجه يفترض أن تكون المضاد الحيوي الخام للبكتيريا *Bacillus coagulans* (Al-Gaboobi, et al., 2010). أخذ ما يقارب ٤٠ ميكروجرام من المضاد الحيوي الخام ووضع في منتصف أطباق بتري تحتوي على الوسط الغذائي GNA الممزوج بعزلتي الطماطم والموالح رقم (١٢) كل على حده وبثلاث مكررات على هيئة نقط (Spots)، استخدمت أقراص معقمة من ورق الترشيح (قطرها ٣ مم) مشبعة بالماء المقطر والمعقم للمقارنة، أخذت النتائج بعد ٤٨ ساعة. حللت النتائج إحصائياً باستخدام التصميم العشوائي الكامل .C.R.D وبالاستعانة بالحزمة الإحصائية SAS (SAS, 2001) اختبرت المعنوية بين المتغيرات عند مستوى احتمال ٠,٠٥ وفقاً لاختبار L.S.D.

النتائج والمناقشة

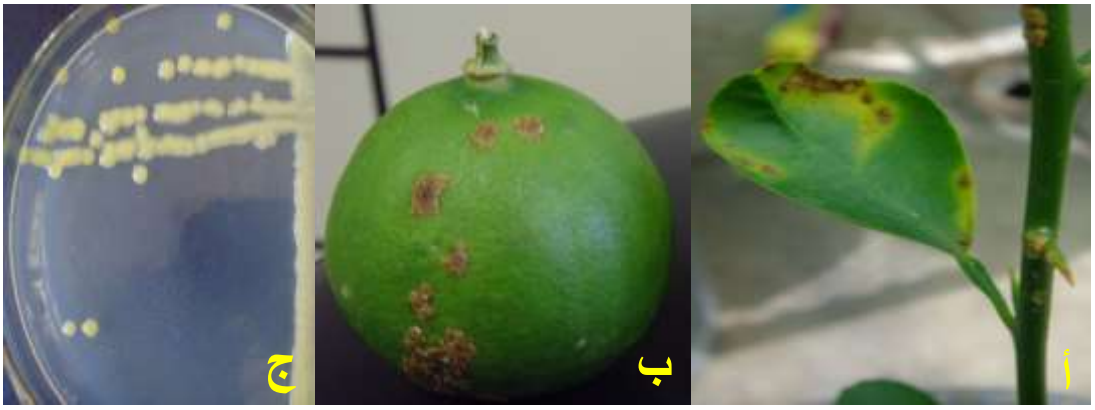
RESULTS DISCUSSION :

١. عزل بكتيريا تقرح الموالح وتعريفها

١٤ عزلة من البكتيريا المسببة لمرض تقرح الموالح Xanthomonas campestris pv. citri تم الحصول عليها من ثمار شكل (٢:ب) وأوراق شتلة ليمون شكل (٢:أ) بدا عليهما أعراض تقرح الموالح أحضرتا من منطقة تهامة، محافظة الحديدة، اليمن. ظهر نمو بكتيري بعد ٣٦ ساعة من التحضين عند درجة حرارة ٢٧ ± ١ س على الأوساط الغذائية GNA، SPA و YPGA. حيث تميزت المستعمرات الفردية بعد

