تأثير بكتريا *Rhizobium leguminosarum biovar. Viciae* على انبات ونمو نباتي الباقلاء والبازلاء وتداخلها مع بعض الفطريات المرضة

م.م. محمد ابراهيم الطائي
كلية علوم البيئة وتقاناتها

م.م. غيداء صلاح العنزي
كلية التربية الاساسية

جامعة الموصل

تاريخ تسليم البحث : ٢٠٠٨/٤/٧ ؛ تاريخ قبول النشر : ٢٠٠٨/٦/١٢

ملخص البحث :

تم في هذا البحث دراسة تلقيح بذور نباتي الباقلاء والبازلاء ببكتريا *Rhizobium leguminosarum* biovar. *Viciae* على انباتها ونموها. كذلك دراسة تداخل هذه البكتريا مع بعض الفطريات الملقح بها بذور النباتين وهي فطر *Aternaria alternata* وفطر *Fusarium solani* حيث اظهرت النتائج ان تلقيح بذور نبات الباقلاء ادى الى زيادة نسبة الانبات بنسبة ٧٠ % بينما لم تؤثر بصورة واضحة على انبات ونمو بذور نبات البازلاء وايضا عملت البكتريا على تقليل فعالية بعض الفطريات النامية مع بذور النباتين .

Effect of *Rhizobium leguminosarum* biovar. *Viciae* bacteria on Broad Bean and Pea germination and growth and Its interaction with some pathogenic fungi

Mohammad I. Altaee
Environ. Sci & Tech. College

Ghaydaa S. Alinizy
Basic Education College

University of Mosul

Abstract:

This research studies the effect of *Rhizobium leguminosarum* biovar. *Viciae* on germination and growth of Broad Bean and Pea Plants. Moreover the interrelation effect of these bacteria with fungi *Aternaria alternata* and *Fusarium solani* on plants seed activity and germination was detected. The Results show that Bacteria inoculation on Vicia seed with bacteria increasing germination rate about 70 % while there is no clearly effect of this Bacteria inoculation on Pea seeds germination . Also some fungi activity which grow with two plant seed are decreased by bacteria.

المقدمة

يتعرض النتروجين في التربة الى فقد مستمر عن طريق امتصاص النبات له او عن طريق الغسل بوساطة الري او بمياه الامطار او بعملية عكس النترجة Denitrification ويتم تعويض هذا النقص عن طريق اضافة الاسمدة العضوية والمعدنية كما يعوض جزءاً رئيسياً منه عن طريق تثبيت النتروجين الجوي بايولوجيا ومن المعروف الاهمية الكبيرة للنباتات البقولية في زيادة خصوبة التربة وذلك بتثبيت النتروجين الجوي بفعل البكتريا التابعة لجنس الرايزوبيا Rhizobia خلال معيشة تعاونية مع النبات البقولي [1].

وعند زراعة بذور النباتات في التربة لاول مرة فانه من الممكن عدم احتواء التربة على بكتريا الرايزوبيا Rhizobia لهذا فانه من الضروري اضافة البكتريا الى التربة لتشجيع عملية تكوين العقد الجذرية وتثبيت النتروجين [2] . فعندما ينمو النبات بوجود سلالات فعالة من بكتريا *Rhizobium* تزداد عملية تثبيت النتروجين مما يكون له تأثير ايجابي على الانتاجية [3] ، وتعد بكتريا *Rhizobium leguminosarum* احد سلالات بكتريا الرايزوبيا التي تحول النتروجين الجوي الى امونيا يستخدمها النبات في صنع الاحماض الامينية (الوحدات الاساسية في بناء البروتين) في حين ينتقل قسم من الكاربوهدرات المصنعة من قبل النبات بعملية البناء الضوئي الى العقد الجذرية لتستخدمها البكتريا كمصدر غذائي كما تستخدمها كمصدر لايون الهيدروجين اثناء تحويل النتروجين الجوي N_2 الى امونيا NH_4 [4] ، ويتحدد نجاح عملية تلقيح النبات بالبكتريا بعدة عوامل تتضمن الظروف البيئية وعدد الخلايا المصابة بالبكتريا ووجود بكتريا العقد الجذرية نفسها [5].

ويهدف البحث الى دراسة تأثيربكتريا الرايزوبيم *Rhizobium* على انبات ونمو بذور نباتي الباقلاء والبزاليا وتداخل تاثيرهذه البكتريا مع تأثيربعض الفطريات الممرضة للنبات .

