الجمهورية العربية السورية

جامعة دمشق

كلية الهندسة الزراعية

قسم وقاية النبات

تثبيط بعض أمراض ذبول القرعيات باستخدام عزلات محلية من البكتيريا الجذرية المحفزة لنمو النبات

Inhibition of some wilt diseases of cucurbits using local isolates of Plant Growth Promoting Rhizobacteria

رسالة مقدمة لنيل درجة الدكتوراه في الهندسة الزراعية

قسم وقاية النبات

إعداد

م. فاتن عواد العلوش

إشراف

أ.د. محمد فواز العظمه

قسم وقاية النبات

جامعة دمشق

مشرفاً رئيساً

أ.د. محمود أبو غرة

قسم وقاية النبات

جامعة دمشق

مشرفاً مشاركاً

2024

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

قرار لجنة الحكم

قدمت هذه الرسالة استكمالاً لمتطلبات نيل درجة الدكتوراه في الهندسة الزراعية / اختصاص وقاية نبات/ من كلية الهندسة الزراعية – جامعة دمشق، وأجيزت من قبل السادة أعضاء لجنة الحكم

This thesis has been submitted as partial fulfillment of the requirement for the degree of PHD in plant protection at the Faculty of Agriculture, Damascus University, Referee committee has approved the thesis .

نوقشت هذه الرسالة بتاريخ 23/ 6/ 2024.

أمام لجنة الحكم المؤلفة من

أ.د. محمد فواز العظمة

الأستاذ في قسم وقاية النبات / كلية الهندسة الزراعية / جامعة دمشق (عضواً مشرفاً)

أ.د. خالد العسس

الأستاذ في قسم وقاية النبات / كلية الهندسة الزراعية / جامعة دمشق (عضواً)

أ. د. زكريا الناصر

الأستاذ في قسم وقاية النبات / كلية الهندسة الزراعية / جامعة دمشق (عضواً)

أ. د. أحمد محمد مهنا

الأستاذ في قسم وقاية النبات / كلية الهندسة الزراعية / جامعة دمشق (عضواً)

د. شعلة الخاروف

الأستاذ مساعد في قسم وقاية النبات / كلية الهندسة الزراعية / جامعة الفرات (عضواً)

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

تصريح

أصرّح بأن هذا البحث " **تثبيط بعض أمراض ذبول القرعيات باستخدام عزلات محلية من البكتريا الجذرية المحفزة لنمو النبات**"

لم يسبق أن قُدم للحصول على أي درجة جامعية أخرى، وغير مقدم حالياً لذلك، زأنّ كل العمل والنتائج المذكورة هي جهودي الشخصية ، وبتوجيه من المشرف والمشرف المشارك، وجميع المراجع التي ذكرت في هذه الرسالة نسبت إلى مصادرها ضمن النص وفي قائمة المراجع.

المُرشّح

فاتن عواد العلوش

DECLERATION

This is to declare that, this work

"Inhibition of some wilt diseases on cucurbits using local isolates of Plant Growth Promoting Rhizobacteria"

Is a new research work, and has neither been submitted concurrently already accepted for any degree, no has been submitted concurrently already accepted for any degree.

All the mentioned results are my efforts and done by direct supervision of my guides, all the referred literature are cited, and well-documented in the list of refrence.

Candidate

Faten Aoad Alalouche

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

شهادة

نشهدُ بأنّ هذا العمل المُقدم في هذه الرسالة هو نتيجة بحث علمي قامت به المرشحة فاتن عواد العلوش بإشراف الدكتور محمد فواز العظمة (المشرف) الأستاذ في قسم وقاية النبات/ كلية الهندسة الزراعية- جامعة دمشق وبمشاركة الدكتور محمود أبو غرة الأستاذ في قسم وقاية النبات/ كلية الهندسة الزراعية- جامعة دمشق، وأنّ المراجع المستخدمة في هذه الرسالة موثقة أصولا ضمن النص.

المُرشح	المُشرف	المشرف المشارك
فاتن العلوش	أ. محمد فواز العظمة	أ. محمود أبو غرة

CERTIFICATION

We witness that the described work in this thesis is the result of scientific research conducted by the candidate Faten Awad Alalouche , under supervision of

Dr. Mohammad Fawaz Azmeh at the Department of plant protection and Associate Supervisor Dr. Mahmoud abu Ghoura at the Department of plant protection, and any reference of other researchers work has been duly acknowledged in the text

Candidate	supervision	Associate supervision
Faten alalouche	Mohammad Fawaz Azmeh	Mahmoud abu Ghoura

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

إهداء

الحمدلله الذي وفقني لإتمام مسيرتي الدراسية وكل الشكر والامتنان للسادة أعضاء لجنة الحكم
على الإطروحة وأخص بالذكر

الأستاذ الدكتور محمد فواز العظمة
كنت وستبقى المعلم الفاضل الذي ننهل من علمه
تخجل جميع عبارات الشكر أمام ماقدمته لي من نصائح.

.....

الأستاذ الدكتور محمود أبو غرة
أول من علمني طرائق العزل البكتيري وصنع الأوساط
أول من رسم لي خطواتي الثابتة في مجال الأمراض البكتيرية
غرست فينا بذوراً قطفنا ثمارها في نهاية مسيرتنا الدراسية
شكرا لك من القلب

.....

أمي وأبي
المصدر الأول والأخير للحنان والدعم.
ولدعائكما المبارك عظيم الأثر في حياتي
أشكركما على الصبر اللامحدود والتشجيع الدائم

.....

أخوتي وأخواتي
خير سند لي في الحياة
وبكم أشد عضدي

.....

تاله وسارة
ابنتاي من تحملتا غيابي الطويل وانشغالي عنهما
وطابت بكن حياتي

.....

صديقاتي وأصدقائي
تحلو الحياة بوجود أناس مثلكم
كل الشكر على ماقدمتوه لي من مساعدة
أخص بالذكر
منال الدوس
بثينة سلامة
اسماعيل الصالح

.....

والحمد لله رب العالمين
فاتن عواد العلوش

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

فهرس المحتويات Index contents

المحتوى	رقم الصفحة
الفصل الأول: الجزء التمهيدي Introduction	11
1-1- التعريفات Definitions	14
1-2- المقدمة Introduction	16
1-3- مشكلة البحث Research problem	17
1-4- أهمية البحث Research importance	18
1-5- تساؤلات البحث Research questions	18
1-6- فرضيات البحث Research Hypothesis	19
1-7- مبررات البحث Research axioms	19
1-8- محدوديات البحث Research Limitations	20
1-9- مسلمات البحث Research justifications	21
1- 10- أهداف البحث Research Objectives	21
1-11- الاختصارات Short words	22
الفصل الثاني: الدراسة المرجعية Literature Review	23
2-1- البطيخ Water melon	24
2-2- الشمام Sweet melon	24
2-3- ذبول الفوزاريوم	25
2-4- الصفات المجهرية	27

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

2-5- الصفات الشكلية	28
2-6- المدى العوائلي	28
2- 7 – دورة حياة ذبول الفوزاريوم	29
2-8- أعراض المرض	30
2-9- طرائق المكافحة	31
2-9-1- المكافحة الزراعية	32
2-9-2- الأصناف المقاومة	32
2-9-3- التطعيم	32
2-9-4- المكافحة الكيميائية	33
2-9-5- المكافحة الحيوية	34
2-9-5-1- التأثير المباشر	34
2-9-5- التأثير غير المباشر	36
الفصل الثالث: المواد والطرائق Materials and Methods	38
3-1-جمع العينات	39
3-2-الفحص الظاهري للعينات المصابة بالذبول	39
3-3- الأوساط المستخدمة في عزل ذبول فوزاريوم من العوائل القرعية المصابة	39
3-3-1-وسط أغار البطاطا والدكستروز (PDA)	40
3-3-2- وسط أغار قطع أوراق القرنفل(CLA)	40
3-4- عزل مسبب ذبول فوزاريوم على القرعيات	40
3-5-تعريف أنواع الجنس *Fusarium* بالاعتماد على الصفات الزرعية والشكلية	41

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

3-6- حساب سرعة النمو	42
3-7- القدرة الإمراضية للعزلات الفطرية على العائل النباتي	42
3-8- العدوى التصالبية للمسببات المرضية	43
3-9-عزل البكتريا الجذرية المحفزة للنمو من التربة المحيطة بجذور القرعيات	44
3-10- القدرة التضادية للعزلات البكتيرية تجاه عزلتين من فطر ذبول فوزاريوم مخبرياً	45
3-11- تقدير نسبة التثبيط لعزلات البكتيرية تجاه عزلتين من فوزاريوم البطيخ والشمام مخبرياً	45
3-12- تعريف العزلات البكتيرية المثبطة لنمو ذبول فوزاريوم بيوكيميائياً	46
3-12-1- اختبار صبغة غرام	46
3-12-2- اختبار غرام بطريقة RYV	47
3-12-3- اختبار الأوكسيداز	47
3-12-4- اختبار قدرة البكتريا على تشكيل الجراثيم الداخلية (التبوغ)	47
3-12-5- إنتاج البكتريا للصبغات الوميضية على وسط King B	47
3-12-6- اختبار فرط الحساسية على التبغ	48
3-12-7- اختبار التنفس	48
3-12-8- اختبار كاتلاز	49
3-12-9- اختبار تحلل البكتين أو تعفن شرائح البطاطا	49
3-12-10- اختبار تحلل الجيلاتين	50
3-12-11- اختبار تحلل النشاء	50
3-11-12- اختبار تحمل البكتريا لتركيز NaCl 2%	50
3-11-13- اختبار أحمر الميتيل (MR)	50

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

3-11-14- اختبار حلمهة الدم	51
3-11-16- اختبار (VP)	51
3-12-17- حركة البكتيرية	51
3-13- اختبارات انتماء البكتريا المثبطة لزمرة البكتريا المحفزة للنمو PGPR	52
3-13- 1- اختبار تحلل الفوسفات	52
3-13- 2- اختبار تحلل البوتاسيوم	53
3-13-3- اختبار إنتاج هرمون حمض اللإندول الخلي	53
3-14- كفاءة البكتيريا المعزولة في الحد من الإصابة بذبول الفوزاريوم على البطيخ والشمام في الأصص	54
3-14-1- معاملة التورب	54
3-14-2- تحميل اللقاح الفطري على بذور القمح	55
3-15-التحليل الإحصائي	57
الفصل الرابع: النتائج والمناقشة Results and Discussion	58
4-1-الفحص الظاهري للعينات المصابة بالذبول	58
4-2- تعريف أنواع الجنس *Fusarium* بالاعتماد على الصفات الزرعية والشكلية	61
4-3- القدرة الإمراضية للعزلات الفطرية على مضيفاتها	65
4-4- العدوى الاصطناعية التصالبية	67
4-5- تقدير نسبة وشدة الإصابة بالعزلات الفطرية	69
4-6- عزل البكتريا من المحيط الجذري للنباتات القرعية	71
4-7- مسافة التضاد بين العزلات البكتيرية المثبطة والعزلات الفطرية ونسبة التثبيط المخبري	74

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

4-8- تعريف البكتيريا المعزولة من المحيط الجذري المثبطة لذبول فوزاريوم	78
4-9- كفاءة العزلات البكتيرية المثبطة في الحد من الإصابة بالذبول الوعائي على البطيخ والشمام	86
4-9-1-تقدير نسبة الإصابة وشدة المرض على البطيخ والشمام	86
4-9-1- دراسة مؤشرات النمو على البطيخ والشمام	86
4-10- اختبارات الانتماء لزمرة البكتريا الجذرية المحفزة لنمو النبات PGPR.	87
4-10-1- تحلل الفوسفات	87
4-10-2- تحلل البوتاسيوم	88
4-10-3- إنتاج هرمون حمض الإندول الخلي	90
الفصل الخامس: الاستنتاجات والتوصيات Recommendation and Conclusion	92
الاستنتاجات Conclusions	93
التوصيات Recommendations	94
الفصل السادس: المراجع	95

فهرس الأشكال

رقم الشكل	عنوان الشكل	رقم الصفحة
(1)	أشكال الأبواغ لفطر فوزاريوم	28
(2)	دورة حياة فطر فوزاريوم	30
(3)	أعراض الأصابة بالذبول على الكوسا	59
(4)	أعراض الإصابة بالذبول على الخيار	59
(5)	أعراض الإصابة بالذبول على البطيخ	60
(6)	أعراض الإصابة بالذبول على الشمام	60
(7)	تلون بعض جذور النباتات المصابة باللون البني	61
(8)	تلون الأوعية الناقلة باللون البني	61

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

(9)	جذور وأجزاء من الساق لعزل المسبب المرضي	61
(10)	أشكال وألوان المزارع الفطرية المعزولة من القرعيات	62
(11)	التوصيف الشكلي لأبواغ العزلات الفطرية للفوزاريوم	63
(12)	أعراض المرض بعد تطبيق فرضية كوخ على الكوسا	66
(13)	أعراض المرض بعد تطبيق فرضية كوخ على البطيخ	66
(14)	أعراض المرض بعد تطبيق فرضية كوخ على الشمام	67
(15)	مظهر بعض العزلات البكتيرية المعزولة من المحيط الجذري للقرعيات	71
(16)	كفاءة العزلات البكتيرية في تثبيط نمو العزلتين FO7 وFO5 مخبرياً	77
(17)	اختبار تحمل الملوحة	79
(18)	اختبار VP	80
(19)	اختبار متيل ريد	80
(20)	اختبار تحلل النشاء	80
(21)	اختبار تحلل البكتين	80
(22)	اختبار التنفس	81
(23)	اختبار الكاتالاز	81
(24)	اختبار اليورياز	81
(25)	اختبار فرط الحساسية	81
(26)	اختبار الأوكسيداز	81
(27)	قدرة العزلات البكتيرية على تحلل الفوسفات	83
(28)	قدرة العزلات البكتيرية على تحلل البوتاسيوم	84
(29)	قدرة العزلات البكتيرية في إنتاج هرمون حمض الإندول الخلي	85

فهرس الجداول

رقم الجدول	عنوان الجدول	رقم الصفحة
(1)	عدد وموقع العينات النباتية التي ظهرت عليها أعراض الذبول	40
(2)	الخصائص المجهرية للعزلات الفطرية من النوع *F. oxysporum*	64

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

(3)	الخصائص الشكلية للعزلات الفطرية من النوع *F. oxysporum*	65
(4)	نتائج العدوى الاصطناعية التصالبية على العوائل القرعية	69
(5)	نتائج نسبة الإصابة وشدة المرض للعزلات الفطرية على العوائل القرعية	71
(6)	رموز ومصادر ووصف المستعمرات البكتيرية المعزولة من المحيط الجذري للقرعيات	73
(7)	متوسطات مسافة التضاد بين العزلات البكتيرية مع العزلتين FO5 و FO7	76
(8)	نتائج الاختبارات البيوكيميائية للعزلات البكتيرية	78
(9)	نسبة التثبيط % للعزلتين FO5 و FO من قبل العزلات البكتيرية في تجربة الأصص	83
(10)	تأثير المعاملات البكتيرية في مؤشرات النمو على الشمام في الأصص	84
(11)	تأثير المعاملات البكتيرية في مؤشرات النمو على البطيخ في الأصص	85

فهرس المعادلات

رقم المعادلة	عنوان المعادلة	رقم الصفحة
(1)	النسبة المئوية لشدة المرض	45
(2)	النسبة المئوية لنسبة الإصابة	45
(3)	النسبة المئوية للتثبيط	47
(4)	معامل الإذابة	50

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

الاختصارات:

PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria	البكتريا المحفزة لنمو النبات
PDA: Potato Dextrose Agar	وسط البطاطا والدكستروز
CLA: Carnation Leaf Piece Agar	قطع أوراق القرنفل
VP: Voges-Proscaver	اختبار لكشف قدرة البكتيريا على انتاج acetyl-methyl carbinol
NA: Nutrient Agar	وسط لنمو البكتريا
PKA: Pikovskaya's agar	وسط للكشف عن إذابة الفوسفات
F.sp: Formae special	نمط شكلي
PPO: Poly Phenol Oxidase	
PAL: Phenylalanine Ammonia Lyase	
PSB :Phosphate Solubilizing Bacteria	بكتريا محللة للفوسفات
PSM : Phosphate Solubilizing Microorganisms	كائنات محللة للبوتاسيوم
TMPA: Tetra- Methyl-p- PhenylenediAmine	
IAA : Indole Acetic Acid	هرمون حمض الإندول الخلي
SI : Solubilization Index	معامل الإذابة
CFU: Colony Forming Unit	وحدة تكوين مستعمرة

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

الملخص

نُفّذَ البحث في مخبر التنوع الحيوي، الهيئة العامة للتقانة الحيوية ومخبر الأمراض النباتية، كلية الزراعة– جامعة دمشق خلال الفترة 2020–2024 بهدف عزل وتعريف بعض مسببات ذبول القرعيات، بالإضافة لعزل وتعريف عزلات بكتيرية من المحيط الجذري للقرعيات واختبار قدرتها التضادية تجاه مسبب مرض ذبول الفوزاريوم الوعائي. جُمعت 30 عينة من عوائل قرعية مختلفة؛ الخيار،الكوسا، الشمام، البطيخ من أربعة محافظات؛ دمشق، ريف دمشق، درعا، دير الزور. عُزلت المسببات الفطرية ووّصفت شكلياً ودُرست قدرتها الإمراضية وحُسبت النسبة المئوية للإصابة وشدتها لكل عزلة على مضيفها، حيث وُجد أنّ 10عزلات فطرية تنتمي للنوع *Fusarium oxysoporum*، تم تحديد تخصصها العوائلي وأشكالها التخصصية formae specials فكانت العزلتان FO1 وFO2 تنتميان إلى الشكل *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* والعزلتان FO5 وFO6 تنتميان إلى الشكل *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* في حين كانت العزلات FO7، FO8، FO9 وFO10 من الشكل *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* . تراوح قطر المستعمرة الفطرية بين 3.8 سم و 6.8 سم بعد سبعة أيام من التحضين في وسط PDA عند حرارة 27±3 درجة مئوية بينما تراوحت شدة الإصابة بين 12% و69.3%. حيث كانت العزلة FO7 المأخوذة من البطيخ من منطقة درعا هي الأعلى في نسبة الإصابة وشدة المرض، تليها العزلة FO5 المعزولة من الشمام من منطقة دير الزور وفقاً لسلم الإصابة المعتمد. أمكن الحصول على 40 عزلة بكتيرية أبدت قدرة تضادية تجاه الشكلين الممرضين FO7 وFO5 بنسب متفاوتة. واختير 4 عزلات بكتيرية B20، B2، B10، B25 أظهرت تفوقاً في تثبيط الشكلين الممرضي FO7 و FO5 مخبرياً. بالتعريف البيوكيميائي للعزلات البكتيرية انتمت العزلتان B2، B10 للنوع *Pseudomonas fluorescens* والعزلتان B20،B25 للنوع *Bacillus sabtilis*. عند استخدام العزلات البكتيرية المدروسة في تجربة الأصص على البطيخ والشمام، أعطت العزلة B20 أفضل تثبيط للفطرين الممرضين FO5 و FO7 حيث انخفضت نسبة الإصابة على الشمام والبطيخ 40% و30% على الترتيب البطيخ وشدة المرض 10% و 11% على الترتيب مقارنة بباقي العزلات والشاهد المعدى بالفطر الممرض كانت نسبة الإصابة فيه 80% على البطيخ

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

و 96% على الشمام. كما أظهرت النتائج تأثير العزلات البكتيرية في بعض مؤشرات النمو لنبات البطيخ في الأصص، فقد تبيّن التفوق المعنوي للعزلة B20 في جميع مؤشرات النمو المدروسة لنبات البطيخ مقارنةً بباقي العزلات البكتيرية، وسجلت معاملة النبات بالعزلة البكتيرية B20 فقط أعلى ارتفاع للساق ووزن رطب وجاف للمجموع الخضري، طول للجذر والوزن الرطب والجاف للمجموع الجذري، بالمقارنة بباقي المعاملات والشاهد السليم (85.60 سم، 52.13 غ، 8.43 غ، 32.53 سم، 6.39 غ، 3.27 غ، على التوالي)، وعلى الشمام سجلت معاملة النبات بالعزلة البكتيرية B20 فقط أعلى ارتفاع للنبات والوزن الرطب والوزن الجاف للمجموع الخضري وطول للجذر والوزن الرطب والجاف للمجموع الجذري، بالمقارنة بباقي المعاملات مع الشاهد السليم (76.00 سم، 48.66 غ، 7.43 غ، 32.83 سم، 5.52 غ، 3.51 غ، على التوالي، كما اختبرت قدرة العزلات على تحليل الفوسفات والبوتاسيوم وإنتاج هرمون حمض الإندول الخلي حيث تميزت العزلة B20 بقدرتها على تحليل الفوسفات والبوتاسيوم وكفاءتها في إنتاج هرمون حمض الإندول الخلي. تفسح هذه النتائج المجال أمام المزيد من الاختبارات للعزلات البكتيرية المنتخبة في تثبيط مسببي مرض ذبول الفوزاريوم الوعائي لاستخدامها لاحقاً في إنتاج مخصبات حيوية.