٤٨ ساعة، فظهرت صغيرة الحجم، دائرية ومحدبة، ناعمة ولامعة، ذات لون أصفر باهت شكل (٢:ج) مع ملاحظة أن مستعمرات بكتيريا تبقع أوراق الطماطم أخذت نفس الصفات مع فارق أن لونها كان واضح الصفار شكل (١:ج) ومستعمراتها أقل حجماً على الوسط الغذائي GNA. وتتطابق هذه الصفات مع تلك التي أشارت إليها العديد من الدراسات فيما يتعلق بالجنس Xanthomonas(Bergey, 1977، Fahy and Persley, 1983، Klement, et al. 1990 و Schaad, 1988). أظهر الفحص المهجري لبكتيريا تقرح الموالح المصبوغة بصبغة جرام أن خلاياها ذات شكل عصوي، سالبة لصبغة جرام، غير متجرثمة، وتتفق هذه النتائج مع نتائج دراسات سابقة فيما يتعلق بصفات الجنس Xanthomonas (Bergey, 1977، Fahy and Persley, 1983، Klement, et al., 1990 و Schaad, 1988). ولدى مقارنة تلك النتائج سواء تلك المتعلقة بالصفات المظهرية أو بالصفات الفسيولوجية والبيوكيميائية، مع ما سبق التوصل إليه في الدراسات السابقة أنفة الذكر يمكن الاستنتاج بأن البكتيريا المسببة لمرض تقرح الموالح في اليمن تتبع النوع *Xanthomonas campestris* . وجد تباين في قدرة عزلات التقرح البكتيري (١٤ عزله) على إحداث المرض على شتلات الليمون إذ لم تظهر بعض العزلات أعراض التقرح البكتيري في اختبار القدرة الإمراضية (٨ عزلات) تتفق هذه النتيجة مع نتيجة Swarup, et al., (1992) حيث ذكروا عن وجود سلالات بكتيرية تتبع الجنس Xanthomonas ضعيفة القدرة الإمراضية أو انتهازية على الموالح فتتطلب هذه السلالات اكتساب جين القدرة الإمراضية للتقرح البكتيري (pthA) حتى تصبح لديها القدرة على إصابة الموالح وإظهار أعراض التقرح البكتيري، بينما أظهرت خمس عزلات (٥، ١٠، ١١، ١٢، ١٤) قدرة مرضية عالية، حيث شوهدت أعراض تقرح الموالح على شتلات الليمون بعد مرور ١٣ يوم من التلقيح بظهور قرح دائرية صغيرة على السطح السفلي للأوراق ما لبثت وإن ظهرت على السطح العلوي للأوراق وبعض هذه البقع كانت محاطة بهالة صفراء، من ناحية أخرى أظهرت العزلة رقم (٧) قدرة مرضية متوسطة حيث ظهر أعراض تقرح الموالح بعد مرور ٣٥ يوم، تماثلت هذه النتيجة مع دراسات سابقة (Agrios, 2005 و عبد الله و شوقي، ٢٠٠٩).

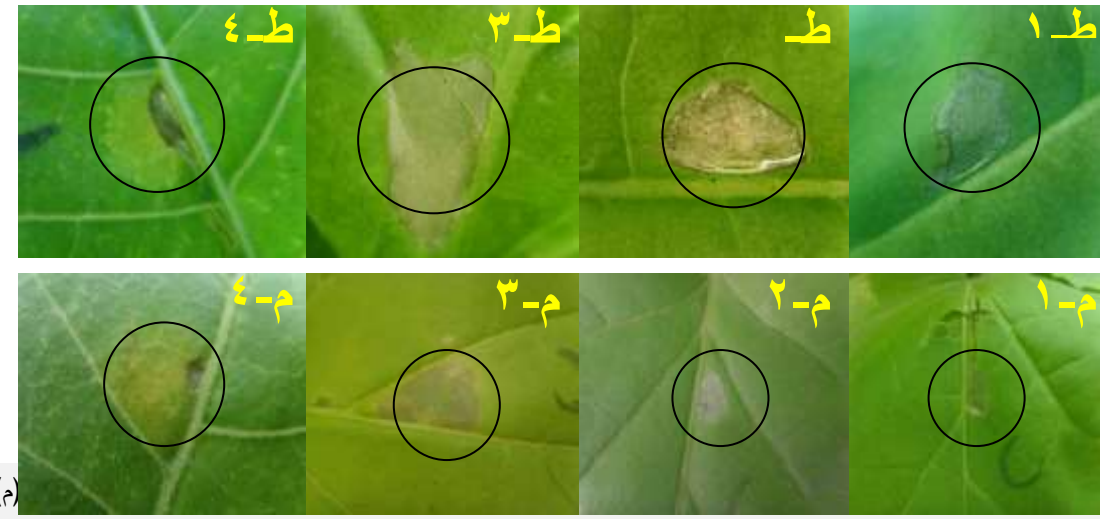
شكل ١. أعراض مرضية نموذجية للإصابة بكتيريا Xanthomonas campestris pv. vesicatoria المسببة لمرض تبقع أوراق الطماطم على الورقة (أ)، الثمرة (ب) والمستعمرات البكتيرية على الوسط الغذائي GNA (ج).



