تقييم كفاءة عزلات محلية مختلفة من بكتيريا *Bacillus subtilis* في استحثاث المقاومة ضدّ فيروس الذبول المتبقع على الطماطم/البندورة في نباتات الفلفل/الفليفلة

حميد حمود علي*، علاء حميد محمد ورغد نايف مهيدي

قسم وقاية النبات، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل، العراق

* البريد الإلكتروني للباحث المراسل: dr.hameed@uomosul.edu.iq

الملخص

علي، حميد حمود، علاء حميد محمد ورغد نايف مهيدي. 2023. تقييم كفاءة عزلات محلية مختلفة من بكتيريا *Bacillus subtilis* في استحثاث المقاومة ضد فيروس الذبول المتبقع على الطماطم/البندورة في نباتات الفلفل/الفليفلة. مجلة وقاية النبات العربية، 41(1): 71–76.
https://doi.org/10.22268/AJPP-41.1.071076

في محاولةٍ للمكافحة الحيوية لفيروس الذبول المتبقع للطماطم/البندورة *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) والحدّ من الخسائر التي يسببها في محصول الفلفل/الفليفلة، تمّ استخدام ثلاث عزلات محلية من بكتيريا *Bacillus subtillis* (العزلة B-T المعزولة من حقول الطماطم/البندورة، والعزلة B-G المعزولة من تربة الحدائق، والعزلة B-W المعزولة من حقول الحنطة/القمح). تمّ تشخيص الفيروس بالاعتماد على الأعراض على نباتات الفلفل/الفليفلة واختبار الإليزا المصلي بالاحتواء المزدوج للأجسام المضادة (DAS-ELISA). تمّت معاملة بذور الفلفل/الفليفلة بمعلق العزلات الثلاث لبكتيريا *Bacillus subtillis* الحاوي على 10^8 وحدة مستعمرة بكتيرية/مل لمدة 24 ساعة. جفّفت البذور على ورق ترشيح، وزرعت تحت ظروف البيت البلاستيكي. أظهرت النتائج أن معاملة بذور الفلفل/الفليفلة بعزلات بكتيريا *B. subtillis* أدّت إلى تحسين معايير النمو (ارتفاع النبات، عدد الأوراق، الوزن الجاف للمجموع الخضري) وكذلك إلى اختفاء أعراض الإصابة بالفيروس، وتثبيطه في النباتات الناتجة من البذور المعاملة، وأعطت العزلة البكتيرية T– أفضل النتائج، وتلتها العزلة B-G، ثم العزلة B-W مقارنة بالنباتات غير المعاملة.

كلمات مفتاحية: فيروس الذبول المتبقع للطماطم/البندورة TSWV، بكتيريا *Bacillus subtillis*، الفلفل/الفليفلة، مقاومة.

المقدمة

تعدّ نباتات الفلفل/الفليفلة من محاصيل الخضر المهمة اقتصادياً وطبياً عالمياً لما تملكه ثمارها من مضادات أكسدة، بالإضافة إلى تناولها طازجةً أو مع السلطات وغيرها من التحضيرات الغذائية. يتعرض الفلفل/الفليفلة أثناء نموه للعديد من المسببات المرضية الفطرية، البكتيرية، النيماتودية والفيروسية، وبدأت هذه الأخيرة بالانتشار على هذا المحصول بكثرة لكونه حساساً للإصابة بها إذ يوصف نبات الفلفل/الفليفلة بأنه "لاقط للفيروسات". ويعدّ فيروس الذبول المتبقع للطماطم/البندورة (TSWV) *Tomato spotted wilt virus* التابع لجنس *Orthotospovirus* من الفيروسات المهمة اقتصادياً والتي تنتشر في جميع أنحاء العالم، ولاسيما على العائلة الباذنجانية، محدثاً خسائر اقتصادية كبيرة وفقداً في الحاصل كمّاً ونوعاً، إذ صنّف هذا الفيروس في المرتبة الثانية عالمياً من بين أهم عشرة فيروسات نباتية تسبب أضراراً اقتصادية (Scholthof *et al.*, 2011). يصيب هذا الفيروس معظم أصناف الفلفل/الفليفلة (*Capsicum annuum*)، ويكون مرافقاً لأعراض شديدة عليها (Zitter & Murphy, 2009)، حيث تظهر على الأوراق الحديثة للنباتات المصابة بـ TSWV بقعاً صغيرة صفراء مخضرة شبه شفافة يتحدّد شكلها بالعروق الصغيرة للورقة وتتطور إلى موزاييك أو تبرقش أصفر، وتؤدي الإصابة الشديدة إلى تشوه الأنصال وتقزم النباتات وقصر سلامياتها، وتأخذ الأوراق نصف الحجم الطبيعي، وتعطي أزهاراً قليلة وينتج عنها عدد قليل من الثمار (مكوك وآخرون، 2008). وبسبب عدم جدوى المبيدات الكيميائية في مكافحة الفيروسات فضلاً عن خطورتها على الإنسان وسلامة البيئة، فقد أجريت عدّة محاولات لمكافحة الفيروس بواسطة المستخلصات النباتية رشاً على المجموع الخضري (قاسم وآخرون، 2006)، وكذلك تمّ اللجوء إلى استحثاث المقاومة الجهازية ضدّ الإصابة الفيروسية باستعمال بعض المركبات الكيميائية مثل البايون والرايبوفلافين (Anfoka, 2000؛ علي وأحمد، 2018). لوحظ خلال العقدين الأخيرين تزايد الاهتمام بالأحياء المجهرية التي تعيش في المنطقة المحيطة بجذور العديد من النباتات، حيث تهيئ افرازات جذور هذه النباتات وسطاً ملائماً لنموها وفي الوقت نفسه فإن البكتيريا تفرز بعض المركبات التي تحسن من صفات النمو في النباتات