الكلمات المفتاحية :

ذبول الفوزاريوم الوعائي، بكتريا المحيط الجذري المحفزة للنمو، *Bacillus subtilis*، البطيخ، الشمام، ذبول القرعيات، *Pseudomonas fluorescens*.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

الفصل الأول

الجزء التمهيدي

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

1-1- التعريفات Definitions

ذبول فوزاريوم الوعائي Fusarium vascular wilt:

أحد الأمراض الفطرية الناجم عن وجود ونشاط الكائن الممرض فوزاريوم في أنسجة الأوعية الخشبية للنبات. يُعد الفطر من ساكنات التربة soil- borne، ويصيب النبات عن طريق الجذور التي يخترقها مباشرة أو عن طريق الجروح ثم تنمو المشيجة الفطرية لتصل إلى الأوعية الخشبية وتؤدي لانسدادها كلياً أو جزئياً. ينتج الفطر الممرض ثلاثة أشكال من الأبواغ اللاجنسية وهي الأبواغ الكونيدية الصغرى و الأبواغ الكونيدية الكبرى و الأبواغ الكلاميدية، يعد الفطر الممرض محباً للظروف البيئية الدافئة (Agrios, 2005).

المحيط الجذري Rhizosphere:

تم استخدام هذا المصطلح من قبل لورينو هيلتنر عالم الجراثيم المتخصص في ميكروبيولوجيا التربة حيث تم تعريف المحيط الجذري بأنه مكان التفاعل بين التربة والنبات والكائنات الحية الدقيقة على الجذور أو بالقرب منها، حيث تعتمد هذه التفاعلات على الظروف البيئية السائدة (Norini, 2007). تمتد منطقة المحيط من سطح الجذر إلى مسافة عدة مليمترات، كما تختلف المكونات البيولوجية والكيميائية للمحيط الجذري في الترب المزروعة عن الترب غير المزروعة (Morgan *et al*., 2005)، كما عرفت بأنها منطقة التربة الواقعة حول جذور النباتات وتخضع لتأثيرها المباشر، إنه مكان للتبادلات بين النبات والركيزة المعدنية للتربة والنشاط الميكروبي المكثف (Anoua *et al*., 1997).

البكتيريا الجذرية المحفزة لنمو النبات PGPR :

هو اختصار للأحرف الأولى من Plant Growth Promoting Rhizobacteria التي تشير إلى البكتيريا التي لها تأثير نافع على نمو النباتات وتطورها. تمتلك هذه البكتيريا القدرة على استعمار سطح الجذور بشكل فعال ولها تأثير مفيد على النبات من خلال تحفيز نموه عن طريق الحماية ضد العوامل الممرضة للنبات (Haas and

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

(Defago, 2005). فهي تعمل كسماد حيوي وكائنات حية مضادة حيث تمنع بشكل مباشر أو غير مباشر تطور الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض النباتية من خلال العديد من الآليات كالمنافسة والتضاد والمقاومة المستحثة (Kloepper, 2003).

المكافحة الحيوية Biocontrol:

التعريف الذي اعتمدته المنظمة الدولية للمكافحة الحيوية International Organization for Biological Control (IOBC) هو استخدام الكائنات الحية او منتجاتها لمنع أو تخفيف الخسائر او الأضرار الناتجة عن الآفات، ومن وجهة نظر بيئية هي مرحلة من مراحل المكافحة الطبيعية تحافظ على كثافة مجتمع كائن حي بواسطة الطفيليات أو المفترسات أو الممرضات.

التضاد الحيوي Antibiosis:

آلية إفراز الكائن المضاد السموم أو المواد الأيضية الميكروبية التي ينتجها لتحد من نمو الكائن الممرض أو تقتله تماماً، بينما لا يتأثر الكائن المضاد بهذه المواد، تنتج بعض الكائنات الحية المضادة مستقلباً واحداً فقط ، بينما يُعرف أن بعض الكائنات الحية المضادة تنتج مستقلبات عدة حتى تكون فعالة ضد ممرض واحد أو أكثر (Pal and Gardener, 2006).

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

1-2-المقدمة introduction

تعد القرعيات من محاصيل الخضر الهامة التي تُزرع في مناطق مختلفة من العالم، حيث تزرع على نطاق واسع في الحقول المكشوفة، كما تطورت زراعة بعض نباتات الفصيلة القرعية ضمن الزراعات المحمية في البيوت البلاستيكية. تضم هذه الفصيلة Cucurbitacae عدة أجناس أهمها اقتصادياً : الجنس *Cucumis* ويضم الخيار *Cucumis sativus* والشمام *Cucumis melo* ، والجنس *Citrullus* ويضم البطيخ *Citrullus lunatus*، والجنس *Cucutbita* ويضم الكوسا *Cucurbita pepo* واليقطين *Cucurbita moschata*.

يزرع البطيخ والشمام في معظم دول العالم وبمساحات واسعة، حيث ينتج العالم سنوياً من ثمار البطيخ حوالي 29 مليون طن، فهو ثاني أكبر محصول خضار بعد البندورة. تعتبر الصين أكثر دول العالم إنتاجاً للبطيخ، تليها إيران و تركيا والولايات المتحدة الأمريكية، أما على المستوى العربي تعد الجزائر من أكثر الدول العربية المنتجة للبطيخ والسادسة عالمياً، في حين بلغت المساحة المزروعة للبطيخ في سورية عام 2022 عشرة ألاف هكتار بإنتاج 335000 طن، في حين بلغت المساحة المزروعة للشمام 3400 هكتار وبإنتاج 75000 طن وتركزت زراعتهما في محافظات درعا، حماه، دير الزور، الرقة، ريف دمشق (المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية،2022).

تصاب القرعيات بالعديد من الآفات الزراعية والأمراض ومنها الأمراض الفطرية مما يؤثر على المحصول والغلة الناتجة. تعد أمراض الذبول ولاسيما ذبول فوزاريوم من الأمراض الهامة لصعوبة مكافحتها بسبب النمو الفطري للمسبب المرضي داخل النبات واستمرار وجود أبواغه في التربة، لذلك توجد العديد من طرائق المكافحة مثل انتخاب الأصناف المقاومة والمكافحة الحيوية والدورة الزراعية والمبيدات الفطرية الكيميائية (Jiménez and Gasco, 2011).

.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

يمثل استخدام الكائنات الدقيقة المضادة استراتيجية بديلة لإدارة الأمراض، حيث تم استخدام العوامل الحيوية بشكل فعال للحد من مرض ذبول فوزاريوم على البندورة (Freeman *et al*., 2002). ونتيجة ازدياد الوعي والرغبة بالحصول على غذاء خالٍ من الأثر المتبقي للمبيدات وتأثيرها على الصحة، ظهرت أهمية استخدام الكائنات الحية الدقيقة المتواجدة في منطقة المحيط الجذري و منتجاتها في الحد من أضرار أمراض النبات. إنّ الآليات التي تعتمدها عوامل المكافحة الحيوية تستخدم إما مباشرة أو غير مباشرة أو مختلطة (Pal and Gardener, 2006) يعد الجنسان البكتيريان *Bacillus* و *Pseudomonas* أكثر الأجناس البكتيرية المستخدمة في الزراعة كمحفزات لنمو النبات وعوامل مضادة حيوية للفطريات (Petatán *et al*., 2011)، كذلك نواتج الاستقلاب التي تنتجها البكتيريا ضد الفطريات Siderophores، Phenazines، Pyrrolnitrin والببتيدات الحلقية Cyclic peptides، و خافضات التوتر السطحي الحيوية Biosurfactants والأنزيمات المحلّلة للجدر الخلوية مثل الكيتيناز والغلوكاناز (Raaijmakers *et al*., 2010).

تعد خافضات التوتر السطحي الحيوية Biosurfactants (BS) مركبات نشطة تنتج على سطح خلايا الكائنات الحية الدقيقة وتعمل كخافضات للتوتر السطحي أي أنها تقلل من زاوية التماس بين جزيئات المادة الكارهة للماء والوسط المائي، وتصنف في أربع فئات بناءً على التباين الهيكلي و صفاتها الفيزيائية والكيميائية وهي غلوكوليبيدات وببتيدات دهنية وفوسفوليبيدات وبوليميرات خافضة للتوتر السطحي وتكون ذات فعالية عالية في ظروف الإجهاد وتعتبر قليلة السمية وصديقة للبيئة ويمكن تطبيقها في الزراعة حيث تساعد هذه المركبات في إنبات البذور وحماية النبات من الأمراض ومعالجة التربة وإتاحة العناصر الغذائية للنبات (Otzen, 2017).

1- 3- مشكلة البحث Research problem

للقرعيات أهمية كبيرة فهي من المحاصيل الصيفية المرغوبة وذات محتوى غذائي جيد ومردود اقتصادي، حيث ينخفض إنتاج المحصول لقابليته للإصابة بالعديد من المسببات المرضية والتي تشكل عائقاً أمام زراعتها. ويعد ذبول فوزاريوم الوعائي Fusarium vascular wilt من أكثر المسببات ضرراً على

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

القرعيات لما يسببه من انخفاض كبير على الإنتاجية وخاصة البطيخ والشمام في مناطق زراعته نظراً لتوافر الظروف البيئية الملائمة لحدوث الإصابة، ونظراً لزيادة الطلب على البطيخ كمنتج تسويقي طازج، تظهر حاجة ملحة لزيادة إنتاجية المحصول، ويمكن تحقيق ذلك من خلال استخدام أصناف جيدة وطرائق حديثة للتسميد الكيميائي والمكافحة الحيوية للمسببات المرضية. ولا تخفى مساوئ الاستخدام المتكرر للأسمدة الكيميائية وأثرها على البيئة والتربة وعلى نوعية المنتج الزراعي، خصوصاً أنه قد ثبت أنّ التسميد الكيميائي له آثار ضارة على صحة الإنسان. من جانب أخر أدى ظهور مفاهيم الزراعة النظيفة الخالية من المواد الكيميائية والزراعة العضوية إلى إيجاد بدائل سمادية أو استخدام العوامل الحيوية في التربة من بكتيريا وفطور مفيدة يمكن لها أن تؤمن العناصر الغذائية للنبات. كما تستخدم في مكافحة الأمراض لتوفير نظام مكافحة صديق للبيئة (Hamed *et al.*, 2009).

1-4- أهمية البحث Research importance

تعد المواد الكيميائية كاستخدام الأسمدة والمبيدات إحدى الطرق الرائدة و الفعالة لزيادة إنتاج المحاصيل وحمايتها من الأمراض، إلّا أنّ الاستخدام العشوائي والمفرط يؤدي إلى العديد من الآثار السلبية الضارة كتطور سلالات مقاومة للمسببات المرضية (Gupta *et al*, 2014)، والإخلال بمكونات النظام البيئي والتركيب الميكروبي للترب الزراعية وتراكم هذه المواد في أجزاء النباتات الصالحة للأكل مما يستدعي تبني استراتيجيات بديلة وأمنة ومستدامة للحفاظ على خصوبة التربة وزيادة إنتاج المحاصيل دون الحاجة إلى استخدام المبيدات والأسمدة الكيمائية، فلابد من البحث عن طرق آمنة وبديلة في سبيل تحقيق الزراعة المستدامة كالمكافحة الحيوية مثل استخدام بكتريا المحيط الجذري المحفزة للنمو PGPR أو نواتج استقلابها، هذه الكائنات المستخدمة ونواتجها آمنة للإنسان والكائنات الحية الأخرى، وغير سامة، وليس لها أثر متبقٍ (Adnan *et al.*, 2016).

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

1-5- تساؤلات البحث Research questions

1. ما هي أشكال الجنس فوزاريوم المسببة لأعراض الذبول على القرعيات التي جُمعت من مناطق زراعة القرعيات.
2. ما هي أنواع بكتيريا المحيط الجذري المعزولة من نباتات القرعيات السليمة المزروعة في الحقول المزروعة بالقرعيات التي تنتشر فيها الإصابة بالذبول؟
3. هل جميع العزلات البكتيرية المعزولة من المحيط الجذري قادرة على تثبيط نمو مشيجة فطر فوزاريوم في الزجاج.
4. هل يوجد ارتباط بين قدرة البكتيريا على تثبيط نمو مشيجة فطر الذبول في الزجاج وقدرتها على تثبيط الإصابة بذبول فوزاريوم في الأصص ؟
5. أي الأجناس البكتيرية أفضل في تثبيط نمو ذبول الفوزاريوم الوعائي على البطيخ والشمام.
6. ماهي المؤشرات التي نتجت عن استخدام بكتيريا معزولة من المحيط الجذري على النمو الخضري والجذري للبطيخ والشمام.

1-6- فرضيات البحث Research Hypothesis

1. اختلاف القدرة الإمراضية بين العزلات الفطرية المسببة لذبول الفوزاريوم على القرعيات.
2. يوجد فروق في قدرة البكتيريا المعزولة من المحيط الجذري على تثبيط نمو مسبب ذبول الفوزاريوم على البطيخ والشمام مخبرياً.
3. يوجد فروق في اختبار قدرة البكتيريا المعزولة من المحيط الجذري على الحد من الإصابة بذبول الفوزاريوم على الصنف المحلي للبطيخ والشمام في تجربة الأصص.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

4. يوجد ارتباط عكسي أو طردي بين قدرة البكتيريا على تثبيط نمو مشيجة فطر الذبول في الزجاج (in vitro) وقدرتها على الحد من الإصابة بذبول الفوزاريوم في الأصص.

1-7- مبررات البحث Research justifications

1. الأهمية الاقتصادية للمحاصيل القرعية في سورية ولاسيما البطيخ والشمام.
2. شراسة الفطريات المسببة للذبول الوعائي وصعوبة مكافحتها عند ظهور الإصابات في الحقول.
3. ضعف تأثير المبيدات الفطرية على مسببات أمراض الذبول الوعائي وتأثيراتها الضارة على البيئة والإنسان والكائنات الحية المفيدة.
4. دور بكتريا الجذرية المحفزة للنمو PGPR في تحريض المقاومة ضد العوامل الممرضة واستخدامها كمخصبات للتربة و زيادة الغلة مع انخفاض التكلفة حيث يعتبر اللقاح البكتيري أقل سعراً من المبيدات الكيميائية.
5. محدودية الدراسات في سورية حول بكتريا PGPR على القرعيات لاسيما البطيخ والشمام، وقلة الأبحاث عن السلالات المنتشرة في سورية ودورها في الحد من تطور وانتشار أمراض الذبول الوعائي.

1-8- محدوديات البحث Research Limitations

اقتصرت الدراسة فقط على بعض المناطق السورية (دمشق وريف دمشق ودرعا ودير الزور) حيث نُفّذَ المسحُ الحقليّ وجمعُ العينات النباتية المصابة والسليمة لعزل مسببات ذبول فوزاريوم والبكتيريا المضادة لها، في صيف موسم 2020-2021، من حقول مزروعة بالقرعيات، ثم نفذت الأعمال المخبرية في مخبر التنوع الحيوي التابع للهيئة العامة للتقانة الحيوية في دمشق ومخبر الأمراض النباتية في جامعة دمشق كلية الزراعة، اقتصرت الدراسة على عزلات للفطر فوزاريوم المسبب لذبول القرعيات، حيث عزلت 25 عزلة منها عشر عزلات فطرية تابعة للنوع *Fusarium oxysporum* من عينات قرعية مصابة في الحقول المزروعة ثم اقتصرت الدراسة علىFO5 و FO7 وهما الشكلان المسببان لذبول البطيخ والشمام نظراً لشراسة العزلتين

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

في حدوث الإصابة، و60 عزلة بكترية محلية معزولة من المحيط الجذري للقرعيات، اختيرت 40 عزلة منها أثبتت قدرتها في تثبيط نمو الفطر المسبب للذبول مخبرياً بنسب متفاوتة، إلا أنه انتخبت أربع عزلات أبدت تفوقاً معنوياً، كما أجريت تجارب الإمراضية للعزلات الفطرية على صنف البطيخ والشمام المحلي القابل للإصابة في الإصص في موسم الزراعة في المزرعة التابعة للهيئة العامة للتقانة الحيوية.

1-9- مسلمات البحث Research axioms

1. إنّ تعريف الفطريات الممرضة للنبات هو الخطوة الأولى والأكثر صعوبة في عملية التشخيص وهذا ينطبق بشكل خاص على الجنس *Fusarium* (Rahjoo *et al*., 2008).
2. وجود تباين مورفولوجي بين عزلات الفطر فوزاريوم وتباين في قدرتها الإمراضية (Al-Khatib,2004).
3. تعد معرفة الممرض وسلالاته جانب مهم في مكافحة المرض، بالإضافة إلى أنه يسمح للمزارع باختيار الأصناف الأنسب للزراعة (Do Amaral *et al*., 2008).

1-10- أهداف البحث Research Objectives:

1. عزل و تعريف الفطريات المسببة للذبول الوعائي من القرعيات من عدة مناطق في سورية
2. عزل بكتريا المحيط الجذري المحفزة للنمو PGPR Plant Growth Promoting Rhizbacteria من المحيط الجذري لنباتات القرعيات من عدة مناطق في سورية.
3. تقييم كفاءة العزلات البكتيرية الجذرية المحفزة للنمو (PGPR) في تثبيط فطريات الذبول الوعائي مخبرياً وفي البيت الزجاجي.
4. قدرة العزلات البكتيرية الأكثر كفاءة في التضاد في تيسير بعض العناصر المعدنية وتأثيرها على مؤشرات النمو.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

الفصل الثاني

الدراسة المرجعية

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

2-1- البطيخ Water melon:

ينتمي البطيخ لرتبة *Cucurbitales* وعائلة *Cucurbitaceae* وجنس *citrulls*، عُرفت زراعة البطيخ منذ عهد القدماء عند المصريين واليونانيين والرومان، يُعتقد أن الموطن الأصلي للبطيخ هو المناطق الجافة من جنوب أفريقيا (Singh,1990)، ثماره كروية أو أسطوانية الشكل ذات لون أخضر فاتح أو أخضر غامق، ذات لب عصيري حلو المذاق أحمر اللون، تنتشر فيه بذور سوداء اللون لها لب أبيض (Boualem *et al*., 2016). يُعد البطيخ مادة غذائية مرطبة ومنعشة في فصل الصيف، تحوي كميات متوسطة من فيتامين A وB5 وكمية قليلة من فيتامينات B6,B1,C (Jensen *et al*., 2011) ونظراً لغنى الثمار بأملاح البوتاسيوم فهي تساعد على إدرار البول وإذابة بلورات حمض البولة الموجودة في الكلية أو الحالب، وفي علاج فقر الدم لاحتوائها على حمض الفوليك (Rimando and perkins, 2005)، ولقشرة البطيخ فوائد طبية لا تقل أهمية عن الثمرة حيث تحوي مادة السيترولين وهو أحد الأحماض الأمينية التي تساعد على إزالة الآزوت من الدم، ويحتوي على نسبة ليكوبين أعلى من البندورة (Biswas *et al*., 2017)، الليكوبين Lycopene مفيد في تلوين الطعام (Naz *et al*., 2014)،

2-2- الشمام Sweet melon :

ينتمي الشمام لرتبة *Cucurbitales* وعائلة *Cucurbitaceae* وجنس *Cucumis* و النوع *Cucumis melo* . يعتقد علماء النبات أن موطن البطيخ الأصلي أفريقيا والهند، وفي العصر الحديث لا يزال من الممكن العثور على البطيخ البري في بعض البلدان الأفريقية إلا أن الدراسات الجزيئية تشير إلى أنّ الموطن الأصلي هو آسيا (Erickson *et al*., 2005)، وقد استخدمت ثماره لعدة قرون لعلاج اضطرابات الكلى كحصوات الكلى والمثانة، وتقرحات المسالك البولية، ولعلاج السعال والأمراض الصفراوية ويقال إن الزيت المستخرج من البذور مغذي للغاية ويحتوي على حمض اللينوليك (60-70٪) والليسيثين والسيفالين والسيربروسيد تحتوي بذوره على متعدد

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

الفلورينول، إيزومولتيفلورينول، 24-ميثيلين سيكلوارتينول، وقد أثبتت الدراسات البحثية أنه مضاد للميكروبات، ومضاد للأكسدة، ، ومضاد للالتهابات، وطارد للديدان (Ismail *et al*., 2010).

2-3- ذبول فوزاريوم:

يعد جنس *Fusarium* أحد أهم الأجناس الفطرية، ينتشر في جميع أنحاء العالم، ويعزى الانتشار الواسع للفطر قدرة أبواغه على النمو في نطاق واسع من الظروف المناخية وعلى عوائل نباتية مختلفة (Booth, 1971)، يضم الجنس على أكثر من 120 نوع تسبب أمراضاً مختلفة قد تكون مدمرة مثل الذبول الوعائي Fusarium vascular wilt، تعفن الساق Stem rot، تعفن الجذور Root rot على العديد من المحاصيل الاقتصادية الهامة (Leslie and Summerell , 2006).

ظهر مرض الذبول الوعائي للفوزاريوم على البطيخ في أوائل التسعينات في جنوب الولايات المتحدة الأمريكية وسبب خسائر كبيرة. وبدأ عالم الأمراض النباتية Eewin smith بدراسة المرض والبحث عن المسبب المرضي واستطاع أن يُحدد مسببه الفطري وأطلق عليه اسم *Fusarium niveum* حيث تعني كلمة *niveus* باللاتينية الأبيض أو الثلجي استناداً لمظهر مشيجة الفطر ذات المظهر الثلجي (Smith, 2007).