شكل 2. أعراض مرضية نموذجية للإصابة ببكتيريا *Xanthomonas campestris pv. citri* المسببة لمرض تقرح الموالح على الورقة والفرع (أ)، الثمرة (ب) والمستعمرات البكتيرية على الوسط الغذائي GNA (ج).

٢. فرط الحساسية (HR):

ظهرت نتائج فرط الحساسية بعد مرور ٢٤ ساعة من تلقيح أصناف نبات التبغ باللقاح البكتيري لعزلات الموالح التي أظهرت قدرة مرضية عالية على شتلات الليمون وعزلة الطماطم، وكانت النتائج ايجابية من خلال ردة فعل أصناف نبات التبغ لعزلات تقرح الموالح (٥، ١٠، ١١، ١٢ و ١٤) ذات القدرة الإمراضية العالية وكذلك عزلة الطماطم شكل (٣). أظهر نبات العباب حساسية منخفضة لعزلات الموالح وعزلة الطماطم من خلال تأخر ردة فعل النبات رغم أنه ينتمي للعائلة الباذنجانية وهو من النباتات الطبية، وقد يرجع ذلك لسماكة أوراق نبات العباب أو أن سمية العزلات البكتيرية المختبرة غير متخصصة لنبات العباب تتوافق هذه النتيجة مع Klement, et al., 1990 حيث ذكر أن ظهور تفاعل أختبار الـ HR بعد مرور ٢٤ ساعة أو تحول المناطق المحقونة باللقاح البكتيري للبكتيريا التابعة xanthomonads للون الأصفر ربما يحدث ذلك بسبب السمية غير التخصصية من الخلايا البكتيرية المتحللة. ظهرت ردة فعل نبات العباب للقاح البكتيري بعد مرور أسبوعين في ظهور نكرزة محاطة بهالة صفراء، بينما كانت أصناف نبات التبغ أكثر حساسية للعزلات البكتيرية المختبرة ربما لغضاضة أوراقها والتخصصية السمية لكل من عزلات الموالح وعزلة الطماطم وبالتالي كانت حساسية النبات للعزلات سريعا خلال ٢٤ ساعة من التلقيح بظهور موت للخلايا النباتية التي أنساب أليها اللقاح البكتيري وكانت هذه النتيجة متوافقة مع نتائج كل من Fahy and Persley, 1983، Klement, et al., 1990 . والملاحظ من الشكل (٣) تباين في لون أعراض موت خلايا أصناف التبغ الملقحة باللقاح البكتيري، حيث نلاحظ أن الخلايا الميتة للصنف *Nicotiana rustica* كان لونها رمادي مزرق مع عزلة الطماطم في حين كانت الخلايا الميتة شفافة مع عزلة الموالح، وفي الصنف *Nicotiana tobacum* أعطت الخلايا الميتة لون بني مع عزلة الطماطم ورمادي مع عزلة الموالح، من ناحية أخرى، كان اللون متماثل في الصنف *Nicotiana glutinosa* حيث أعطت الخلايا الميتة اللون البني الفاتح لكلاالعزلتين



(م)

العزلة رقم (١٢) حيث أن:

