عزل وتعريف البكتيريا المسببة لمرض ذبول الطماطم/البندورة وتحديد طرزه الحيوية في البيوت المحمية

رقيب عاكف العاني، رجاء غازي عبد المحسن و كامل سلمان جبر
قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، أبو غريب، بغداد، العراق

الملخص

العاني، رقيب عاكف، رجاء غازي عبد المحسن وكامل سلمان جبر. 2004. عزل وتعريف البكتيريا المسببة لمرض ذبول الطماطم/البندورة وتحديد طرزه الحيوية في البيوت المحمية. مجلة وقاية النبات العربية. 22: 53-58.

هدفت هذه الدراسة إلى عزل وتحديد البكتريا المسببة لمرض الذبول على الطماطم/البندورة *Lycopersicon esculentum Mill.* في البيوت المحمية. تم الحصول على ثلاث عزلات من البكتريا R_1 ، R_2 و R_3 من جذور وسوق نباتات مصابة جمعت من حقول في محافظات بغداد، النجف وكربلاء. ظهرت مستعمرات البكتريا الممرضة بلون أبيض ومركز وردي على مستنبت كلوريد التترازوليوم والآجار (TZCA). وأوضحت نتائج اختبار فرط الحساسية والقدرة الإمراضية أن كل العزلات قادرة على إحداث المرض على النباتات. حدد جنس البكتريا *Ralstonia* من خلال دراسة الصفات المظهرية للمستعمرات النامية على مستنبتي مرق مغذي- آجار (NA) ومستخلص بطاطا - دكستروز - آجار (PDA)، وعلى شكل الخلايا تحت المجهر الضوئي، وحركتها وقابليتها للنمو على الوسط الإنتخابي كنكز (KB)، وقدرتها على إنتاج الإنزيمين oxidase و catalase، وقدرتها على إنتاج حامض، وشخص النوع *Solanacearum* إعتماداً على الصفات البيوكيميائية: القدرة على اختزال النترات، إنتاج H_2S، إنتاج الأمونيا من البيتون، وقابليتها على تمثيل بعض المواد الكاربوهيدراتية. وأشارت نتائج قدرة العزلات على استخدام بعض السكريات الثنائية والكحولات السداسية كمصدر وحيد للكربون إلى أن العزلة R_2 قد تعود للطراز الحيوي 3 في حين يمكن أن تعود العزلتين R_1 و R_3 إلى الطراز الحيوي 5.

كلمات مفتاحية: البيوت المحمية، الطماطم/البندورة، الطرز الحيوية، *Ralstonia solanacearum*.

المقدمة

يعد مرض الذبول البكتيري الجنوبي من بين أهم الأمراض التي تصيب الفصيلة الباذنجانية في المناطق الإستوائية وشبه الإستوائية وفي الزراعات المحمية (2، 8، 24).

وللبكتيريا *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi. المسبب للمرض مدى واسع من العوائل النباتية، إذ تصيب فضلا عن نباتات الفصيلة الباذنجانية كل من الموز ونباتات الأدغال، وتسبب خسائر إقتصادية مهمة لهذه المحاصيل (14، 18، 23). وتأتي في المرتبة الأولى من حيث الأهمية الاقتصادية بين الأحياء التي تقطن التربة وتهاجم نباتات الفصيلة الباذنجانية (10). أوضحت الدراسات التصنيفية أن للبكتيريا *R. solanacearum* العديد من السلالات التي يمكن التمييز بينها تبعا للصفات المصلية والقدرة الامراضية وكذلك مقدرتها على إحداث فرط الحساسية (Hypersensitive reaction) لأوراق صنف التبغ (L.) *Nicotiana tabacum xanthi*. وقد قسم Buddenhagen وآخرون (4) هذا النوع إلى ثلاثة سلالات هي: R_1 ولها القدرة على إصابة نباتات التبغ والطماطم/البندورة والبطاطا/البطاطس، R_2 ولها القدرة على إصابة الموز فقط و R_3 ولها القدرة على إصابة نباتات الطماطم/ البندورة والبطاطا/البطاطس فقط. وقسم Palleron و Daudoroff (27) هذه البكتريا إلى أربعة طرز حيوية (Biotype) إعتماداً على الصفات المظهرية وتكوين الـ DNA. وقسم Hayward (11) النوع *Solanacearum* إلى خمسة طرز حيوية تختلف عن بعضها في قدرتها على استغلال ثلاث سكريات ثنائية هي: Cellobiose، Lactose و Maltose وثلاثة كحولات سداسية هي: Sorbitol، Mannitol و Dulcitol وخمسة سلالات اعتماداً على المدى العائلي.