وبعد دراسات عديدة على اسم النوع الفطري أُقترح تسمية السلالات المتخصصة بإصابة المضيفات المختلفة محددة بنمط شكلي وإضافة كلمة Formae speciale (f.sp) إلى اسم النوع حيث حظي مفهوم الأشكال المتخصصة قبولاً واسعاً، وتم توصيف أكثر من 150 شكلاً متخصصاً (Fourie *et al*., 2011)، ثمانية منها تصيب العائلة القرعية.

يحتوي النوع الفطري *Fusarium oxysporum* على نمطين مختلفين أحدهما ممرض والآخر غير ممرض يصعب تمييزها مورفولوجياً (Snyder and Smith , 1981).

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

يضم النمط الممرض تقريباً 150 شكلاً خاصاً حسب العائل الذي يصيبه (Armstrong, 1981)، ويعود ذلك إلى قدرة الفطر غير الممرض المحدودة في اختراق الجذر وإصابة العائل، أما الفطر الممرض فإنّه يخترق الأنسجة النباتية للجذر ويحدث ذبولاً على النبات (Alabouvette *et al*., 2009).

يعد ذبول البطيخ ثاني مرض تم توصيفه بعد ذبول القطن كما عقد مؤتمر EUCARPIA عام 2012 في أنطاليا حيث ركزت المناقشة فيه على ذبول البطيخ وبدرجة أقل على ذبول القرعيات (Martyn, 2012)، وفي السنوات الأخيرة أصبحت المسببات المرضية من العوامل الرئيسية المحددة لإنتاج البطيخ. بينت دراسات حديثة أنّ أمراض الذبول الناتجة عن *Fusarium oxysporum* تأتي في المرتبة الخامسة في قائمة أهم مسببات الأمراض الفطرية على النبات (Geiser *et al*., 2013)، حيث ساعد على انتشار ذبول الفوزاريوم استخدام الأصناف المرغوبة تجارياً وهي ثلاثية الصيغة الصبغية التي سيطرت على معظم مناطق الإنتاج وهي ضعيفة المقاومة للسلالات التابعة لفطر الفوزاريوم في تلك الفترة (Zhou et al, 2010). كما ظهر الذبول الوعائي على نباتات الكوسا *Cucurbita pepo* في جنوب أفريقيا، ثم لاحقاً في أوروبا واستراليا واليابان (Jamiolkowska *et al*., 2011). ينمو الفطر الممرض كمتطفل داخل النسيج النباتي أما الفطر غير الممرض فإنه يبقى رمياً في المحيط الجذري والمادة العضوية النباتية (Gordan and Martyn, 1997).

وجد Kelly وأخرون (1994) من خلال التحليل الوراثي أن هناك مجموعتين مميزتين من الأعراض الأولى مسؤولة عن الاصفرار، حيث تؤدي إلى موت النبات خلال 40 يوماً بينما المجموعة الثانية تكون مسؤولة عن الذبول وتؤدي إلى موت النبات خلال 20 يوماً، كما لوحظ من خلال الطرق الجزيئية بأن هناك نموذجين مرضيين مختلفين (Mar and Jimenz-Gasco, 2001) .

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

2-4- الصفات المجهرية للنوع *Fusarium oxysporum*

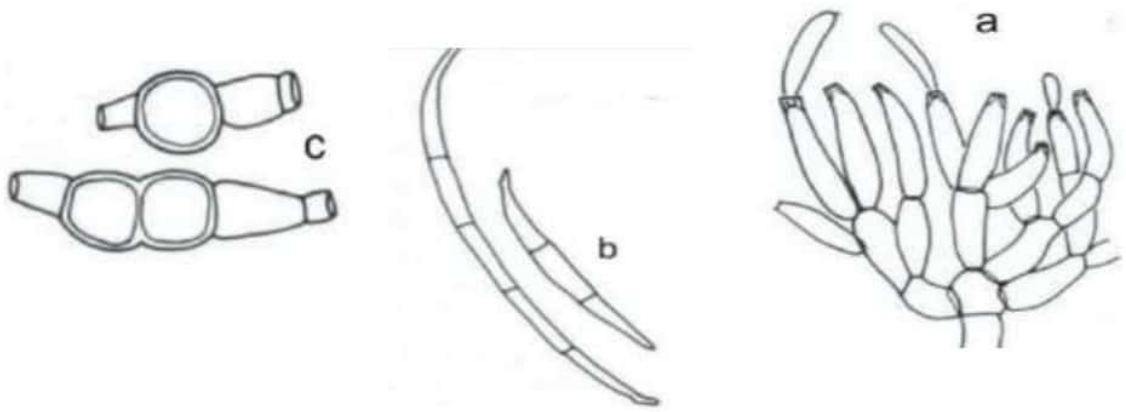
يتكاثر الفطر بطريقة لاجنسية ليعطي ثلاثة نماذج بوغية وهي تعتبر أهم صفة تشخيصية للفطر، وهي الأبواغ الكونيدية الصغرى Microconidia والأبواغ الكونيدية الكبرى Macroconidia والأبواغ الكلاميدية الحافظة Chlamydospores.

الأبواغ الكونيدية الصغرى Microconidia تنشأ على حوامل قصيرة وحيدة الفياليد Monophialidic جانبية على الهيفات. تكون ذات شكل بيضوي أو متطاول، مستقيمة إلى منحنية كثيرة العدد، عادة غير مقسمة، حجمها 5-12 × 2-3.5 ميكرومتر. تتوضع على رؤوس كاذبة على الحوامل البوغية أحادية الفياليد الشكل (a،1)، (Biles *et al*., 1990).

الأبواغ الكونيدية الكبرى Macroconidia تنشأ على تفرعات الخيوط الهيفية، وتكون هلالية الشكل مستدقة النهايات مقسمة بجدر عرضية من 3-5 خلايا، مغزلية مستقيمة إلى منحنية قليلاً، رقيقة الجدران، عادة ما تحوي 3-5 حواجز، أبعادها 27-60 × 3-5 ميكرومتر، فيها خلية قمية مستدقة ومنحنية وخلية قاعدية على شكل قدم (شكل1،b) غالبا ما تكون هذه الأبواغ متفرقة في معظم السلالات وعادة تكون موجودة على الحبيكة Sporodochium، (Biles *et al*., 1990).

تنشأ الأبواغ الكلاميدية من الخلايا الهيفية مباشرةً على المستعمرات القديمة وتحت ظروف معينة، تتشكل الأبواغ الكلاميدية بسرعة وتكون كثيرة العدد، عادة وحيدة منفردة أو ثنائية أو على شكل أزواج أو في مجموعات أو في سلاسل قصيرة (Nene and Reddy, 1987). قد تكون الأبواغ طرفية أو بين خلايا المشيجة وتكون ذات جدران ملساء أو خشنة ، تتميز بشكلها المكور وجدارها السميك والتي تتكون طرفياً أو بينياً في الهيفات (شكل1،c) أو أحياناً على الأبواغ الكونيدية الكبرى بعد أسبوعين إلى ثلاثة أسابيع من تنميتها على وسط أغار البطاطا والدكستروز PDA. (Ismail *et al*, 2015).

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner



الأبواغ الكونيدية الصغرى الأبواغ الكونيدية الكبرى الأبواغ الكلاميدية

شكل (1) أشكال الأبواغ لفطر فوزاريوم (Okungbowa and Shittu, 2012)

2-5- الصفات الشكلية للفطر *Fusarium oxysporum* :

يشكل الفطر مشيجة تكون في البداية بيضاء ذات مظهر ثلجي ثم تفرز صبغات مختلفة مثل القرنفلي والأرجواني والوردي والبني في وسط الزرع (Nirenberg,1982; Nelson *et al* .,1983)، يتم الحصول على أعلى نمو فطري لـ *F.oxysporum* عند حرارة 25 درجة مئوية حيث تنمو المستعمرات الفطرية على الأوساط المغذية بقطر مابين 7 – 8 سم بعد 7 أيام من التحضين ودرجة الحموضة الأمثل لنمو جميع أنواع فوزاريوم pH = 7.5 (Mohsen *et al*., 2016)، قد تظهر على أجزاء النبات الخارجية كالساق نموات فطرية بلون أبيض أو وردي أو برتقالي وخاصة في الظروف الجوية الرطبة (Ajigbola and Babalola, 2013).

2-6- المدى العوائلي:

يضم جنس *Fusarium* العديد من الأنواع والتي تصيب النباتات المختلفة تابعة لمحاصيل ذات الأهمية الاقتصادية، ويعد النوع *Fusarium oxysoporum* نوعاً معقداً ويسبب الذبول لمجموعة واسعة من المحاصيل (Namiki,1994) حيث أدى المستوى العالي للتخصص المضيف للسلالات المسببة للذبول في النوع

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

Fusarium oxysoporum إلى تطوير مفهوم الأشكال المتخصصة (formae speciales) للتمييز بين السلالات المتشابهة شكلياً (Lievens *et al*.,2008).

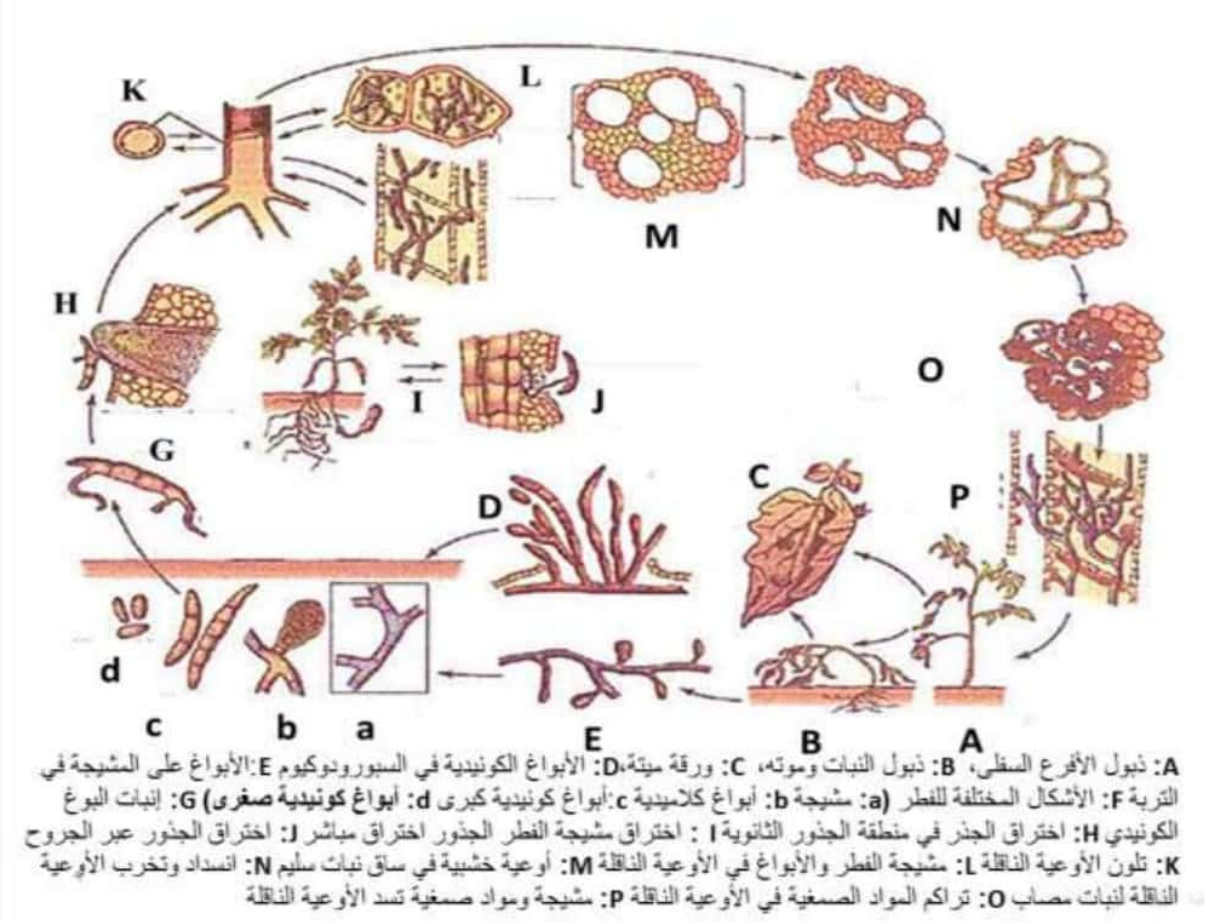
تُصاب الفصيلة القرعية بأشكال تخصصية من *F. oxysoporum* تبعاً للعائل النباتي المُصاب (Naiki,1986)، فالشكل *Fusarium oxysoporum* f.sp. niveum يُصيب البطيخ *Citrullus lunatus* والشكل *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* يُصيب الخيار *Cucumis sativus* والشكل *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* يُصيب الشمام *Cucumis melo* (Zitter *et al*.,1996; Martyn and Egel, 2013)، تم تسجيل عدة سلالات فيزيولوجية في الولايات المتحدة الأمريكية للشكل الذي يُصيب البطيخ بناءً على قدرتها على التغلب على مورثات مقاومة محددة في مجموعة من الأصناف التفريقية وهي Race 0 التي تم اكتشافها لأول مرة في فلوريدا في عام 1963، مسببة للذبول فقط على أصناف البطيخ التي لا تحتوي على مورثات مقاومة، Race 1 سائدة ومنتشرة في جميع أنحاء مناطق إنتاج البطيخ التجارية في الولايات المتحدة والعالم، تتمتع معظم الأصناف ثنائية الصيغة الصبغية التجارية بدرجة عالية من المقاومة للسلالة 0 و1، أما Race3 فهي الأكثر شراسةً من بينها (champaco *et al*., 1993)، كما سُجلت سلالات من *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* في تونس حيث تُصاب النباتات عند الاقتراب من النضج بتعفن للطبقة القشرية الخارجية في منطقة التاج والجزء العلوي من الجذر، والذي يسبب اصفرار وذبول الأوراق، ثم موت النباتات في أيام قليلة (Martyn, 1996; Boughalleb and El Mahjoub, 2006).

ينتقل ذبول فوزاريوم عن طريق البذور المصابة وبقايا المحصول في التربة وعند مزج البذار المصابة مع البذار السليمة، حيث تنتقل العدوى إلى مناطق جديدة وينتشر المرض في التربة إلى مستويات العتبة الاقتصادية خلال3 مواسم من زراعة المحصول العائل (Saremi *et al*., 2011).

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

2-7- دورة حياة المرض :

تشبه دورة حياة *Fusarium oxysporum* دورة حياة معظم أنواع *Fusarium* يقضي الفطر الشتاء في التربة وعلى بقايا المحاصيل من النباتات المصابة بصيغة الأبواغ الكلاميدية التي تحدث العدوى الأولية إما عن طريق البذور أو الجذور وخاصة عند طرف الجذر، فالأبواغ تكون في التربة تنبت لتعطي أنابيب إنبات تخترق أنسجة الجذر حيث تدخل أنابيب الإنبات قمة الجذر مباشرةً أو عن طريق الجروح في منطقة القمة النامية الميرستيمية ومن خلال خلايا البشرة فى منطقة الاستطالة، أو في منطقة تكوين الجذور الجانبية (لوجود فتحات طبيعية)، أو من خلال الجروح التي تحدثها النيماتودا أو الحشرات (شكل 2) ويبدأ تقدم الميسليوم في قشرة الجذر ماراً بين الخلايا حتى يصل إلى الأوعية الخشبية (Egle and Martyn, 2007).



A: ذبول الأفرع السفلى، **B:** ذبول النبات وموته، **C:** ورقة ميتة،**D:** الأبواغ الكونيدية في السبورودوكيوم **E**:الأبواغ على المشيجة في التربة **F:** الأشكال المختلفة للفطر (**a:** مشيجة **b:** أبواغ كلاميدية **c**:أبواغ كونيدية كبرى **d: أبواغ كونيدية صغرى**) **G:** إنبات البوغ الكونيدي **H:** اختراق الجذر في منطقة الجذور الثانوية **I** : اختراق مشيجة الفطر الجذور اختراق مباشر **J:** اختراق الجذور عبر الجروح **K:** تلون الأوعية الناقلة **L:** مشيجة الفطر والأبواغ في الأوعية الناقلة **M:** أوعية خشبية في ساق نبات سليم **N:** انسداد وتخرب الأوعية الناقلة لنبات مصاب **O:** تراكم المواد الصمغية في الأوعية الناقلة **P:** مشيجة ومواد صمغية تسد الأوعية الناقلة

شكل (2) دورة حياة مرض الذبول (Gordonet al.,2017)

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

2-8- أعراض المرض:

يعدُّ الاصفرار العام على أوراق النبات وتلوّن الأوعية الناقلة باللون البني من الأعراض الرئيسية للإصابة بالمرض (Loganathan *et al*, 2009)، حيث تذبل أوراق النباتات الكبيرة تدريجياً من الأسفل إلى الأعلى على مدى عدة أيام وتجفُّ حوافها ثم يموت النبات تماماً وقد تبدأ الأعراض على أحد الفروع بشكل جفاف واصفرار الأوراق وتساقطها ثم تلون الأوعية الناقلة للنبات بلون بني، والنتيجة هلاك وموت النبات (Okungbowa and Shittu, 2012)، وعند عمل مقطع طولي أو عرضي في جذر النبات يشاهد تلون الحزم الوعائية باللون البني، وقد يظهر نمو مشيجة الفطر البيضاء على الفروع الميتة خاصة في الجو الرطب، يصاحب هذه الأعراض أحياناً وجود تشققات على سيقان النباتات في منطقة التاج يمكن أن تمتد إلى الأفرع وأعناق الأوراق وترتبط شدة ذبول النبات بشل إيجابي مع درجة استعمار الفطريات للجهاز الوعائي (Zhou and Everts, 2007)، تشتد الإصابة بهذا المرض فى الأراضي الخفيفة الملوثة بالنيماتودا و المشاتل غير المُعتنى بها وينتقل الفطر عن طريق البذور ويعيش في التربة لعدة سنوات، يؤدي المرض إلى انخفاض عدد النباتات في الحقل وكذلك حجم وإنتاج النبات (Ravikumar *et al*., 2007)، لاحظ Chauhan (1961) أنّ الأعراض الفيزيولوجية للمرض تكون من خلال انخفاض في البلاستيدات الخضراء والنشاء وضعف تشكيل جدر الخلايا النباتية (Perincherry, 2019).

2-9 - طرائق المكافحة:

لجأ العالم منذ التسعينات إلى زراعة أصناف البطيخ ثلاثية الصيغة الصبغية (بدون بذور) الذي يعد صنفاً مطلوباً في السوق وسيطرت هذه الأصناف على معظم مناطق إنتاج البطيخ إلا أن ظهور بؤر إصابة بذبول الفوزاريوم على هذه الأصناف في معظم المناطق المنتجة للبطيخ وخاصة مع اكتشاف وجود السلالةRace3 التي تعد من أشرس سلالات فوزاريوم البطيخ (Chikh-Rouhou *et al*., 2010) مما استوجب البحث عن طرائق لمكافحة الذبول والحد من الإصابة ومنها:

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

2-9-1- المكافحة بالطرائق الزراعية:

المقصود هو استخدام الوسائل التقنية والخدمات الزراعية كافة بغية التقليل من الإصابة بالمرض والحد من أضراره وذلك عن طريق إجراء تغيير في البيئة لجعلها غير ملائمة لنموه وتكاثره. كاتباع الدورة الزراعية حيث يعد تناوب المحاصيل الزراعية من أقدم الممارسات التي استخدمت للحد من الإصابة بالذبول، وتعد الدورات الثلاثية والتي يتم فيها زراعة محصول معين كل ثلاث سنوات في نفس الحقل، وعادة ما تتبادل البقوليات والنجيليات في تلك الدورة يؤدي الى الحد من الإصابة وتكون ناجحة في التخلص من الإصابة بالآفات وحيدة العائل، كما يلعب التشميس دوراً في الحد من الإصابة بأمراض الذبول (King *et al*., 2008).

2-9-2- الأصناف المقاومة:

إنّ استخدام الأصناف المقاومة للمرض يعد من أفضل الطرق الزراعية فقد لجأ المزارعون إلى زراعة الأصناف الهجينة ثنائية الصيغة الصبغية المقاومة للسلالات التي كانت في تلك الفترة Race 0 ، Race1، لكن مع تغيير ممارسات الإنتاج والزراعات التكثيفية أدى لوجود سلالات أكثر شراسة من فوزاريوم البطيخ *FO*. fsp *.niveum* (Martyn *et al*., 2014).

2-9-3- التطعيم :

استخدم التطعيم تجارياً لأول مرة على البطيخ في اليابان وكوريا حيث تم اعتماد التطعيم على جذور غير مضيفة للفطر (Davis *et al*., 2008)، حيث استخدم القرع المُسكي (*cucurbita moschata*) كأصل للتطعيم ممازاد من حجم الثمرة (Miguel and Camacho, 2014)، كما انخفضت نسبة الإصابة بالذبول عند زراعة نباتات البطيخ المطعمة إلى 80% في تركيا (Yetisir *et al*., 2007)، إلا أنّ ارتفاع تكاليف البذور واليد العاملة حد من استخدام الأصناف المطعمة عند كثير من المزارعين (Davis *et al*., 2008).