https://doi.org/10.22268/AJPP-41.1.071076
© 2023 الجمعية العربية لوقاية النبات Arab Society for Plant Protection

وتحميها من الإصابة بالعديد من المسببات المرضية من خلال المنافسة على المواد العضوية للنمو أو عن طريق إفراز مضادات لهذه المسببات. وقد تمّ عزل العديد من هذه البكتيريا واختبارها، وكان أكثرها انتشاراً كلّ من البكتيريا *Pseudomonas fluorescens* (Leeman *et al.*, 1995؛ Liu *et al.*, 1995)، و*Bacillus* spp. (Kloepper *et al.*, 1999؛ Murphy *et al.*, 2003).

ونظراً لانتشار فيروس الذبول المتبقع للطماطم/البندورة على نباتات الفلفل/الفليفلة في حقول المزارعيين والبيوت البلاستيكية بمحافظة نينوى، العراق، فقد أجريت هذه الدراسة بهدف تقييم كفاءة عزلات محلية من بكتيريا *Bacillus subtillis* في محاولة لمكافحة هذا الفيروس.

مواد البحث وطرائقه

زراعة نباتات الاختبار

زرعت بذور نباتات الفلفل/الفليفلة والطماطم/البندورة كنباتات اختبار حيوي في تربة مزيجية معقمة في أصص بلاستيكية (10×10 سم) داخل البيت البلاستيكي التابع لقسم وقاية النبات. فردت النباتات بمرحلة 3 أوراق إلى أصص أخرى، وحفظت تحت ظروف البيت البلاستيكي.

جمع العينات المصابة

جُمعت أوراق من نباتات الفلفل/الفليفلة والطماطم/البندورة والتي ظهرت عليها أعراض فيروسية مثل الموزاييك، تقزم وتشوه للأوراق، وذلك من حقول مكشوفة وبيوت بلاستيكية من مناطق مختلفة في محافظة نينوى. سحقت عينات الأوراق في محلول منظم فوسفاتي (0.01 مولر، وحموضة 7.0) وبنسبة 1:3 غ/مل ضمن هاون خزفي.

التشخيص المصلي والحيوي/البيولوجي

استعمل المستخلص المحضر مسبقاً لأغراض التشخيص الحيوي بتلقيح نباتي الطماطم/البندورة (*Solanum lycopersicum*) والفلفل/الفليفلة (*Capsium annum*)، والاختبار المصلي الإليزا DAS-ELISA، باستعمال أمصال مضادة متعددة النسيلة لفيروس TSWV مجهزة من قبل شركة BIOREBA السويسرية، وحسب البروتوكول المرفق من الشركة المنتجة. تمّ تقييم نتائج اختبار الإليزا لونياً وطيفياً وذلك بفحص حفر المعايرة لطبق الإليزا الحاوية على العينات بواسطة جهاز المطياف Spectrophotometer UV-9200 عند طول موجة 405 نانومتر. سجلت قيم الامتصاصية الضوئية (OD) لكل عينة واستخرج الوسط الحسابي $\overline{X}$ والانحراف القياسي (Sd) لها، وتمّ الاعتماد على المعادلة القطعية في تحديد العينات المصابة: Cut-off = ($\overline{X}$ – 3Sd + 10%)