ونظراً لانتشار المرض بشكل وبائي في الآونة الأخيرة على الطماطم/البندورة في الزراعة المحمية في العراق فقد هدفت هذه الدراسة إلى تحديد البكتريا المسببة للمرض وطرزها الحيوية وكذلك اختبار قدرتها الامراضية على الطماطم/البندورة.

مواد البحث وطرائقه

1. عزل البكتريا

أخذت عينات من نباتات طماطم/بندورة أظهرت أعراض مثالية للذبول الجرثومي من أعراض ظاهرية وتلون أوعيتها الناقلة، جمعت خلال الموسم الزراعي 1999/1998 من البيوت المحمية في محافظات بغداد، ديالى، كربلاء والنجف. غسلت النباتات جيداً بماء الصنبور لإزالة الأتربة، وقطعت سوقها إلى قطع صغيرة بطول 0.5-1.0 سم، ثم عقمت سطحياً بغمرها في محلول هيبوكلوريت الصوديوم 1% لمدة دقيقة واحدة ومن ثم غسلت بالماء المقطر المعقم. سحق جزء من القطع في قطرة ماء مقطر معقم على شريحة زجاجية وفحصت تحت المجهر الضوئي. وسحق الجزء الآخر في بضع قطرات من الماء المقطر المعقم في طبق بتري معقم واخذ جزء من المعلق الناتج بواسطة ابرة التلقيح ذات العقدة ولقحت به أطباق بتري تحتوي على Nutrient Agar (NA) (شركة Fluka السويسرية) و Potato Dextrose Agar (PDA)، ثم حضنت عند درجة حرارة

30±1 س مدة 72 ساعة (16). انتخبت مستعمرات فردية ثم أعيدت زراعتها بالطريقة ذاتها للتأكد من نقاوة العزلة. نقلت المستعمرات الفردية إلى أنابيب اختبار تحوي 5 مل ماء مقطر وحفظت عند درجة حرارة 21±1 س.

2. الكشف عن العزلات الممرضة

الصفات المظهرية

لقح مستنبت كلوريد التترازوليوم - آجار Tetrazolium Chloride Agar (TZCA) بمعلق البكتريا بطريقة التخطيط في أطباق بتري بلاستيكية وحضنت المزارع عند درجة حرارة 30±1 س لمدة 48 ساعة. حضر الوسط بإذابة 5 غ جلوكوز، 10 غ ببتون، 1 غ Casein hydrolysate، 20 غ آجار في 1000 مل ماء مقطر، درجة حموضة 7.2. عقم الوسط بالأوتوكلاف تحت ضغط 15 باوند/بوصة ودرجة حرارة 121 س، ثم أضيف لكل 200 مل مقدار 1 مل تركيز 1% من مادة 2,3,5 Triphenyl tetrazolium chloride المعقم بالترشيح. نقلت المستعمرات الفردية التي تنطبق عليها خصائص المستعمرات الممرضة (20) إلى أنابيب اختبار يحوي كل منها 5 مل ماء مقطر معقم ثم حفظت في الثلاجة لحين الاستخدام.

اختبار فرط الحساسية على أوراق التبغ

زرعت بذور تبغ صنف *Nicotiana tabacum* xanthi L. في صناديق بلاستيكية تحتوي خليطاً من تربة مزيجية وبتموس (1:1) معقمة ببروميد المثيل. فردت النباتات في مرحلة 4 أوراق ونقلت إلى أصص بلاستيكية تحتوي خليطاً معقماً من ذات التربة. حقن اللقاح المعدي (10^8 وحدة تكوين مستعمرة/مل) في الأوراق باستخدام محقنة طبية دقيقة microsyringe وأبرة حجم 28. وضعت النباتات الملقحة في البيت الزجاجي مع المتابعة اليومية لحين ظهور الأعراض. حقنت أربعة أوراق لكل عزلة كما حقنت أربعة نباتات اخرى بالماء المقطر استخدمت كشاهد.

تحديد البكتريا الممرضة

تحديد الجنس - أعتمد في تحديد الجنس الخصائص المظهرية للمستعمرات على المستنبت المغذي Nutrient agar (NA)، (YDC) Yeast Extract Dextrose $CaCO_3$، Kings' B medium (KB) و Crystal violet-pectate medium (CVP) وذلك للتمييز بين جنسي Ralstonia و Erwinia. كما أستخدم المستنبت D-1 Agar للتمييز بين Ralstonia و Agrobacterium وذلك من حيث قابليتها على النمو في الظروف اللاهوائية، إضافة إلى شكل الخلايا تحت المجهر الضوئي (13، 19، 26، 29). كما درست الصفات البيوكيميائية وهي اختبار oxidase (7)، اختبار catalase (6)، واختبار حليب اللتموس (16).

