دراسات جزيئية ومرضية على مرض الذبول البكتيرى المتسبب عن بكتريا (رالستونيا سولاناسيرم) فى محصولى البطاطس والطماطم

رسالة مقدمة من:

سامح عبدالكريم شعبان عبدالكريم

بكالوريوس العلوم الزراعية (أمراض نبات)- كلية الزراعة- جامعة الفيوم 2008

ماجستير العلوم الزراعية (أمراض نبات) - كلية الزراعة - جامعة الفيوم 2013

للحصول على درجة دكتوراه الفلسفة في العلوم الزراعية

(أمراض نبات)

قســـم النبات الزراعى

كلية الزراعة

جامعة الفيوم

2019

الملخص العربى

تعتبر الطماطم والبطاطس من أهم محاصيل الخضر الاقتصادية والتي تصاب بالعديد من الأمراض الكامنة فى التربة ويعتبر مرض الذبول البكتيرى المتسبب عن البكتريا رالستونيا سولاناسيرم أحد أهم وأخطر تلك الأمراض والتى تهدد زراعة محصولى الطماطم والبطاطس على مستوى العالم. وقد اجريت هذه الدراسة بغرض تحديد درجة الإصابة بمرض الذبول البكتيرى على الطماطم والبطاطس فى جمهورية مصر العربية وكذ عزل وتعريف المسبب المرضى ودراسة المدى العوائلى ودراسة قابلية بعض الأصناف من الطماطم والبطاطس للإصابة بالبكتريا المعزولة ووضع استراتيجية لمكافحة هذا المرض .

وفى هذا المجال تم دراسة التأثير لبعض معاملات ماقبل وبعد الزراعة لتقليل أو منع الإصابة بالمرض مثل استخدام الكائنات الحية المضادة والمعزولة من منطقة المجال الجذرى لنباتات الطماطم والبطاطس. كذلك البكتريوسين المنتج من سلالات بكتريا حامض اللاكتيك وبعض الزيوت النباتية والشيتوزان وبعض المستحثات الكيميائية كبدائل للمبيدات. ويمكن تلخيص النقاط البحثية والنتائج المتحصل عليها على **النحو التالى:**

- تم حصر سبعة عشر محافظة من محافظات مصر ثمانية بصعيد مصر وهى الجيزة- الفيوم- بنى سويف- المنيا- أسيوط- سوهاج- قنا- الأقصر وتسع محافظات بالوجه البحرى وهى القليوبية- المنوفية- الغربية- الدقهلية- الشرقية- السويس- كفرالشيخ- الإسماعيلية والبحيرة. تم الحصر على الأقل فى ثلاثة مراكز من كل محافظة وفى كل مركز ثلاثة الى خمسة قرى وفى كل قرية ثلاثة الى خمسة حقول. وبحصر حدوث المرض فى صورة نسبة وشدة الإصابة بالمرض فى حقول قرى ومراكز محافظات جمهورية مصر العربية خلال موسم النمو 2015/2014 أظهرت النتائج أن معظم الحقول بها إصابة بمرض الذبول البكتيرى بدرجات متفاوتة.
- كان متوسط نسبة وشدة الإصابة بالذبول البكتيرى فى محافظات الوجه القبلى على محصول الطماطم 9.88, 3.01 على التوالى. أما على محصول البطاطس فكانت 11.30, 4.12 % على التوالى. أما فى محافظات الوجه البحرى فكان متوسط نسبة وشدة الإصابة على الطماطم 12.30, 4,00 % على التوالى ، 18.52, 5.75 % على البطاطس.
- سجل أعلى متوسط نسبة وشدة إصابة بالذبول البكتيرى لمحصول الطماطم فى محافظات الوجه القبلى في محافظة الأقصرحيث كان متوسط نسبة وشدة الإصابة 10.29, 3.44% على التوالى، تبعت بمحافظة أسيوط 10.21, 3.17%، ثم محافظة المنيا 10.10 , 3.13% على التوالى ، أما اقل متوسط نسبة وشدة إصابة فسجلت فى محافظة الجيزة تبعت بمحافظة سوهاج ثم الفيوم. أما محافظات الوجه البحرى فسجلت أعلى نسبة إصابة بالذبول البكتيرى على الطماطم فى محافظة البحيرة حيث كان متوسط نسبة وشدة الإصابة 15.28 , 5.70% على التوالى، تبعت بمحافظة الدقهلية ثم الغربية ثم كفر الشيخ.
- على محصول البطاطس سجل اعلى متوسط نسبة وشدة إصابة بمرض الذبول البكتيرى فى محافظات الوجه القبلى سجلت فى محافظة المنيا حيث كان 12.12, 4.42% على التوالى، تبعت بمحافظة بنى سويف ثم الجيزة، وأقلها سجلت فى محافظة سوهاج ثم الفيوم على التوالى. أما فى محافظات الوجه البحرى سجل أعلى متوسط نسبة وشدة إصابة بالذبول البكتيرى بمحافظة البحيرة (23.20, 7.68% على التوالى، ثم الإسماعيلية ثم القليوبية والغربية.