تحضير لقاح بكتيريا *B. subtillis*

تمّ الحصول على البكتيريا من قسم وقاية النبات، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل. نُمّيت البكتيريا على الوسط الغذائي KB السائل المكون من 20 غ Peptone و 2.5 غ K_2HPO_4 و 6 غ $MgSO_4$ و 15 مل جليسرول في ليتر من الماء المقطر. عُقّم الوسط بالاتوكلاف عند حرارة 121°س وضغط 1.5 كغ/سم^2 وحضنت بدرجة حرارة 25±2°س لمدة 24 ساعة.

تحضير تخفيفات من بكتيريا *B. subtillis*

حُضّرت سلسلة من تخفيفات من البكتيريا وذلك بأخذ 1 مل من معلق البكتيريا النامية على وسط KB السائل وأضيف إلى 9 مل ماء مقطر معقم في أنبوبة اختبار للحصول على التخفيف 10^{-1}، كررت هذه العملية لغاية الوصول إلى التخفيف 10^{-9}. نقل 1 مل من كلّ تخفيف إلى أطباق بتري قطر 9 سم وصبّ فوقها الوسط KB. حضنت الأطباق عند درجة حرارة 25±2°س لمدة 48 ساعة، وحُسب عدد الخلايا بضرب عدد المستعمرات بمقلوب التخفيف (Clark, 1965).

معاملة بذور الفلفل/الفليفلة بعزلات بكتيريا *B. subtillis*

عقّمت بذور فلفل/فليفلة (80 بذرة) سطحياً بمحلول هيبوكلوريد الصوديوم وبنسبة 1% كلور حر لمدة 3 دقائق، ثم غسلت بالماء المقطر المعقم ونشفت بورق نشاف معقم. غطّست 20 بذرة في معلق كل عزلة من بكتيريا *Bacillus subtillis* بتركيز 10^8 خلية/مل لمدة 24 ساعة، بينما عوملت 20 بذرة أخرى بتغطيسها في الوسط KB السائل لمدة 24 ساعة للمقارنة. زرعت البذور في تربة مزيجية معقمة في أصص معقمة، وتمّت حمايتها من الحشرات بتغطيتها بقماش الموسلين. وكانت المعاملات على النحو الآتي: (أ) بذور معاملة بعزلات البكتيريا (استخدمت في هذه المعاملة ثلاث عزلات محلية B-T، B-G، B-W) فقط؛ (ب) بذور معاملة بالبكتيريا ولُقّحت أوراقها بفيروس الذبول المبقع للطماطم/البندورة بمرحلة الأوراق الأولية (استخدمت في هذه المعاملة ثلاث عزلات محلية B-T، B-G، B-W)؛ (جـ) بذور معاملة بوسط النمو السائل الخالي من البكتيريا كمقارنة؛ (هـ) بذور معاملة بوسط النمو السائل الخالي من البكتيريا ولُقّحت أوراقها بفيروس الذبول المبقع للطماطم/البندورة بمرحلة الأوراق الأولية. قلعت النباتات بعد 20 يوم من عملية التلقيح، وتم حساب عدد أوراق كل نبات على حدة، ارتفاع النبات، أوزان النباتات بواسطة ميزان حساس، بعد ذلك تمّ تجفيف النباتات وإعادة وزنها لاستخراج الوزن الجاف لكل نبات. سجّلت النتائج واستخرجت معدلات أطوال النباتات وأوزانها ولكل معاملة، وحلّلت النتائج احصائياً بالاعتماد على برنامج التحليل الاحصائي Genestat discovery الإصدار الرابع، واختبرت

الفروق بين المتوسطات حسب اختبار أقل فرق معنوي (LSD) عند مستوى احتمال 0.05.