تحديد النوع - حدد النوع عن طريق دراسة الخصائص البيوكيميائية التالية: إختزال النترات (5)، فحص الإندول (9)، غنتاج كبريتيد الهيدروجين (16)، إنتاج الأمونيا (9)، تحلل النشاء (16)، إضافة إلى القدرة على إستهلاك بعض المركبات الكاربوهيدراتية وإنتاج حامض أو حامض وغاز (3، 13، 29)، وكذلك التحلل المائي للأرجنين (32)، والتحلل المائي للجيلاتين (16).

تحديد السلالة - لتحقيق هذا الهدف درست الخصائص المصلية والمدى العائلي للعزلات.

أ. تحضير المصل المضاد: حضر مصل مضاد للعزلة البكتيرية R_1 عن طريق حقن أرنب نيوزيلاندي أبيض وزنه 3 كغ. حقن الأرنب خمسة حقنات في وريد الأذن بفاصل ثلاثة أيام بين الحقنة والأخرى، وأستخدم في كل حقنة على التوالي الكميات 0.5، 1.0، 1.5، 2.0، 2.5 مل من معلق البكتريا (10^8 وحدة تكوين مستعمرة /مل) النامية على الوسط المغذي (NA)، في محلول منظم فوسفاتي ملحي (PBS) (16، 28). جمع المصل بعد أسبوعين من الحقنة الأخيرة عن طريق الوريد الحافي للأذن اليمنى، واعتمد اختبار الانتشار المناعي المزدوج في وسط الآجار الصلب لإيجاد العلاقة المصلية بين العزلات.

ب. المدى العائلي: اعديت نباتات باذنجان، بطاطا/بطاطس، طماطم/بندورة، وفول سوداني بمعلق (10^8 وحدة تكوين مستعمرة/مل) من العزلات في أبط ثالث ورقة من الأعلى بوساطة محقنة طبية معقمة. اعديت أربعة نباتات لكل عزلة وكررت ثلاث مرات، وترك شاهد حقنت فيها النباتات بالماء المقطر المعقم.

تحديد الطرز الحيوية للعزلات - حددت الطرز الحيوية للعزلات بناء على قدرتها في استخدام ثلاثة سكريات ثنائية Lactose، Maltose، Cellobiose وثلاثة كحولات سداسية Mannitol، Sorbitol، Dulcitol (11).

اختبار القدرة الإمراضية للعزلات - استخدمت نباتات طماطم/بندورة بعد 30 يوما من نقلها إلى الأصص، كم أستخدم معلق من عزلات البكتريا *R.solanacearum* المنماة مدة 48 ساعة على الوسط المغذي كلوريد التترازوليوم والآجار (TZCA). حقن اللقاح المعدي (10^8 وحدة تكوين مستعمرة/مل) في أبط الورقة العلوية الثالثة بوساطة محقنة طبية معقمة. وضعت النباتات الملقحة في البيت الزجاجي عند 28-32 س وغطيت بأكياس نايلون مثقبة مدة 48 ساعة للمحافظة على الرطوبة. استخدمت خمسة نباتات لكل عزلة، إضافة إلى نباتات الشاهد التي حقنت بماء مقطر معقم. نفذت التجربة وفق تصميم القطاعات العشوائية الكاملة وبثلاث مكررات. سجلت النتائج بعد ثلاثة أيام باستخدام سلم التقييس التالي: صفر= نبات سليم، 1= ذبول ورقة واحدة من النبات الواحد، 2= ذبول 2-3 أوراق من النبات الواحد، 3= ذبول

جميع أوراق النبات عدا القمة النامية، 4= ذبول جميع أوراق النبات، 5= موت النبات.

استمر أخذ القراءات كل ثلاثة أيام لمدة 15 يوماً وحسبت شدة الإصابة وفق معادلة McKinney (21) وحللت النتائج إحصائياً.

$$\text{شدة الإصابة \%} = \frac{\text{مجموع (عدد النباتات لكل فئة x رقم الفئة)}}{\text{العدد الكلي للنباتات x أعلى درجة إصابة}} \times 100$$

النتائج والمناقشة

عزل البكتريا

عزلت البكتريا المسببة لمرض الذبول البكتيري من جميع العينات (جذور وسوق نباتات الطماطم/البندورة) التي أظهرت أعراض ذبول وتلون أوعيتها الخشبية المجموعة من حقول محافظات بغداد والنجف وكربلاء. وظهر نمو بكتيري عند زرع نماذج من العينات المصابة على الوسطين مستخلص البطاطا/البطاطس والدكستروز والآجار (PDA) والوسط المغذي (NA) بعد 24 ساعة من التحضين عند درجة حرارة 30 ± 1 س. وتميزت المستعمرات الفردية بعد 48 ساعة، فظهرت صغيرة الحجم، دائرية ومحدبة، ملساء، ذات لون أبيض حليبي تحول إلى لون رمادي ثم إلى بني فاتح، ثم أصبحت هلامية بزيادة مدة التحضين. وتتطابق هذه الصفات مع تلك التي أشارت إليها العديد من الدراسات فيما يتعلق بالجنس *Ralstonia* (3، 11، 13).

