تقييم كفاءة أنواع من البكتيريا المعزولة من ترب بيوت بلاستيكية في نمو الفطر *Sclerotinia sclerotiorum* المسبب لمرض العفن الأبيض على الخضروات مختبرياً

عبد الله كامل عبد الله الكبيسي* وحرية حسين الجبوري

قسم وقاية النبات، كلية علوم الهندسة الزراعية، جامعة بغداد، العراق.

*البريد الالكتروني للباحث المراسل: abdullah.kamel1204a@coagri.uobaghdad.edu.iq

الملخص

الكبيسي، عبد الله كامل عبد الله وحرية حسين الجبوري. 2022. تقييم كفاءة أنواع من البكتيريا المعزولة من ترب بيوت بلاستيكية في نمو الفطر *Sclerotinia sclerotiorum* المسبب لمرض العفن الأبيض على الخضروات مختبرياً. مجلة وقاية النبات العربية، 40(2): 140–147.
https://doi.org/10.22268/AJPP-40.2.140147

أجريت هذه الدراسة بغرض عزل بكتيريا مفيدة من ترب بيوت بلاستيكية مزروعة بنباتات باذنجان وخيار في عدّة مناطق من محافظة بغداد وتشخيصها جزيئياً واختبار مقدرتها التضادية إزاء نمو ستِّ عزلاتٍ من الفطر الممرض *Sclerotinia sclerotiorum* المسبب لمرض العفن الأبيض. أظهرت نتائج العزل الحصول على 18 عزلة بكتيرية مختلفة من عدّة حقول في محافظة بغداد. أبدت العزلات البكتيرية قدرةً تضادية تجاه عزلات الفطر الممرض *S. sclerotiorum* (ScE1، ScE2، ScE3، ScE4، ScC1 وScC2)، وتراوحت النسبة المئوية للتثبيط ما بين 84.25–93.75%، حيث تفوّقت العزلتان BE1 وBE6 المعزولتان من ترب بيوت بلاستيكية مزروعة بنباتات باذنجان بإعطائها أعلى نسب تثبيط (بلغت 93.75% لكلٍّ منهما) لجميع عزلات الفطر المختبرة، في حين حقّقت العزلة BC9 المعزولة من ترب مزروعة بنباتات خيار أعلى نسب تثبيط (بلغت 84.25%) لعزلات الفطر كافّةً ما عدا العزلة ScE1. أمكن التشخيص الجزيئي لعزلات البكتيريا تحت رقم الانضمام MZ436922، MZ436923، MZ436921 وMZ436920 والتي تعود إلى *Alcaligenes faecalis*، *Bacillus amyloliquefaciens*، *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas aeruginosa*، على التوالي، وتمّ تسجيل هذه العزلات في البنك الدولي للجينات.

كلمات مفتاحية: *Sclerotinia sclerotiorum*، المكافحة الأحيائية، تشخيص جزيئي، الباذنجان.

المقدمة

يعد نبات الباذنجان الذي ينتمي إلى العائلة الباذنجانية (Solanaceae) أحد أهم محاصيل الخضر، ويزرع على نطاق واسع في المناطق الاستوائية والمعتدلة (Leogrande *et al.*, 2014). قدّرت المساحة المزروعة في العراق لسنة 2020 بحوالي 54469 دونماً وبإنتاج 207.2 ألف طن (الجهاز المركزي للإحصاء، 2021). تصاب العائلة الباذنجانية بالعديد من المسببات الفطرية الممرضة مثل *Botrytis cinerea*، *Fusarium solani*، *Macrophomina phaseolina* و*Rhizoctonia solan* (Al-Juboory & Al-Hadithy, 2021؛ Almammory & Matloob, 2019)، ويعدّ الفطر *Sclerotinia sclerotiorum* (lib) DeBary المسبب لمرض العفن الأبيض من أهمّ الفطريات التي تصيب نباتات الباذنجان بشدّة وخاصة في الزراعة المحمية مسبباً له خسائر اقتصادية كبيرة (Barros *et al.*, 2015). تظهر علامات المرض على هيئة غزلٍ فطري أبيض اللون قطني المظهر في أماكن الإصابة، وبتقدم الإصابة تتكون أجسام حجرية سوداء اللون غير منتظمة الشكل يبلغ حجمها كحجم حبّة الحمص. تعدّ الأجسام الحجرية للفطر *Sclerotinia sclerotiorum* وسيلة البقاء في التربة أو بقايا النباتات، وهي الإصابة الأولية في الحقل، إذ تنبت عند توفّر الظروف البيئية المواتية مكوِّنةً جسماً ثمرياً كأسياً تنطلق منه الأبواغ الكيسية/الزّقيّة (Peltier *et al.*, 2012).

تمّ تطبيق العديد من الأساليب للحدّ أو التخفيف من الأضرار التي تسببها تلك الأمراض ومنها استعمال المبيدات (He *et al.* , 2016)؛ ومن ناحيةٍ أخرى أدى الاستعمال العشوائي للمبيدات الكيميائية من قبل المزارعين إلى ظهور العديد من المشاكل، مثل تطور مقاومة مسببات الأمراض النباتية تجاه المواد الكيميائية، والتكاليف المرتفعة في القطاع الزراعي، وتأثيرها على البيئة والإنسان (Fortunati *et al.*, 2019). لذا اتجهت الدراسات الحديثة نحو نهج أسلوب المكافحة الأحيائية باستعمال الأنواع البكتيرية المعروفة باسم البكتيريا الجذرية المحفزة لنمو النبات (PGPR) (Olanrewaju *et al.*, 2017). أشارت دراساتٌ متعددة إلى فعالية الأنواع التابعة للأجناس الـ *Pseudomonas* والـ *Bacillus* حيث أنها ذات مقدرة تثبيطية للفطر *S. sclerotiorum* المسبب لمرض العفن

https://doi.org/10.22268/AJPP-40.2.140147
© 2022 الجمعية العربية لوقاية النبات Arab Society for Plant Protection

الأبيض تحت ظروف المختبر (التميمي، 2019؛ Fernando *et al.*, 2007؛ Tozlu *et al.*, 2016). وعليه، هدفت هذه الدراسة إلى عزل بكتيريا محفزة لنمو النبات وتشخيصها جزيئياً واختبار تأثيرها في نمو الفطر *S. sclerotiorum* مختبرياً على الوسط الزرعي آغار ديكستروز البطاطا (PDA).