النتائج والمناقشة

الإختبارات الحيوية/البيولوجية لتشخيص الفيروس المدروس

تبين من خلال تجارب الاختبارات الحيوية التي أجريت على النباتات الكاشفة للفيروس المسبب لأعراض التبقعات والموزاييك والاصفرار والموت الموضعي على النباتات (الطماطم/البندورة والفلفل/الفليفلة) والتي جمعت من عدة حقول، بأن الفيروس المسؤول عن هذه الأعراض هو فيروس الذبول المتبقع للطماطم/البندورة، حيث ظهرت استجابات مرضية متمثلة بأعراض فيروسية على النباتات الكاشفة تنطبق مع ما وصف في كثير من المراجع، حيث ظهرت الأعراض على النباتات الكاشفة (نباتات الفلفل/الفليفلة الملقحة بعصير مستخلص من أوراق تحوي أعراضاً فيروسية) على هيئة بقع حلقية مصفرة على الأوراق تطورت إلى أشكالٍ مختلفة من الخطوط الصفراء والبقع المتماوتة، كما امتازت النباتات المصابة بكثرة تفرعاتها، وظهرت تلك الأعراض ابتداءً من حواف الأوراق متجهة نحو المركز، وينطبق هذا مع ما يسببه هذا الفيروس من أعراض على نباتات الفلفل/الفليفلة (Halabi *et al.*, 2014؛ Saeed & Ali, 2020)، أما الأعراض على نباتات الطماطم/البندورة فتمثلت بشكل تشوهات وبقع مصفرة مع تنخرات على الأوراق السفلية بالإضافة إلى تلون العروق باللون البرونزي وخصوصاً على سطحها السفلي، وكانت الأوراق أصغر من حجمها الطبيعي وظهرت عليها حلقات متنخرة، وتتشابه هذه الأعراض مع ما نشر سابقاً (Momol *et al.*, 2004).

الاختبار المصلي (الإليزا) لتشخيص الفيروس المدروس

أظهرت نتائج الاختبار المصلي الإليزا (DAS-ELISA) تفاعلاً ايجابياً مع العينات الحاوية على الاعراض وذلك عند استخدام أجسام مضادة متعددة النسيلة متخصصة ضدّ فيروس الذبول المتبقع للطماطم/البندورة. إذ يعدّ اختبار الإليزا ELISA من الاختبارات المصلية الفعالة للكشف عن الفيروسات النباتية، بما يوفر من حساسية عالية في الكشف عن التراكيز الفيروسية المنخفضة (بحدود 1–10 نانوغرام/مل) في النسيج النباتي، حيث ذكر Lannelli *et al.* (1996) بأنه تمّ الكشف عن فيروس موزاييك الخيار (CMV) بتركيز 2.5 نانوغرام/مل باختبار DAS-ELISA، بينما أشار (Cherif & Spire, 1983) بأن اختبار الإليزا يمتلك حساسية تزيد بـ 5000 مرة عن حساسية اختبار الانتشار المزدوج في الآجار في الكشف عن فيروس التقزم الشجيري للطماطم/البندورة (TBSV) (علي وأحمد، 2018).

تأثير نقع بذور الفلفل/الفليفلة بمعلق بكتيريا *B. subtillis* في ارتفاع النبات

أظهرت النتائج (جدول 1) بأن معاملة بذور الفلفل/الفليفلة بالعزلة B-T لبكتيريا *B. subtillis* أدّت إلى زيادة في أطوال النباتات وصلت إلى 45 سم/نبات مقارنة بالنباتات غير المعاملة بالبكتيريا وغير المعداة بالفيروس والتي كانت 29 سم، تلتها المعاملة بالعزلة البكتيرية B-G حيث وصلت أطوال النباتات إلى 43 سم/نبات، وكانت الفروق معنوية بينهما وبين المعاملة بالعزلة البكتيرية B-W إذ وصلت اطوال النباتات فيها إلى 35 سم. سبّبت العدوى بفيروس الذبول المتبقع للطماطم/البندورة على نباتات الفلفل/الفليفلة خفضاً في ارتفاع النبات مقارنة بتلك التي عوملت بذورها بالبكتيريا ثم لقحت بالفيروس لاحقاً، حيث كانت أطوال النباتات المعداة بالفيروس 21 سم مقارنة بـ 33 سم في النباتات الناتجة من بذور معاملة بالبكتيريا *Bacillus subtillis* (العزلة B-T) وأعديت لاحقاً بالفيروس، ولم تلاحظ فروق معنوية بين المعاملة بالعزلات الثلاث مقارنة بمعاملة العدوى بالفيروس، إذ وصلت أطوال النباتات المعاملة بالعزلات B-G و B-W والتي أصيبت بالفيروس إلى 30 سم لكل منها، على التوالي.