وجود المرض

أظهرت نتائج التشخيص للعينات التي جمعت من محافظات بغداد، كربلاء، النجف وديالى انتشار المرض في المحافظات الثلاث الأولى. ولم يظهر الفحص وجود المرض في محافظة ديالى بسبب انخفاض مستوى الماء الأرضي وقلة الرطوبة لتعرضها للجفاف في السنوات الأخيرة. وقد أشارت بعض المصادر إلى علاقة مرض الذبول البكتيري على الطماطم/البندورة بمستوى الماء الأرضي إذ أن العوامل المحددة لظهور وتطور المرض هي الرطوبة والحرارة المرتفعتين (12). ولا يستبعد أن يكون السبب هو عدم تكرار زراعة الطماطم/البندورة في ذات المنطقة، إذ من المعروف أن البكتريا *R.solanacearum* من قاطنات التربة وتزداد أعدادها بتكرار زراعة ذات المحصول بشكل مستمر في ذات الحقل (22، 25).

العزلات الممرضة

الصفات المظهرية على الوسط المغذي TZCA - تميزت المستعمرات الفردية للعزلات الممرضة على وسط كلوريد التترازوليوم والآجار(TZCA) بشكلها شبه الدائري، مرتفعة قليلاً عن سطح الوسط، لزجة، ذات لون أبيض ومركز وردي، قطرها 3.5-4.2 مم. أما مستعمرات العزلات غير الممرضة التي ظهرت على الوسط ذاته فكانت دائرية ذات لون أحمر غامق مع وجود حافة شفافة زيتية القوام، صغيرة قطرها 1.0-2.0 ملم. وتتماثل هذه الصفات مع دراسات سابقة (15، 19، 20). ويعود سبب هذا الاختلاف في الخصائص المظهرية إلى أن السلالة الممرضة غير قادرة على اختزال ملح التترازوليوم العديم اللون والذائب في الماء بذات الدرجة التي تستطيع بها السلالة غير الممرضة التي تختزله إلى مادة الفورمازان Formazan الملونة وغير الذائبة في الماء مما يدل على أن نشاط الإنزيمات المزيلة للهيدروجين (Dehydrogenase) يكون أعلى في العزلات غير الممرضة (1).

اختبار فرط الحساسية - أوضحت نتائج اختبار فرط الحساسية أن جميع العزلات التي تم الحصول عليها من نباتات الطماطم/البندورة المأخوذة من حقول محافظات بغداد، كربلاء والنجف لديه القدرة الإمراضية لنباتات التبغ (L.) *N. tabacum xanthi*. ونتيجة لذلك ظهرت بقع صفراء في المنطقة الملقحة بعد 48 ساعة من حقن اللقاح البكتيري في الأوراق، واستمر الاصفرار بالانتشار بعد 72 ساعة ثم تحول إلى لون بني بمرور الوقت. وبناءً على هذا الاختبار والصفات المظهرية للمستعمرة النامية على الوسط المغذي كلوريد التترازوليوم والآجار (TZCA)، أختيرت العزلات R_1، R_2 و R_3 التي تمثل الزراعة المحمية في كلية الزراعة-جامعة بغداد، مزرعة النهروان والبيوت البلاستيكية في محافظة كربلاء، على التوالي. وتميزت هذه العزلات بسرعة ظهور الأعراض على نبات التبغ وظهور عدد كبير من المستعمرات الممرضة على الوسط TZCA .

ويعد اختبار فرط الحساسة على صنف التبغ *N. tabacum xanthi* من الاختبارات المعتمدة في تحديد الإختلافات بين العزلات والسلالات، إذ توصل Lozano و Sequeira (17) إلى تمييز ثلاث سلالات لهذه البكتريا على أساس استجابة أوراق نبات التبغ عند حقنها بمعلق منها وكانت R_1 نتج عنها ظهور بقعة بنية غامقة محاطة بهالة صفراء بعد 36 ساعة و R_2 نتج عنها ظهور بقعة صفراء بعد 10-12 ساعة من عملية الحقن وR_3 نتج عنها اصفرار المساحة الملقحة من الورقة بعد 48 ساعة. وعند اعتماد هذا الاختبار في هذه الدراسة، ظهرت اختلافات في المنطقة المصفرة بين العزلات مما قاد إلى تقسيمها بالشكل الذي سبقت الإشارة إليه.