(١) صنف التبغ *Nicotiana rustica* (٣) صنف التبغ *Nicotiana glutinosa*

(٢) صنف التبغ *Nicotiana tobacum* (٤) نبات العباب *Withinia sominefora*

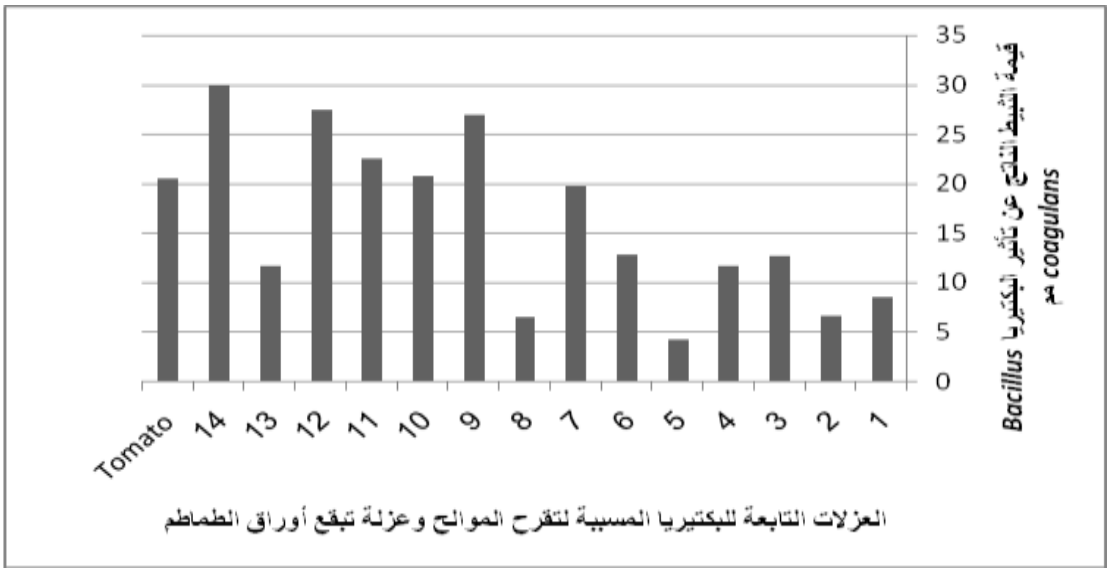
٣. فاعلية البكتيريوسين:

لم تظهر أية نتائج ايجابية لهذا الاختبار من خلال المناطق الرائقة حول المستعمرات البكتيرية تحت الدراسة سواء لعزلة الطماطم أو لعزلة الموالح، وبالتالي فانه يمكن الاستنتاج أن الأنواع البكتيرية تحت الدراسة والتابعة للجنس Xanthomonas لا تنتج البكتيريوسين سواء للنوع الواحد أو للأنواع القريبة منها وهذا يرجع إلى عدم احتوائها على الجينات المسؤولة عن إنتاج البكتريوسين.

٤. فاعلية بكتيريا التضاد على عزلات بكتيريا تقرح الموالح وبكتيريا تبقع أوراق الطماطم:

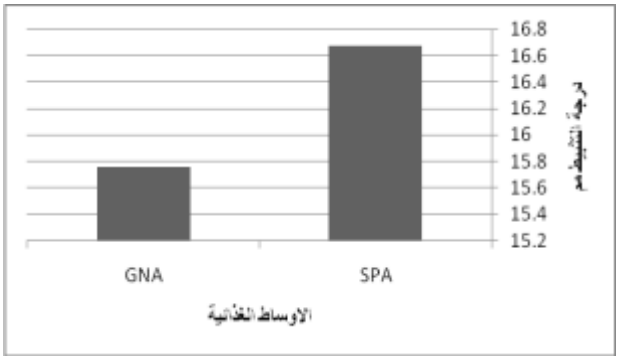
يتضح من الشكل رقم (٤) تباين بين عزلات الموالح وعزلة الطماطم في تأثرهم ببكتيريا التضاد *Bacillus coagulans*، فالملاحظ أن بعض العزلات تأثرت تأثراً كبيراً ببكتيريا التضاد في حين أن البعض الأخر كان تأثرها ببكتيريا التضاد إما تأثير متوسط أو منخفض، تتفق هذه النتيجة مع نتائج Byren, et al (2005) و Ji, et al (2006) من أن نتائج مكافحة بكتيريا تبقع أوراق الطماطم حيوياً في الحقل كانت منخفضة إلى متوسطة هذا يشير إلى أن سلالات البكتيريا المسببة لتبقع أوراق الطماطم تتأثر بدرجات متفاوتة بعامل المكافحة الحيوية، وكما بين Lvanova and Bogatzevska (2006) إلى أن المقاومة للسلالة T3 من بكتيريا تبقع أوراق الطماطم كانت أعلى من المقاومة للسلالة T1 في بعض أصناف الطماطم المختبرة. أظهرت بكتيريا التضاد قدرة تثبيطية عالية على عزلات الموالح ١٤، ١٢، ٩، ١١، ١٠ وعزلة الطماطم بمتوسط قدره ٣٠، ٢٧,٥، ٢٧، ٢٢,٥، ٢٠,٨ و ٢٠,٥ ملي متر على التوالي، تتفق هذه النتيجة مع ما وجده شوقي (٢٠١١) من أن البكتيريا *Bacillus coagulans* كانت الأقوى تأثيرا على البكتيريا *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* من بكتيريا التضاد التابعة للبكتيريا fluorescent pseudomonades، في حين كان تأثير بكتيريا التضاد *Bacillus coagulans* ضعيفاً على عزلات الموالح ٥، ٨ و ٢ حيث بلغ متوسط