مواد البحث وطرائقه

عزل بكتيريا المكافحة الأحيائية من التربة

جمعت عينات تربة من بيوت بلاستيكية مزروعة بنباتات باذنجان وخيار (الموسم الزراعي السابق) من مواقع أبي غريب/الزيدان ومن محطة تجارب B التابعة لقسم وقاية النبات في كلية علوم الهندسة الزراعية، جامعة بغداد واليوسفية والمدائن. أخذت خمس عينات عشوائية مستقلة من كل بيت بلاستيكي بمقدار 5 كغ لكلٍّ منها ووضعت في أكياس بولي ايثلين، وتمّ تسجيل رقم العينة ونوع المحصول المزروع وتاريخ ومكان الجمع. نُقلت العينات إلى المختبر، وأجريت في اليوم التالي عملية العزل للعينات بطريقة التخفيف؛ تمّ إضافة 10 غ من كلّ عينة تربة إلى 90 مل ماء مقطر معقم في دوارق زجاجية سعة 250 مل، رجَّت جيداً وحضِّر منها سلسلة من التخفيفات حتى 10^{-8} وذلك بنقل 1 مل من معلّق التربة إلى سلسة أنابيب اختبار تحتوي على 9 مل ماء مقطر معقم لكل عينة من عينات التربة. أُخذ 1 مل من التخفيفات الثلاثة الأخيرة المحضرة أعلاه وأضيفت إلى أطباق بتري قطر 9 سم تحوي وسط أغار مغذي Nutrient agar (NA) معقم قبل تصلّبه، ورُجَّت الأطباق لتجانس الوسط. حضّنت الأطباق عند حرارة 28±2 °س لمدة 24 ساعة. تمّت ملاحظة النمو البكتيري في الأطباق، وأُخذت مسحات بواسطة إبرة ذات عقدة (Loop) من النمو البكتيري وجرى تخطيطها على وسط زرعي NA. حضّنت الأطباق عند حرارة 28±2 °س لمدة 24 ساعة، ثمّ نُقِّيت على وسط زرعي جديد للحصول على مستعمرات نقية عن طريق أخذ مسحات بواسطة إبرة ذات عقدة من طرف النمو البكتيري وعمل تخطيط لها على وسط زرعي NA جديد. حُفظت العزلات النقية بأنابيب اختبار تحوي الوسط NA مائل، وحُضّنت لمدة 24 ساعة حفظت بعدها في الثلاجة عند حرارة 4°س (Rabeendran *et al.*, 1998).

كفاءة بعض العزلات البكتيرية في تثبيط نمو عزلات الفطر *S. sclerotiorum* على الوسط الزرعي

اختبرت المقدرة التضادية لثمان عشرة عزلة بكتيرية (BE1، BE2، BE3، BE4، BE5، BE6، BE7، BE8، BE9، BC1، BC2، BC3، BC4، BC5، BC6، BC7، BC8 وBC9) تمّ الحصول عليها من عملية العزل من تربة لبيوت بلاستيكية مزروعة بنباتات باذنجان وخيار، ضدّ ستّ عزلات من الفطر الممرض *S. sclerotiorum* (ScE1، ScE2، ScE3، ScE4، ScC1 و ScC2) التي تمّ عزلها من باذنجان وخيار على الوسط الزرعي PDA المعقم حسب طريقة Fatima *et al.* (2009). أضيف 1 مل من معلّق كلّ عزلة بكتيرية من العزلات الثمان عشرة المنمَّاة على الوسط الزرعي السائل (NB) Nutrient broth إلى الوسط الزرعي PDA المعقم قبل تصلبه والمصبوب في أطباق بلاستيكية معقمة مع تحريكه حركة رحوية لتوزيع اللقاح بصورة متجانسة. وبعد تصلب الوسط، لقِّح مركز الطبق بقرص قطره 5 مم تمّ أخذه بواسطة ثاقب فليني معقم من حافة مزارع عزلات الفطر الممرض النقية بعمر ستة أيام. استعملت كل عزلة بكتيرية مع ستِّ عزلات للفطر الممرض وبواقع ثلاثة أطباق كمكررات لكل عزلة بكتيرية وتركت ثلاثة أطباق أخرى دون إضافة أي بكتيريا كمعاملة شاهد. حضِّنت الأطباق في الحاضنة عند حرارة 25±2 °س، وبعد سبعة أيام، حسبت النسبة المئوية للتثبيط (Eksteen *et al.*, 2001) وفق المعادلة التالية:

$$\% \text{ للتثبيط} = \frac{\text{معدل نمو الفطر في معاملة المقارنة} - \text{معدل نمو الفطر في المعاملة}}{\text{معدل نمو الفطر في معاملة المقارنة}} \times 100$$

التشخيص الجزيئي لعزلات البكتيريا باستعمال تقنية تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل (PCR)

استخلاص الحامض النووي DNA من عزلات البكتيريا – تمّ تنقية خمس عزلات للبكتيريا للحصول على مستعمرات نقية كلاً على انفراد وذلك عن طريق أخذ مسحة بواسطة إبرة التلقيح ذات العقدة (Loop)، اذ انتخبت المستعمرات المنفردة للعزلات البكتيرية وأعيد زراعتها بطريقة التخطيط للتأكد من نقاوتها، وتمّ اجراء التشخيص الجزيئي للعزلات البكتيرية الخمس (BE2، BE5، BE6، BC4 وBC9) التي اثبتت كفاءتها في تثبيط عزلات الفطر الممرض *S. sclerotiorum* في اختبار التضاد، حيث شخِّصت اعتماداً على وجود المورّثة 16sRNA في تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل PCR، باستعمال طقم الأدوات القياسية G- spin DNA extraction kit من انتاج شركة Intron Biotechnology، كوريا.