- وبوجه عام كان متوسط حدوث الإصابة بمرض الذبول البكتيرى على محصولى الطماطم والبطاطس أعلى فى محافظات الوجه البحرى من محافظات الوجه القبلى، وكان المرض أكثر انتشارا على محصول البطاطس أكثر من محصول الطماطم فى كلا الوجهين القبلى والبحرى.
- تم الحصول على عدد 2356 عزلة بكتيرية من كافة الأماكن التى تم حصرها.
- تم إجراء إختبار القدرة المرضية لجميع العزلات البكتيرية المتحصل عليها، وتمت العدوى الصناعيةعلى مرحلتين: فى المرحلة الأولى : تم إجراء إختبار تمهيدى للقدرة المرضية بكل العزلات البكتيرية (2356 عزلة بكتيرية) و تبين من هذه المرحلة قدرة جميع العزلات البكتيرية على إحداث الإصابة بالمرض. فى المرحلة الثانية من إختبارات القدرة المرضية تم إختيار 614عزلة بكتيرية طبقا لقدرتها المرضية والموقع الجغرافى ومصدر العزل (العائل).
- تم إجراء العديد من الإختبارات المورفولوجية والفسيولوجية والبيوكيمائية والجزيئية لتحديد هوية وتعريف العزلات البكتيرية (150 عزلة) التى تم إختيارها من نتائج المرحلة الثانية من إختبار المرضية (150عزلة بكتيرية). أسفرت نتائج هذه الإختبارات عن وجود تشابة كبير فى الصفات المورفولوجية والفسيولولجية والبيوكيمائية لهذه العزلات البكتيرية. تم تأكيد التعريف باستخدام تقنية PCR وباستخدام بريمرات متخصصة لتعريف البكتريا رالستونيا سولاناسيرم. أظهرت النتائج أن العزلات جميعها تنتمى الى بكتريا *Ralstonia solanacearum*.
- أيضا تم استخدام تقنية PCR لتأكيد إصابة نباتات الطماطم والبطاطس بمرض الذبول البكتيرى طبيعيا فى الحقل. تم أيضا من هذه الإختبارات تحديد نوعية biovar لكل السلالات التى تم تعريفها بالفقرة السابقة (150) عن طريق اختبار قدرة هذه السلالات على أكسدة بعض السكريات الثنائية مثل المالتوز واللاكتوز والسيلوبيوز والسكروز والجلوكوز وكذلك بعض الكحولات السكرية مثل المانيتول والسوربيتول والدلسيتول ووجد أن بعض هذه العزلات تنتمى الى **biovar (V ،IV ،III ،II ،I)**
- تم إختبار المدى العوائلى بأشرس السلالات البكتيرية الممرضة (10 سلالات) وهى

(R137, R436, R488, R610,R 766, R859, R2033, R2231, R2352) وذلك على نباتات الباذنجان (صنف مروة) والفلفل (صنف المدينة) ونبات الجيرانيوم (صنف بلدى) و أظهرت النتائج قدرة هذه السلالات على إحداث الإصابة بالمرض لكل العوائل وأن هناك تفاوت بين شدة الإصابة على هذه العوائل النباتية.

- تم اختبار قابلية الإصابة لعدد20 صنف من الطماطم (لوجين- مروة- ندا- إليسا- نيما- مارماند- سوبرمارماند- بيتو- بيتو 068- الباشا- نيروز- كريستال بالاس- جولدستون- 737- 765- 168- 935- سوبر سترين بى- جى إس) و25 صنف من البطاطس وهم (كارا- كنزا- كروز- فلورا- سيلينا- بيلينى- بنلور- بمبا- امارين- موندیال- بيكاسو- اريزونا- برن- دايمونت- دنيا- دراجا- مارجريتا- نيكولا- جيلاتيكا- سينورا- سانتانا- فيفالدى- إليكترا- سبونتا- إلموندو). اظهرت النتائج ان كل أصناف الطماطم والبطاطس المختبرة أصيبت بدرجات متفاوتة، وجد أن صنف الطماطم سوبر سترين بى أكثر الأصناف حساسية للإصابة بمرض الذبول البكتيرى وكذلك صنف البطاطس سيلينا فى التربة المعقمة وغير المعقمة، بينما كان الصنف نيما والنيروز من أصناف الطماطم أكثرهم قدرة على تحمل الإصابة، أما فى البطاطس فكان صنفى نيكولا وبيكاسو أكثر أصناف البطاطس قدرة على تحمل الإصابة.