خط التثبيط لهذه العزلات ٤,٣، ٦,٥ و ٦,٧ مللي متر على التوالي، تتفق هذه النتيجة مع نتيجة Al-Gaboobi, et al., (2010) من أن القدرة التثبيطية للبكتيريا *Bacillus coagulans* في البكتيريا *Ralstonia solanacearum* أقل من قدرة البكتيريا التابعة لل fluorescent pseudomonades. لا توجد فروق معنوية بين عزلات الموالح ١٤، ١٢، ٩، ١١، ١٠، عزلة الطماطم وعزلة الموالح ٧ وهم العزلات الأكثر تأثراً ببكتيريا التضاد، أيضا لا فروق معنوية بين عزلات الموالح ٦، ٤، و ٣، لكن توجد فروق معنوية بين مجموعة العزلات الأكثر تأثراً ببكتيريا التضاد وبين العزلات الأقل تأثراً عند احتمال ٠,٠٥.



شكل ٤. القدرة التثبيطية لبكتيريا التضاد *Bacillus coagulans* على عزلات بكتيريا تقرح الموالح وبكتيريا تبقع أوراق الطماطم.

من ناحية أخرى، لا يوجد فرق معنوي بين الوسطين الغذائيين GNA و SPA في إظهار تأثير بكتيريا التضاد على عزلات تقرح الموالح وبكتيريا تبقع أوراق الطماطم شكل (٥)، ربما أن الوسط الغذائي SPA والذي مصدر الكربون له هو سكر السكروز عند انحلاله يكون نتيجته سكري الجلوكوز والفركتوز فيصبح سكر الجلوكوز مشترك في الوسطين الغذائيين GNA و SPA فلم يظهر فارق معنوي بينهما في إظهار القدرة التثبيطية لبكتيريا التضاد.



شكل ٥. متوسط تأثير بكتيريا التضاد *Bacillus coagulans* ضد عزلات تقرح الموالح وبكتيريا تبقع أوراق الطماطم في الوسطين الغذائيين SPA و GNA.

تأثير المضاد الحيوي الخام على عزلتي تقرح الموالح وتبقع أوراق الطماطم:

أظهرت نتائج اختبار تأثير المضاد الحيوي الخام المستخلص من الوسطين الغذائيين السائلين (SP و GN) بمذيبين مختلفين (قطبي وغير قطبي) والذي نمت عليهما بكتيريا التضاد *Bacillus coagulans* تباين في تأثيره ضد عزلتي تقرح الموالح رقم (١٢) وتبقع أوراق الطماطم شكل (٦). رغم تفوق المضاد الحيوي الخام المستخلص بكحول الإثيل في التأثير على عزلتي تقرح الموالح وتبقع أوراق الطماطم بمتوسط قدره ٢٣ مللي متر إلا أنه لا يوجد فارق معنوي بينه وبين المضاد الحيوي الخام المستخلص بالبنزين في التأثير على البكتيريا الممرضة شكل (٦- ب)، وعليه فإنه بالإمكان استخدام ما يتاح من مذيب قطبي أو غير قطبي لاستخلاص المضاد الحيوي الخام للبكتيريا *Bacillus coagulans*.

شكل ٦. تأثير المضاد الحيوي الخام لبكتيريا التضاد *Bacillus coagulans* المستخلص من الوسطين الغذائيين السائلين SP و GN (أ) بمذيبي كحول الإثيل والبنزين (ب) ضد عزلتي تقرح الموالح رقم (١٢) وتبقع أوراق الطماطم (ج).