أجري تفاعل البلمرة المتسلسل باستعمال البادئ المتخصص specific primer 16s RNA of gene من انتاج شركة Integrated DNA technologies في الولايات المتحدة الأمريكية (جدول 1).

تمّ تجفيف البادئات بالتجميد، وإذابتها في ماء مقطّر منزوع الشوارد (ddH2O) لإعطاء تركيز نهائي قدره 100 بيكامول/ميكروليتر. حضّر خليط تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل بإضافة مكونات التفاعل

(5 ميكروليتر من Taq PCR PreMix، 1 ميكروليتر من Forward Primer، 1 ميكروليتر من Reverse Primer، 1.5 ميكروليتر من DNA و16.5 ميكروليتر من الماء المقطر) وبحجم نهائي 25 ميكروليتر لجميع المكونات. بعد اكمال تحضير المزيج، غلقت الأنابيب ومزجت محتويات الخليط بواسطة جهاز الـ Vortex مدّة 10 ثوانٍ، ثم نقلت الأنابيب إلى جهاز التدوير الحراري (PCR Thermocycler).

أجريت عملية تضخيم المورثة/الجين عند حرارة 94°س للمسخ الأولي ولمدة ثلاث دقائق وبدورة واحدة، ثم تبعتها عملية المسخ الثاني عند درجة حراة 94 °س ولمدة 45 ثانية، وتلتها عملية الالتحام عند حرارة 56 °س ولمدة 45 ثانية، وتبعتها عملية التمديد الأولي عند حرارة 72 °س ولمدة دقيقة واحدة وتضمن عملية المسخ الثاني والالتصاق والتمدد الاولي 35 دورة في حين حصلت عملية التمدد الثاني (النهائي) عند حرارة 72 °س ولمدة 7 دقائق ولدورة واحدة. وأجري تقدير نقاوة الدنا بواسطة جهاز النانو دروب.

تقدير تركيز DNA ونقاوته

أضيف 200 ميكروليتر من Tris-EDTA (TE) إلى 3800 ميكروليتر من الماء المقطر ليصبح المزيج 4000 ميكروليتر. تمّ سحب 10 ميكروليتر من الخليط وإهمالها ثم إضافة 10 ميكروليتر من صبغة الحامض النووي (DNA)، ليجري سحب 200 ميكروليتر من الخليط لكل عينة، وتمّ تحضير سلسلة من الأنابيب محتوية على 200 ميكروليتر من الخليط وأضيف لكلٍّ منها 2 ميكروليتر من DNA Extraction، وضعت بعدها على جهاز Vortex لمدة 10 ثوانٍ لمزجها، ثم تركت عند حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق، وبعدها تمّ استخلاص القيمة بواسطة الجهاز مباشرةً.

الترحيل الكهربائي للحامض النووي للبكتيريا على هلام الأجاروز

تمّ اجراء الترحيل الكهربائي للكشف عن نتيجة تفاعل PCR أثناء وجود الحامض النووي القياسي لتمييز حجم الحزمة وفقًا لـ Sambrook *et al.* (1989)، تمّ تحضير هلام الأجاروز بتركيز 1.5% في المحلول المنظم Tris-borate EDTA (TBE). حقنت بعدها نواتج الـ PCR في حفر لوح الهلام المغمور بواقع 5 ميكروليتر لكل حفرة، فضلاً عن وجود محلول حجم جزيئي قياسي Ladder Molecular، ورحلت كهربائياً (70 فولت) لمدة 1:30 ساعة. فحصت قطع الدنا المصبغة بجهاز توثيق الهلام تحت الأشعة فوق البنفسجية (UV).

تحضير لقاح البكتيريا

حضّرت كمية مناسبة من الوسط الزرعي Nutrient Broth في دوارق زجاجية سعة 500 مل وفي كل دورق 250 مل وعقمت في المؤصدة (عند حرارة 121 °س وضغط 1.5 كم/سم^2 لمدة 15 دقيقة) لاستعمالها في تحضير اللقاح البكتيري للتجارب اللاحقة. لقّحت الدوارق إفرادياً بالعزلات البكتيرية المراد استعمالها في المكافحة الأحيائية بواسطة إبرة التلقيح ذات العقدة وذلك من العزلات بعمر 24 ساعة والمنماة في أطباق بتري على الوسط الزرعي NA، وحضّنت الدوارق في الحاضنة عند حرارة 28±2 °س لمدة يومين مع التحريك المستمر.

تحديد التخفيف الفعال للبكتيريا

تم تحضير سلسلة من تخفيفات لقاح البكتيريا *Alcaligenes faecalis*، *Bacillus subtilis*، *B. amyloliquefaciens*، *Pseudomonas aeruginosa* و*P. mendocina* والتي أعطت أعلى نسب تثبيط لعزلات الفطر *S. Sclerotiorum*. أُخذ 1 مل من اللقاح البكتيري السائل النامي على الوسط الزرعي NB وبعمر 48 ساعة (لكل عزلة بشكل إفرادي) وأضيف إلى أنبوب اختبار معقم بحوي على 9 مل ماء مقطر معقم. حضّرت سلسلة من التخفيفات ابتداء من 10^{-1} وحتى 10^{8}. أخذ 1 مل من التخفيفات الثلاثة الأخيرة لمعلّق البكتيريا (كلاً على انفراد) وأضيف إلى الوسط الزرعي PDA قبل تصلبه مع تحريك الأطباق لتجانس اللقاح البكتيري مع الوسط الزرعي داخل الأطباق، وبواقع ثلاثة أطباق لكل تخفيف، وتركت ثلاثة أطباق أخرى كشاهد بدون تلقيح. وبعد تصلب الوسط لقِّح مركز كل طبق بقرص قطره 5 مم أخذ من حافة مستعمرة الفطر الممرض النامي على الوسط الزرعي PDA بعمر 5 أيام. حضنت الأطباق عند حرارة 25±2 °س لمدة ثلاثة أيام، وتمّ حساب النسبة المئوية للتثبيط.