تحديد البكتريا الممرضة

تحديد الجنس

- الصفات المظهرية والمجهرية : أظهر الفحص المجهري للبكتريا المصبوغة بصبغة جرام أن خلاياها ذات شكل عصوي، سالبة لصبغة جرام. كما ظهرت البكتريا متحركة في نقطة ماء معلقة. وتميزت المستعمرات النامية على الوسط المغذي (NA) ووسط مستخلص البطاطا/البطاطس والكستروز والآجار (PDA) بأنها ذات لون كريمي و دائرية محدبة، ناعمة ولماعة. وتتفق هذه النتائج مع نتائج دراسات سابقة فيما يتعلق بالصفات المجهرية والمظهرية للجنس *Ralstonia* (5، 11، 13).

- قابلية البكتريا على النمو في بعض الأوساط التفريقية: أشارت نتائج هذا الاختبار أن البكتريا موضوع الدراسة نمت على الوسط المغذي KB، إلا أنها لم تنمو على كل من YDC، CVP و DI التي تم اختبارها أيضاً. وظهرت المستعمرات النامية بيضاء غير لاصقة، تماثلت فيها مع دراسات سابقة (13، 29).

- الاختبارات البيوكيميائية: أظهرت النتائج قدرة هذه البكتريا على إنتاج إنزيمات oxidases من خلال تشكل لون ارجواني على ورقة ترشيح مشبعة بمحلول 1 % Tetramethyl-P-phenyllene diamine-dihydro chloride ووضع عليها جزء من مستعمرة البكتريا النامية على NA (7) (جدول 1). كما أظهر الفحص قدرة البكتريا على إنتاج إنزيم catalase عندما ظهرت فقاعات غازية لدى إضافة قطرات من محلول مائي 3 % من بيروكسيد الهيدروجين إلى النمو البكتيري على NA (6). كما كان لهذه البكتريا القدرة على إنتاج أحماض نتيجة لتغير لون الوسط إلى اللون الأحمر (16). ولدى مقارنة تلك النتائج سواء تلك المتعلقة بالصفات المظهرية والأوساط التفريقية أو بالصفات البيوكيميائية، مع ما سبق التوصل إليه في الدراسات السابقة آنفة الذكر يمكن الاستنتاج بأن جنس البكتريا المسببة لمرض الذبول على الطماطم / البندورة هو *Ralstonia*.

تحديد النوع

- الصفات البيوكيميائية : أوضحت نتائج الاختبارات البيوكيميائية أن البكتريا ليست لها القابلية على النمو تحت الظروف اللاهوائية، وهي قادرة على إختزال النترات وإنتاج H_2S ، وإنتاج الأمونيا من الببتون (جدول 1). وتتفق هذه النتائج مع نتائج دراسات سابقة حول النوع *solanacearum* (11، 13، 28، 31).

- قابلية البكتريا على استهلاك بعض المركبات الكاربوهيدراتية: تشير النتائج إلى أن البكتريا المدروسة كانت قادرة على استخدام Galactose و Glucose و Fructose و Sucrose، وغير قادرة على استخدام Trehalose و Rhaminose و Inuline و starch، كمصدر للكربون. وتتفق تلك النتيجة مع ما توصل إليه العديد من الباحثين حول هذا الموضوع (16، 28، 30، 31). وفي ضوء النتائج التي تم التوصل إليها من دراسة الخواص البيوكيميائية وإستهلاك المركبات الكاربوهيدراتية يمكن القول بأن نوع البكتريا المسببة للذبول على الطماطم / البندورة هو *solanacearum*.

تحديد سلالة البكتريا

- المدى العائلي: وجد أن العزلات الثلاث R_1، R_2، R_3 لها القدرة على إحداث المرض على نباتات الطماطم/البندورة والبطاطا/البطاطس. إذ بدأ ظهور أعراض الذبول على الأوراق السفلية بعد ثلاثة أيام من العدوى، وذبلت تماما بعد 13 يوماً علماً بأن إعراض الذبول لم تظهر على نباتات الشاهد غير المعداة. كما لم تظهر إعراض المرض على نباتات الباذنجان والفستق السوداني بعد 20 يوماً من العدوى. يستنتج من هذه النتائج أن العزلات الثلاث للبكتريا قد تعود للسلالة R_3 حسب ما ذكره Buddenhagen وآخرون (4). ويعزز هذه النتائج اختبار فرط الحساسية على نباتات التبغ التي أظهرت أعراضاً مشابهة لتلك التي تحدثها السلالة R_3.

جدول 1. بعض الصفات البيوكيميائية للعزلات R_1، R_2 و R_3 من البكتريا *Ralstonia solanacearum*.

Table 1. Some biochemical characteristics of R_1 , R_2 and R_3 isolates of *Ralstonia solanacearum*.