تأثير نقع بذور الفليفلة بمعلق بكتيريا *B. subtillis* في عدد الأوراق

بيّنت النتائج (جدول 1) أن معاملة البذور بالبكتيريا *Bacillus subtillis* أدت إلى زيادة في عدد الأوراق مقارنة بعدد الأوراق في النباتات غير المعاملة ولم تُعدَ بالفيروس، حيث كانت أعداد أوراق النباتات التي عوملت بذورها بالعزلة B-G للبكتيريا *B. subtillis* 11 ورقة/نبات مقارنة بـ 7.6 ورقة/نبات في النباتات غير المعاملة بالبكتيريا وغير المعداة بالفيروس. ووجد أن عدوى نباتات الفلفل/الفليفلة بفيروس الذبول المبقع للطماطم/البندورة أدّت إلى خفض عدد أوراق النباتات مقارنة بتلك النباتات المعاملة بالبكتيريا والملقحة بالفيروس، حيث وصل عدد الأوراق المصابة بالفيروس إلى 6.3 ورقة/نبات، قابلها 8 ورقة/نبات في النباتات النامية من بذور معاملة بالبكتيريا تم إعداؤها بالفيروس، ولقد وصلت أعلى معدل لعدد الأوراق عند معاملة النباتات بالعزلة البكتيرية B-G مقارنة بالعزلات البكتيرية الأخرى، وأظهر التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية بينها.

تأثير نقع بذور الفليفلة بمعلق بكتيريا *B. subtillis* في الوزن الجاف للمجموع الخضري

أظهرت النتائج أن معاملة بذور نباتات الفليفلة بعزلات البكتيريا *B. subtillis* أدت إلى زيادة في الوزن الجاف للمجموع الخضري للنباتات، إذ أعطت النباتات النامية من بذور معاملة بالعزلة B-T وزناً جافاً قدره 4.41 غ، تلتها العزلة B-G (3.39 غ)، بينما حققت العزلة B-W المرتبة الثالثة (2.98 غ)، مقارنةً بـ 2.14 غ في النباتات التي لم تعامل بذورها

بالبكتيريا وغير المعداة بالفيروس، بينما بلغت 3.39 و 2.98 غ في العزلتين B-G و B-W، على التوالي. كما أدّت عدوى نباتات الفليفلة بفيروس TSWV إلى خفض الوزن الجاف للمجموع الخضري للنباتات مقارنة بتلك النباتات المعاملة بالبكتيريا والملقحة بالفيروس لاحقاً. إذ تراوح الوزن الجاف في النباتات المعداة بالفيروس بحدود 0.67 غ مقارنة بـ 2.10، 1.75 و 1.70 غ/نبات، على التوالي، في النباتات النامية من بذور معاملة بعزلات البكتيريا B-T، B-G و B-W والمعداة لاحقاً بالفيروس.

يتبين من مجمل النتائج المتحصل عليها بأن للبكتيريا *B. subtillis* تأثير كبير في زيادة نمو النباتات. ولقد أشارت عدة دراسات سابقة إلى كفاءة هذه البكتيريا في تحفيز نمو النباتات، وتقوم PGPR بتحفيز نمو النباتات بطريقة مباشرة وغير مباشرة (العاني وآخرون، 2011). ذكر Idris *et al.* (2004) أن هذه البكتيريا تفرز الجبرلين وإندول حمض الخليك. إن ميكانيكية تحفيز معايير النمو في النباتات بوساطة البكتيريا يكون بأليات مختلفة، ومنها تثبيت النتروجين، إنتاج مادة Sidrophore (المنافس على الحديد)، إذابة المواد غير العضوية مثل الفوسفور وتسهيل امتصاصها من قبل النبات، فضلاً عن إنتاجها للهرمونات مثل الأوكسينات (Lucas García *et al.*, 2004 ؛Han *et al.*, 2001). إن دور بكتيريا *B. subtillis* في مجال المكافحة الأحيائية يتعدى التأثير المباشر على المسببات المرضية ليشمل تحسين ونمو النبات وزيادة جاهزية العديد من العناصر الغذائية لمقدرتها على إنتاج مواد أيضية محفزة لإنبات البذور وتعزيز نمو الجذور وزيادة مقاومة النبات للإجهادات البيئية (Bakker *et al.*, 2003 ؛Kloepper, 2004 ؛Van Loon & Bakkar, 2003). ولقد أشارت العديد من الدراسات إلى إمكانية استخدام هذا النوع من البكتيريا لتحقيق مفهوم الترب المقاومة ذاتياً (الفهد، 2006).