تشير النتيجة في شكل (٦- أ) إلى تقارب ظهور تأثير المضاد الحيوي الخام للوسطين الغذائيين السائلين SP و GN رغم التفوق البسيط للوسط الغذائي SP بمتوسط قدره ٢٠,٥ إلا أنه لا يوجد فارق معنوي بينه وبين الوسط الغذائي GN عند احتمال ٠,٠٥ ربما أن سكر الجلوكوز المنحل من السكروز للوسط SP والمصدر الأساسي للكربون في الوسط GN كان مصدر ا واحدا للسكر في كلا الوسطين الغذائيين فلم يصنع فارق كبير في فاعلية المضاد الحيوي الخام المنتج في الوسطين الغذائيين من خلال بكتيريا التضاد. تأثرت عزلة تقرح الموالح بدرجة أكبر من عزلة تبقع أوراق الطماطم بالمضاد الحيوي الخام بمتوسط قدره ٢٢,٤ بينما بلغ متوسط تأثر عزلة الطماطم بالمضاد الحيوي الخام ١٨,٧ شكل (٦- ج) إلا أنه لا فروق معنوية بين العزلتين عند احتمال ٠,٠٥. نتيجة تأثر عزلتي تقرح الموالح وتبقع أوراق الطماطم بالمضاد الحيوي الخام للبكتيريا *Bacillus coagulans* تتوافق مع نتيجة العريقي وآخرون (٢٠٠٨) و Al-Gaboobi, et al., (2010) من أن المضاد الحيوي الخام للبكتيريا Bacillus coagulans قد تفوق على المضاد الحيوي الخام للبكتيريا التابعة لـ fluorescent pseudomonades في التأثير على البكتيريا *Ralstonia solanacearum*.

المصادر : **REFERENCES**

اولاً: المصادر العربية:

شوقي ناشر سيف العريقي، ٢٠١١. المكافحة الحيوية للبكتيريا *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* مسببة مرض التبقع البكتيري لأوراق الطماطم. مجلة حوليات العلوم الزراعية بمشتهر،٤٩ (٢): ٢٣١ – ٢٤٠.

شوقي ناشر سيف العريقي، عبد الرحمن عبد الفتاح الشامي و صالح حسين القانصي، ٢٠١٠. عزل وتعريف البكتيريا المسببة لمرض تبقع أوراق الطماطم في اليمن واختبار حساسية بعض الأصناف لها. مجلة الخليج العربي للبحوث العلمية، ٢٨(٤): ٢٣٢ – ٢٣٩.

عبد الله ناشر وشوقي ناشر العريقي، ٢٠٠٩. وقاية النبات (أساسيات ومفاهيم). دار جامعة صنعاء للطباعة والنشر، اليمن، ص: ٤٤ – ٤٩.

محمد عبد الرحمن الوكيل، ١٩٨٥. أمراض النبات المتسببة عن الكائنات الحية بدائية النواة. دار المعارف،القاهرة،مصر.ص: ٢٢٩.

ثانياً: المصادر الأجنبية:

Agrios, G.N. 2005. Plant pathology. 5th Elsevier Academic Press, pp 633 – 634. Amsterdam • Boston • Heidelberg • London • New York • Oxford • Paris • San Diego • San Francisco • Singapore • Sydney • Tokyo.

Al-Gaboobi, M.A., El-Zumair, M.A. and El-Ariqi, S.N.S. 2010. *In vitro* inhibitory effects of antagonistic bacteria against growth of Yemeni *Ralstonia solanacearum* strain. *Yem. J. of Biol. Scien*. 6(1): 153 – 162.

Assis, M.P.S., Mariano, R.L.R., Mitchereff, S.J. and Rildo, S.B. 1996. Biocontrol of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on kale with *Bacillus* spp. and endophytic bacteria. In: Wenhua, T., Cook, R.J., Rovira, A. (Eds.), Advances in Biological Control of Plant Diseases. Agricultural University Press, Beijing, China, pp. 347–353.

Bergamin-Filho, A., Amorim, L., Laranjeria, L., and Gottwald, T.R. 2000. Epidemiology of citrus canker in Brazil with and with out the Asian citrus leafminer. In: Proceedings of the International citrus canker Research Workshop, Ft. Pierce, Florida.