النتيجة Result	Test	الاختبار
−	Anaerobic growth	النمو في الظروف اللاهوائية
+	Oxidase	الأوكسيديز
+	Catalase	الكاتاليز
+	Litmus milk	حليب اللتموس
+	Nitrate reduction	إختزال النترات
−	Indol	الإندول
+	H_2S production	إنتاج H_2S
+	Amonia production from peptone	إنتاج الأمونيا من الببتون
−	Starch hydrolysis	التحلل المائي للنشا
−	Argenine hydrolysis	التحلل المائي للأرجنين
−	Gelatine hydrolysis	التحلل المائي للجيلاتين

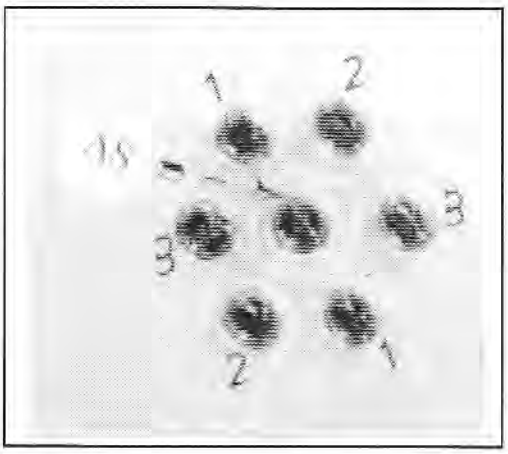
- Negative test − الاختبار سالب

+ Positive test + الاختبار موجب

- الاختبارات المصلية: ظهرت علاقة سيرولوجية بين المصل المضاد للعزلة R_1 والعزلات الثلاث للبكتريا. إذ تشكلت خطوط ترسيب بين حفرة المصل المضاد وحفر كل من العزلات الثلاث بعد 24 ساعة من تحضين الأطباق عند درجة حرارة 37 س. وكانت خطوط الترسيب مستمرة، ولم يلاحظ ظهور مهاميز بينها مما يدعو للإعتقاد بأنها جميعاً تعود لسلالة واحدة (شكل 1). وهذا يتفق مع ما أشار إليه Kiraly و Klement (16) و Rath و Addy (28). وتعزز هذا الإستنتاج من مصداقية نتائج كل من دراسة المدى العائلي للبكتريا واختبار فرط الحساسية.

- القدرة الامراضية : وجد أن العزلات الثلاث R_1، R_2 و R_3 لبكتريا *R.solanacearum* قادرة على إحداث المرض على نباتات الطماطم/البندورة، إذ ظهرت أعراض الذبول على النباتات بعد 3 أيام من العدوى. وقد بلغت شدة الإصابة على نباتات الطماطم صنف "مونتكارلو" بعد 15 يوماً من الإعداء 81.3، 93.0 و 64.0 للعزلات R_1، R_2 و R_3، على التوالي. وعند عمل مقطع طولي في

سـوق النـباتات المصابة لوحظ تلون الأوعية الخشبية بلون بني داكـن. كمـا ظهرت إفرازات بيضاء من النهايات المقطوعة في السـاق. وتـتفق هـذه النتائج مع ما ذكره Agrios (2). وظهرت إختلافات معنوية بين العزلات الثلاث إذ تفوقت العزلة R_2 من حيث شـدة الإصابة وسرعة تطورها، مما يشير إلى أن هذه العزلة هي أكثر شراسة من العزلتين الأخريين.



شـكل 1. اختبار الإنتشار المناعي المزدوج بين المصل المضاد للعزلة R_1 (AS) مـع العـزلات الثلاث R_1 (1)، R_2 (2) و R_3 (3). لاحظ خطوط الترسيب المستمرة بين الحفر.

Figure 1. Double Immunodiffusion Test between the R_1 isolate antiserum (AS) and R_1 (1) , R_2 (2) and R_3 (3) isolates. Note the continuous precipitin lines between the wells.

تشخيص الطرز الحيوية للبكتريا

أظهـرت النتائج اختلاف العزلات في قدرتها على استخدام بعض المركـبات الكحولـية السداسية كمصدر للكاربون. وتميزت العزلة R_2 بقدرتهـا علـى استهلاك المركبين Sorbitol و Dulcitol، في حين لم تتمكـن العزلـتان R_1 و R_3 من القيام بذلك. ومن ناحية أخرى نجد أن العـزلات الـثلاث كانت قادرة على إستهلاك Mannitol و Lactose و Maltose و Cellobiose. ومن مقارنة تلك النتائج مع نتائج دراسات سـابقة حـول ذات الموضوع يمكن أن نستنتج بأن العزلة R_2 قد تعود للطـراز الحـيوي 3 أمـا العزلتان R1 و R3 فقد تعودا إلى الطراز الحـيوي 5. وذكـر Hayward (11) في هذا أن العزلات التي تعود للطرازيـن 3 و 5 لبكتريا *R.solanacearum* تكون قادرة على تمثيل Mannitol و Lactose، إضـافة إلـى أن الطراز الحيوي 3 له القدرة علـى تمثيل Mannitol و Sorbitol و Dulcitol و Cellobiose، أما الطـراز الحـيوي 5 فلـيس له القـدرة على تمثيل كل من Sorbitol و Dulcitol.