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

2-9-4- المكافحة الكيميائية:

استخدام خليط التربة المعقم في المشاتل، استخدام بروميد الميتيل في تبخير التربة ، معاملة البذور بالمبيدات الفطرية، حيث تم تقييم كفاءة ثلاثة مبيدات فطرية (Prothioconazole, Acibenzolar-Smethyl، thiophanate-methyl) في مكافحة ذبول البطيخ في الولايات المتحدة الأمريكية في البيوت البلاستيكية ثم في الحقل مما أدى لانخفاض نسبة الإصابة بالذبول في مرحلة البادرات ثم ظهرت أعراض الذبول تقدم عمر النبات (Everts *et al*., 2014).

إنّ ضعف تأثير المبيدات الفطرية على مسببات أمراض الذبول الوعائي وتأثيراتها الضارة على البيئة وظهور مفهوم الزراعات العضوية النظيفة الخالية من الأثر المتبقي للمبيدات كان الاتجاه إلى طرق المكافحة الحيوية كاستراتيجية اقتصادية بديلة وآمنة وأقل ضرراً على التوازن البيئي (Babalola, 2010).

2-9-5- المكافحة الحيوية:

حفزت صعوبة مكافحة ذبول الفوزاريوم الأبحاث في مجال المكافحة الحيوية لذبول الفيوزاريوم حيث تم استخدام سلالات غير ممرضة من *F. oxysporum* للسيطرة على ذبول الفوزاريوم في العديد من المحاصيل كالموز (Nel *et al*., 2007)، والريحان (Larkin and Fravel, 2002)، والخيار (Mandeel, 2007)، والبطيخ (Alabouvette and Couteaudier, 1992)، إلا أن الخوف من تطور سلالات غير ممرضة إلى ممرضة دفع الباحثون إلى توظيف البكتريا المحفزة للنمو Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) في مكافحة بعض الممرضات النباتية، حيث يُطلق مصطلح (PGPR) على مجموعة متعددة من البكتريا المتواجدة في المحيط الجذري (Rhizosphere) وعلى سطح جذور النباتات التي تعمل على تحفيز كمي ونوعي لنمو النباتات بشكل مباشر أو غير مباشر (Babalola, 2010)، وقد أكدت الكثير من الدراسات على الدور الرئيس للبكتيريا المحفزة للنمو في المكافحة الحيوية (Kloepper, 2003; Vasileva and Tringovska, 2019).

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

قسمت البكتيريا PGPR حسب موقعها من جذر النبات إلى خارج خلوية Exo PGPR تتواجد بجوار ومحيط الجذر، وداخل خلوية Indo PGPR تتواجد بين الخلايا وداخلها، وتمتاز منطقة Rhizosphere بغناه بالأنواع البكتيرية عن غيرها من الترب بسبب إفرازات المجموع الجذري التي تعمل كمصدر للمواد المغذية للنمو الميكروبي (Helman *et al*., 2011)، وكمية البكتريا الموجودة بمنطقة Rhizosphere أكثر من 10- 100 مرة من باقي التربة (Ryan, 2009)، وتضم بكتريا (PGPR) أنواعاً تابعة لأجناس مختلفة نذكر منها:

Azospirillum، *Arthrobacter*، *Alcaligenes*، *Acinetobacter*،*Acetobacter*، *Enterobacter*، *Burkholderia*، *Achromobacter*، *Rhizobium*، *Bacillus*،*Azotobacter*، *Pseudomonas*، *Pantoae*، *Ochrobactrum*، *Gluconacetobacter*، *Klebsiella*، *Stenotrophomonas* (Kumar and Saraf, 2015). *Serratia*،*Rhodococcus*

تتميز بكتريا PGPR بأنها حرّة المعيشة في التربة، وتشكل 2-5 % من بكتريا المحيط الجذري، وتعزز نمو النبات ومجموعه الجذري وفق آليتين:

2-9-5- 1- التأثير المباشر:

1. تزويد النباتات بمواد محفزة لنموها كقدرتها على إنتاج أو زيادة تركيز منظمات النمو كالستوكينينات وحمض الإندول الخلي IAA والجبريلينات، حيث لوحظ أن 80% من البكتريا المعزولة من المحيط الجذري كانت قادرة على إنتاج IAA (Saharabudhe, 2011)، كما أعطت سلالات من النوع *Bacillus Megaterium* و *Bacillus Mucilaginosus* ثلاثة أشكال من السيتوكينينات وعند تلقيح نباتات الخيار بمعلق بكتيري من هذين النوعين أدى إلى زيادة معدل نمو النباتات والكتلة الحيوية للبراعم ونسبة الجذور الجانبية (Sokolova *et al*., 2011)، واختبرت قدرة 150 عزلة من بكتريا المحيط الجذري المعززة لنمو النبات PGPR تابعة للأجناس (*Bacillus*، *Pseudomonas*، *Azotobacter*، *Rhizobium*) على

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

إنتاج هرمون IAA حيث وجد أنّ جميع العزلات التابعة للأجناس *Bacillus*، *Pseudomonas*، *Azotobacter* كانت قادرة على إنتاج هرمون IAA (Joseph, 2007; Bharucha, 2013).

2. تثبيت الآزوت الجوي حيث تحول الآزوت الجوي N2 إلى آمونيا وهو الشكل الذي يستفيد منه النبات (حيث يحول النبات الآمونيا إلى أحماض أمينية كالأسبارجين والغلوتاميك) وذلك من خلال ما يسمى التثبيت الحيوي للآزوت Biological Nitrogen Fixation (Swain and Abhijita, 2013).

3. تيسير بعض العناصر المعدنية ليتم امتصاصها من قبل النبات بسهولة فقد أظهرت أنواعاً من *البكتريا Bacillus* قدرتها على تفكيك عنصري البوتاسيوم والفوسفات حيث تستطيع البكتريا إفراز عديد من الأحماض العضوية مثل Carboxylic acid مما يؤدي لانخفاض pH المحيط الجذري فتتحرر الجزيئات المحتوية على الفوسفات مثل Ca3(Po4)2 في الترب الكلسية، وهذا يعد نوعاً من التخصيب الحيوي للترب بعنصر الفوسفور من خلال جعله أكثر ذوبانية وإتاحة بواسطة الأحماض التي تفرزها هذه البكتريا وبالتالي جعل عنصر الفوسفور متاحاً للنبات (Deubel and Merbach,2005)، وقد استخدمت أسمدة حيوية تحوي هذه البكتريا في كل من كوريا والصين كحل مستدام لتحسن إنتاجية النباتات في ترب تعاني من نقص في عنصري K و P، يلعب الفوسفور دوراً أساسياً في العمليات الفيزيولوجية المختلفة في النبات مثل عملية التركيب الضوئي، وتصنيع الكربوهيدرات والبروتينات وكذلك العمليات الاستقلابية وانقسام الخلايا ونقل الصفات الوراثية، وتكوين البذور ونمو الجذور ونقل الطاقة (Zandi and Basu, 2016)، وعلى الرغم من وجود الفوسفور بكميات كبيرة نسبياً في التربة تتراوح ما بين 0.1– 3 غ/كغ، فإنّ الكمية الميسرة منه للنبات تعد، بصفة عامة، قليلة. وقلة تيسره تعود إلى إمكانية ترسيبه بواسطة أيونات الكالسيوم مكوناً الأباتيت الشحيح الذوبان في التربة القلوية أو ترسيبه بواسطة الحديد و الألمينيوم وأكاسيد المنغنيز في الترب الحامضية كما أنه يدمص بواسطة حبيبات الطين أو على سطوح كربونات الكالسيوم، كل هذه الأسباب تؤدي إلى نقص الفوسفور، وهي ظاهرة منتشرة في كثير من الترب في العالم إذ يجب توفر مستوى معين من الفوسفور الميسر في التربة وإذا نقص مستوى الفسفور الميسر عن هذا الحد (الحد الحرج) يحدث انخفاض في نمو النبات،

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

والحفاظ على هذا المستوى يعد شرطاً أساسياً للإنتاج الجيد والمستدامة (Sharma *et al.*, 2009)، كما أثبتت البكتريا *Achromobacter xylosoxidans* المعزولة من المحيط الجذري لنباتات البطيخ إمكانيتها في تعزيز نمو النباتات من خلال تييسر تسهيل امتصاص عنصر الفوسفات وإنتاج هرمون حمض الإندول الخلي(Ngoma *et al.*, 2013).

4. إنتاج مركبات السيدروفور(Siderophore): مركبات مخلبة ذات وزن جزيئي منخفض تفرزها البكتريا خارج خلاياها للتغلب على نقص الحديد من خلال ارتباط الحديد $Fe+^{3}$ ودخول المعقد إلى سيتوبلاسما الخلايا فتحوله من الشكل غير القابل للإفادة (Fe^{+3}) إلى شكل متاح بإرجاعه إلى (Fe^{+2}) وتستفيد منه في نموها (Jha and Saraf, 2015)، ويؤدي ذلك إلى منافسة العوامل الممرضة على الحديد وافتقار الأخيرة للحديد وعدم قدرتها على توفيره، ومن البكتريا المنتجة لمركبات السيدروفور *Azotobacter vinelandii* و *Pseudomonas putida* (Loper and Henkels, 1999).

5. إنتاج غاز سيانيد الهيدروجين: يعد حمض السيانيد HCN مستقلباً ثانوياً تنتجه الكائنات الحية الدقيقة خلال فترة حياتها وتستخدمه البكتريا PGPR المحفزة للنمو في تثبيط العوامل الممرضة للنبات التي تنافسها على المكان والغذاء (Beauchamp *et al.*, 1991).

2-9-5- 2- التأثير غير المباشر:

1. تحريض المقاومة الجهازية المستحثة Induced systemic resistance وهي نوع من المقاومة الجهازية الناتجة عن تفاعل النبات مع الكائنات الحية الدقيقة النافعة المتعايشة في التربة عند إصابة النبات بالجروح (Alizadeh, 2013)، يتحكم بهذه المقاومة إشارات من حمض الياسمين JA والاثيلين ET (Van *et al.*, 2009)، حيث تنتقل جهازياً لتحمي المجموع الخضري، وفق عدة آليات دفاعية منها كالانفجار التأكسدي الذي يمكن أن يؤدي لموت الخلايا ومحاصرة المسبب المرضي ومنع انتشاره وتغييرات في الجدار الخلوي تؤدي لصعوبة اختراقه وتصنيع المركبات المضادة للمسببات المرضية Phytoalexins و البروتينات المرتبطة بالممرض PR-

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

(proteins) (Heil and Bostock, 2002) وغيرها من نواتج الاستقلاب الثانوية (Van peer *et al*., 1991)، زيادة نشاط الأنزيمات الدفاعية مثل Polyphenol oxidase (PPO)، Phenylalanine ammonia lyase (PAL)،Chitinase، glucanase، Catalase، Peroxidase (Anand *et al*., 2007).

2. التضاد : انتخب Zaim وزملاؤه (2013) 29 عزلة بكتيرية من أصل 131 عزلة بكتيرية بعد إجراء غربلة في المخبر ضد الفطر *Fusarium oxysporum* الذي يُصيب الحمص، فوجدوا أنَ 5 عزلات من *Bacillus* spp. أبدت تضاد مع الفطر حيث تراوحت نسبة التضاد من 25.63 إلى 71.11 % .

3. إنتاج المواد المتطايرة: بينت النتائج أن إنتاج المواد المتطايرة له دور هام في تثبيط الممرض، حيث أنتجت عزلات من *Bacillus* spp كمية كبيرة من المواد المتطايرة وثبطت نمو الفطر بنسبة 40%، كما انخفضت شدة الاصابة بذبول الحمص في التجارب الحقلية من 60 إلى 99% في الصنف الحساس ILC482 المعامل بـ *Bacillus* spp.، ومن الميزات الإيجابية الأخرى أنَ البكتيريا *Bacillus* spp يمكن أن تحسن من نمو النبات بالمقارنة مع الشاهد (Zaim *et al*., 2013).

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

الفصل الثالث

مواد البحث وطرائقه

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

3-1-جمع العينات:

جمعت 30 عينة من نباتات العائلة القرعية (خيار، بطيخ أحمر، كوسا، شمام) وكل عينة تضم أربعة نباتات من كل حقل تظهر عليها أعراض الإصابة بمرض الذبول من اصفرار وذبول المجموع الخضري وتلون للأنسجة الوعائية من مناطق مختلفة في سورية خلال صيف 2020، وضعت العينات في أكياس من النايلون مع بطاقة تحتوي على رقم العينة ومنطقة الجمع وتاريخ أخذ العينة وتم نقلها إلى مخبر أمراض النبات البكتيرية في كلية الزراعة الجدول (1).

جدول (1) موقع وعدد العينات النباتية التي ظهرت عليها أعراض الذبول

العائل النباتي	عدد العينات	منطقة الجمع	المحافظة	الأعراض المشاهدة
الخيار	5	أبي جرش	دمشق	الاصفرار العام على أوراق النبات، جفاف الأوراق، تلون الأوعية الناقية باللون البني للساق
الكوسا	4			
البطيخ	5			
البطيخ	2	طيبة	ريف دمشق	تلون الأوعية الناقلة بلون بني، وموت النبات في الحقل
البطيخ	4		درعا	
البطيخ	5	موحسن	دير الزور	بؤر متفرقة للنباتات المصفرة وأعراض الذول واضحة وتلون الأوعية الناقلة بلون بني، وموت النبات في الحقل
الشمام	5			

3-2-الفحص الظاهري للعينات المصابة بالذبول:

تمّ توصيف الأعراض الظاهرية الموجودة على كل عينة، ومقارنتها مع المراجع المختصة وتصويرها (Boughallebet al., 2007; Booth,1971; Martyn and Vakalounakis,2012).

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

3-3- الأوساط المستخدمة في عزل ذبول فوزاريوم من العوائل القرعية المصابة:

استُخدم في هذه الدراسة وسطان مغذيان لعزل الفطر، ودراسة الصفات الزرعية والشكلية.

3-3-1- وسط أغار البطاطا والدكستروز Potato Dextrose Agar (PDA):

حُضّر هذا الوسط بإذابة 39غرام من المستحضر الجاهز (شركة Titan Biotech) في 1ليتر من الماء المقطر في دورق زجاجي، بعدها تمّ تعقيم الوسط بالاتوكلاف عند حرارة 121 درجة مئوية، لمدة 20 دقيقة، ثمّ بُرّد الوسط قليلاً وأضيف إليه المضادات الحيوية 20 mg/L من Penicillin و 40 mg/L من Streptomycin ثم صُب في أطباق بتري البلاستيكية وتُرك حتى يبرد.

3-3-2- وسط أغار قطع أوراق القرنفل Carnation Leaf Piece Agar (CLA) :

جُمعت أوراق فتية من نباتات القرنفل، ثم قُطّعت إلى قطع صغيرة، ثم جُففت في الفرن الكهربائي عند حرارة 50 درجة مئوية لمدة ساعتين، ثم وُضعت في أوراق من الألمنيوم، وطُويت جيداً لمنع وصول الرطوبة إليها، وعُقمت بجهاز الأوتوكلاف عند حرارة 121 درجة مئوية لمدة 20 دقيقة، ثم وزّعت على أطباق بتري تحتوي وسط أغار الماء المعقم والمبرّد، (Burgess *et al*.,1994).

3-4-عزل مسبب ذبول فوزاريوم من القرعيات:

تم تجهيز العينات في المخبر لعزل المسبب المرضي من منطقة الساق بحدود 10 سم فوق المنطقة التاجية مباشرة، حيث عُقمت هذه المنطقة بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم بتركيز 3% لمدة دقيقتين، غُسلت جيداً بالماء المقطر والمعقم وجُففت على ورق ترشيح وقُطعت إلى أجزاء بطول1سم تقريباً. زُرعت هذه القطع في وسط غذائي Potato dextrose agar (PDA) في أطباق بتري (قطعة في وسط كل طبق)، حُضنت عند حرارة 25 درجة مئوية لمدة عشرة أيام (Agrios ،2005)، ثم أُخذت النموات الهيفية لميسليوم الفطر عند ظهورها، حيث

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

نُقيت في أطباق بتري تحوي نفس الوسط الغذائي وحُضر منها مزارع نقية ثم رُقمت العزلات وأعطيت لكل عزلة رمزاً ورقماً يميزها جدول (1).

حُضر معلق بوغي من العزلات الفطرية بزرع الفطر على وسط PDA وتحضينه في الظلام لمدة 10 أيام حتى تتشكل الأبواغ، ثم وُضع 10 مل ماء مقطر معقم فوق مشيجة الفطر، وحُركت باستخدام إبرة معقمة، ثم أُخذت قطرة من المعلق بواسطة الماصة الشعرية ، وزرعت على وسط PDA، بعد 24 ساعة فحص الوسط تحت المكبرة لالتقاط المشيجة النامية عن بوغة واحدة، ونقلت إلى وسط PDA، وحضنت تحت نفس الشروط السابقة بغية الحصول على مستعمرة فطرية ناتجة عن بوغة واحدة (Burgess *et al.*,1994) لإكثارها والحفاظ على حيويتها وحفظها على الوسط PDA في البراد لاستخدامها لاحقاً.

3-5-تعريف أنواع الجنس *Fusarium* بالاعتماد على الصفات الزرعية والشكلية:

دُرست الخصائص الزرعية لـ 25 عزلة على الوسط PDA من حيث شكل المستعمرات ولونها وقطرها، والصبغات التي تنتجها ضمن الآغار بعد 10-14 يوماً من التحضين عند حرارة 25 ±3 درجة مئوية في الظلام (Akbar *et al.*, 2018). كما دُرِست الخصائص الشكلية للأبواغ الكونيدية الكبيرة Macrconidia المتشكلة على وسط أغار قطع أوراق القرنفل، وصفات الأبواغ الكونيدية الصغيرة Microconidia، وكيفية توضّعها على الحوامل البوغية بعد 6- 10 أيام من التحضين على وسط أغار البطاطا والدكستروز PDA عند حرارة 25 درجة مئوية ، بالإضافة إلى نمط الفياليدات Phialide والحوامل البوغية Conidiophores.

فُحصت المزارع بمعدل كل أسبوع أو أسبوعين لمراقبة تشكل الأبواغ الكلاميدية Chlamydospores، وكيفية توضعها على حوافها عند العزلات المختلفة. فُحصت أبعاد الأبواغ باستخدام المجهر الضوئي Olympus تكبير ×400 وصورت الأبواغ باستخدام كاميرا موصولة مع برنامج Image view على الحاسوب وحُددت أنواع فوزاريوم المتحصل عليها باستخدام المفاتيح التصنيفية المعتمدة (Ismail *et al.*,2015; Da Costa *et al.*, 2023; Zhou *et al.*, 2010)، ثم اعتمدت الخصائص المظهرية في التشخيص مثل لون المستعمرة الفطرية

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

وشكل حوافها ووجود وشكل الأبواغ الكونيدية الكبرى Macroconidia والصغرى Microconidia وعدد الحواجز وشكل الخلية القمية، ولفحص لون المستعمرة للعزلة الفطرية تم نقل دائرة قطرها 1سم من حافة مستعمرة حديثة لعزلة فطرية نقية الى منتصف طبق بتري حاوي على الوسط PDA وكررت الطريقة ذاتها مع العزلات كافة وحُفظت الأطباق في الظلام عند حرارة 25 ± 2 درجة مئوية ولمدة سبعة أيام (Akbar *et al*., 2018). بعد انتهاء مدة الحضن فحصت المزارع الفطرية خاصة لون المستعمرة وحوافها ومظهر المشيجة الفطرية وتطور صبغتها إن وجدت حسب طريقة Nelson و Summerell وسُجلت النتائج في الجدول (2) (Nelson *et al*., 1983; Summerell *et al*., 2003; Watanabe, 2020; Zidan, 2020)

3-6- حساب سرعة النمو:

لُقحت الأطباق المحتوية على وسط PDA بأقراص منتظمة بقطر5 مم من المزارع الفطرية المعزولة والمُنقاة بعمر7 أيام وبمعدل ثلاثة مكررات لكل عزلة، وحُضّنت في الظلام لمدة 7 أيام عند حرارة 25 درجة مئوية ثم حُسب قطر المستعمرات بعد 7 أيام من التحضين بعمل خطّين متعامدين على قاعدة الطبق، وقياس كلّ منهما وأخذ المتوسط الحسابي وقُدرت سرعة النمو حسب Leslie و Summerell حيث تعد المستعمرة الفطرية ضعيفة النمو إذا تراوح قطر المستعمرة بين 1سم إلى 2.9 سم ومتوسطة النمو اذا تراوح قطر المستعمرة ما بين 3 سم إلى 4.9 سم وسريعة النمو اذا تراوح قطر المستعمرة ما بين 5سم إلى 9 سم (Leslie and Summerell, 2006; Burgess *et al*., 1994).

3- 7- القدرة الإمراضية للعزلات الفطرية مع مضيفاتها النباتية:

أُختبرَت القدرة الإمراضية للعزلات الفطرية لكل عزلة من العائل النباتي المعزولة منه حيث تمَّ زراعة البذور بتحضير التربة من تربة عادية ورمل مازار وتورب بنسبة1:1:1 (وحدة) وعُقمت بالأوتوكلاف عند حرارة 120 درجة مئوية ووزعت في أصص بقطر25 سم، ثم حُضرت معلقات بوغية من مستعمرات فطرية بعمر 10 أيام بتركيز 5×10^5 بوغة/ مل باستخدام شريحة التعداد ومن كل عزلة فطرية على حدة (Sharma *et al*.,

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

2009)، وبمعدل أربعة مكررات لكل معاملة (عزلة فطرية) و3 أصص في المكرر الواحد، ثم سُقيت الأصص بالمعلق البوغي للفطر بمعدل 20 مل، وأعيدت السقاية بالمعلق البوغي بعد شهر أيضاً، ثم أُخذت القراءات بشكل دوري من حيث عدد الأوراق التي بدأت بالاصفرار وذبول الأفرع حيث الهدف هو تأكيد القدرة الإمراضية للعزلات الفطرية على مضيفاتها.