المواد وطرق العمل

1. عزل الاحياء المجهرية

1.1 عزل البكتريا ***Rhizobium leguminosarum*** **biovar.** ***Viciae*** :

عزلت بكتريا *Rh. leguminosarum* biovar. *Viciae* من العقد الجذرية لنبات الباقلاء (*Vicia faba*) المزروع لمدة شهرين اذ فصلت العقد الجذرية ذات اللون الوردي (الفعالة) وعقمت سطحيا بمحلول هايبوكلورات الصوديوم (NaOCl 1 %) لمدة 3 دقائق ثم غسلت بماء مقطر معقم لمدة 2 – 3 دقائق لازالة التاثير السمي ثم سحقت جيدا باستخدام هاون خزفي معقم ثم فرش المسحوق على اطباق بتري زجاجية بقطر 9 سم حاوية على الوسط الغذائي مستخلص خميرة المانيتول الخاص ببكتريا العقد الجذرية Mannitol Yeast

Extract Agar for Rhizobia (MYA) حضنت الاطباق عند درجة حرارة 30 ْم لمدة 5 أيام حيث تكون هذه البكتريا متخصصة على نبات الباقلاء [6] .

2.1 عزل الفطريات *Alternaria alternata* و *Fusarium solani*

استخدمت عزلتان فطريتان في هذا البحث وهما فطر *Alternaria alternata* وفطر *Fusarium solani* نظرا لتسجيلهما كمسببات مرضية لنبات الباقلاء حيث تم عزل فطر *A. alternata* من اوراق الباقلاء المصابة والتي تظهر بشكل بقع على هيئة دوائر متحدة المركز بنية الى سوداء اللون داخل الورقة او على حافاتها [7] ، حيث عقمت الاجزاء المصابة سطحيا بمحلول هايبوكلورات الصوديوم (NaOCl 1 %) لمدة 3 دقائق ثم غسلت بماء مقطر معقم لمدة 2 – 3 دقائق لازالة التاثير السمي نقلت بعدها الى اطباق بتري حاوية على وسط بطاطا سكروز اكار Potato Sucrose Agar (PSA) المضاف له المضاد الحيوي ستربتومايسين بتركيز 100 ملغم / مل ، عند درجة حرارة 28 ْ م لمدة سبعة ايام بمعدل ثلاثة مكررات .

اما فطر *Fusarium solani* فقد تم عزله من التربة باستعمال طريقة التخفيف Dillution methode اذ تم وزن 10 غم من التربة واضيف الى 90 مل ماء مقطر ومعقم ومن ثم اخذ 1 مل من هذا التخفيف واضيف الى 9 مل ماء مقطر ومعقم بعدها سحب 1 مل من التخفيف الاخير واضيف الى طبق بتري حاوي على الوسط الغذائي PSA عند درجة حرارة 28 ْ م لمدة سبعة ايام[8].

شخصت الفطريات المعزولة بالاعتماد على المفاتيح التصنيفية [9]،[10] ونقيت العزلات الفطرية باستخدام طريقةٍ Sub Culture .

3.1 الاوساط الغذائية المستخدمة في عزل وتنقية الاحياء المجهرية :

1.3.1 وسط مستخلص اكار البطاطا والسكروز Potato Sucrose Agar:

ويتكون من: Potato extract 200g\l , sucrose 20g\l , agar agar 15 g\l

2.3.1 وسط اكار سكر المانيتول ومستخلص الخميرة Manitol Yeast Extract Agar

ويتكوم من : K_2HPO_4 0.5g\L, $MgSO_4$ 0.2g\L, NaCl 0.1g\L, Mannitol 10g\L, Yeast Extract 0.4g\L, Agar 10g\L

2. تهيئة التربة :

تم تهيئة 30 كغم من التربة المزيجية التي تم الحصول عليها من احد المشاتل في مدينة الموصل ، عقمت هذه التربة باستخدام محلول الفورمالين 1% لمدة ثلاثة ايام، تركت بعدها التربة لمدة يومين للتهوية [11]، ثم وزعت على سنادين بلاستيكية بقطر 10 سم لاجراء التجربة (500 غم / سندان تقريبا) .