جدول 1. البوادئ المستعملة في تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل PCR لتشخيص عزلات البكتيريا

Table 1. Primers used in the polymerase chain reaction (PCR) to identify bacterial isolates.

اسم البادئ Primer Name	تتابع البادئ Sequence	Tm (°C)	GC (%)	حجم المنتج Product size
ITS1 البادئ الامامي Forward	5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	54.3	50.0	1250 bp
ITS4 البادئ العكسي Reverse	5'- GGTTACCTTGTTACGACTT-3'	49.4	42.1	

حساب الكثافة العددية للبكتيريا

استعملت طريقة العد المباشر في الأطباق المزروعة (Pawsey, 1974) لحساب عدد المستعمرات البكتيرية. تمّ تحضير سلسلة من تخفيفات اللقاح البكتيري في أنابيب اختبار من 10^{-1} إلى 10^{-8}. لقحت أطباق بتري قطر 9 سم حاوية على الوسط الزرعي NA المعقم بمعلّق البكتيريا بمعدل 1 مل من التخفيفات الفعالة لكل مزرعة بكتيرية قبل تصلب الوسط، وتمّ تحريكه حركة رحوية لضمان توزيع اللقاح البكتيري، وكرّرت كل معاملة ثلاث مرات، وتركت ثلاثة أطباق أخرى بدون إضافة اللقاح البكتيري كشاهد. وحضّنت الأطباق عند حرارة 28±2 °س لمدة 24 ساعة. تمّ حساب عدد الخلايا البكتيرية وفق المعادلة التالية (Clark, 1965):

عدد المستعمرات cfu/ml (1 مل من العينة الأصلية) = عدد المستعمرات في الطبق × مقلوب التخفيف

وبناء على ذلك تكون الكثافة العددية المستعملة للبكتيريا (وحدة تكوين مستعمرة/مل) هي: 48×10^{7} للبكتيريا *A.faecalis*؛ و50×10^{7} للبكتيريا *P. aeruginosa*؛ و43×10^{7} للبكتيريا *P. mendocina*؛ 46×10^{6} للبكتيريا *B. subtilis*؛ و40×10^{6} للبكتيريا *B. amyloliquefaciens*.

النتائج والمناقشة

عزل بكتيريا المكافحة الأحيائية من التربة

أظهرت نتائج العزل وتشخيص البكتيريا الحصول على 18 عزلة بكتيرية (جدول 2) من ترب بيوت بلاستيكية مزروعة بنباتات باذنجان وخيار من عدّة مناطق في محافظة بغداد. تباينت أعداد البكتيريا وأنواعها، وربما يعود هذا التفاوت إلى اختلاف أماكن الجمع وتباين الظروف البيئية ما بين المناطق التي جمعت منها العينات، فضلاً عن طبيعة تواجد البكتيريا مع الأحياء الاخرى في الترب واختلاف نوع المحصول المزروع ونوع التربة والأسمدة الحيوانية المضافة (حسين، 2014). اتفقت هذه النتيجة مع ما وجده Kifle & Laing (2016) في عزل عدّة أجناس بكتيرية من ترب بيوت بلاستيكية لعدّة محاصيل، إضافةً إلى دور الممارسات الزراعية أيضاً في تعديل الخواص الفيزيائية والكيميائية للتربة مما يؤدي إلى اختلاف وتنوع المجتمع البكتيري في التربة (Jangid *et al.*, 2008). أشار عددٌ من الدراسات إلى عزل عدد من الأجناس البكتيرية المحفزة لنمو النباتات، والتي تستعمر الجذور والمنطقة التي حول الجذور، ومنها: *Pseudomonas* spp.، *Bacillus* spp.، *Streptomyces* sp. و*Azotobacter chroococcum* (الدليمي، 2019؛ الفلوجي، 2019؛ مطلوب، 2012)، كما أشارت أبحاث أخرى إلى أن البكتيريا الجذرية المحفزة للنمو (PGPR) مثل *P. aeruginosa*، *P. fluorescens*، *B. amyloliquefaciens* و*B. subtilis* تستحثّ النبات لمقاومة مسببات الأمراض ومنها مرض العفن الأبيض (الحلبوسي، 2016؛ Abdel-Kader, 2012؛ Rostami *et al.*, 2013).

اختبار كفاءة عزلات البكتيريا في تثبيط نمو الفطر الممرض *S. sclerotiorum* على الوسط الزرعي