3- 8- العدوى الإصطناعية التصالبية

تم اختيار صنف بلدي لكل من الخيار والكوسا والبطيخ والشمام مصدره الصيدلية الزراعية، أُجريت العدوى الاصطناعية بالعزلات الفطرية التي بلغ عددها 10 عزلات فطرية من الفطر *F. oxysporum* ، بهدف تقييم قدرتها الإمراضية وشراستها، حيث تم تعقيم بذور الأنواع سطحياً باستخدام هيبوكلوريت الصوديوم 3% لمدة دقيقتين، ثم غُسلت بماء مقطر معقم.

زُرعت هذه البذور في صواني تحوي تورب معقم، أُخرجت البادرات بمرحلة 5 أوراق بحذر وُغسلت الجذور بماء جار لتنظيفها من أثار الرمل والتورب ثم خُدشت باستخدام مشرط معقم، وغُمرت الجذور في معلق بوغي بتركيز 5x 10^5 بوغة/ مل لمدة 3 دقائق ولكل عزلة فطرية على حدة بعدها نُقلت البادرات المُعداة إلى أصص بقطر 25 سم تحوي رمل+ تورب + تربة معقمة بمعدل (1:1:1) وحدة حجم بواقع 5 أصص للمعاملة الواحدة وبكل أصيص 3 مكررات ، بالإضافة إلى معاملة شاهد غير معدى. جرت مراقبة تطور المرض على النباتات المعداة وتُركت حتى وصلت لمرحلة النمو الخضري والإزهار، حُددت شراسة العزلات من خلال أخذ قراءات بعد 100 يوم من العدوى وتسجيل عدد النباتات المصابة التي ظهرت عليها أعراض المرض من اصفرار الأوراق السفلية، وحساب عدد النباتات المصابة وتوزيعها وفق سلم تقييم خماسي درجات (0-5) حيث تُعطى الدرجة 0 نباتات سليمة لا تبدي أي أعراض للمرض، الدرجة 1 اصفرار 2- 5 أوراق، الدرجة 2 اصفرار 6 – 9 أوراق، الدرجة 3 اصفرار أكثر من 10 أوراق مع ذبول أحد الأفرع النباتية، الدرجة 4 اصفرار المجموع الخضري

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

مع ذبول في أكثر من فرع في النبات، الدرجة 5 ذبول وموت النبات (Mckinny, 1923)، ثم حُسبت نسبة الإصابة وفق المعادلة :

النسبة المئوية للإصابة =عدد النباتات المصابة / العدد الكلي للنباتات × 100

و حُسبت شدة المرض وفق المعادلة التالية: (Gao *et al.*,1995)

$$R= \sum[(a\times b)\times 100/N\times K]$$

حيث a عدد النباتات المصابة، b الدرجة الموافقة للسلم ، N عدد النباتات الكلي، K أعلى درجة في سلم الإصابة (McKinney, 1923).

3- 9- عزل البكتريا من المحيط الجذري للقرعيات:

أُخذت جذور لنباتات القرعيات سليمة موجودة في جوار نباتات مصابة بالذبول في الحقل وغُسلت بالماء ثم قُطعت جذور البطيخ و الشمام والخيار والكوسا ووضعت في أنابيب معقمة (كل جذر في أنبوب) تحوي ماء مقطر معقم لمدة 10 دقائق للتخلص من حبيبات التربة العالقة عليها، ثم وُضعت في أنبوب اختبار يحوي 5 مل ماء مقطر معقم ورج جيداً لمدة دقيقة لفصل البكتريا العالقة. ومُدد المعلق البكتيري ثلاثة تمديدات بمعدل 10^{-1}، 10^{-2} ، 10^{-3} ومن التمديد الثالث أُخذ 50 ميكروليتر من كل عينة، زرعت في أطباق بتري على كامل الطبق الحاوي وسط الأغار المغذي Nutrient Agar (NA) بمعدل ثلاث مكررات لكل عينة، كما وضع 5غ من التربة المحيطة بالجذور من كل عينة في دورق زجاجي يحوي 100 مل ماء مقطر معقم وتم رج الأنبوب لمدة 5 دقائق على رجاج كهربائي. مُددت كل عينة 6 تمديدات 1^{-10} / 10^{-2} /10^{-3} / 10^{-4} / 10^{-5} /10^{-6} حيث يضاف كل مرة 1 مل من المعلق الى أنبوب اختبار يحتوي 9 مل ماء مقطر معقم ويرج ثم نُشر 10 ميكروليتر من التمديد السادس 10^{-6} على طبق بتري يحوي وسط الأغار المغذي NA على كامل سطح الطبق وكررت العملية لكل عينة ثلاث مكررات.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

حُضنت الأطباق عند حرارة 25 ± 3 درجة مئوية وبعد مرور 48 ساعة من التحضين تم اختيار مستعمرات مختلفة في الشكل واللون أخذت وأُعطيت كل مستعمرة رمزاً محدداً، ثم نقلت إلى طبق بتري يحوي وسط مغذي NA لتنقيتها وحُفظت العزلات بالتجميد باستخدام وسط يحوي (30% +70% LB Broth غليسرول) .

3- 10 - القدرة التضادية للعزلات البكتيرية تجاه عزلتين من فطر الفوزاريوم مخبرياً:

أُجري اختبار التضاد الحيوي في المخبر لـ 40 عزلة بكتيرية ضد العزلتين من فطر الفوزاريوم FO7 و FO5، حيث حُضر مزيج من وسط (NA+ PDA) بنسبة (1:1) وعُقمت عند حرارة 120 درجة مئوية لمدة 30دقيقة، ثم صُب في أطباق بتري بلاستيكية بقطر 9 سم. وُضعت قطعة من العزلتين FO7 و FO5 في مركز الطبق بقطر 1سم وتم تقسيم الطبق إلى 4 أقسام وُضع في كل قسم وعلى بعد 0.5 سم من حافة الطبق العزلات البكتيرية بشكل خط مستقيم وبمعدل 3 مكررات لكل عزلة وبعد 96 ساعة من التحضين عند حرارة 25±3 درجة مئوية تم قياس المسافة الفاصلة بين نهاية المستعمرة الفطرية والنهاية المقابلة من النمو البكتيري باستخدام مسطرة ميليمترية (Ajilogba *et al.*, 2013).

3- 11- تقدير نسبة التثبيط للعزلات البكتيرية تجاه عزلتين من فطر الفوزاريوم مخبرياً:

دُرست القدرة التضادية للعزلات البكتيرية تجاه عزلتي الفطر FO7 و FO5 في أطباق بتري تحتوي وسط صلب مكون من مزيج وسط فطري وبكتيري NA+PDA بنسبة 1:1 حجماً حيث حُضر معلق بكتيري بتركيز 10^{-6} CFU للعزلات البكتيرية من كل عزلة على حدة، ثم أخذ 50 ميكرو ليتر من هذا المعلق ونُشر على سطح الطبق بمعدل 5 أطباق لكل عزلة، ترك المعلق حتى يجف على سطح الطبق لمدة 10 دقائق.

أُخذ جزء من مستعمرة فطرية نقية بقطر 5 مم وزُرعت بوسط كل طبق، كما زُرعت أطباق الشاهد بالعزلة الفطرية بدون المعلق البكتيري وبواقع 5 مكررات. حُضنت الأطباق عند حرارة 25 درجة مئوية لمدة 7 أيام. تم

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

قياس قطر المستعمرة في اليوم السابع كمتوسط لقطرين متعامدين لمقارنته مع الشاهد وحساب نسبة التثبيط (Gao *et al.*, 1995) من خلال المعادلة التالية:

نسبة التثبيط % =(قطر مستعمرة الشاهد– قطر المستعمرة المعاملة/ قطر مستعمرة الشاهد)× 100

وأُنتخبت أفضل العزلات البكتيرية، من حيث قدرتها على تثبيط نمو الفطر في الطبق، لكي يتم تعريفها بالاختبارات الكيميائية الحيوية.

3- 12 - تعريف العزلات البكتيرية المثبطة لنمو مسبب ذبول فوزاريوم بيوكيميائياً:

عُرفت العزلات البكتيرية المنتخبة تبعاً للاختبارات البيوكيميائية وهي :

3-12-1-اختبار صبغة غرام Gram stain test: (Colwell and Grigrova ,1987)

الكواشف المستخدمة : الكريستال البنفسجي ومحلول الليغول ومحلول السفرانين

الهدف من هذا الاختبار تحديد شكل الخلية البكتيرية، ومعرفة ما إذا كانت موجبة أم سالبة غرام، حيث أن البكتيريا موجبة غرام تظهر بلون بنفسجي داكن، والبكتيريا سالبة غرام تظهر بلون وردي أو أحمر.

تعلق البكتيريا في قطرة ماء مقطر موضوعة على شريحة، ويثبت المعلق بالتسخين على اللهب، يصبغ المحضر بالكريستال البنفسجي لمدة 1 دقيقة، ثم يغسل المحضر بمحلول الليغول، ثم بالماء، ثم بالكحول 95%، ثم يغسل المحضر بالماء المقطر، ثم يصبغ بالسفرانين لمدة 3-2 دقيقة، ويغسل بالماء، ويفحص بالعدسة الزيتية الغاطسة.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

3-12-2-اختبارغرام بطريقة GRAM reaction RYV: (Suslow *et al.*, 1982)

يُحضر محلول من ماءات البوتاسيوم KOH 3%، نضع قطرة من هذا المحلول على شريحة مجهرية ويحُضر منها معلق بكتيري بواسطة إبرة التلقيح. إذا شوهدت اثناء تحضير المعلق خيوط لزجة على إبرة التلقيح تكون البكتيريا سالبة غرام، أما إذا انفصلت الكتلة البكتيرية بسهولة من إبرة التلقيح ولم تشكل خيوطاً لزجة فهذا يعني أنها موجبة غرام. والهدف من هذا الاختبار معرفة ما إذا كانت موجبة أم سالبة غرام

3-12-3-اختبار الأكسيداز Oxidase Test **(**Aryal, 2022**)**:

يفيد هذا الاختبار بصورة خاصة لتمييز جنس *Pseudomonas* عن غيره من العصيات سالبة الغرام. يوضع 1% من كاشف Tetra-methyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD)، في الماء على ورقة ترشيح، ثم تنقل المستعمرة بحلقة التلقيح إلى قرص الكاشف وتمزج جيداً حيث يدل ظهور اللون البنفسجي الذي يظهر بعد 10 ثواني على أنّ الاختبار موجب

3-12-4-اختبار قدرة البكتيريا على التبوغ (Vries, 2011):

يحضر معلق بكتيري كثيف من مستعمرة بكتيرية هرمة عمرها عدة أيام، يوضع المعلق في أنبوب. يغمس الأنبوب في حمام مائي درجة حرارته 80 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة، تُخرج الأنابيب وتفتح في ظروف التعقيم ويوزع منها بضع قطرات على وسط مغذي في طبق بتري، ثم تحضن على درجة ملائمة لمدة 24-48 ساعة. إذا نمت البكتيريا بعد التحضين وهذا يدل على قدرتها على التبوغ.

3-12-5-انتاج البكتيريا للصبغات الوميضية على وسط King B (King *et al.*,1954):

تنتج بعض أنواع بكتيريا *Pseudomonas* صبغات وميضية إذا نمت على وسط King B الذي يحوي على كميات قليلة من الحديد، وهي تبدو خضراء وميضية إذا عرضت للأشعة فوق البنفسجية، تزرع البكتيريا

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

بشكل خط طولي على وسط King B، بعد 24 ساعة اذا ظهرت بلون أخضر وميضي تحت الأشعة فوق البنفسجية يدل على أنها أحد أنواع بكتيريا *Pseudomonas* الوميضية.

3-12-6-اختبار فرط الحساسية على التبغ (Klement and Goodman, 1967):

يجرى هذا الاختبار للتأكد من أن البكتيريا المعزولة ممرضة للنبات. ويتم بحقن معلق من البكتيريا المراد اختبارها (10^9 خلية بكتيرية / مل) بواسطة محقن (سيرينغ)، يتم الحقن بجانب العصب الأساسي لورقة نبات التبغ أو أحد الأعصاب الثانوية. يسمح هذا الحقن بارتشاح المعلق البكتيري ضمن نسيج الورقة كما يجب أن تكون مساحة الجزء المحقون لا تقل عن 1-2 سم2. بعد 24 ساعة من الحقن، إذا لوحظ ذبول وموت النسيج النباتي الذي لامس البكتيريا فالاختبار إيجابي.

3-12-7-اختبار التنفس (Murray *et al.*, 2007):

الهدف من هذا الاختبار تحديد طبيعة تنفس البكتيريا، حيث يضاف إلى الوسط المغذي الخاص بهذا الاختبار أزرق بروم الثيمول كدليل على درجة pH الوسط، كما يضاف للوسط NA سكر الغلوكوز كمصدر للكربون والطاقة، يضاف 3 غ/ل أغار لتشكيل وسط نصف صلب ويوزع الوسط في انابيب اختبار عادية ويُعقم، يستخدم أُنبوبان لكل عزلة بكتيرية، حيث يلقح كلاهما بالبكتيريا ولكن يوضع أحداهما بشكل لا هوائي بإضافة زيت البارافين المعقم على سطح الوسط، ويتم التحضين عند درجة حرارة ملائمة لمدة 24-48 ساعة.

إذا تحول كلا الأنبوبين للون الأصفر: البكتيريا هوائية لا هوائية اختيارية، تحول الأنبوب الذي لا يحوي زيت البارافين إلى اللون الأصفر: البكتيريا هوائية، ، تلون الأنبوب الذي يحوي الزيت البكتيريا لاهوائية اجبارية.

3-12-8-اختبار كاتلاز Catalase Test: (Facklam and Elliott, 1995)

هو اختبار يكشف عن وجود أنزيم الـ Catalase ويقوم هذا الأنزيم بتكسير بيروكسيد الهيدروجين H2O2 إلى ماء واكسجين، يتم إنتاج هذا الأنزيم بواسطة البكتيريا الهوائية أو اللاهوائية الاختيارية أما البكتيريا

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

اللاهوائية، لا تملك القدرة على إنتاج هذا الأنزيم، تضاف كمية صغيرة من البكتيريا المعزولة في محلول بيروكسيد الهيدروجين (3%) على شريحة زجاجية. يدل تشكيل الفقاعات خلال 10 ثواني على أنّ الاختبار موجب.

3-12-9-اختبار تحلل البكتين أو تعفن شرائح البطاطا (Lelliot *et al*., 1966):

يفيد هذا الاختبار في تحديد الأنواع البكتيرية القادرة على إنتاج الأنزيمات المحللة للبكتين. نختار درنات بطاطا سليمة وتغسل جيداً وتجفف، ثم تغمس بالكحول 90% لمدة 10 ثواني، ونمرّرها بسرعة على اللهب. تُقطع كل درنة إلى قطعتين باستخدام سكين معقمة، ثم تُصنع حفرة بقطر وعمق 5 مم في مركز سطح الدرنة المقطوع، نضع أنصاف الدرنات المحضرة سابقاً في وعاء معقم، وضع في قعره ورق ترشيح معقم ومبلل بالماء. يحضر معلق بكتيري من السلالة المراد اختبارها تركيزه 10 8 خلية بكتيرية /مل، وتملأ الحفر المصنوعة في الدرنات بالمعلقات البكتيرية، يقفل بعدها الوعاء الموضوع فيه الدرنات بالغطاء المناسب للمحافظة على رطوبة نسبية عالية، وتحضن الدرنات عند حرارة 25 درجة مئوية لمدة 48 ساعة. في حال حصل تحلل وطراوة في أنسجة البطاطا المحيطة بالحفرة يدل على أنّ البكتيريا أنتجت الأنزيم الذي يحلل البكتين ويعد الاختبار إيجابي.

3-12-10-اختبار تحلل الجيلاتين: (Dela cruz, 2012)

الهدف من الاختبار تحديد نوع البكتيريا القادرة على إنتاج أنزيم الجيلاتيناز المحلل للجيلاتين.

يُحضر وسط يحوي (مستخلص المرق الغذي 5 غ، جيلاتين 120 غ، Enzymatic digest 3 غ gelatin، 1000 مل ماء مقطر)، ويوزع الوسط في أنابيب اختبار بمعدل 5 مل/ أنبوب. تزرع الأنابيب ببكتيريا حديثة النمو، بوخز الوسط من منتصفه بإبرة الزرع، وتحضن الانابيب عند حرارة 25 درجة مئوية لمدة 15 يوماً. ثم توضع الأنابيب في البراد عند حرارة 6 درجة مئوية لمدة 10 دقائق، لكي يأخذ الجيلاتين الشكل الصلب وبعدها نخرج الأنابيب من البراد. إذا كان الجيلاتين في حالة سائلة اختبار إيجابي، الجيلاتين في حالة صلبة اختبار سلبي.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

3-12-11-اختبار تحلل النشاء: (Tille, 2014)

يفيد هذا الاختبار في معرفة ما إذا كانت البكتيريا قادرة على إنتاج أنزيم الأميلاز المحلل للنشاء. يُحضر وسط Starch agar يحوي النشاء القابل للانحلال. يتم تعقيم الوسط ويصب في أطباق بتري ثم تزرع البكتيريا بشكل لطع أو خطوط، ثم يتم التحضين عند درجة حرارة المخبر25 درجة مئوية، وبعد التحضين والحصول على نمو جيد للبكتيريا يضاف إلى الطبق محلول اليود اليودي (محلول الليغول) الذي يلون النشاء باللون البني ويترك هالة غير ملونة حول البكتيريا التي تحلل النشاء.

3-12-12-اختبار تحمل البكتيريا للملوحة بتركيز NaCl 2% (Barra *et al*., 2016)

يستخدم لهذا الاختبار وسط Yeast salts broth يوزع المحلول بعد تمام ذوبان المواد في أنابيب اختبار بمعدل 5 ميليلترات / الأنبوب. ثم تعقم عند حرارة 120 درجة مئوية لمدة 20 دقيقة. تزرع الأنابيب بإضافة قطرتين من معلق بكتيري ثم تحضن الأنابيب على درجة 25°س لمدة أسبوع. يلاحظ تعكر الوسط في حال نمو البكتيريا.

3-12-13-اختبار أحمر الميتيل (Crown and Gen,1998):

يكشف هذا الاختبار عن إنتاج حمض كاف أثناء تخمير الغلوكوز مع الحفاظ على رقم هيدروجيني pH= 4.5، ويتضح ذلك من خلال تغير لون مشعر أحمر الميثيل في نهاية فترة التحضين، يُحضر وسط MRVP يحوي (ببتون 7 غ، غلوكوز 5 غ، فوسفات ثنائي البوتاسيوم 5غ)، ويصب في أنابيب اختبار وبعد التعقيم في الأوتوكلاف يتم زرع البكتريا في الأنابيب ثم التحضين مع الرج لمدة 24 – 48 ساعة ثم يسحب 1 مل من الأنبوب، ويوضع في أنبوب ابندورف ويضاف له 3 – 5 نقاط من مشعر أحمر الميثيل. إذا أعطى حلقة حمراء فالاختبار إيجابي، وإذا أعطى حلقة صفراء يكون الاختبار سلبي.

3-12-14-اختبار اليورياز (Bailey and Scott.1974) :

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

يفيد هذا الاختبار في تحديد البكتيريا القادرة على إنتاج أنزيم اليورياز المحلل لليوريا. تم إجراء الاختبار باستخدام وسط Christensen's urea، ويوزع الوسط في انابيب اختبار 4-5 مل في الأنبوب. وتلقح الأنابيب بالبكتيريا وتحضن عند حرارة 37 درجة مئوية لمدة 48 ساعة، يؤدي إنتاج اليورياز إلى تغير لون الوسط من الأصفر إلى الوردي .

3-12-15- اختبار حلمهة الدم Hemolytic test: (Ruoff *et al.*,1999)

لمعرفة قدرة البكتيريا على حلمهة الدم من خلال زراعتها على وسط blood agar base infusion agar، يغلى الوسط لدقيقة، ثم يعقم بالأتوكلاف ويبرد بعدها إلى حرارة 45-50 درجة مئوية، ويضاف له 5 % دم معقم منزوع الفبرين ويخلط جيداً، وتحضن عند حرارة 37 درجة مئوية /24 ساعة فإذا تشكلت هالات حول المستعمرات فإن الاختبار إيجابي.

3-12-16-اختبار (VP) Voges-Proscaver: (Barry *et al.*,1967)

يعد هذا الاختبار لكشف قدرة البكتيريا على انتاج acetyl-methyl carbinol من تخمير الغلوكوز، تم وضع 10 مل الوسط المغذي في أنابيب، وعقم في الأُوتوكلاف. وقبل زرع البكتيريا تم تركه في وسط حرارة الغرفة لمدة 24 ساعة، تم زرع بكتيريا بعمر 18-24 ساعة، وحضنت لـ 24 ساعة. ثم أُخذ 2 مل من الوسط، ووضع في إنبوب ابندورف معقم، وأُضيف له 6 قطرات من كاشف Alpha-naphtol 5% ونخلطها جيداً، ثم يضاف له قطرتان من كاشف هيدروكسيد البوتاسيوم وتترك لمدة 30 دقيقة، ظهور حلقة باللون الوردي أو الأحمر دليل اختبار إيجابي.