3. تأثير بكتريا *R. leguminosarum* biovar. *Vicia* وتداخلها مع كل من فطري *A. alternata* و *Fusarium solani* على انبات بذور و نمو بادرات نباتي الباقلاء والبزاليا

تم تلقيح السنادين بالاحياء المجهرية وعلى النحو التالي : بكتريا *R. leguminosarum* ، فطر *A. alternata* ، فطر *Fusarium sp.* ، بكتريا *R. leguminosarum* مع فطر *A. alternata* ، بكتريا *R. leguminosarum* مع فطر *Fusarium sp.* ، فطر *Fusarium sp.* مع فطر *A. alternate* بمعدل نصف طبق لكل سندان من الكائن المجهري بعمر5 ايام تحضين مع ترك المقارنة بدون معاملة ، تركت السنادين لمدة ثلاثة ايام مع مراعاة مستوى الرطوبة وتجانسها ، بعدها تم زراعة السنادين ببذور الباقلاء والبزاليا المعقمة سطحيا بمحلول هايبوكلورات الصوديوم 1 % بمعدل خمسة بذورلكل سندانة بثلاثة مكررات لكل معاملة [12]. تركت السنادين تحت ظروف البيت الزجاجي 25 – 35 مْ مع متابعة مستوى الرطوبة باستخدام ماء مقطر لغرض السقي، واخذت النتائج بعد شهرين بحساب نسبة الانبات للبذور ونمو البادرات لنباتي الباقلاء والبزاليا.

النتائج والمناقشة :

1. تاثير الإحياء المجهرية المستخدمة في إنبات بذور الباقلاء والبازلاء :

تشير نتائج تلقيح بذور الباقلاء ببكتريا *R. leguminosarum* لوحدها ومع كل من فطري *Fusarium solani* و *A. alternata* وايضا كل فطر على حدة .ان البذور الملقحة ببكتريا *R. leguminosarum* اظهرت أعلى نسبة انبات وصلت الى 70 %، جدول (1) أي تفوقت على معاملة المقارنة التي بلغت نسبة انباتها 20 % .

وهذا يعود الى ان بكتريا *R. leguminosarum* تكون متخصصة للتعايش مع نبات الباقلاء حيث انها عزلت من جذوره ومن ثم فهي توفر ظروف مثالية لنمو البذور وتكوين العقد الجذرية التي تزود النبات بمركبات النتروجين وتزيد مساحة الامتصاص عن طريق

فعالياتها الحيوية [6]. وقد ذكر [13] ان تلقيح بذورالنبات ببكتريا *Rhizobium* يزيد نسبة انبات البذور وكمية المحصول الناتج .

كما بلغت نسبة انبات بذور الباقلاء الملقحة بالفطر *A. alternata* 66% اما البذور الملقحة بالفطر *Fusarium solani* فبلغت نسبة انباتها 20 % أي تساوت مع معاملة المقارنة ولم يؤثر الفطر على نسبة انبات هذه البذور .

وكانت نسبة انبات البذور بتأثير نتائج تداخل تأثير بكتريا *R. leguminosarum* مع فطر *A. alternata* و *R. leguminosarum* مع فطر *F. solani* و فطر *A. alternata* مع فطر *F. solani* 13 هي % و 20 % و 33 % على التوالي .

الجدول (1) تاثير الاحياء المجهرية على انبات بذور نبات الباقلاء.

المعاملة	%لانبات بذور الباقلاء
معاملة السيطرة	20
Rhizobium leguminosarum	70
Alternaria alternate	66
Fusarium solani	20
R. leguminosarum مع *A. alternata*	13
R. leguminosarum مع *Fusarium solani*	20
A. alternate مع *Fusarium solani*	33

اما بالنسبة لبذور نبات البازلاء فكانت نسبة الانبات كما موضح في الجدول (2).

الجدول (2) تاثير التلقيح بالاحياء المجهرية على انبات بذور نبات البازلاء .

المعاملة	%لانبات بذور الباقلاء
معاملة السيطرة	40
Rhizobium leguminosarum	50
Alternaria alternata	60
Fusarium solani	70
R. leguminosarum مع *A. alternata*	50
R. leguminosarum مع *Fusarium solani*	50
A. alternata مع *Fusarium solani*	60