أوضحت النتائج (جدول 2) أن عزلات البكتيريا التي تمّ عزلها من ترب بيوت بلاستيكية مزروعة بنباتات باذنجان وخيار كانت ذات كفاءةٍ تثبيطيةٍ عالية لنمو عزلات الفطر *S. Sclerotiorum* الستّ (ScE1، ScE2، ScE3، ScE4، ScC1 وScC2)، وقد تباينت معدلات نسب التثبيط باختلاف عزلات البكتيريا وعزلات الفطر الممرض قياساً بمعاملة المقارنة. وقد حققت ستُّ عزلات بكتيرية أعلى نسب تثبيط للفطر، إذ حققت العزلتان BE1 وBE6 المعزولتان من ترب بيوت بلاستيكية مزروعة بنباتات باذنجان أعلى نسب تثبيط لجميع عزلات الفطر المختبرة حيث بلغت 93.75%، وحقّقت العزلة البكتيرية BE2 أعلى نسب تثبيط بلغت 93.75% إزاء العزلات الفطرية ScE1، ScE2، ScE4 وScC2، في حين أعطت نسب تثبيط بلغت 92.12% و88.75% إزاء العزلتين الفطريتين ScE3 وScC1، على التوالي. كما حققت العزلة البكتيرية BC9 المعزولة من ترب مزروعة بنباتات خيار أعلى نسب تثبيط (84.25%) لجميع عزلات الفطر ما عدا العزلة ScE1، وتلتها العزلة البكتيرية BE5 التي حققت أعلى نسب تثبيط (93.75%) للعزلات الفطرية ScE1، ScE2 وScC2 في حين تراوحت نسب التثبيط للعزلات الفطرية ScE4، ScC2 وScE3 ما بين 80.5%–90.87%. وتفاوتت باقي عزلات البكتيريا في مدى كفاءتها في نسب تثبيط الفطر والتي تراوحت مالا بين 0%–93.75%. وربما يعود سبب اختلاف كفاءة عزلات البكتيريا في خفض نمو عزلات الفطر الممرض إلى اختلاف مقدرتها على إنتاج المواد الأيضية الثانوية وإنتاج الأنزيمات المحلّلة لجدران خلايا الفطر مثل Chitinaese، Proteases وB-1,3-glucanse والمضادات حيوية والمركبات العضوية وسيانيد الهيدروجين، فضلاً عن تنافس البكتيريا مع الفطر الممرض على المواد الغذائية والحيّز (Babu *et al.*, 2015؛ Hernandez-Leon *et al.*, 2015)، فضلاً عن انتاج البكتيريا لعدد من المركبات المضادة لمسببات الأمراض الفطرية مثل Pyrolnitrin، Phenazines، Siderophores و2.4-diacetylphoroglucinol (Compant *et al.*, 2005). وتتفق هذه النتائج مع ما ذكره Gupta *et al.* (2006) بأن للبكتيريا *P. aeruginosa* مقدرة على تثبيط نمو الغزل الفطري ومنع تكوين الأجسام الحجرية للفطر الممرض *S. sclerotioum* في المختبر، إذ

ظهرت الخيوط الفطرية تحت المجهر متحللةً ومجزأة وذات تشوهات نتيجة فعالية البكتيريا في إنتاج أنزيم Chitinaese الذي يحلل جدران خلايا الفطر. وذكر الحلبوسي (2016) أنّ للبكتيريا *P. aeruginosa* تأثير تثبيطي لنمو الفطر الممرض*S. sclerotioum* وتكوين الأجسام الحجرية في المختبر. كما اتفقت النتائج مع ما تحصل عليه التميمي (2019) بأنّ البكتيريا*P. fluorescens* قد أحدثت تأثيراً معنوياً في نمو عزلة الفطر الممرض *S. sclerotioum* المسبب لمرض العفن الأبيض على نباتات الباذنجان، حيث بلغت نسبة التثبيط 75.92%. وعلاوةً على ذلك، اتفقت نتائجنا مع ما وجده Abdullah *et al.* (2008) والذين استعملوا عزلتين من البكتيريا *B. amyloliquefaciens* التي أثبتت كفاءتها في تثبيط نمو الفطر ومنعت تكون الأجسام الحجرية. وجاءت النتائج متوافقة أيضاً مع ما حصل عليه Rostami *et al.* (2013) عند استعمال البكتيريا *B. amyloliquefaciens* كعامل حيوي في تثبيط الفطر *S. sclerotioum* المسبب لمرض العفن الأبيض على الخيار. وقد أشار عدد من الدراسات إلى فعالية أنواع من البكتيريا *Bacillus* sp. و*Pseudomonas* sp. في تثبيط نمو الفطر *S. sclerotioum* المسبب لمرض العفن الأبيض (Fernando *et al.*, 2007؛ Tozlu *et al.*, 2016).

التشخيص الجزيئي لعزلات البكتيريا باستعمال تقنية تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل (PCR)

أظهرت نتائج التشخيص الجزيئي بواسطة تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل للعزلات البكتيرية التي تم عزلها من ترب بيوت بلاستيكية مزروعة بنباتات باذنجان وخيار أن سلسلة الحامض النووي DNA التي تمّ تضخيمها للعزلة البكتيرية BE6 تعود إلى بكتيريا *Alcaligenes faecalis* في حين أنّها تعود في العزلات BC9 وBC4 إلى البكتيريا *Bacillus amyloliquefaciens* و*Bacillus subtilis*، على التوالي، كما أن العزلات BE2 وBE5 تعود إلى البكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* و*P. mendocina*، على التوالي.

جدول 2. العزلات البكتيرية التي جمعت في هذه الدراسة وتأثيرها في النسبة المئوية لتثبيط بعض عزلات الفطر الممرض *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary.

Table 2. Bacterial isolates collected in this study and their effect on inhibition rate of some isolates of the pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary.