3-12-17- حركة البكتيرية: (Shields and Cathcart, 2011)

يفيد هذا الاختبار لمعرفة ما إذا كانت البكتيريا متحركة ام لا. تزرع خزعة من مستعمرة حديثة بعمر 18-24 ساعة في الوسط المغذي الخاص بهذا الاختبار، يوزع الوسط في أنابيب 5 مل ويعقم بالأوتوكلاف، ثم

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

تزرع الخزعة حتى منتصف الأنبوب بشكل عامودي، وتحضن بدرجة حرارة مناسبة مدة 24 ساعة، إذا انتشرت البكتيرية بكامل الوسط تعتبر متحركة وإذا نمت فقط في خط الزرع تعتبر غير متحركة.

3-13- اختبارات انتماء البكتريا المضادة لزمرة البكتريا الجذرية المحفزة لنمو النبات:

3- 13-1- اختبار تحلل الفوسفات (Gupta *et al.*,2000):

تم تنمية العزلات على بيئة Pikovskaya's agar (PKA) التي تتكون من 10 غ جلوكوز ، ثلاثي فوسفات الكالسيوم 5غ، مستخلص الخميرة 0.5غ، سلفات الامونيوم 0.5 غ، كلوريد البوتاسيوم 0.2غ ، كلوريد الصوديوم 0.2غ ، سلفات المغنيزيوم 0.1 غ بالإضافة الى 15غ أغار ويكمل المزيج بالماء المقطر الى 1ليتر، ثم تُحضن الاطباق عند حرارة 28±2 درجة مئوية لمدة 14 يوم وعند تشكل هالات حول العزلات يدل على قدرة العزلات البكتيرية على تحليل للفوسفات ثم تم قياس القطر الكلي للمستعمرة وقطر الهالة الشفافة باستعمال مسطرة مليمترية وحُسب معامل الإذابة SI من المعادلة

$$SI = D / C$$

حيث SI : معامل الإذابة (Determination of solubilization index)

D : قطرالمستعمرة البكتيرية مضافٌ له الهالة الشفافة، C : قطر المستعمر الكلي Edi-Premono *et al.*,1996).

3- 13-2- اختبار تحلل البوتاسيوم (Meena *et al.*, 2015**):**

تم استخدام وسط الكسندروف الصلب المعدّل المتكون من (glucose %0.5 و 0.05% $MgSO_4.7H_2O$ و $FeCl_3$ %0.0006 و $CaCO_3$ %0.01 و Ca_3PO_4 %0.2 و Mica 0.3%) مصدراً للبوتاسيوم والمضاف اليه صبغة phenyl red ، 20 أغار ويكمل المزيج بالماء المقطر الى 1ليتر ثم ضبط pH الوسط على 6.5) وعقم الوسط في جهاز الأوتوكلاف عند حرارة 121 درجة مئوية ولمدة 20 دقيقة، وبعد

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

صب الوسط في الأطباق تمت زراعة المستعمرات البكتيرية ثم تحضن الاطباق عند حرارة 28±2 درجة مئوية لمدة 7 يوم وعند تشكل هالات شفافة حول العزلات فهذا يدل على قدرة العزلات البكتيرية على إذابة مصدر البوتاسيوم غير الذائب الموجود في الوسط وتم قياس قطر المستعمرة وقطر الهالة بالمسطرة المليمترية وحُسب معامل الإذابة SI من المعادلة:

$$SI = D / C$$

حيث SI : معامل الإذابة، D: قطرالمستعمرة البكتيرية مضافٌ له الهالة الشفافة، C : قطر المستعمر الكلي (Edi-Premono *et al*.,1996).

3- 13-3- اختبار إنتاج هرمون حمض الإندول الخلي:

تم تحضير معلقات بكتيرية للعزلات B2,B10,B20,B25 بتركيز 1×10^{9} cfu/مل باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer على طول موجة 600 nm واستخدم 1 مل من هذه المعلقات في تلقيح كل أنبوب من الأنابيب تحتوي 10 مل وسط King´B السائل (20 غ ببتون، 10غ غليسرول، 1.5 MgSo4.7H2O، 18غ أغار، 2غ L-tryptophan ، 1000مل ماء مقطر) وبمعدل ثلاثة مكررات لكل عزلة، وبعد التلقيح حضنت الأنابيب عند حرارة 25 درجة مئوية مع الرّج بسرعة 125 دورة /دقيقة خلال فترات زمنية مختلفة (24- 48- 72- 96) ساعة تم الكشف عن قدرة العزلات المدروسة على إنتاج الـ IAA حسب طريقة سالكوسكي مع تعديلات طفيفة باستخدام المشعر Perchloric acid 70% مضافاً له Fecl3 0.5M (holt وزملاؤه، 1994) حيث أُخذ المعلق البكتيري وتم التخلص من البكتريا بالتثفيل على 10000 g لمدة خمس دقائق لمرتين متتاليتين عند حرارة 4 درجة مئوية، أُخذ 0.5 مل من الطافي وأُضيف له 2 مل من المشعر وحُضّن لمدة 30 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة وأُوقف التفاعل بإضافة3 نقاط من حمض الفوسفور N10، يؤدي وجود IAA في التفاعل إلى تغير لون المشعر الأصفر إلى اللون الأحمر القرمزي وتم قياس الشدة اللونية بقياس الامتصاصية بوساطة جهاز المطياف الضوئي عند طول موجة nm535، وحددّ التركيز الكمّي لحمض الإندول الخلّي بالمقارنة مع محلول قياسي من الـ IAA التجاري (Schend e/L620253 306) المحضر بعدة بتراكيز(0 ، 3.125 ، 6.25 ، 12.5 ، 25 ، 50 ،200 ، 100) ميكروغرام / مل ضمن وسط King´B السائل حيث ساعد المحلول القياسي في الحصول على معادلة خط مستقيم.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

3-14- كفاءة العزلات البكتيرية المضادة في الحد من ذبول البطيخ والشمام وتأثيرها على نمو النبات:

3-14-1- معاملة التورب

استخدم في هذه التجربة التورب المعقم في الاوتوكلاف عند حرارة 120 درجة مئوية لمدة 20 دقيقة وتُرك في أكياس مغلقة بإحكام لمدة 10 أيام قبل الزراعة.

3-14-2- تحميل اللقاح الفطري على بذور القمح:

غُسلت بذور القمح جيداً بالماء ثم سُلقت مدة 30 دقيقة على درجة 100 درجة مئوية مع مراعاة عدم هرس الحبوب، ثم تصفيتها و جُففت البذور المسلوقة في غرفة العزل للتخلص من الرطوبة الزائدة ثم عُقمت البذور في الأوتوغلاف عند حرارة 120 درجة مئوية لمدة 30 دقيقة على مرتين بفاصل زمني 24 ساعة، ثم زُرع الشكلان الفطريان FO7 و FO5 على أطباق بتري تحوي وسط PDA بمعدل 3 مكررات لكل فطر وتم وضع عدد من بذور القمح المعقمة (10-15) بذرة ليتم نمو الفطر عليها لتحضير اللقاح الأولي، ثم حُضنت الأطباق لمدة خمسة أيام عند حرارة 25 درجة مئوية وبعد ذلك أخذت البذور الحاملة للفطر ووُضعت في وعاء زجاجي الحاوي على بذور القمح المعقم وحضنت مدة 7أيام عند حرارة 25 درجة مئوية تم خلالها تقليب الوعاء الزجاجي لخلط البذور والسماح بنشر الفطور على كامل البذور.

حُضر اللقاح البكتيري بعد تنمية البكتريا على وسط NA حيث حُضنت البكتريا عند حرارة 27 درجة مئوية لمدة 24 ساعة وحضر المعلق البكتيري بتركيز (10^8 CFU / مل) من خلال قياس تركيز البكتيريا في الماء المقطر المعقم وقياس الامتصاصية عند طول موجة 600 نانومتر، باستخدام المطياف الضوئي. تمت عدوى التورب في الأصص ببذور القمح الحاملة للفطر بوضع 10 بذور في كل إصيص ثم زرعة بذور البطيخ والشمام بوضع بذرة بكل إصيص بعد غمرها بالمعلق البكتيري تركيز 10^8 CFU / مل لمدة 24 ساعة قبل الزراعة وتم تجهيز الأصص وفق المعاملات التالية:

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

1. معاملات تضم بذور البطيخ والشمام سليمة
2. معاملات تضم بذور البطيخ والشمام معاملة بالعزلات البكتيرية
3. معاملة تضم بذور البطيخ والشمام مُعداة بالعزلات الفطرية فقط
4. معاملة تضم بذور البطيخ والشمام مُعداة بالعزلات الفطرية و معاملة بالعزلات البكتيرية.

أُستخدمت لكل معاملة خمسة أصص ووضعت في البيت البلاستيكي وتمت السقاية بعد الزرع مباشرة والري حسب الحاجة، واعتمد سلم خماسي (0-5) لتقييم شدة المرض والأعراض الظاهرية على النباتات (Mckinny, 1923)، حيث تُعطى الدرجة 0 نباتات سليمة لا تبدي أي أعراض للمرض، الدرجة 1 اصفرار 2-4 أوراق، الدرجة 2 اصفرار 5 – 9 أوراق، الدرجة 3 اصفرار أكثر من 10 أوراق مع ذبول أحد الأفرع النباتية، الدرجة 4 اصفرار المجموع الخضري مع ذبول في أكثر من فرع في النبات، الدرجة 5 ذبول وموت النبات.

تمت مراقبة وقياس مؤشرات النمو لمعرفة مدى تأثير كل من العزلتين الفطريتين والعزلات البكتيرية المستخدمة على طول النبات وهل حفزت هذه البكتيريا على النمو، ثم أُخذت القراءات التالية بعد 60 يوم من الزراعة تم قلع النباتات ودرست المؤشرات التالية:

1. شدة المرض وفق السلم المعتمد ونسبة الإصابة
2. طول المجموع الخضري وطول المجموع الجذري
3. الوزن الرطب والجاف للمجموع الخضري.
4. الوزن الرطب والجاف للمجموع الجذري

وسُجلت القياسات لكافة المؤشرات السابقة.

3-15- التحليل الإحصائي:

تم تحليل البيانات بطريقة تحليل التباين أحادي الاتجاه باستخدام برنامج Genstat النسخة 12، وتمت المقارنة بين المتوسطات باستخدام اختبار أقل فرق معنويLSD (Least Significant Difference) على مستوى معنوية 1% و5 % عند مستوى ثقة 99%.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

Results and Discussion

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

4-1- الفحص الظاهري للعينات المصابة بالذبول

أظهرت النتائج إلى وجود وانتشار مرض ذبول الفوزاريوم الوعائي على القرعيات في مناطق الدراسة (دمشق، ريف دمشق، دير الزور ودرعا). وأثناء الجولات الحقلية سُجلت أعراض الإصابة بهذا المرض، والتي بدت بشكل موت عام للنبات مع بقع ذبول للنباتات في الحقل المزروع، وخاصة ذبول للأوراق (الشكل 3)، وفي بعض الأحيان كانت الإصابة على شكل بؤر متفرقة في الحقل وخاصة النباتات الفتية (الشكل 6). كما لوحظت الأعراض بشكلين: الأول هو اصفرار الأوراق، بدءاً من الأوراق السفلية نحو الأعلى، وغالباً ما اقتصر على جانب واحد من النبات أو أصاب غصن واحد الشكل (4)، والشكل الثاني ذبول وموت في النباتات بدءاً من أسفل النبات نحو الأعلى.

لوحظ ذبول الساق وتحلله من الداخل مع بقاء الساق أخضر وصلب من الخارج، وتلون الأوعية الناقلة باللون البني المحمر، الذي تمت مشاهدته بشكل خطوط عندما أجريت مقاطع طولية في نسيج الساق.

أما الشكل الثاني من الأعراض، شوهدت على الجذور، بشكل تعفن في الجذور الرئيسية والثانوية يمتد الى منطقة التاج وتحول الجذور للون البني المسود (الشكل 7). وعندما أجري مقطع عرضي بالقرب من قاعدة ساق النبات المصاب لوحظ وجود حلقة بنية اللون في مستوى الأوعية الناقلة (الشكل 8) واختلف ظهور هذه التلونات الوعائية في الأجزاء العلوية من النبات حسب شدة الإصابة، ولعلّ السبب الفيزيولوجي لهذه الأعراض إلى انسداد الأوعية الناقلة بهيفات الفطر وتشكيل التيلوزات كرد دفاعي من قبل النبات (Srinivas *et al*., 2019) وقدرة الفطر على إفراز حمضFusaric acid الذي يمنع الجذر من امتصاص الماء (Wu *et al*., 2010).

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner



الشكل3 أعرض الإصابة بالذبول على الكوسا (أبي جرش، دمشق)



الشكل 4 أعرض الإصابة بالذبول على الخيار (أبي جرش، دمشق)

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner



الشكل 5 أعرض الإصابة بالذبول على البطيخ (درعا)



الشكل 6 أعراض الإصابة بالذبول على الشمام (موحسن، دير الزور)

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner



الشكل 7 تلون بعض جذور النباتات المصابة باللون البني



الشكل 8 تلون بني في الأوعية الناقلة

4-2- تعريف أنواع الجنس *Fusarium* بالاعتماد على الصفات الزرعية والشكلية:

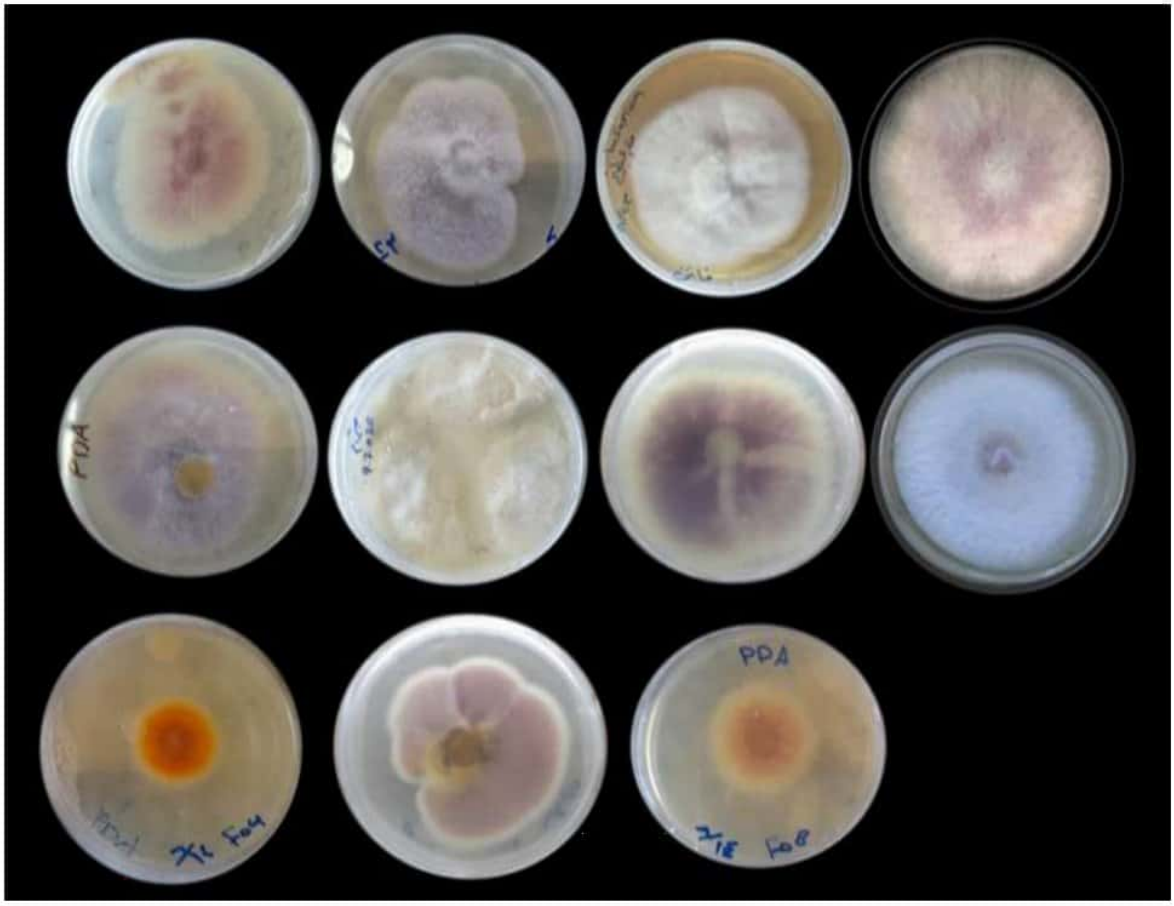
بعد جمع العينات النباتية للمحاصيل القرعية المُصابة بالذبول من أربع محافظات سورية تم الحصول على 10 عزلات فطرية (FO1,FO2,FO3,FO4,FO5,FO6,FO7,FO8,FO9,FO10) تابعة للجنس *Fusarium oxysporum* فقد شكّلت العزلات الناتجة في هذه الدراسة خيوطاً فطرية ذات مظهر زغبي أو قطني (الشكل 9) على الأجزاء النباتية بعد التحضين في أطباق تحوي ورق نشاف مبللة بالماء.



الشكل 9 جذور وأجزاء من الساق لعزل المسبب المرضي ولوحظ نمو مشيجة على بعضها بعد التحضين

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

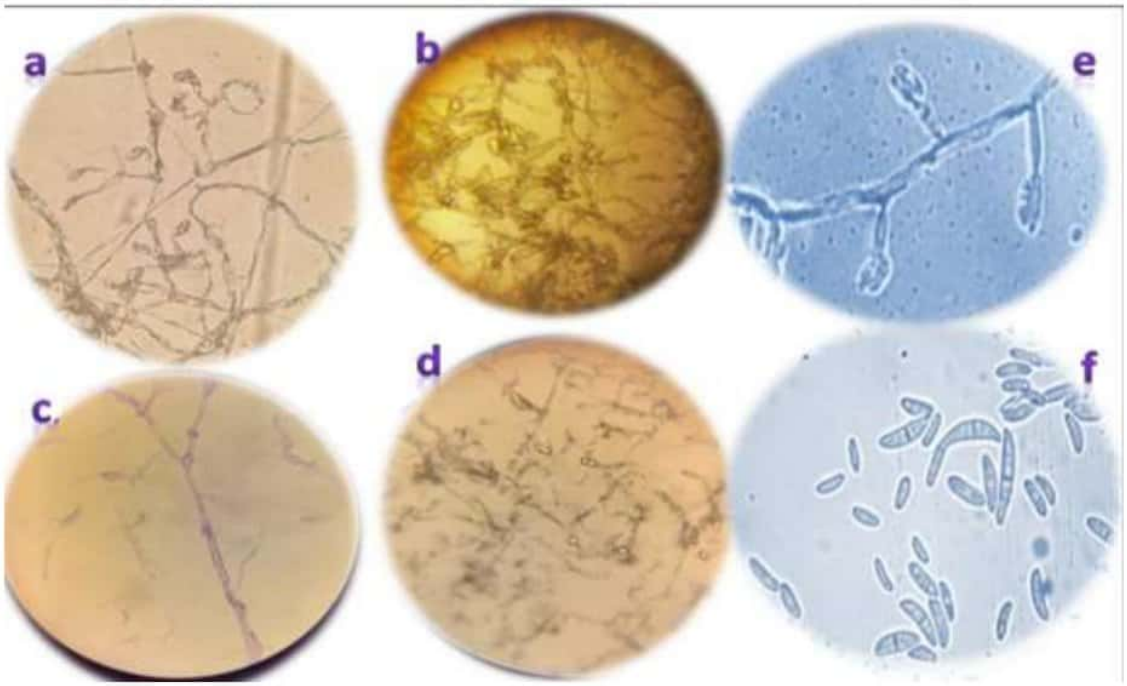
و ظهرت على أوساط الزرع مشيجة ذات مظهر زغبي أو قطني بيضاء إلى بنفسجية اللون، وكوّنت بعض العزلات صبغة بنفسجية وأخرى صبغة حمراء قرمزية أو برتقالية اللون في الأغار (الشكل 10).