- تم الحصول على عدد 371 عزلة فطرية (201 عزلة من الطماطم)، (170 عزلة من البطاطس) ، عدد 568 عزلة بكتيرية (309 عزلة من الطماطم، 259 عزلة من البطاطس) وكذلك تم الحصول على عدد 302 عزلة من الأكتينومايستات (161 عزلة من الطماطم، 141 عزلة من البطاطس) من أماكن الحصر المختلفة.
- تم إختبار قدرة تلك العزلات معمليا على تضاد وتثبيط نمو السلالات العشرة الأكثر مرضية البكتيرية الممرضة وتم إختيار افضل العزلات المضادة من الفطريات و البكتريا والاكتينوميستات والتى أظهرت أعلى قدرة تثبيطية لنمو السلالات البكترية الممرضة ، وكان عددهم 12 عزلة فطرية، 10 عزلات بكتيرية، 7 عزلات من الأكتينومايستس.
- تم تعريف العزلات المختلفة من الفطريات والبكتريا والاكتينومايستس بالمراكز المتخصصة المختلفة بمركز البحوث الزراعية بالجيزة، وكانت نتائج التعريف كالآتى:
- **بالنسبة للعزلات الفطرية وهى**

خمسة عزلات تنتمى للفطر الترايكوديرما *Trichoderma harzianum* برقم كودى (TH17, TH43, TH58, TH69, TH71) ، أربعة عزلات تنتمى للنوع *T. viride* برقم كودى (TV77, TV89, TV105, TV113)، ثلاثة عزلات تنتمى الى *T. koningii* برقم كودى (TK121, TK135- TK141)

- **بالنسبة للعزلات البكتيرية وهى**

أربعة عزلات عرفت على أنها *Bacillus subtilis* برقم كودى (B9, B23, B45 and B103) ، ستة عزلات عرفت على أنها *Pseudomonas fluorescens* برقم كودى (Pf13, Pf 47, Pf 83, Pf 98, Pf 107 and Pf 118).

- **الأكتينومايسيتس (7 عزلات)** وعرفت عزلات الأكتينومايستس على أنها تنتمى للجنس Streptomyces بأنواع مختلفة (St14) *S. fumigatisclerotis* ، (St19) *S.rochei*، (St27) *S. avermitilis*، (St33) *griseus* . (St38) *S. griseviridis* ، (St40) *S. violaceusniger* ، (St41) *Streptomyces spp*.

تم إختبار قدرة البكتريوسين المنتج من خمسة سلالات بكتريا حامض اللاكتيك (عدد 5 سلالات وهم: *Lactobacillus rhamnosus* (Lab 100)، *Lactobacillus casei* (Lab102)، *Lactobacillus paracasei* (Lab58) ، *Lactobacillus paracasei* (Lab107)، *Lactobacillus sp* (Lab105)

- تم إختبار البكتيريوسين المنتج من هذه السلالات على تثبيط نمو أشرس السلالات البكتيرية الممرضة سالفة الذكر (10 سلالات) و أسفرت النتائج عن قدرة كل البكتريوسين المنتج من سلالات بكتريا حامض اللاكتيك على تثبيط نمو العشرة سلالات الممرضة ولكن بدرجات متفاوتة , سجلت العزلة Lab100 أعلى قدرة تثبيطية (21.08mm) بينما سجلت العزلة Lab105 أقل قدرة تثبيطية.(20.33 mm)
- تم اختبار عدد 5 أنواع مختلفة من الزيوت النباتية وهى الزعتر والكافور والقرنفل والقرفة والثوم بثلاث تركيزات وهي 1.5 و3 و4.5 % على تثبيط نمو السلالات البكتيرية العشرة الأكثر مرضية و اظهرت النتائج أن جميع الزيوت المختبرة لها قدرة تثبيطية على نمو السلالات البكتيرية العشرة الأكثر مرضية، وأظهر زيت القرنفل أعلى

قدرة تثبيطية تجاه العزلات حيث سجل تلاه زيت القرفة بينما سجل زيت الثوم أقل قدرة تثبيطية لنمو السلالات البكتيرية الممرضة.