رمز العزلة Isolate code	نوع المحصول Type of crop	مكان الجمع	ion site	عزلات الفطر * Fungal isolates					
				ScE1	ScE2	ScE3	ScE4	ScC1	ScC2
BE1	باذنجان Eggplant	ابي غريب		93.75	93.75	93.75	93.75	93.75	93.75
BE2	باذنجان Eggplant	ابي غريب		93.75	93.75	92.08	93.75	88.75	93.75
BE3	باذنجان Eggplant	الجادرية/جامعة بغداد	versity of Baghdad	80.83	61.67	58.58	66.67	82.50	68.33
BE4	باذنجان Eggplant	الجادرية/جامعة بغداد	versity of Baghdad	92.08	62.08	60.83	63.33	89.17	60.00
BE5	باذنجان Eggplant	الجادرية/جامعة بغداد	versity of Baghdad	93.75	93.75	88.75	90.83	90.42	93.75
BE6	باذنجان Eggplant	اليوسفية		93.75	93.75	93.75	93.75	93.75	93.75
BE7	باذنجان Eggplant	اليوسفية		85.00	64.17	58.75	63.75	62.92	85.83
BE8	باذنجان Eggplant	المدائن		86.25	50.00	57.50	69.58	48.33	75.83
BE9	باذنجان Eggplant	المدائن		93.75	71.67	65.83	83.33	72.08	72.08
BC1	خيار Cucumber	الجادرية/جامعة بغداد	versity of Baghdad	24.17	11.25	29.58	27.92	18.33	17.08
BC2	خيار Cucumber	الجادرية/جامعة بغداد	versity of Baghdad	58.33	55.42	81.19	72.08	80.00	66.67
BC3	خيار Cucumber	الجادرية/جامعة بغداد	versity of Baghdad	35.00	36.67	24.17	25.00	26.58	21.25
BC4	خيار Cucumber	ابي غريب		83.75	69.58	56.25	81.25	67.50	58.75
BC5	خيار Cucumber	ابي غريب		88.75	7.50	24.17	61.67	64.33	0.00
BC6	خيار Cucumber	اليوسفية		39.17	36.25	48.33	37.50	47.08	42.08
BC7	خيار Cucumber	اليوسفية		60.00	67.92	68.75	62.08	62.92	86.25
BC8	خيار Cucumber	المدائن		75.42	77.92	84.17	76.67	86.25	80.42
BC9	خيار Cucumber	المدائن		84.17	93.75	93.75	93.75	93.75	93.75
الشاهد Control				0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

* ScE = عزلة الفطر الممرض معزولة من الباذنجان، ScC = عزلة الفطر الممرض معزولة من الخيار.
أقل فرق معنوي عند مستوى احتمال 5% لعزلات لبكتيريا= 3.81، لعزلات الفطر= 2.14 ولتفاعل البكتيريا × الفطر =9.33.

* ScE= isolates of pathogenic fungi isolated from eggplant, ScC= isolates of pathogenic fungi isolated from cucumber.
LSD at P=0.05 for bacterial isolates=3.81, for fungal isolates=2.14 and for the interaction bacteria x fungi = 9.33.

أظهرت نتائج تحليل التتابع النيكلوتيدي للقطع المجينية المُضخَّمة للعزلات البكتيرية BE6، BC9، BC4، BE2 وBE5 باستعمال برنامج BioEdit إلى أنها تعود للبكتيريا *Alcaligenes faecalis*، *Bacillus amyloliquefaciens*، *Bacillus subtilis*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Pseudomonas mendocina*، على التوالي، وبنسبة تطابق 99–100% مع العزلات العالمية الموجودة في بنك الجينات العالمية (NCBI)، وتمّ ايداع تسلسل القواعد الآزوتية لكلٍ من بكتيريا *Alcaligenes faecalis*، *Bacillus amyloliquefaciens*، *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas aeruginosa* في بنك الجينات تحت رقم الانضمام MZ436922، MZ436923، MZ436921 وMZ436920، على التوالي (جدول 3).

جدول 3. أسماء العزلات المُشخَّصة في الدراسة وأرقامها التسلسلية وتشابهها مع العزلات العالمية.

Table 4. Names and accession number of isolates identified in this study and their similarity with the world isolates.

نسبة التشابه % Similarity %	أرقام العزلات المرجعية (العالمية) Reference isolate numbers	الاسم والرقم التسلسلي للعزلات المشخصة Name and accession number of the identified isolates
99%	KF977857.1	*Pseudomonas aeruginosa MZ436920.1*
99%	MT588731.1	*Bacillus subtilis MZ436921.1*
99%	LC499775.1	*Pseudomonas mendocina* لم يتم ايداعها
99%	FJ151631.1	*Alcaligenes faecalis MZ436922.1*
100%	MF138127.1	*Bacillus amyloliquefaciens MZ436923.1*

تحديد التخفيفات الفعالة

أظهرت النتائج أن أعلى تخفيف فعال في تثبيط نمو الفطر الممرض *Alcaligenes faecalis*، الـ كان 10^{-7} لكلٍ من بكتيريا *P. aeruginosa* و *P. mendocina* و10^{-6} للبكتيريا *B. subtilis* و*B. amyloliquefaciens*.

Abstract

Al-Kubaisy, A.K.A. and H.H. Al-Juboor. 2022. Evaluation of Inhibition Efficiency of Some Bacteria Isolated from Greenhouse Soils on the Growth of the Pathogenic Fungus *Sclerotinia sclerotiorum* that Causes White Rot Disease on Vegetables in the Laboratory. Arab Journal of Plant Protection, 40(2): 140-147. https://doi.org/10.22268/AJPP-40.2.140147

This study aimed to isolate beneficial bacteria from the soil of plastic houses planted with eggplant and cucumber at different locations of Baghdad Governorate and characterize them molecularly in addition to determining their antagonistic ability to inhibit six isolates of the pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, the causal agent of white rot disease. The isolation results showed that 18 different bacterial isolates were obtained from several fields in Baghdad governorate. Bacterial isolates showed antagonistic ability towards six isolates of the pathogenic fungus *S. sclerotiorum* (ScE1, ScE2, ScE3, ScE4, ScC1 and ScC2), and the inhibition rate ranged between 84.25 and 93.75%. The two bacterial isolates BE1 and BE6 excelled in plastic houses grown with eggplant plants, and the inhibition rate of the fungal pathogen reached 93.75%. Whereas, the bacterial isolate BC9 isolated from soils planted with cucumber plants achieved the highest inhibition rate of all fungal isolates, except isolate ScE1, which reached 84.25%. Bacterial isolates were identified molecularly and they were registered in the GenBank under accession numbers MZ436922, MZ436923, MZ436921 and MZ436920 for the isolates of *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa*, respectively.