أشارت نتائج اختبار الإليزا إلى وجود تفاعل موجب لمستخلصات عينات من نباتات فلفل/فليفلة معاملة بعوامل استحثاث إحيائية ومعداة بفيروس الذبول المتبقع للطماطم، إذ اعطت معاملة العزلة البكتيرية B-T عند استعمالها بغمر بذور الفلفل بالمعلق البكتيري وبوجود الفيروس أعلى نسبة منع تضاعف لفيروس الذبول المتبقع للطماطم/البندورة، إذ بلغت 81.12%، وكان مقدار الامتصاص (OD) 0.182 مقارنة بقيمة معاملة الشاهد للنباتات المعداة بالفيروس فقط والتي كانت 0.976 تلتها معاملة غمر البذور بالمعلق البكتيري وللعزلتين B-G و B-W وبوجود الفيروس، إذ بلغت نسبة منع تضاعف الفيروس 76.23 و 73.65% وبقيم امتصاص 0.231 و 0.259، على التوالي. وهذا يشير إلى أن وجود البكتيريا المحفزة للنمو في مراحل مبكرة قبل حصول العدوى بالفيروس يوفر الوقت اللازم لها لكي تنمو لتعمل على تحفيز إنتاج مواد تعمل على تحفيز المقاومة الجهازية في النبات ضد الإصابة الفيروسية. ويعتقد أن بعض المركبات المحفزة لا تعمل مباشرة ضد الفيروس ولكنها ربما تعمل على تحفيز إنتاج موادٍ أخرى كالبروتينات والتي تؤثر في إيقاف تضاعف الفيروس (Kandan, 2005 ؛Hull, 2002).

جدول 1. تقويم فعالية معاملة بذور نباتات الفلفل/الفليفلة بعزلات مختلفة من بكتيريا *Bacillus subtillis* والعدوى بفيروس TSWV في بعض معايير النمو ومنع تضاعف الفيروس.

Table 1. Evaluation of the effectiveness of pepper seed treatment with different isolates of *Bacillus subtillis* and infection with Tomato spotted wilt virus (TSWV) on some growth parameters and virus replication inhibition.

قيم امتصاص اختبار الإليزا على الطول الموجي 405 نانومتر بعد 6 أيام من العدوى ELISA O.D. values at 405 nm after 6 days of infection	الوزن الجاف (غ) Dry weight (g)	عدد الأوراق Number of leaves	ارتفاع النبات (سم) Plant height (cm)	المعاملة* Treatment*
0.100	4.41 a	11.0 a	45 a	(B-T) *B. subtillis*
0.098	3.39 b	9.0 a	43 a	(B-G) *B. subtilli*
0.106	2.98 c	10.0 a	35 b	(B-W) *B. subtillis*
0.182	2.10 c	8.0 ab	33 b	TSWV + (B-T) *B. subtillis*
0.231	1.75 d	9.0 a	30 b	TSWV + (B-G) *B. subtillis*
0.259	1.70 d	8.0 ab	30 b	TSWV + (B-W) *B.subtillis*
0.976	0.67 e	6.3 bc	21 c	Control + TSWV
0.069	2.14 d	7.6 bc	29 bc	Control without TSWV
0.013	1.040	3.201	5.661	$LSD_{0.05}$

B-T: معزولة من الطماطم/البندورة، B-G: معزولة من تربة الحدائق، B-W: معزولة من القمح.
جميع القيم في الجدول أعلاه تمثل معدل ثلاث مكررات.
القيم التي يتبعها نفس الأحرف في نفس العامود لا يوجد بينها فرق معنوي عند مستوى احتمال 5%.

B-T: Isolated from tomato, B-G: isolated from garden soil, B-W: isolated from wheat.
Each value in the table represents an average of three replicates.
Values followed by the same letters in the same column are not significantly different at P=0.05.

Abstract

Ali, H.H., A.H. Mohamed and R.N. Mhed. 2023. Efficiency of Different Local Isolates of *Bacillus subtilis* in Inducing Resistance Against Tomato spotted wilt virus in Pepper Plants. Arab Journal of Plant Protection, 41(1): 71-76. https://doi.org/10.22268/AJPP-41.1.071076

The study aimed to try to control Tomato spotted wilt virus (TSWV, genus *Orthotospovirus*) and reduce pepper yield loss by the application of three local isolates of *Bacillus subtillis* (B-T isolated from tomato fields, B-G obtained from garden soil, and B-W isolated from wheat fields). The virus was diagnosed based on symptoms produced on pepper plants and DAS-ELISA test. Pepper seeds were treated with a suspension of *B. subtillis* isolates separately containing 10^8 CFU/ml after 24 hours. Seeds were dried on filter paper and planted in sterilized soil in 30 cm diameter plastic pots, and placed in cages covered with cheese cloth under greenhouse conditions. The results showed that treatment of pepper seeds with *B. subtillis* isolates led to an improvement of growth parameters inducing plant growth (plant height, number of leaves, shoot dry weight, disappearance of virus symptoms, and virus inhibition in treated seed plants as compared to the untreated plants.