- تم اختبار ثلاثة تركيزات مختلفة من الشيتوزان (1.5 و3 و4.5 %)، على قدرتهم التثبيطية على السلالات البكتيرية العشرة الأكثر و أظهرت النتائج أن هناك تأثير تثبيطى من مركب الشيتوزان بتركيزاته المختلفة مقارنة بالكنترول ،ووجد أنه كلما زاد التركيز زادت القدرة التثبيطية، سجل تركيز 4.5 % أعلى قدرة تثبيطية .
- تم اختبار 5 مركبات مقاومة مستحثة وهم: بوتاسيوم سوربات – كبريتات النحاس- حامض الأسكوربيك- حامض الساليسيلك وحامض البنزويك بثلاثة تركيزات 5- 10- 15 ملليمول، لاختبار قدرتهم التثبيطية على السلالات البكتيرية العشرة الأكثر مرضية. و أوضحت النتائج أن جميع مركبات المقاومة المستحثة الكيماوية بتركيزاتهم المختلفة لها تأثير تثبيطى على السلالات البكتيرية العشرة الأكثر مرضية مقارنة بالكنترول، ووجد أنه كلما زاد التركيز زادت القدرة التثبيطية.
- سجل حامض الساليسيلك من بين هذه المركبات أعلى قدرة تثبيطية تبع بحامض الأسكوربيك ثم كبريتات النحاس بينما سجل حامض البنزويك وسوربات البوتاسيوم أقل قدرة تثبيطية على نمو السلالات البكتيرية المختبرة.
- تم اختيار عزلتين من فطر *Trichoderma harzianum* (TH58&TH69) وعزلة من بكتريا *Bacillus subtilis* وهى (B103)وعزلة من بكتريا *Pseudomonas fluorescens* وهى(Pf118) و عزلتين من الأكتينومايستس وهما *Streptomyces griseus* (St33) &*Streptomyces fumigatisclerotis* (St14)
- ثلاثة أنواع من البكتريوسين المنتج السلالات (Lab100, Lab 102, Lab58) من سلالات بكتريا حامض اللاكتيك.
- تم اختيارتركيز (4.5%) من كل الزيوت النباتية السابقة وكذلك مركب الشيتوزان وتركيزى (10- 15 mM) من مركبات المقاومة المستحثة لدراسة تأثيرهم على مكافحة المرض تحت ظروف العدوى الصناعية بالصوبة.
- أدى استخدام الكائنات الحية المضادة المعزولة من المجال الجذرى (فطر- بكتريا- أكتينوميستس) لنباتات الطماطم والبطاطس الى خفض وتقليل نسبة وشدة الإصابة بمرض الذبول البكتيرى على محصولى الطماطم والبطاطس تحت ظروف العدوى الصناعية، وكانت عزلات كلا من الفطر *Trichoderma harzianum* (TH69), وعزلة البكتريا *Bacillus subtilis* (B103) وعزلة استريبتوميسس *Streptomyces gresiuss* (St33) الأكثر قدرة على خفض نسبة وشدة الإصابة على الطماطم . على البطاطس سجلت العزلات*Trichoderma harzianum* (TH69),وعزلة البكتريا(B103) *Bacillus subtilis* وعزلة استريبتوميسس *Streptomyces fumigatisclerotis* (St14) أعلى قدرة تثبيطية للمرض.
- تم استخدام البكتيريوسين المنتج من سلالات بكتريا حامض اللاكتيك Lab58- Lab100- Lab102 وهم الأكثر تثبيطا للسلالات البكتيرية العشرة الأكثر مرضية. أظهرت النتائج أن جميع البكتيريوسين أدى الى خفض نسبة وشدة الإصابة بمرض الذبول البكتيرى تحت ظروف العدوى الصناعية فى التوقيتات المختلفة . كانت أعلى قدرة تثبيطية للمرض من خلال البكتيريوسين المنتج من السلالة Lab 100 .