Keywords: *Sclerotinia sclerotiorum*, biological control, molecular identification, eggplant.

Affiliation of authors: *A.K.A. Al-Kubaisy* and H.H. Al-Juboor, Department of Plant Protection, College of Agricultural Engineering Sciences, University of Baghdad, Iraq. *Email of corresponding author: abdullah.kamel1204a@coagri.uobaghdad.edu.iq*

المراجع

التميمي، سماح كامل مطشر. 2019. تقييم فعالية بعض المستخلصات النباتية والعوامل الأحيائية في مكافحة الفطر *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) De Bary مسبب مرض العفن الأبيض على الباذنجان. رسالة ماجستير، قسم تقنيات المقاومة الأحيائية، كلية التقاني-المسيب، جامعة الفرات الاوسط التقنية، العراق. 97 صفحة.

*[**El-Tamimi, S.K.M.** 2019. Evaluation of the effectiveness of some plant extracts and biological agents for the control of Sclerotinia sclerotiorum (Lib) De Bary, the causal agent of eggplant white rot. MSc Thesis, Biological Control Technology Department, Faculty of Technology-Mosayeb, Technology University of Central Furat, Iraq. 97 pp. (In Arabic)].*

الجهاز المركزي للإحصاء مديرية الإحصاء الزراعي. 2021. إنتاج المحاصيل والخضراوات حسب المحافظات لسنة 2020. وزارة التخطيط، الجهاز المركزي للإحصاء، العراق. 59 صفحة.

*[**Central Statistical Organization Agricultural Statistics Directorate.** 2021. Crops and vegetables production by governorates for the year 2020. Ministry of Planning - Central Statistical Organization, Iraq. 59 pp. (In Arabic)].*

References

Abdullah, M.T., Y.A. Nida and P. Suleman. 2008. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. Crop Protection, 27(10): 1354-1359. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.05.007

Al-Juboory, H.H. and H.B Al-Hadithy. 2021.Evaluation of Chitosan and Salicylic Acid to Induce Systemic Resistance in Eggplant against under Plastic *Botrytis cinerea* House Conditions, Indian Journal of Ecology, 48(13): 213-216.

Almammory, M.K.N. and A.A.H. Matloob. 2019. Efficiency of *Trichoderma harzianum* and bio-fertilizer bokashi and salicylic acid to control of fungi causing eggplant damping off disease. Plant Archives, 19(1): 73-82.

Babu, A.N., S. Jogaiah, S-i. Ito, A.K. Nagaraj and L.P. Tran. 2015. Improvement of growth, fruit weight and early blight disease protection of tomato plants by rhizosphere bacteria is correlated with their beneficial traits and induced biosynthesis of antioxidant Peroxidase and Polyphenol oxidase. Plant Science, 231: 62-73. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.11.006

Barros, D.C.M., I.C.B. Fonseca, M.I. Balbi-Peña, S.F. Pascholati and D.C. Peitl. 2015. Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* and white mold of soybean using saprobic fungi from semi-arid areas of Northeastern Brazil. Summa Phytopathologica, 41(4): 251-255. https://doi.org/10.1590/0100-5405/2086

Clark, F.E. 1965. Agar-plate method for total microbial count. Pages 1460-1466. In: Methods of Soil Analysis- part 2. A.G. Norman (ed.). American Society of Agronomy. Madison, Wisconson, USA. 1572 pp. https://doi.org/10.2134/agronmonogr9.2.c48

Compant, S., B. Duffy, J. Nowak, C. Clement and E.A. Barka. 2005. Use of plant growth promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. Applied and Environmental Microbiology Journal, 71(9): 4951-4959. https://doi.org/10.1128%2FAEM.71.9.4951-4959.2005

Eksteen, D., J.C. Pretorius, T.D. Nieuwoudl and P.C. Zietsman. 2001. Mycelial growth inhibition of plant pathogenic fungi by extracts of South African plan species. Annals of Applied Biology, 139(2): 243-249. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2001.tb00400.x

Fatima, Z., M. Saleemi and M. Aslam. 2009. Anti-fungal activity of plant growth promoting rhizobacteria isolates against *Rhizoctonia solani* in wheat. African Journal of Biotechnology, 8(2): 219-225.

Fernando, W.G.D., S. Nakkeeran, Y. Zhang and S. Savchuk. 2007. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by Pseudomonas and Bacillus species on canola petals. Crop Protection, 26(2): 100-107. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.04.007

حسين، صفاء نعمت. 2014. بعض أوجه التكامل في مقاومة مرض تعفن جذور وقواعد سيقان الرقي. رسالة ماجستير، قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة بغداد، العراق. 129 صفحة.

[Hussein, S.N. 2014. Some aspects of complementarity in resisting the disease of rotting roots and bases of the stalks of sophistication. MSc Thesis, Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Baghdad, Iraq. 129 pp .(In Arabic)]

الحلبوسي، حسين محمود جاسم. 2016. المكافحة الأحيائية للفطر *Sclerotinia sclerotiorum* المسبب لمرض العفن الأبيض على نبات الزينة الرانتكيل *Ranunculus asiaticus* L. رسالة ماجستير، قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة بغداد، العراق. 110 صفحة.

[Al-Halbousi, H.M.J. 2016. Biological control of the fungus Sclerotinia sclerotiorum that causes white rot on the ornamental plant Ranunculus asiaticus L. MSc Thesis, Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Baghdad, Iraq .110 pp.(In Arabic)].