Bergey, D.H. 1977. "Bergey's mannual of systematic bacteriology" 8th ed. Pages 77 – 83, 1104 – 1139 Eds.by Noel R.Krieg and John, G. Holt.Williams and Wilkins Boltimore/London .

Burning, A.M., and Gabriel, D.W. 2003. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Mol. Plant Pathol.* 4(3): 141-157.

Fay, P.C., and Persley, G.J. 1983. Plant bacterial diseases, a diagnostic guide. Academic Press, pp 189 – 228 . Sydney, New York London .

Gent, D.H. and Schwartz, H.F. 2005. Management of *Xanthomonas* leaf blight of onion with a plant activator, biological control agents, and copper bactericides. *Plant Dis.* 89: 631–639.

Graham, J.H., Gottwald, T.R., Cubero, J., and Achor, D.S. 2004. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Mol. Plant Pathol.* 5(1):1-15.

Ji, P., Campbell, H.L., Kloepper, J.W., Jones, J.B., Suslow, T.V. and Wilson, M. 2006. Integrated biological control of bacterial speck and spot of tomato using foliar biological control agents and plant growthpromoting rhizobacteria. *Biol. Con.* 36: 358–367.

Jones, J.B., Lacy, G.H., Bouzar, H., Stall, R.E. and Schaad, N.W. 2004. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Sys. App. of Micr.* 27: 755–762.

Khalid, H., Khalid, N., Abdul Majeed Ikram, U., Feng, L., Kazim, A., Shahid, A., Farah, K., Abdul Ghani and Ghulam, R. 2010. Molecular and biochemical characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* pathotypes. *Afr. J. of Biote.* 9(54): 9092 – 9095.

Byrne, J.M., Dianese, A.C., Ji, P., Campbell, H.L., Cuppels, D.A., Louws, F.J., Miller, S.A., Jones, J.B. and Wilson, M. 2005. Biological control of bacterial spot of tomato under field conditions at several locations in North America. *Biol. Con.* 32: 408–418.

Das, A.K. 2003. Citrus canker-A review. *J. Appl. Hort.* 5(1): 52-60. Egel DS, Graham JH, Stall RE (1991). Genomic relatedness of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of citrus. *Appl. Environ. Microbol.* 57: 2724-2730.

Dianese, A.C., Ji, P. and Wilson, M. 2003. Nutritional similarity between nonpathogenic bacteria and the pathogen is not predictive of efficacy in biological control of bacterial spot of tomato. *App. Envir. of icr.* 69: 3484–3491.

El-Ariqi, S.N.S., Abo El-Dahab, M.K., El-Kasheer, H.M. and El-Kazzaz, S.I. 2008. *In vitro* antibiosis activity of *Bacillus* spp. Against *Ralstonia solanacearum* (Betaproteobacteria: Burkholderiales: Ralstoniaceae) the causative factor of potato brown-rot disease. *Yem. J. of Biol. Scien.*4(1): 121 – 129.

El-Hendawy, H.H., Osman, M.E. and Sorour, N.M. 2005. Biological control of bacterial spot of tomato caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* by *Rahnella aquatilis*. *Micro. Res.*160: 343–352.

Romeiro, R.S., Vieira Junior, J.R., Ferraz, H.G.M., Barra, V.R.S. and Melo, I.S. 2005. A biocontrol agent for bacterial blight that induces systemic resistance as it restrains pathogen multiplication in bean leaf tissue. Abstract. 1st *International Symposium Biological Control Bacterial Diseases*, Darmstadt, Germany.

Sahi, S.T., Ghazanfar, M.U., Afzal, M., Rasheed, A., and Habib, A. 2007.Incidence of citrus canker disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) dows on kinnow (*Citrus reticulata*) and its chemotherapy. *Pak. J. Bot.* 39(4): 1319-1327.

SAS, 2001. SAS/STAT. User's guide for personal computers. Release 6.12. SAS Institute Inc., Cary. NC, U.S.A.

Schaad, N.W. 1988. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. (2nd ed.). Bacteriology committee of American Phytopathological society, Minnesota, pp.60 – 77 and 81 – 92.

Schubert, T.S., Sun, X. 2003. Bacterial citrus canker. Plant Pathol.Circular No. 377. Fl. Dep. Agric. and Cons. Services. Division. Plant industry. pp. 1-6.