لقـد أشارت الدراسات التصنيفية أن لبكتريا *R.solanacearum* العديـد مـن السلالات حددت بناءً على الصفات الفسيولوجية والقدرة الإمراضية والمدى العائلي وإستجابة أوراق نباتات التبغ *N. tabacum xanthi* عـند حقنها بمعلق منها، فقد قسمت إلى ثلاث سلالات تختلف عـن بعضـها بـالقدرة الإمراضية والمدى العائلي، فضلاً عن إمكانية التمييز بينها اعتماداً على نوع الإستجابة لأوراق نباتات التبغ لها (17). ثـم قسـمت إلـى طرز حيوية تختلف في قدرتها على استخدام ثلاث سكريات ثنائية Cellobiose، Lactose و Maltose، وثلاثة كحولات سداسية Sorbitol، Mannitol و Dulcitol (11). وقد اعتمدت في هذه الدراسـة، استجابة نباتات التبغ للبكتريا موضوع الدراسة وقدرتها على اسـتخدام السكريات والكحولات كمصدر للكربون. واتضح من النتائج التـي تم الحصول عليها أن هناك سلالة واحدة لهذه البكتريا في العراق مشـابهة للسلالة R_3 (4)، وطرازين مشابهة للطرازين 3 و 5 التي أشار إليها Hayward (11).

Abstract

Al-Ani, R.A., R.G. Abdel Muhsen and K.S. Juber. 2004. Isolation and Identification of the Bacteria Causing Tomato Wilt and its Biotypes in Protected Cultivation. Arab J. Pl. Prot. 22: 53-58.

This study was conducted to isolate and identify the causal agent of the bacterial wilt on tomato in protected cultivation. Three isolates, R_1, R_2 and R_3 were isolated from roots and stems of wilting plants collected from fields of Baghdad, Najaf, and Karbala in Iraq. White, raised and shiny colonies with rose center, were developed on TZCA medium. Results of hypersensitivity and pathogenicity tests showed that all isolates were able to induce similar disease symptoms on tomato plants. The genus *Ralstonia* was identified according to the visible characteristics of the colonies on NA and PDA media, cell shape, its ability to grow on KB selective medium and to produce oxidase, catalase and acids. The species *solanacearum* was identified on the basis of its ability to reduce nitrate, produce H_2S, produce ammonia from peptone and on its ability to assimilate certain carbohydrates. Assimilation results of mannitol, lactose, cellobiose, sorbitol and dulcitol revealed that the R_2 isolate belong to biotype 3, whereas R_1 and R_3 isolates belong to biotype 5.

Key words: Protected cultivation, Tomato, Biotype, *Ralstonia solanacearum*.

Corresponding author: R.A. Al-Ani, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Abu-Ghreib, Baghdad, Iraq.

المراجع

1. **أبو الذهب، مصطفى كمال، الجعراني ومحمد عبد القادر.** 1988. البكـتريا. الجـزء الأول والثاني، الطبعة الثانية. دار المعارف بالإسكندرية، مصر. 287 صفحة.
2. **Agrios, G.N.** 1997. Plant Pathology. 4th ed. Academic Press, New York, 870 p.

References

3. **Buchanan, R.E. and N.E. Gibbson.** 1974. Bergys Manual of Detrminative Bacteriology, 8th ed. The Wilkins Company, Baltimore. 1268 p
4. **Buddenhagen, J., L. Sequeira and A. Kelman.** 1962. Designation of races of *Pseuodomonas solanacearum*. Phytopathology, 52:726.