Keywords: Tomato spotted wilt virus, *Bacillus* spp., pepper, control.

Affiliation of authors: *H.H Ali*, A.H. Mohamed and R.N. Mhed, Plant Protection Department, College of Agriculture and Forestry, University of Mosul, Iraq. *Email of corresponding author: dr.hameed@uomosul.edu.iq*

References

region. Publication of the Arab Society for Plant Protection. Dar Al-Nahda, Beirut, Lebanon. 631 pp. (In: Arabic)].

Anfoka, G.H. 2000. Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester induces systemic resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum.* Mill cv. Vollendung) to Cucumber mosaic virus. Crop protection, 19(6): 401-405. https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00031-4

Bakker, P.A.H.M., L.X. Ran, C.M.J. Pieterse and L.C. Van Loon. 2003. Understanding the involvement of rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases. Canadian Journal of Plant Pathology 25(1): 5-9. https://doi.org/10.1080/07060660309507043

Cherif, C., D. Spire and M.A. Hasni. 1983. Identification du virus de rabougrissement buissonneux de la tomate (Tomato bushy stunt virus) en Tunisie sur tomate, piment et aubergine: quelques caractéristiques de la souche tunisienne. *Agronomie*, 3(7): 701-706.

Clark, F.E. 1965. Agar-plate method for total microbial count. Methods of Soil Analysis: Part 2 Chemical and Microbiological Properties, 9(2):1460-1466. https://doi.org/10.2134/agronmonogr9.2.c48

Halabi, M.H., E. Akel and I. Ismail .2014. Survey of Tomato spotted wilt Tospovirus on solanaceous crops and associated weeds in Lattakia Province. Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series, 36(4): 196-205

Han, M., X. Gao, J.Z. Su and S. Nie. 2001. Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules. Nature biotechnology, 19(7): 631-635. https://doi.org/10.1038/90228

Hull, R. 2022. Matthews' Plant virology, 4th edition. Academic press. 1056 pp.

Idris, E.E., H. Bochow, H. Ross and R. Borriss. 2004. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. VI. Phytohormonelike action of culture filtrates prepared from plant growth-promoting *Bacillus amyloliquefaciens* FZB24, FZB42, FZB45 and *Bacillus subtilis* FZB37. Journal of Plant Diseases and Protection, 111(6): 583-597.

المراجع

العاني، رقيب عاكف، مصطفى علي عذاب وبشرى حامد عبد الغفور. 2011. تأثير التداخل بين التلقيح بالرايزوبيوم وفيروس موزاييك اللوبياء الشديد في تكوين العقد البكتيرية وتثبيت الازوت في اللوبياء. مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية، 27(1): 259-270.

*[**Al-Ani, R.A., M.A. Azab and B.H. Abd El-Ghafour**. 2011. Effect of interaction between rhizobium inoculation and infection with severe cowpea mosaic virus on nodulation and nitrogen fixation in cowpeas. University of Damascus Journal for Agricultural Sciences, 27(1):259-270. (In: Arabic)].*

علي، حميد حمود ونور صلاح أحمد. 2018. استحثاث المقاومة ضد فيروس التقزم الشجيري للطماطم بالبايون والرايبوفالفين. مجلة علوم الرافدين، 27(4): 129-137.

*[**Ali, H.H. and N.S. Ahmed.** 2018. Induced systemic resistance in tomato plant against tomato bushy stunt virus by bion and riboflavin. Rafidain Journal Science, 27(4):129-137. (In: Arabic)].*

الفهد، معاذ عبد الوهاب العالي. 2006. دراسة تشخيصية والأهمية الإقتصادية والمقاومة لفيروس تقزم واصفرار الشعير Barley yellow dwarf virus . أطروحة دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة بغداد. 136 صفحة.

*[**Al-Fahd, M.A.W.** 2006. Diagnostic study, economic importance and resistance to Barley yellow dwarf virus. Ph.D. thesis, College of Agriculture, University of Baghdad. 136 pp. (In: Arabic)].*

قاسم، نبيل عزيز، حميد حمود علي ومحمد عدنان عبد الملك . 2006. دراسة تأثير بعض المستخلصات النباتية والمضادات الحياتية على فيروس موزانيك الخيار Cucumber mosaic cucumovirus. مجلة زراعة الرافدين، 34(4): 134-139.