- تم استخدام تركيز 4.5% من زيوت (القرنفل- القرفة- الكافور- الزعتر –الثوم) لاختبار قدرتها فى مكافحة مرض الذبول البكتيرى تحت ظروف العدوى الصناعية. سجل زيت القرنفل أعلى قدرة على خفض نسبة الإصابة على الطماطم و البطاطس مقارنة بالكنترول.
- تم استخدام مركب الشيتوزان بتركيز 4.5% لمكافحة مرض الذبول البكتيرى تحت ظروف العدوى الصناعية كمعاملات لشتلات الطماطم ودرنات البطاطس قبل الزراعة أو حقن التربة بعد الزراعة وكذلك الاثنين معا. أظهرت النتائج أن للشيتوزان تأثيرا معنويا على خفض نسبة وشدة الإصابة بمرض الذبول البكتيرى.
- تم استخدام تركيزى 10، 15 ملليمول من مركبات سوربات البوتاسيوم- كبريتات النحاس- حامض الساليسلك- حامض الأسكوربيك- حامض البنزويك كمعاملات للشتلات والدرنات أو معاملات تربة، وذلك لاختبار قدرتها على كبح أو تثبيط مرض الذبول البكتيرى تحت ظروف العدوى الصناعية. أظهرت النتائج وجود تأثير معنوى لجميع هذه المركبات بالتركيزين على خفض نسبة وشدة الإصابة بالمرض.
- تم دراسة تأثير استخدام عزلتى فطر *Trichoderma harzianum* (TH58- TH69) معا كخليط أو خلطهما مع البكتيريوسين , الزيوت النباتية , الشيتوزان , مركبات المقاومة المستحثة على مكافحة المرض. أظهرت النتائج وجود تأثيرات معنوية لكل هذه المعاملات، وسجلت معاملة خلط عزلتى الترايكودرما مع زيت الزعتر أعلى قدرة على خفض حدوث المرض تلاه خلط عزلتى الفطر مع الشيتوزان 4.5%. سجلت معاملة خلط عزلتى الفطر مع حامض البنزويك (15ملليمول) أقل قدرة تثبيطية للمرض.
- تم دراسة تأثير استخدام عزلتى بكتريا *Bacillus subtilis* (B103)وعزلة *Pseudomonas fluorescens* (Pf118) معا كخليط أو خلطهما مع البكتيريوسين أو خلطهما مع الزيوت النباتية أو مع الشيتوزان أو مع مركبات المقاومة المستحثة. أظهرت النتائج وجود تأثيرات معنوية لكل المعاملات فى خفض حدوث المرض، وسجلت معاملة خلط عزلتى البكتريا مع الشيتوزان أعلى قدرة على خفض حدوث المرض تلاه خلط عزلتى البكتريا مع زيت الزعتر. سجلت معاملة خلط عزلتى البكتريا سالفة الذكر مع البكتريوسين المنتج من السلالة Lab100 أقل قدرة على خفض حدوث المرض. وتبين أن لهذه المعاملات تأثير طفيف على خفض حدوث المرض مقارنة بباقى المعاملات الأخرى.
- تم دراسة تأثير استخدام عزلتى استريبتوميسس (St14) *Streptomyces fumigatisclerotis&* (St33) *Streptomyces griseus* معا كخليط أو خلطهما مع البكتيريوسين أو مع الزيوت النباتية , الشيتوزان , مركبات المقاومة المستحثة على مكافحة المرض. أظهرت النتائج وجود تأثيرات معنوية لكل المعاملات، وسجلت معاملة خلط عزلتى الأكتينومايستس معا أعلى قدرة على خفض حدوث المرض تلاه خلط العزلتين مع الشيتوزان ، سجلت معاملة خلط عزلتى الأكتينومايستس مع حامض البنزويك (10ملليمول) أقل قدرة على خفض حدوث المرض.
- تم دراسة تأثير استخدام البكتيريوسن المنتج من سلالات مختلفة من بكتريا حامض اللاكتيك معا كخليط أو خلطهما مع الزيوت النباتية أو مع الشيتوزان أو مع مركبات المقاومة المستحثة. أظهرت النتائج وجود تأثيرات معنوية لكل المعاملات، وسجلت معاملة خلط البكتريوسين معا ومع الشيتوزان أعلى قدرة على خفض حدوث المرض تلاه خلط

البكتيريوسين معا بدون خلطه مع المعاملات الاخرى.سجلت معاملة خلط البكتيريوسين مع سوربات البوتاسيوم (15 ملليمول) وكذلك مع كبريتات النحاس (10ملليمول) أقل قدرة على خفض حدوث المرض.

- بوجه عام سجلت كل المعاملات المختبرة إنخفاضا معنويا فى نسبة وشدة الإصابة بمرض الذبول البكتيرى فى الطماطم والبطاطس مقارنة بالكنترول. وسجل توقيت معاملات قبل وبعد الزراعة أفضل النتائج وتبعت بتوقيت قبل الزراعة ثم توقيت بعد الزراعة.