5. **Cowan, S.T.** 1977. Cowan and Steel Manual for the identification of medical bacteria. 2nd ed. Cambridge university Press, Cambridge, 955 p.
6. **Crabtree, K.T. and R.D. Hinsdill.** 1974. Fundamental experiments in microbiology. Saunders, W.B. Company, New York, 495 p.
7. **Fingold, S.M. and W.J. Martin.** 1982. Bailiy and Scotts diagnostic microbiology 6th ed. The C.V. Mosby Co. St. Louis. Toronto, London,
8. **Hanson, M.P. and J.F. Wang.** 1996. Variable reaction of tomato lines to bacterial wilt evaluated at several locations in Southest Asia. Hort Science, 31:143-146.
9. **Harrigan, W.F. and M.E. McCance.** 1976. Laboratory methos in food and dairy microbiology. Academic Press, London, New York, San Francisco. 452 p.
10. **Hartman, G.L. and L.E. Datnoff.** 1997. Soil borne disease of tropical crops. CAB International. London, 162-165.
11. **Hayward, A.** 1994. Systematic and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. Pages 123-136. In Bacterial wilt; the disease, its causative organism *Pseudomonas solanacearum*. A.C. Hayward and G.L. Hartman (Editor). CAB International, wallingfold, United Kingdom.
12. **Hingorani, M.K., P.P. Metha and N.J. Singh.** 1965. Bacterial brown rot of potato in India. Indian Phytopathology, 9: 67-71.
13. **Holt, J.N., N.R. Krieg, J.T. Staley and S.T. Williams.** 1994. Bergys manual of determinative bacteriology, 9th ed. Williams and Wilkins. Baltimors, Maryland, U.S.A. Pages 93-94.
14. **Jackson, M.S. and L.C. Gonzales.** 1981. Persistence of *Pseudomonas solanacearum* (race 1) in a naturally infested soil in Costa rica. Phytopathology, 71: 690-693.
15. **Jenkins, S. and A. Kelman.** 1979. Techniques for study of *Pseudomonas solanacearum*. Pages 143-147. In Proc. 1st international conference and workshop on ecology and control of bacterial wilt caused by *P. solanacearum*. North Carolina.
16. **Kiraly, Z.and Z. Klement.** 1974.General charcteristics of plant pathogenic bacteria. Methods in plant pathology. Elsevier scientific publishing company, New York. 509 p.
17. **Lozano, J.C. and L. Sequeira.** 1970. Differentiation of race of *Pseudomonas solanacearum* by a leaf infiltration technique. Phytopathology, 60: 833-838.
18. **Marino, R.L.b., N.S.S. Silverio and S.J. Michereff.** 1998. Bacterial wilt in Brazil: current status and control methods. Pages 386-393. In: Bacterial wilt disease. Molecular and Ecological Aspects. P. Prior, C. Allen and J. Ephin Stone (Editors). S. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
19. **Martin, C. and U. Nydegger.** 1982. Susceptibility of *Cyphomondra betacea* to *Pseudomonas solanacearum*. Plant Disease, 66: 1025-1027.
20. **McDonald D. and V.K. Mehan.** 1995. Techniques for diagnosis of *Pseudomonas solanacearum* and for resistance screening against groundnut bacterial wilt. Technical Manual No.1 (ICRISAT), Pages 126.
21. **McKinney, H.H.** 1923. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedling by *Helminthosporium sativum*. Journal of Agricultural Research, 26:195-212.
22. **Michel, V.V., J.F. Wang, D.J. Didmore and G.L. Hartmans.** 1977. Effects of intercropping and soil amendment with urea and calcium oxide on the incidence of bacterial wilt tomato and survival of soil borne *Pseudomonas solanacearum* in Taiwan. Plant Pathology, 46:600-610.
23. **Nesmith, W.C. and S.F.C. Jenkins.** 1983. Survival of *Pseudomonas solanacearum* in selected north Carolina. Soil Phytopathology, 73:1300-1304.
24. **Opena, R.T., G.L. Hartman, J.T. Chen and C.H. Yang.** 1990. Breeding for bacterial wilt resistance in tropical tomato. Pages 44-50. In: Proceeding of 3rd International conference on Plant Protection in the tropics. Genting High Lands, Malaysia.
25. **Opina, N.L., R.B. Valdez and O.S. Opina.** 1977. Effect of rice-tomato cropping patterns and floating on the survival of *Pseudomonas solanacearum*. Philippine Phytopathology, 30:93-99.
26. **Palleron, N.J.** 1984. Gram-Negative aerobic rods and cocci. Pages 140-180. In: Bergys manual of systematic bacteriology. H.A. Peter (Editor). Williams & Wilkins, Baltimore, London , Los Angles, Sydney.
27. Palleron, V. and M. Doudoroff. 1977. Phenotypic characterization and deoxyribonucleic acid homologies of *Pseudomonas solancearum*. Journal of Bacteriology, 107:690-696.
28. **Rath, P.K. and S.K. Addy.** 1977. Variation in *Pseudomonas solanacearum* causing bacterial wilt of tomato. Indian Phytopathology, 30:502-505.
29. **Schaad, N.W.** 1980. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bcteria. Bacteriology Committee of American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota, 72 p.
30. **Strider, D.L., R.K. Jones and R.A. Haygood.** 1982. Southern bacterial wilt of geranium caused by *Pseudomons solanacearum*. Phytopathology, 60:506-512.
31. **Wanepoel, A.E. and B.W. Young.** 1988. Characteristics of South Africa strains of *Pseudomonas solanacearum*. Plant Disease, 72:403-405.
32. **Thorneyles, M.S.** 1960. The differentiation of *Pseudomonas solanacearum* from other gram-negative bacteria on the basis of organism metabolism. Journal of Applied Bacteriology, 1:37-52.

Received: May 5, 2002; Accepted: November 14, 2003

تاريخ الاستلام: 2002/5/5؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2003/11/14