الدليمي، شاكر اسماعيل عيد. 2019. تقويم كفاءة اوكسيد المغنيسيوم النانوي وبعض العوامل الأحيائية في استحثاث المقاومة الجهازية في نبات الطماطة ضد الفطر *F. oxysporum* f.sp *lycopersici* تحت ظروف البيت البلاستيكي. رسالة ماجستير، قسم وقاية النبات، كلية علوم الهندسة الزراعية، جامعة بغداد، العراق. 122صفحة.

[Al-Dulaimi, S.I.E. 2019. Evaluation efficacy MgO nanoparticles and some bio-agents to induce systemic resistance in tomato against F. oxysporum* f.sp. *lycopersici under Plastic house. MSc Thesis, Department of Plant Protection, College of Agricultural Engineering Sciences, University of Baghdad, Iraq. 122 pp. (In Arabic)].

الفلوجي، صبا عبد الهادي كاظم. 2019. دراسة جزيئية ومكافحة حياتية لبكتيريا *Pseudomonas syringae* المسبب لمرض التبقع الزاوي على الخيار. أطروحة دكتوراه، قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة الكوفة، العراق. 218 صفحة.

[Al-Fallooji, S.A.K. 2019. Moleculer and Bio - control study of Pseudomonas syringe causing angular leaf spot in cucumber. PhD thesis, Department of plant protection, College of Agriculture, University of Kufa, Iraq. 218 pp. (In Arabic)].

مطلوب، عهد عبد علي هادي. 2012. تحديد مسببات تعفن جذور وقواعد سيقان الفاصوليا وتقويم فعالية بعض عوامل المكافحة الأحيائية في مقاومتها. اطروحة دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة بغداد، العراق. 185 صفحة.

[Matloob, A.A.A.H. 2012. Determining the causes of bean root and base rot and evaluating the effectiveness of some biological control agents in their resistance. PhD thesis. College of Agriculture, University of Baghdad, Iraq. 185 pp. (In Arabic)].

Abdel–Kader, M.M., N.S. El-Mougy, M.D.E. Aly and E.I. Embaby. 2012. Occurrence of Sclerotinia foliage blight disease of cucumber and pepper plants under protected cultivation system in Egypt II. Bio-control measures against *Sclerotinia* spp. in Vitro. Advances in Life Sciences, 1(2): 59-70. https://doi.org/10.5923/j.als.20120204.02

Leogrande, R., O. Lopedota, C. Vitti, D. Ventrella and F. Montemurro. 2014. Effects of irrigation volumes and organic fertilizers on eggplant grown in Mediterranean environment. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science, 64(6): 518-528. https://doi.org/10.1080/09064710.2014.927526

Olanrewaju, O.S., B.R. Glic and O.O. Babalola. 2017. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 33(11): 197. https://dx.doi.org/10.1007%2Fs11274-017-2364-9

Pawsey, R.K. 1974. Techniques with bacteria. Hutchinson Educational, London. 160 pp

Peltier, A.J., C.A. Bradley, M.I. Chilvers, D.K. Malvick, S.M. Daren, K.A. Wise and P.D. Esker. 2012. Biology, yield loss and control of Sclerotinia stem rot of soybean. Journal of Integrated Pest Management, 3(2): 1-7. https://doi.org/10.1603/IPM11033

Rabeendran, N., E.E. Jones and A. Stewart, 1998. Isolation and in vitro screening of soil fungi for biological control of *Sclerotinia sclerotiorum*. Proceedings of the 51st New Zealand Plant Protection Conference, August 12, New Zealand, 51: 102-106.

Rostami, S., M. Maleki and D. Shahriari. 2013. The Use of *Bacillus Amyloliquefaciens* to Control of Sclerotinia Stem Rot (*Sclerotinia Sclerotiorum*) of Cucumber. International Journal of Farming and Allied Sciences, 2(22): 965-970.

Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Tozlu, E., P. Mohammadi, M. Senol Kotan, H. Nadaroglu and R. Kotan. 2016. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, the causal agent of white mould disease in red cabbage, by some bacteria. Plant Protection Science, 52(3): 188-198. https://doi.org/10.17221/96/2015-PPS

Fortunati, E., A. Mazzaglia and G.M. Balestra. 2019. Sustainable control strategies for plant protection and food packaging sectors by natural substances and novel Nano technological approaches Journal of the Science of Food and Agriculture, 99(3): 986-1000. https://doi.org/10.1002/jsfa.9341

Gupta, C.P., B. Kumar, R.C. Dubey and D.K. Maheshwari. 2006. Chitinase-mediated destructive antagonistic potential of *Pseudomonas aeruginosa* GRC1 against *Sclerotinia sclerotiorum* causing stem rot of peanut. BioControl, 51(6): 821-835. https://doi.org/10.1007/S10526-006-9000-1

He, D.C., J. Zhan. and X. Lian-Hui. 2016. Problems, challenges and future of plant disease management: from an ecological point of view. Journal of Integrative Agriculture, 15(4): 705–715. https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61300-4

Hernandez-Leon, R., D. Rojas-Solis, M. Contreras-Perez, M.C. Orozco- Mosqueda, L.L. Macias-Rodriguez, H. Reyes-de la Cruz, E. Valencia-Cantero and G. Santoyo. 2015. Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. Biological Control, 81: 83–92. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.11.011

Jangid, K., M.A. Williams, A.J. Franzluebbers, J.S. Sanderlin, J.H. Reeves, M.B. Jenkins, D.M. Endale, D.C. Coleman and W.B. Whitman. 2008. Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems. Soil Biology and Biochemistry, 40(11): 2843-2853. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.07.030

Kifle, M.H. and M.D. Laing. 2016. Isolation and screening of bacteria for their diazotrophic potential and their influence on growth promotion of maize seedlings in greenhouses. Frontiers in Plant Science Journal, 6: 1-8. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01225

Received: January 21, 2022; Accepted: March 12, 2022

تاريخ الاستلام: 2022/1/21؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2022/3/12