من النتائج اعلاه يتضح ان جميع المعاملات فاقت معاملة السيطرة وان بكتريا *R. leguminosarum* لم تؤثر على نسبة الانبات كثيرا وهذا قد يعود الى عدم فعالية هذه البكتريا مع بذور نبات البازلاء.اذ يتكون جنس الرايزوبيا من انواع عديدة ولكل نبات بقولي نوع خاص به او سلالة خاصة هي الوحيدة القادرة على تثبيت النتروجين في هذا النبات وهو ما يطلق عليه بالتخصص فاذا اصيب النبات بالسلالة او النوع المتخصص فانها تكون عقدا قادرة على تثبيت النتروجين وتسمى بالعقد الفاعالة effective nodules اما اذا وجدت سلالة او نوعاً خلاف النوع الملائم فانها قد لاتكون عقدا او قد تكون عقداً صغيرة غير قادرة على تثبيت النتروجين وتسمى بالعقد غير الفعالة ineffective nodules [1] اذ تسبب البكتريا المتخصصة على نبات البازلاء زيادة في معدل النمو ويظهر النبات المصاب بها اطول واكثر نشاطا وحيوية من النبات غير المصاب [4].

بينما اعطت الفطريات نسبة نمو اعلى من معاملة السيطرة وهذا قد يعود الى مشاركتها في توفير المواد العضوية للبذور عن طريق تحليل المواد المعقدة لتصبح سهلة الامتصاص وعدم حساسية هذه البذور لفطر *Fusarium solani* .

2. تاثير بكتريا *R. leguminosarum* على نمو بادرات نباتي الباقلاء والبازلاء :

ادى نمو بذور الباقلاء مع بكتريا *R. leguminosarum* الملقحة في التربة المعقمة الى زيادة عدد البادرات النامية مقارنة بمعاملة السيطرة والى نمو جيد وواضح بينما لم تؤثر بكتريا *R. leguminosarum* على نمو بادرات نبات البازلاء بصورة قد تكون مقاربة لمعاملة السيطرة وكما موضح في الصور (1) و (2)

الصورة (1)
توضح الفرق بين معاملة السيطرة ومعاملة البكتريا لنبات الباقلاء .

الصور (2)
توضح الفرق بين معاملة السيطرة ومعاملة البكتريا لنبات البازلاء

وهذا قد يعود الى ان بكتريا *R. leguminosarum* اصبحت فعالة في تكوين العقد الجذرية التي تزيد من مساحة امتصاص الجذور وكذلك تثبيت النتروجين الجوي ، بينما لم تكوّن عقد جذرية في نبات البازلاء لكون هذه البكتريا متخصصة [6] .

3. تاثير الفطريات *A. alternata* و *F. solani* على نمو بادرت نباتي الباقلاء والبازلاء :

ادى تلقيح بذور نبات الباقلاء بالفطر *F.solani* الى موت بادراتها بالكامل (الصورة3). كما اثر الفطر على بادرات البازلاء اذ سبب اختزالاً كبيراً في عدد البادرات (الصورة 4).

الصورة (3)
توضح موت بذور نبات الباقلاء بالكامل نتيجة لتلقيحها بالفطر *Fusarium solani*

الصور (4)
توضح تاثير فطر *Fusarium solani* على نمو بذور نبات البازلاء

اذ يعد الفطر *F.solani* من الفطريات المسببة لتعفن البذور seed born fungi [14] ، فقد سجل الفطر كمسبب لتعفن جذور نبات الباقلاء وذبول بادراتها [15]، كما انه يسبب اختزال في عدد بادرات نباتات الحنطة والشعير والسلجم [16] ، وهذا قد يعود الى قدرة الفطر على افراز سموم فطرية مثل B1 و G1 والتي تؤدي الى تثبيط نمو بعض النباتات حسب طبيعة النبات نفسه كما له القدرة على احداث تغيرات سريعة في المواد الاساسية في التربة[8]. اما بالنسبة للفطر *A. alternata* فقد اعطى نمواً جيداً لبادرات نبات الباقلاء (صورة 5) كما اعطى عدد اكبر من البادرات لنبات البازلاء مقارنة بباقي المعاملات (صورة 6) .الا انه في مراحل متقدمة من النمو بدأت تظهر اعراض المرض على نبات الباقلاء نتيجة للاصابة بالفطر *A. alternata* اذ يسبب هذا الفطر مرض تبقع الاوراق الالترناري على نبات الباقلاء [17]

الصورة (5)

توضح تاثير فطر *A. alternata* على نمو نبات الباقلاء

الصور (6)

توضح مقارنة بين معاملة السيطرة على اليمين ومعاملة فطر *A. alternata* على

وقد ادى نمو *A. alternata* مع *F. solani* الى نمو جيد مع اختزال في اعداد البادرات لنبات الباقلاء الصورة (7)