الشكل (10) أشكال وألوان المزارع الفطرية لعزلات ***Fusarium oxysporum*** معزولة من نباتات العائلة القرعية

وعند الفحص المجهري لوحظ تواجد الأبواغ الصغرى بأعداد كبيرة، وحيدة أو ثنائية الخلية، بيضاوية الشكل أو منحنية قليلاً وتشكلت على رأس الحوامل الكونيدية القصيرة Conidiophores وحيدة الفياليد Monophialides، تراوح أبعاد الأبواغ الصغرى بين 4.4×2.1 µm و 8.3× 3.6 µm بينما الأبواغ الكبرى عريضة رقيقة الجدران ذات 3–5 حواجز عرضية وتمتلك خلايا قمية مقوسة الشكل، تراوحت أبعادها بين 21.8×2.4 µm و 43.8×6.3 µm وسجلت أبعاد الأبواغ الكونيدية الصغرى والكبرى للعزلات في الجدول (2)، أما الأبواغ الكلاميدية Chlamydospores كانت مكورة أو بيضاوية سميكة الجدار مفردة عادة طرفية وأحيانا بينية أو ملتحمة ببعضها على شكل سلاسل قصيرة، وتشكلت على المستعمرات القديمة الشكل (11,e)

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner



الشكل (11) التوصيف الشكلي لأبواغ العزلات التابعة للنوع *F. oxysporum* حيث f: الابواغ الكونيدية الكبرى و الصغرى: e الحوامل الكونيدية القصيرة، d: الابواغ الكلاميدية a و b و c المشيجة الفطرية باستخدام المجهر الضوئي

الجدول (2) الخصائص المجهرية للعزلات الفطرية من النوع *F. oxysporum*

رمز العزلة	شكل الأبواغ الكونيدية الكبرى	شكل الأبواغ الكونيدية الصغرى	أبعاد الابواغ الكونيدية الكبرى (µm)	أبعاد الابواغ الكونيدية الصغرى (µm)
FO1	هلالية	بيضوية	3.4×30.5	2.7×7.1
FO2	هلالية	بيضوية	4.6×33	2.3×7.9
FO3	هلالية	متطاولة	3×31	2.5×5.9
FO4	هلالية	متطاولة	5.3×25.33	2.1×4.4
FO5	هلالية	بيضوية	5.2×37.5	2.7×8.3
FO6	هلالية	بيضوية	3.8×29.22	3.3×6.7
FO7	هلالية	متطاولة	6.3×43.8	3.6×9.5
FO8	هلالية	متطاولة	4×23.4	2.4×5.8
FO9	هلالية	متطاولة	2.4×21.8	3.4×6.9
FO10	هلالية	متطاولة	2.9×27.35	1.7 ×5.64

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

الجدول(3): الخصائص الشكلية للعزلات الفطرية من النوع *F.oxysporum*

النبات العائل	*Fusarium oxyspoum* (*FO*)	الخصائص الشكلية					
		سرعة النمو	قوام المستعمرة	حواف المستعمرة	لون سطح المستعمرة		متوسط قطر المستعمرة سم
					العلوي	السفلي	
الخيار	FO1	متوسطة	قطني	غير منتظمة	أبيض	أبيض	4.4
الخيار	FO2	متوسطة	قطني	غير منتظمة	أبيض	بنفسجي	3.8
الكوسا	FO3	متوسطة	قطني	منتظمة	أبيض	مائل للإرجواني	3.9
الكوسا	FO4	متوسطة	قطني	منتظمة	أبيض	أبيض	4.2
الشمام	FO5	سريعة	قطني	منتظمة	أبيض	برتقالي	5.2
الشمام	FO6	متوسطة	قطني	منتظمة	أبيض	أبيض زهر	4.9
البطيخ	FO7	سريعة	زغبي قطني	مشرشرة	أبيض	أبيض	6.8
البطيخ	FO8	سريعة	زغبي قطني	غير منتظمة	أبيض الى البنفسجي	بنفسجي	5.4
البطيخ	FO 9	سريعة	زغبي قطني	مشرشرة	أبيض يميل البنفسجي	بنفسجي	5.3
البطيخ	FO 10	سريعة	قطني	غير منتظمة	بني فاتح	أحمر قرمزي	5.4

توافقت النتائج مع ماذكره Joffe (1974) أن الأبواغ الكبيرة التابعة لأنواع الجنس *Fusarium* تمتلك الشكل الهلالي أو المغزلي والأبواغ الصغيرة متطاولة أو هلالية وتفرز المشائج الفطرية صبغات في الوسط وهذا ما أكدته دراسات (Nelson *et al*., 1983; Callaghan *et al*., 2016)، اختلفت العزلات التي تمّ الحصول عليها في سرعة النمو عند تحضينها على وسط PDA في الظلام عند حرارة 25 ± 2 درجة مئوية حيث تراوحت سرعة النمو للعزلات الفطرية مابين 3.8 سم للعزلة FO2 إلى 6.8 سم للعزلة FO7 بعد 7 أيام من التحضين عند 25 ± 2 درجة مئوية الجدول (3) وجاءت النتائج متوافقة مع ماذكره (Nelson *et al*., 1990; Walker,1971) حيث تراوحت سرعة النمو لعزلات النوع *F. oxysporum* مابين 3.8 سم إلى 8.5 سم، وهذا يتوافق مع Booth (1971) الذي حدد أن نمو المستعمرات الفطرية للنوع *F. oxysporum* يكون سريعاً حيث يتراوح قطر المزارع الفطرية بين 7 – 10 سم حيث تعد المستعمرة ضعيفة النمو إذا كان قطر المستعمرة أقل من

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

3 سم و متوسطة النمو إذا كان قطر المستعمرة بين 3.1– 5 سم و سريعة النمو إذا كان قطر المستعمرة أكبر من 6 سم وذلك بعد 7 أيام من التحضين عند 25 ± 2 درجة مئوية (Leslie and Summerell, 2006).

تشابهت ألوان المستعمرات والأصبغة التي تنتجها الأشكال المدروسة من *F. oxysporum* مع ما توصل إليه كل من Ciampi وآخرون (2009) و Ismail وآخرون (2015) و Al-Tuwaijri (2015)، وبالنسبة للتوصيف الشكلي للفطر فقد تطابق توصيف الأبواغ الكونيدية الصغرى والكبرى جدول () والحوامل الكونيدية مع تصنيف كل من Aris وأخرون (2020) و Zidan (2020) و Din وأخرون (2020) حيث تميّزت الحوامل الكونيدية عند *F. oxysporum* بأنها قصيرة كما وصفها (Leslie and Summerell, 2006).

4–3– القدرة الإمراضية للعزلات الفطرية على مضيفاتها:

أجريت تجربة القدرة الإمراضية لـ 10 عزلات فطرية عُزلت من عوائل مختلفة للقرعيات بتطبيق فرضية كوخ وبمعدل ثلاث مكررات لكل عزلة حيث ظهرت أعراض الإصابة على النباتات المعداة بعد 90 يوم من إجراء العدوى فكانت العزلتان FO1 و FO2 ممرضتان على الخيار والعزلتان FO3 و FO4 ممرضتان على الكوسا وكانت الأعراض الأولى عبارة اصفرار للأوراق السفلية وذبول لفرع نباتي أو أكثر الشكل(12) والعزلتان FO5 و FO6 ممرضتان لنبات الشمام حيث بدت النباتات مصفرة وذبول لبعض الأفرع الشكل(14)، أما العزلات FO7، FO8، FO9، FO10 فكانت ممرضة لنبات البطيخ الشكل (13)، وهذه الأعراض تتوافق مع ما ذكرته الدراسات السابقة حول ما يسببه الفطر من أعراض على النبات العائل (Martyn and McLaughlin 1983; Zhou *et al*., 2010) ولعل ذلك يعود لقدرة الفطر على النمو وتقدم المشيجة في الأوعية الخشبية ممايمنع وصول النسغ الناقص لبعض الأفرع النباتية كما ذكر كل من (Din *et al*., 2020 ; Egle and Martyn, 2007).

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner



الشكل 12 أعراض المرض بعد تطبيق فرضية كوخ على نبات الكوسا



الشكل 13 أعراض المرض بعد تطبيق فرضية كوخ على نبات البطيخ

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner



الشكل 14 أعراض المرض بعد تطبيق فرضية كوخ على نبات الشمام

4-4- العدوى الإصطناعية التصالبية:

بينت نتائج العدوى التصالبية للعزلات الفطرية على المضيفات النباتية عدم قدرة كل عزلة على إحداث الإصابة على المضيفات القرعية الأخرى فالعزلتان FO1 وFO2 كانت ممرضة فقط على الخيار ولم تظهر أي أعراض على البطيخ والشمام والكوسا، والعزلتان FO3 و FO4 أعطت أعراض الإصابة على الكوسا فقط بينما العزلتان FO5 وFO6 كانت ممرضة للشمام فقط وكذلك العزلات FO7 وFO8 وFO9 وFO10 كانت ممرضة للبطيخ فقط جدول (4)، وبالتالي فإنّ العزلات الفطرية كانت ذات أشكال تخصصية تبعاً للعائل النباتي حيث تعود العزلتان FO1 و FO2 للشكل *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* وهو الشكل المتخصص الذي يُصيب نباتات الخيار وظهرت أعراض المرض عليه دون غيره من القرعيات المُعداة الأخرى وهذا ما أكده كل من (Armstrong and Armstrong, 1981; Snyder and Hansen,1940) والعزلتان FO5 وFO6 من الشكل *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* الذي يُصيب نباتات الشمام وظهرت أعراض المرض عليه دون غيره من القرعيات المعداة الأخرى في حين كانت العزلات FO7, FO8, FO9 و FO10 من الشكل *Fusarium* oxysporum f.sp. *niveum* الذي يُصيب نباتات البطيخ وظهرت أعراض

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

المرض عليه دون غيره من القرعيات المعداة الأخرى، بينما العزلتان FO3 و FO4 فلم نتمكن من تحديد الشكل الخاص بها واعتمدت تسمية النوع ***F. oxysporum***.

الجدول 4 نتائج العدوى الاصطناعية التصالبية على العوائل القرعية

العائل النباتي / العزلة الفطرية	الخيار	الكوسا	الشمام	البطيخ	تعريف العزلة
/الخيار FO1	+	–	–	–	***F.O*.fsp. *cucumerinum***
/الخيار FO2	+	–	–	–	***F.O*.fsp. *cucumerinum***
/الكوسا FO3	–	+	–	–	**F.O**
/الكوسا FO4	–	+	–	–	**F.O**
/الشمام FO5	–	–	+	–	***F.O*.fsp. *melonis***
/الشمام FO6	–	–	+	–	**F.O.fsp . *melonis***
/البطيخ FO7	–	–	–	+	***F.O* f.sp *niveum***
/البطيخ FO8	–	–	–	+	***F.O* f.sp *niveum***
/البطيخ FO9	–	–	–	+	***F.O* f.sp *niveum***
/البطيخ FO10	–	–	–	+	***F.O* f.sp *niveum***

حيث + ظهور أعراض المرض على النبات، – عدم ظهور أعراض المرض على النبات

كما ذكر Zhou وأخرون (2010) أنّ الشكل الممرض *F.* oxysporum f.sp *niveum* متخصص في إصابة نبات البطيخ Water melon وتبين في دراسته وجود أربع سلالات مختلفة الشراسة فيما بينها على نبات البطيخ وأكد أنّ السلالة 3 هي الأقوى شراسة فيما بين السلالات وهذا ما أكدته دراسات كل من (Amaradasa *et al*., 2018) وكذلك دراسات Roberts وأخرون (2019).

كما أكد Hudson وأخرون (2021) أنّ الشكل الممرض الذي يُصيب البطيخ هو *F. oxysporum* f.sp *niveum* ويمتلك أربع سلالات مختلفة الشراسة فيما بينها على نبات البطيخ (Fulton *et al*.,2021).

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

وأكد ذلك كل من (Cumagun *et al*., 2010; Cafri and Katan, 2005; Vakalounakis *et al*., 2005)، كما يتوافق مع نتائج العدوى التصالبية لكل من (Reid, 1958 ; Davis, 1966; Martyn and McLaughlin, 1983) ويتوافق مع ما ذكره كل من (McMillan 1986; Gerlagh and Blok 1988; Kim *et al*., 1993).

أكد كل من Egel و Martyn (2013) أنّ أشكال النوع *F.oxysporum* خاصة بمضيفاتها وبناءً عليه تبين وجود عدة أشكال ممرضة من النوع *F.oxysoprum* استناداً على خصوصية المضيف فقد كانت العزلة الممرضة المعزولة من العائل النباتي لاتصيب سوى العائل نفسه المعزولة منه سابقاً، كما أثبت كل من (Martyn and Netzer,1991; Zhou *et al*, 2010)، أن الشكل *F. oxysoporum* f.sp. *niveum* تصيب البطيخ *C.lunatus* والشكل الممرض *F. oxysporum* f.sp. *melonis* يصيب الشمام *C.melo* والشكل *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* تصيب الخيار *C.sativus* .

4-5- تقدير نسبة وشدة الإصابة للعزلات الفطرية:

سُجلت شدة الإصابة ونسبة الإصابة لكل من العزلات الفطرية حيث كانت الأعلى من حيث نسبة الإصابة وشدة المرض وفق سلم الإصابة المعتمد العزلة FO7 تليها العزلتان FO5 و FO8 (الجدول 5). ولوحظ أنّ قطر المستعمرة ونسبة الإصابة في العزلة FO7 كانت الأعلى حيث بلغ متوسط قطر المستعمرة 6.8 سم ونسبة الإصابة 69.3 % تليها العزلة FO5 حيث بلغ متوسط قطر المستعمرة 5.2 سم ونسبة الإصابة 48 % ويُعزى ذلك أن البذور المستخدمة هي أصناف محلية وليست هجينة وغير مطعمة على أصناف مقاومة (Fulton *et al*., 2021) حيث أن الأصناف المحلية غير مقاومة للإصابة بالذبول.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

الجدول(5) نسبة الإصابة وشدة المرض للعزلات الفطرية على العوائل القرعية

العزلة الفطرية	العائل النباتي	نسبة الإصابة	شدة الإصابة
FO1	الخيار	%73	%14.6
FO2	الخيار	%53	% 21.3
FO3	الكوسا	%60	% 12
FO4	الكوسا	%66.6	% 13
FO5	الشمام	%80	% 48
FO6	الشمام	%66.6	% 26.6
FO7	البطيخ	%86.6	% 69.3
FO8	البطيخ	%80	% 48
FO9	البطيخ	%73	% 32
FO10	البطيخ	%66.6	% 13

وهذا ما أكده كل من (Snyder and Hansen, 1940; Armstrong and Armstrong, 1981)، كما ذكر Zhou وأخرون (2010) أنّ الشكل الممرض *F. oxysporum* f.sp *niveum* متخصص في إصابة نبات البطيخ Water melon، تبين في دراسته وجود أربع سلالات مختلفة الشراسة فيما بينها على نبات البطيخ وأكد أن السلالة 3 هي الأقوى شراسة فيما بين السلالات وهذا ما أكدته دراسات كل من (Amaradasa *et al.*, 2018) وكذلك دراسات Roberts وأخرون (2019).

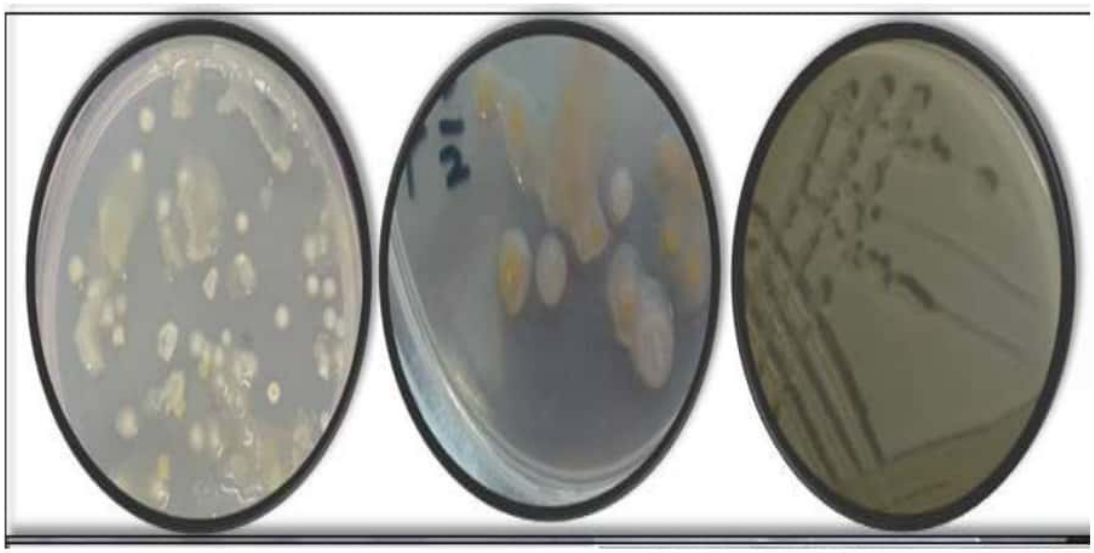
استطاع Hudson وآخرون (2021) تأكيد أنّ الشكل الممرض الوحيد الذي يُصيب البطيخ هو *F. oxysporum* f.sp *niveum* ويمتلك أربع سلالات مختلفة الشراسة فيما بينها على نبات البطيخ (fulton *et al.*,2021)، وهذا ما أكدته دراسات كل من (Cumagun *et al.*, 2010; Cafri *et al.*, 2005 Vakalounakis *et al.*, 2005,)، كما يتوافق مع نتائج العدوى التصالبية لكل من (Martyn and McLaughlin, 1983) ويتوافق مع ما ذكره كل من (McMillan 1986; Kim *et al.*,1993).

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

أكد كل من Egel و Martyn (2013) أن أشكال النوع *F.oxysporum* خاصة بمضيفاتها وبناءً عليه تبين وجود عدة أشكال ممرضة من النوع *F.oxysoporum* استناداً على خصوصية المضيف فقد كانت العزلة الممرضة المعزولة من العائل النباتي لاتصيب سوى العائل نفسه المعزولة منه سابقاً، كما أثبت كل من Martyn and Netzer,1991; Zhou *et al*, 2010) أن الشكل *F. oxysoporum* f.sp. *niveum* تصيب البطيخ *C.lunatus* والشكل الممرض *F. oxysporum* f.sp. *melonis* يصيب الشمام *C. melo* والشكل *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* تصيب الخيار *C. sativus* .

4-6- عزل البكتيريا من المحيط الجذري للقرعيات:

أخذت 60 عزلة بكتيرية من تربة المحيط الجذري للقرعيات التي تم جمعها خلال فترة 2021 - 2023 من الحقول المزروعة بالقرعيات المصابة بالذبول في دمشق وريفها ودير الزور ودرعا حيث وُصفت 40 عزلة منها من حيث تدرج لون المستعمرات من الأبيض إلى الكريمي أو الأبيض المصفر وبعضها تعطي صبغة وميضية أو تميل للون البني في وسط الزرع. ملساء شفافة أو عاتمة قليلاً، محدبة ، مسطحة منتظمة الحواف أو غير منتظمة مسننة الحواف، مستديرة إلى بيضاوية (الشكل15) وتراوحت أقطار المستعمرات النقية النامية على وسط NA بعد 48 ساعة من التحضين ما بين 0.5 و3.5 مم (الجدول 6).