*[**Kassim, N.A., H.H. Ali and M.A.A. Eisa.** 2006. Effect of some plant extract and antibiotic on cucumber mosaic Cucumovirus. Mesopotamia Journal of Agriculture, 34(4):134-139. (In: Arabic)].*

مكوك، خالد محي الدين، جابر ابراهم فجلة وصفاء غسان قمري. 2008. الأمراض الفيروسية للمحاصيل الزراعية المهمة في المنطقة العربية. اصدار الجمعية العربية لوقاية النبات. دار النهضة العربية، بيروت، لبنان. 631 صفحة.

*[**Makkouk, K.M., G.A. Figla and S.G. Kumari**. 2008. Viral diseases of important agricultural crops in the Arab*

Lucas García, J.A., A. Probanza, B. Ramos, J. J. Colón Flores and F. J. Gutiérrez Mañero. 2004. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) on the biological nitrogen fixation, nodulation, and growth of *Lupinus albus* L. cv. Multolupa. Engineering in Life Sciences, 4(1): 71-77. https://doi.org/10.1002/elsc.200400013

Momol, M.T., S.M. Olson, J.E. Funderburk, J. Stavisky and J.J. Marois. 2004. Integrated management of tomato spotted wilt on field-grown tomatoes. Plant Disease, 88(8): 882-890. https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.8.882

Murphy, J.F., M.S. Reddy, C.M. Ryu, J.W. Kloepper and R. Li. 2003. Rhizobacteria-mediated growth promotion of tomato leads to protection against Cucumber mosaic virus. Phytopathology, 93(10): 1301-1307. https://doi.org/10.1094/phyto.2003.93.10.1301

Saeed, G.M. and H.H. Ali. 2020. Determination of the field spread of Tomato spotted wilt virus Orthotospovirus on the Solanaceae crops and the associated weeds in Nineveh province. Plant Archives, 20 (2): 6362-6366.

Scholthof, K.B.G., S. Adkins, H. Czosnek, P. Palukaitis, E. Jacquot, T. Hohn and G.D. Foster. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology, 12(9): 938-954. https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x

Van Loon, L.C. and P.A. Bakker. 2003. Signaling in rhizobacteria–Plant Interaction. Ecological Studies. 168: 297-330.

Zitter, T.A. and J.F. Murphy. 2009. The plant health instructor: Cucumber mosaic virus. American Phytopathological Society. Plant Health Instructor. https://doi.org/10.1094/PHI-I-2009-0518-01.

Kandan, A., M. Ramiah, V.J. Vasanthi, R. Radjacommare, R. Nandakumar, A. Ramanathan and R. Samiyappan. 2005. Use of *Pseudomonas fluorescens*-based formulations for management of Tomato spotted wilt virus (TSWV) and enhanced yield in tomato. Biocontrol Science and Technology, 15(6): 553-569. https://doi.org/10.1080/09583150500088546

Kloepper, J.W., R. Rodriguez-Kabana, G.W. Zehnder, J.F. Murphy. E.J. Sikora and C. Fernandez. 1999. Plant root-bacterial biological control of soilborne diseases and potential interaction in systemic and foliar diseases. Australasian Plant Pathology, 28: 21-26. https://doi.org/10.1071/AP99003

Kloepper, J.W., C.M. Ryu and S. Zhang. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. Phytopathology, 94(11): 1259-1266. https://doi.org/10.1094/phyto.2004.94.11.1259

Lannelli, D., M. Barba, L. D'Apice, G. Pasquini, R. Capparelli, L. Monti and C. Noviello. 1996. Cytofluorimetric method for the detection of Cucumber mosaic virus. Phytopathology, 86(9): 959-965. https://doi.org/10.1094/Phyto-86-959

Leeman, M., J.A. Van Pelt, F.M. Den Ouden, M. Heinsbroek, P.A.H.M. Bakker and B. Schippers.1995. Induction of systemic resistance against Fusarium wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens.* Phytopathology, 85(9): 1021-1027. https://doi.org/10.1094/Phyto-85-1021

Liu, L., J.W. Kloepper and S. Tuzun. 1995. Induction of systemic resistance in cucumber against Fusarium wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. Phytopathology, 85(6): 695-698. https://doi.org/10.1094/Phyto-85-695

Received: February 24, 2022; Accepted: August 29, 2022

تاريخ الاستلام: 2022/2/24؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2022/8/29