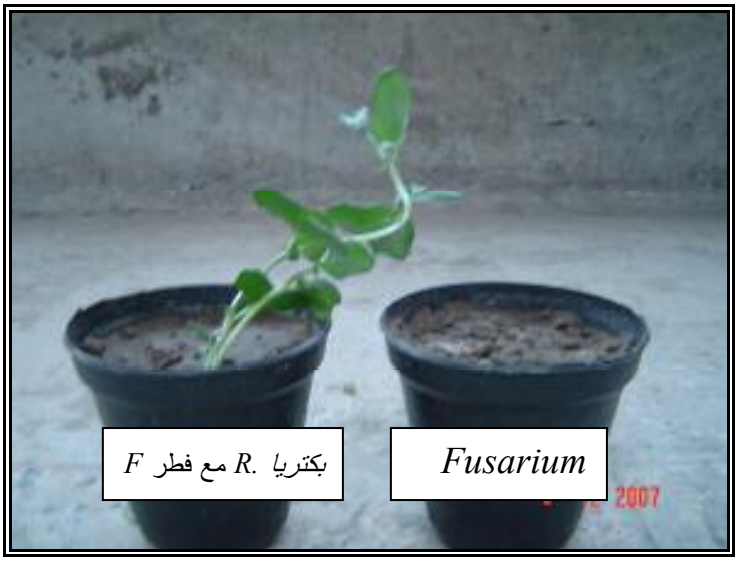
الصورة (7)

توضح تاثير تلقيح بذور نبات الباقلاء بفطري *A. alternata* و*Fusarium solani*

4. تاثير تداخل بكتريا *R. leguminosarum* مع كل من فطري *A. alternata* و *Fusarium sp.* على نمو بادرات نباتي الباقلاء والبازلاء :

ادى تلقيح بذور الباقلاء ببكتريا *R. leguminosarum* مع فطر *F. solani* الى تقليل تاثير الفطر اذ نمت البادرات بصورة جيدة صورة (8) . كما ادى تلقيح بذور البازلاء ببكتريا *R. leguminosarum* مع فطر *F. solani* الى زيادة عدد البادرات صورة 10 وهذا قد يعود الى قابلية البكتريا على تثبيط نمو الفطر مما ادى الى نمو البادرات بدون تأثير الفطر الممرض حيث تشير البحوث الى ان البكتريا *R. leguminosarum* عملت على

اختزال نمو العديد من الفطريات بنسبة كبيرة [18] ، واشار [19] ان جرثـــومـــــــــــة *R.legminosaruim* تفرز مضادات حيوية لها القدرة على تحليل هايفات الفطريات ، كمـــا ذكر [20] من ان بكتريا *R.legminosaruim* لها القدرة على تثبيط نمو العديد من الفطريات عن طريق افراز مواد طيارة من ظمنها غاز الـــ Cyanide السام ، حيـــث تمتلـــك بكتريـــا *R.legminosaruim* عدة اليات تمكنها من السيطرة على الممرضات والتي تتضمن المنافسة على الحديد والمغذيات الاخرى وافراز المضادات . ان سبب تثبيط نمو الفطريات يعود الـــى افراز المواد الايضية في الوسط الغذائي والتي قد تتضمن مضادات حيوية وانزيمات محللـــة للجدار الخلوي .



الصورة (8)

توضح تاثير تلقيح بذور نبات الباقلاء مع ببكتريا *R. leguminosarum* مع فطر *Fusarium solani* مقارنة مع تلقيح البذور بفطر *Fusarium solani* فقط

كذلك وجـــد ان تلقـــيح بـــذور البـــاقلاء بفطـــر *A. alternata.* مـــع بكتريـــا *R leguminosarum* أدى الى موت بادرات الباقلاء بصورة كاملة الصورة (9)، في حين قللت بكتريا *R. leguminosarum* من عدد بادرات نبات البازلاء عند تلقيحهـــا مـــع فطـــر *A. alternata* صورة (10)

الصورة (9)
على اليمين توضح موت بذور نبات الباقلاء عند تلقيحها ببكتريا *R leguminosarum* مع فطر *A. alternata*.

الصور (10)
على اليسار توضح تاثير بكتريا *R. leguminosarum* عند تلقيحها مع فطر *A. alternata* على نمو بذور نبات البازلاء

تشير نتائج هذا البحث تدل الى ان بكتريا *R. leguminosarum* تكون متخصصة على نبات الباقلاء الذي عزلت منه وان لها القدرة على التفاعل مع كائنات اخرى مسببة للامراض مثل الفطريات و تقليل تاثيرها على النبات العائل ، كما ان لبعض الفطريات القدرة على توفير مواد اولية لنمو النبات في مراحل معينة من النمو [21].