Stall, R.E., and Senymour, C.P. 1983. Canker, a threat to citrus in the Gulfcoast States. *Plant Dis.* 67: 581-585.

Khodakaramian, G., Heydari, A., and Balestra, G.M. 2008. Evaluation of *Pseudomonas* bacterial isolates in biological control of citrus bacterial canker disease. *Int. J. Agric. Res.* 3(4): 268-272.

Klement, Z., Rudolph, K. and Sands, D.C. 1990. Methods in phytobacteriology. Akademiai Kiado, Budapest pp. 24, 70, 86, 97,101 – 102, and 272 .

Lvanova, B. and Bogatzevska, N. 2006. Rrsistance to race T1 and T3 of *Xanthomonas vesicatoria* in tomato lines. *Raste. Nauki* 43(5): 435 – 438.

Massomo, S.M.S., Mortensen, C.N., Mabagala, R.B., Newman, M.A. and Hockenhull, J. 2004. Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of cabbage in Tanzania with *Bacillus* strains. *J. Phyto.* 152: 98–105.

Mehrotra, R.S. 1980. Bacteria and bacterial diseases. Plant Pathology. Tata McGraw–Hill pub. Co. Ltd. New Delhi. pp. 636-638.

Montakhabi, M.K., Rahimian, H., Falahati, Rastegar, M. and Jafarpour, B. 2011. *In vitro* investigation on bacterial of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* cause of citrus bacterial canker by citrus antagonistic bacteria. *J. of Plant Pro.* 24(4):46.

Wulff, E.G., Mguni, C.M., Mortensen, C.N., Keswani, C.L. and Hockenhull, J. 2002. Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv.*campestris*) of brassicas with an antagonistic strain of *Bacillus subtilis* in Zimbabwe. *Eur. J.of Plant Path.*108: 317–325.

Swarup, S., Yang, Y., Kingsley, M.T. and Gabriel, D.W. 1992. An *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, pthA, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 5(3): 204 – 213.

Isolation, identification and study the pathogenicity characteristics and biocontrol of bacterial citrus canker and tomato leaf spot causes

EL-Ariqi[1], S.N.S1., S. A. A. Abeer[1], A. H. Ahmed[1] AND M. A. Al-Jaboobi[2]

1Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Sana'a University, Sana'a, Yemen, dr.ariqi@yahoo.com;

2Department of Plant Production, Faculty of Agriculture and veterinary, Thamar University, Thamar, Yemen

ABSTRACT:

Laboratory and greenhouse experiments were conducted at the plant protection department, Agriculture college, University of Sana'a to study the hypersensitive reaction and bacteriocine of citrus canker and tomato leaf spots isolates and evaluate the biocontrol effects of Bacillus coagulans and crude antibiotic against pathogenic bacteria for citrus and tomato. Fourteen isolates were isolated from Lemon Lemon's seedlings with citrus canker on GNA medium collected from Tehama district, Hodeida, Yemen. *Xanthomonas campestris pv. citri* was identified according to the pathogenicity (6 isolates were positive), morphological, physiological and biochemical characteristics. Positive reaction was shown for citrus canker isolates no. 5, 10, 11, 12 and 14 and tomato leaf spots isolates for HR test in tobacco cultivars, while Withinia sominefora had late reaction. Citrus canker isolates and tomato leaf spots isolate were could not produced of bacteriocin. The results of *Bacillus coagulans* clearly had more inhibitory effects against citrus canker isolates no. 14, 12, 9, 11 and 10 and tomato leaf spots isolate with means 30, 27.5, 27, 22.5, 20.8 and 20.5 mm respectively, however, Bacillus coagulans showed less effective on citrus canker isolates no.5, 8 and 2. Data showed that crude antibiotic of *Bacillus coagulans* had a strong antibacterial activity against citrus canker isolate no. 12 with mean 23 mm, but, no significant differences between two crude antibiotic effects which extracted by ethyl and benzene solutions, also, no significant differences were observed between product crude antibiotics in two media GNA and SPA on effect its of disease bacteria.

Key words: Citrus, Tomato, Bacteriocin, HR, Biocontrol, Xanthomonas.