المصادر :

(1) الراشدي ، راضي كاضم وتاج الدين ، السيد منذر (1988). احياء التربة المجهرية . دار الحكمة للطباعة والنشر . جامعة البصرة العراق .

(2) Roland , M.A. and Alfred, E.B.(1995). Laboratory Manual of experimental microbiology , Moby-year book, Inc., U.S.A.

(3) Cakmakci, M.L. (1987). Biyolojik azot tespiti ve ekoloji; arastrima yontemlrri. TUBITAK TURK TARIM OrmancilicArastirma Grubu . Tarimsal MiKrobioloji. YAy. No:2 Ankara

(4) " Soil Improvement with Legumes " Available : http://www.gov.sk.ca/agfood

(5) Brockwell, J.;P.JBottomley and J.E. thies.(1995). Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility : Acritical assessment plant soil :174: 143-180.

(6) Vincent, J. The genus *Rhizobium* in : starr , M.P.; Stolp,H.;Truper, H.G.;Balows, A. And Schilegel, H.G.(eds).(1981)."The Prokaryotes "Vol.1, Springer-Verlang,U.S.a Pp. 818-837.

(7) العنزي، غيداء صلاح(2004).دراسات امراضية وسمية الفطر *Alternaria alternata* على نبات الباقلاء *Vicia faba* . رسالة ماجستير،جامعة الموصل، العراق

(8) Clarck , F.E. (1979). Agar plate method for total microbial count in method in soil analysis. Amer.Soc.Agron.Pp.(1460-14660, Madison, Wisconsin., U.S.A.

(9) Moubasher , A.H.(1993)Soil Fungi in Qatar and Other Arab Countries. The Scientific And Applied research Center, University of Qatar .

(10) Pitt, J.T. and Hocking , A.D.(1997). Fungi And Food Spoilage . Academic press London. 405Pp.

(11) Mustafa, T.P.and Chattopadhyay,S.B. (1981). Fungicidal control of some soil inhibiting pathogens . Pesticides. 15: 29-31.

(12) Saydam, C.;Copeu,M. and Segin ,E. (1973).Studies on inoculation techniques of cotton with caused by *Verticillium dahliae* Kelb.1-Investigation on the laboratory inocukation techniques .J.TUr.Phytopathol. 2:69-75.

(13) Albayrak, S.;Serimay, C.S. and Tongenl, O.(2006). Effect of Inoculation with Rhizobium on seed yield and yield component of common vetch (*Vicia Sativa* L.)Turk J.Agric. 31-37

(14) Brazauskiene, I. (1998). Fungal diseases of Faba bean and the efficiency of fungicides . Zemdirbyste, Mokslo_darbai, No.62. 166-174.

(15) Akem , C. and Bellar , M.(1999). Survy of Faba bean *Vicia faba* diseases in the main faba bean _growing regions of Syria .Arab J. of plant Protection .!7 (2) : 113-116.

(16) Hasan , H.A.(1999). Phytotoxicity of pathogenic fungi and their mycotoxins to cereal seedling viability . Mycopathology . 148(3): 149-155.

(17) فرحان ، محمد عبد الله (1981) . دراسة مرض تبقع الاوراق والقرون الاســكوكايتي على الباقلاء في محافظة نينوى مع اشارة خاصة لاهمية البذور السليمة في المقاومــة ، رسالة ماجستير ، جامعة الموصل

(18) Sharif , T.; Khalil , S.and Ahmad,S.(2003). Effect of *Rhizobium sp.*on growth of pathogenic fungi under in vitro conditions. Pakistan Journal of biological Sciences 6(18):1597-1599.

(19) Malajezuk , N.(1983). Microbial antagonism to phytopathora Amer. Phytopha. Soc.st.Paul, Minnesota, U.S.A.

(20) Arfaoui , A.;Sifi, B.; Boudabous, A.; Elhadrami , I. and Cherif, M.(2006). Identification of *Rhizobium isolates Possessing antagonistic activity against Fusarium oxysporum F.S.P. ciceris,* the causal agent of *fusarium* wilt of chickpea. Journal of plant pathology , 88(1), 67-75

(21) Frey, S.M. and Urban, J.E.(1986). Stimulation of nodulation in Clover *Rhizobium trifolii* O403 system by Penicillium and mecillium . plant physiol. 81, 326-328.