الشكل (15) مظهر بعض العزلات البكتيرية المعزولة من المحيط الجذري للقرعيات

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

الجدول (6) رموز ووصف المستعمرات للعزلات البكتيرية المعزولة من المحيط الجذري للقرعيات

رمز المستعمرة	مصدر العزل	وصف المستعمرة	قطر المستعمرة بعد 48 ساعة من التحضين (مم)
B1	جذور البطيخ، درعا	مستعمرات ذات لون أبيض محدبه	0.5 مم
B2	جذور البطيخ، درعا	مستعمرات ذات لون أبيض تعطي صبغة مخضرة	0.5 مم
B3	جذور البطيخ، درعا	مستعمرات ذات لون أبيض دات حواف مستديرة ملساء	0.7 مم
B4	جذور البطيخ، درعا	مستعمرات بلون أبيض كريمي دات حواف مستديرة	0.5 مم
B5	جذور البطيخ، درعا	مستعمرات غير منتظمة الحواف بلون أبيض حليبي	0.7 مم
B6	جذور البطيخ، درعا	مستعمرات بلون أبيض حليبي ملساء مسننة الحواف	0.9 مم
B7	جذور البطيخ، درعا	مستعمرات بلون أبيض مصفر ملساء مسننة الحواف	0.5 مم
B8	جذور البطيخ، درعا	مستعمرات ملساء منتظمة الحواف بلون رمادي	0.8 مم
B9	جذور البطيخ	مستعمرات رمادية اللون ملساء منتظمة الحواف	0.9 مم
B10	جذور البطيخ، درعا	مستعمرات رمادية اللون مائل للخضرة مدورة	0.9 مم
B11	جذور الشمام، دير الزور	مستعمرات بيضاء كريمية مسننة الشكل شعاعية المظهر	1 مم
B12	جذور الشمام، دير الزور	مستعمرات بيضاء كريمية محدبة المظهر	1.2 مم
B13	جذور الشمام، دير الزور	مستعمرات بيضاء كريمية بركانية المظهر	1.5 مم
B14	جذور الشمام، دير الزور	مستعمرات بيضاء كريمية مدورة المظهر ملساء	1.4 مم
B15	جذور الشمام، دير الزور	مستعمرات شفافة مائلة للأصفر منتظمة الحواف	2 مم
B16	جذور الشمام، دير الزور	مستعمرات مائلة للأصفر ملساء السطح منتظمة الحواف	1.6 مم
B17	جذور الشمام، دير الزور	مستعمرات مائلة للأصفر المخضر السطح منتظمة الحواف	1.6 مم
B18	جذور الشمام، دير الزور	مستعمرات مائلة للأصفر ملساء السطح مسننة الحواف	1.8 مم
B19	جذور البطيخ، ريف دمشق	مستعمرات دائرية ملساء بيضاء مسننة الحواف	2 مم
B20	جذور البطيخ، ريف دمشق	مستعمرات دائرية ملساء بيضاء كريمية محدبة المظهر	2 مم

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

B21	جذور البطيخ، ريف دمشق	مستعمرات دائرية خشنة بيضاء كريمية	2 مم
B22	جذور البطيخ، ريف دمشق	مستعمرات شعاعية المظهر بيضاء كريمية	2 مم
B23	جذور البطيخ، ريف دمشق	مستعمرات دائرية ملساء بيضاء كريمية منتظمة الحواف	1.8 مم
B24	جذور البطيخ، ريف دمشق	مستعمرات بيضاء شفافة غير منتظمة الحواف مركزها الوسط بلون أبيض غامق	1.8 مم
B25	جذور البطيخ، ريف دمشق	مستعمرات بيضاء كريمية مع هالة شفافة غير منتظمة الحواف	1.7 مم
B26	جذور البطيخ، ريف دمشق	مستعمرات شعاعية المظهر بيضاء كريمية مع هالة صفراء	1.7 مم
B27	جذور الخيار، ريف دمشق	مستعمرات دائرية ملساء بيضاء منتظمة الحواف	2.4 مم
B28	جذور الخيار، ريف دمشق	مستعمرات دائرية ملساء بنية محمرة مشرشرة الحواف	2.4 مم
B29	جذور الخيار، ريف دمشق	مستعمرات دائرية ملساء بيضاء شعاعية المظهر	2.6 مم
B30	جذور الخيار، ريف دمشق	مستعمرات دائرية ملساء بيضاء كريمية محدبة المظهر	2.4 مم
B31	جذور الخيار، ريف دمشق	مستعمرات بيضاء كريمية دائرية لها قبة في الوسط	2.3 مم
B32	جذور الخيار، ريف دمشق	مستعمرات بيضاء كريمية دائرية بلون مصفر في الوسط	2.5 مم
B33	جذور الخيار، ريف دمشق	مستعمرات دائرية ملساء بني داكن منتظمة الحواف	2.5 مم
B34	جذور الكوسا، ريف دمشق	مستعمرات دائرية ملساء متوسطة منتظمة الحواف	3 مم
B35	جذور الكوسا، ريف دمشق	مستعمرات متطاولة بني قاتم غير مسننة الحواف	3 مم
B36	جذور الكوسا، ريف دمشق	مستعمرات دائرية بني قاتم غير منتظمة الحواف	3.4 مم
B37	جذور الكوسا، ريف دمشق	مستعمرات دائرية ملساء بنية قاتمة محدبة المظهر	3.3 مم
B38	جذور الكوسا، ريف دمشق	مستعمرات كبيرة ملساء بنية قاتم منتظمة الحواف	3.5 مم
B39	جذور الكوسا، ريف دمشق	مستعمرات دائرية عاتمة مشرشرة الحواف	3 مم
B40	جذور الكوسا، ريف دمشق	مستعمرات دائرية ملساء بنية اللون منتظمة الحواف	3 مم

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

4-7- مسافة التضاد بين العزلات البكتيرية والعزلات الفطرية ونسبة التثبيط مخبرياً:

أظهرت تجربة التضاد بالقطاعات بين العزلات البكتيرية تجاه FO7 و FO5 وجود عزلات أبدت صفة التضاد ضد الفطرين الشكل (16) حيث بينت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية بين متوسط مسافة التضاد الفاصلة للعزلات البكتيرية المدروسة، وكل من الفطرين الممرضين FO7 و FO5 مخبرياً، حيث أعطت العزلات B20، B2، B10، B25 أعلى قيم لمسافة التضاد مع الفطر FO7 (11.31، 9.71، 9.45، 9.34)مم على الترتيب دون أن تُسجل أي فروق معنوية بينها، بينما سجلت العزلات البكتيرية B26، B34، B11، أدنى قيمة معنوية لمسافة التضاد 1.15، 1.29، 1.40 مم على الترتيب دون أن تسجل أية فروق معنوية فيما بينها في حين أعطت العزلات B20، B25، B10، B2 تجاه الفطر FO5 أعلى قيم لمسافة التضاد 10، 9.90، 9.60، 9.50 مم على الترتيب دون أن تسجل أية فروق معنوية فيما بينها. بينما سُجلت العزلات البكتيرية B28، B30، B26 أدنى قيمة معنوية لمسافة التضاد 0.90، 1، 1.30 مم على الترتيب دون أن تسجل أية فروق معنوية فيما بينها (الجدول 7)، كما لُوحظ التفوق الظاهري والمعنوي للعزلة B20 في تثبيط FO7 و FO5، كما لوحظ وجود فروق معنوية في نسب تثبيط العزلات البكتيرية المختلفة في نمو كل من FO5 و FO7. تبيّن النتائج في الجدول (8) التفوق المعنوي للعزلات B20، B2، B10 على باقي العزلات المدروسة في تثبيطها لـ FO7 (81.56%، 75.11%، 74.22%، على التوالي)، وقد أظهرت العزلة B20 المعزولة من المحيط الجذري تفوقاً ظاهرياً مقارنة بباقي العزلات؛ في حين لوحظ أن العزلتين B13، B26 أعطت أدنى نسبة تثبيط معنوياً مقارنة بباقي العزلات (27.33%، 21.11%، على الترتيب)، ومن ناحية أخرى، فقد أظهرت العزلات B20، B25، B10، B2 أعلى نسبة تثبيط للفطر الممرض FO5 مقارنة بباقي العزلات (78.22%، 71.78%، 70.67%، 69.78%، على التوالي) مع ملاحظة التفوق الظاهري للعزلة B20 في تثبيط كلا العزلتين FO7 و FO5 الجدول (8).

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

الجدول (7) متوسطات مسافة التضاد للعزلات البكتيرية مع العزلتين الفطريتين **FO5 , FO7**(مم)

متوسط أقرب مسافة فاصلة مع الفطر (مم)		العزلة البكتيرية	متوسط أقرب مسافة فاصلة مع الفطر (مم)		العزلة البكتيرية
FO5	FO7		FO5	FO7	
3.00^{ST}	3.40^{nopq}	B21	2.90^{ST}	5.52^{ghi}	B1
5.50^{MN}	7.70^{cd}	B22	9.50^{ABC}	9.71^{b}	B2
5.20^{NO}	3.50^{mnopq}	B23	7.90^{FG}	2.45^{qrst}	B3
7.20^{HI}	8.15^{c}	B24	2.20^{U}	4.14^{klmn}	B4
9.90^{AB}	9.34^{b}	B25	1.40^{VWX}	1.60^{stuv}	B5
1.30^{WX}	0.70^{v}	B26	7.00^{HIJ}	2.55^{pqrs}	B6
6.90^{HIJK}	2.20^{rstu}	B27	3.80^{QR}	5.23^{hij}	B7
0.90^{X}	4.25^{jklmn}	B28	2.00^{UV}	2.60^{pqrs}	B8
9.30^{BC}	5.95^{fgh}	B29	6.50^{JKL}	6.77^{def}	B9
1.00^{X}	5.90^{fgh}	B30	9.60^{AB}	9.45^{b}	B10
5.20^{NO}	6.32^{efg}	B31	6.30^{KL}	1.40^{tuv}	B11
1.90^{UVW}	4.59^{ijkl}	B32	4.30^{PQ}	6.10^{fgh}	B12
4.40^{PQ}	6.17^{fgh}	B33	8.60^{DE}	1.15^{uv}	B13
8.20^{EF}	1.29^{uv}	B34	4.90^{NOP}	6.88^{def}	B14
4.70^{OP}	8.05^{c}	B35	6.70^{IJK}	7.32^{cde}	B15
2.50^{TU}	7.45^{cd}	B36	7.40^{GH}	5.17^{hijk}	B16
3.40^{RS}	5.12^{hijk}	B37	5.90^{LM}	4.53^{ijklm}	B17
4.60^{OP}	3.61^{lmnop}	B38	3.90^{QR}	5.46^{ghi}	B18
8.90^{CD}	4.15^{klmn}	B39	8.30^{DEF}	3.79^{lmno}	B19
2.40^{TU}	2.78^{opqr}	B40	10.00^{A}	11.31^{a}	B20
FO5 = 0.6547		$LSD_{0.01}$	FO7 = 1.0639		$LSD_{0.01}$
FO5 = 5.6		CV%	FO7 = 9.7		CV%

يشير اختلاف الأحرف الكبيرة ضمن العمود الواحد إلى وجود فروق معنوية في مسافة التضاد للعزلات البكتيرية مع الفطر **FO5**، ويشير اختلاف الأحرف الصغيرة ضمن العمود الواحد إلى وجود فروق معنوية في مسافة التضاد للعزلات البكتيرية مع الفطر **FO7**.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

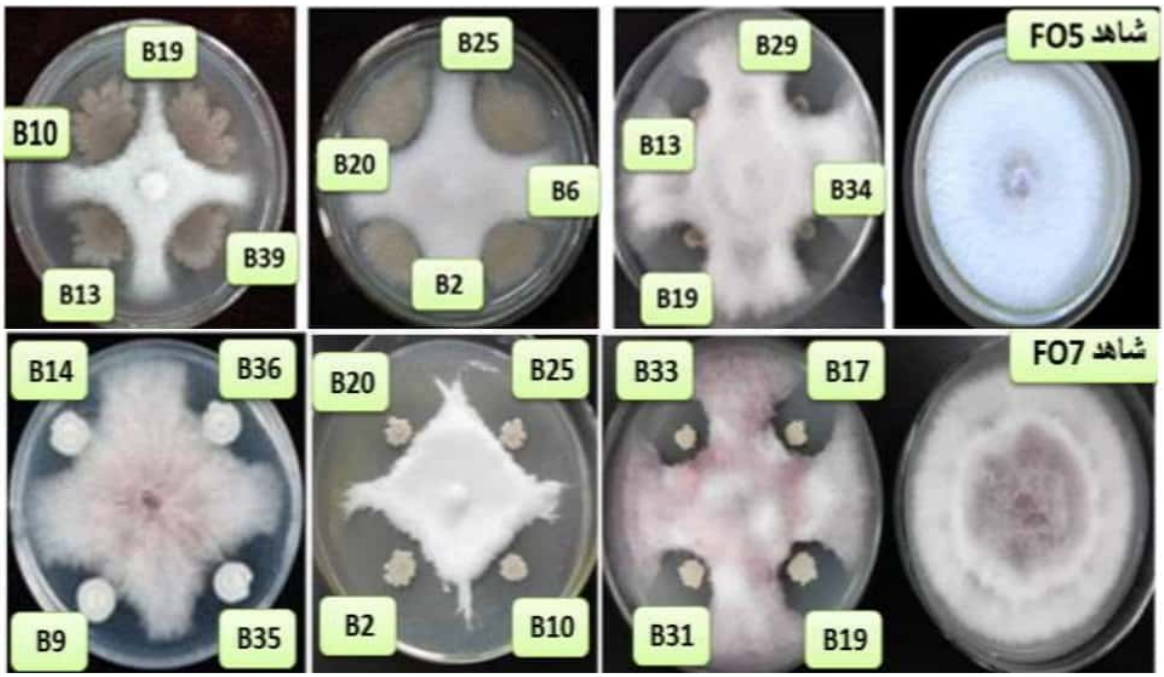
الجدول (8) نسبة التثبيط المئوية للعزلتين **FO7** و **FO5** من قبل العزلات البكتيرية مخبرياً

العزلة البكتيرية	نسبة التثبيط %		العزلة البكتيرية	نسبة التثبيط %		العزلة البكتيرية	نسبة التثبيط %	
	FO7	FO5		FO7	FO5		FO7	FO5
B1	56.89 fghijk	39.11 NOP	B15	65.11 def	61.11 EFGH	B28	52.00 ijklmn	13.33 S
B2	75.11 ab	69.78 ABCD	B16	53.78 ghijk	66.67 BCDEF	B29	58.00 efghij	69.33 BCDE
B3	40.67 o	66.67 BCDEF	B17	52.22 ijklmn	57.56 GHIJ	B30	57.56 efghij	16.00 S
B4	50.22 ijklmn	36.67 OP	B18	56.44 fghijk	48.22 KLM	B31	61.78 defgh	52.22 IJKL
B5	31.78 pq	26.00 QR	B19	50.22 ijklmn	67.56 BCDE	B32	52.89 ijklm	30.67 PQ
B6	44.00 no	62.44 CDEFG	B20	81.56 a	78.22 A	B33	58.67 efghi	49.11 JKLM
B7	53.78 ghijk	47.33 LMN	B21	48.22 klmno	41.56 MNO	B34	30.00 q	66.89 BCDEF
B8	44.22 mno	30.89 PQ	B22	66.00 cde	56.67 GHIJK	B35	67.56 bcd	51.56 IJKL
B9	62.44 defg	58.67 FGHI	B23	48.44 klmno	53.78 HIJKL	B36	66.00 cde	37.33 OP
B10	74.22 abc	70.67 ABC	B24	69.11 bcd	63.33 BCDEFG	B37	53.11 hijkl	47.33 LMN
B11	31.56 pq	58.67 FGHI	B25	70.22 bcd	71.78 AB	B38	49.56 jklmn	50.00 JKLM
B12	58.22 efghij	48.44 KLM	B26	21.11 r	20.89 RS	B39	50.89 ijklmn	69.33 BCDE
B13	27.33 qr	68.00 BCDE	B27	39.78 op	61.78 DEFGH	B40	44.67 lmno	36.89 OP
B14	63.78 def	52.00 IJKL						

$LSD_{0.01}$	FO7 = 8.827	$LSD_{0.01}$	FO5 = 8.658
CV%	FO7 = 10.0	CV%	FO5 = 10.1

يشير اختلاف الأحرف الكبيرة ضمن العمود الواحد إلى وجود فروق معنوية في نسبة التثبيط للعزلات البكتيرية في الفطر **FO5**، ويشير اختلاف الأحرف الصغيرة ضمن العمود الواحد إلى وجود فروق معنوية في نسبة التثبيط للعزلات البكتيرية في الفطر **FO7**.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner



الشكل (16) تثبيط بعض العزلات البكتيرية للعزلتين الفطريتين FO7 و FO5 مخبرياً

أشارت عدة دراسات إلى أن بكتريا الجذور لها القدرة على تثبيط الفطريات الممرضة، ولعل الفهم العميق لأهمية التربة والكائنات الحية الدقيقة المحيطة بالجذور في أنظمة المحاصيل والتقنيات الجديدة لدراسة الكائنات الدقيقة من حيث إمكانية استغلال نشاطاتها أدى إلى فتح مجالات بحث جديدة لإيجاد حلول حيوية للحد من تأثير مسببات الأمراض (Johansson *et al*., 2003)، وقد ثبت أن البكتيريا الموجودة في المنطقة المحيطة بالجذور أكثر فعالية وقدرة على المكافحة الحيوية ضد مسببات أمراض الجذور في العديد من المحاصيل النباتية (Crawford *et al*., 1993; Yuan and Crawford, 1995) حيث يركز الباحثون في دراساتهم على عزل البكتريا الجذرية من المنطقة المحيطة بجذور النباتات (PGPR) التي تستعمر الجذور والمنطقة التي حول الجذور (Olanrewaju and Babalola, 2022; Ojuederie *et al*., 2019)، وتعود لأجناس عديدة منها *Bacillus*. spp و*Pseudomonas*. Spp ، يعود سبب اختلاف كفاءة عزلات البكتيريا الجذرية في تثبيط نمو عزلات الفطر الممرض إلى اختلاف مقدرتها على إنتاج المواد الأيضية الثانوية وإنتاج الأنزيمات المحللة لجدارن خلايا الفطر مثل Chitinaese، Proteases و B-1,3-glucanse للمضادات الحيوية والمركبات العضوية (Hernández-León *et al*., 2015).

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

يعد إنتاج المضادات الحيوية معيارًا مهمًا للغاية للتنافس بين الكائنات الحية الدقيقة مع بعضها حيث تم اكتشاف مجموعة واسعة جدًا من المضادات الحيوية التي تنتجها PGPR ، مثل سيانيد الهيدروجين HCN، أوميسين، أ. فينازين، بيولوتورين، بيرولنترين، بنيسيلين (Compant *et al*., 2005).

4-8- تعريف البكتيريا المعزولة المثبطة لذبول فوزاريوم:

عُرفت العزلات البكتيرية التي أظهرت تأثيراً تثبيطياً تجاه عزلات الفطر الممرض بيوكيميائياً حيث أنّ جميع العزلات عصوية هوائية وتنتج أنزيم السيتوكروم اكسيداز والكاتلاز وتنتج أنزيم الجيلاتيناز ولم تسبب فرط الحساسية على نبات التبغ لكن B2، B10 متحركة وتنتج أنظيم اليورياز والصبغات الوميضية على وسط king B وغير متبوغة والعزلتان B20، B25 موجبة غرام لاتنتج صبغات وميضية وحللت النشاء، وقادرة على إنتاج Acetyl-methyl carbinol من تخمير الغلوكوز، ولون المستعمرات على الوسط Blood Agar كريمي الى أبيض أو رمادي وله مسحة خضراء وبمقارنة نتائج الاختبارات (الجدول 8) مع مرجع تصنيف البكتيريا (Bergey *et al*., 2005) أمكن تصنيفها، حيث انتمت B2، B10 للنوع *Pseudomonas fluorescens*، بينما انتمت العزلتان B20،B25 للنوع *Bacillus subtilis*. الشكل (18).

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

الجدول (8) نتائج الاختبارات البيوكيميائية للعزلات البكتيرية

العزلة البكتيرية / الاختبارات البيوكيمائية	B2	B10	B20	B25
غرام	–	–	+	+
التنفس	هوائية إجبارية	هوائية إجبارية	هوائية اختيارية	هوائية اختيارية
الصبغة الوميضية	+	+	–	–
كاتالاز	+	+	+	+
أوكسيداز	+	+	–	–
تحلل البكتين	سلبي	سلبي	+	+
voges-proscaver	+	+	–	–
تحلل النشاء	–	–	+	+
حلمهة الدم	–	–	+	+
تحمل NaCl 2%	+	+	+	+
تحلل الجيلاتين	+	+	+	+
متيل ريد	+	+	+	+
التبوغ	–	–	+	+
فرط الحساسية على التبغ	–	–	–	–
إنتاج اليورياز	+	+	–	–
تعريف العزلة	*Pseudomonas fluorescens*		*Bacillus subtilis*	

حيث + الاختبار إيجابي ، – الاختبار سلبي



الشكل 18 اختبار تحلل الملوحة نلاحظ تعكر الوسط في الأنابيب ممايدل على تحمل العزلات للملوحة مقارنة مع الشاهد

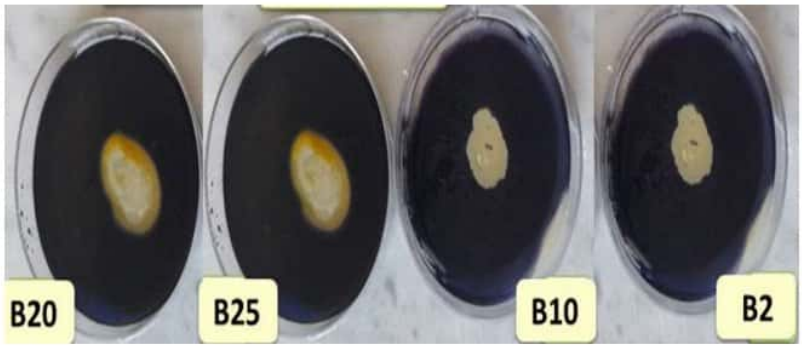
الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner



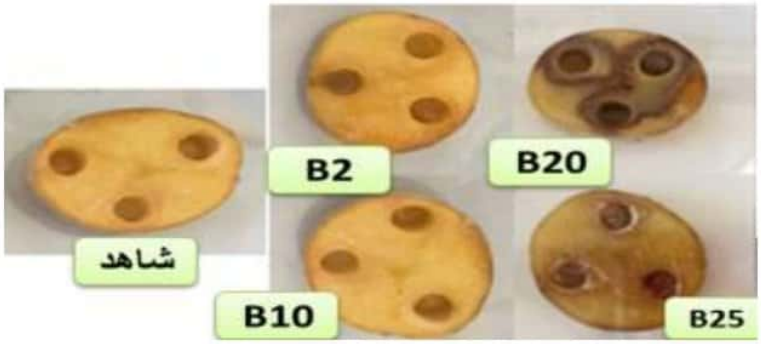
الشكل19 اختبارVP



الشكل 20 اختبار متيل ريد



الشكل 21 اختبار تحلل النشاء نلاحظ العزلتين B20 وB25 أظهرت قدرتها على تحلل النشاء لوجود هالة في الوسط لم تعط هالة حولها في الوسطB2 وB10بينما العزلتان

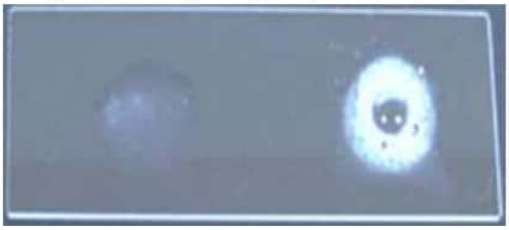


شكل 22 اختبار تحلل البكتين فالعزلتان B20 وB25 أظهرت قدرتها على تحلل البكتين لوجود تحلل وطراوة وتلون باللون البني المسود بينما العزلتان B10 وB2 لم تعط ذلك

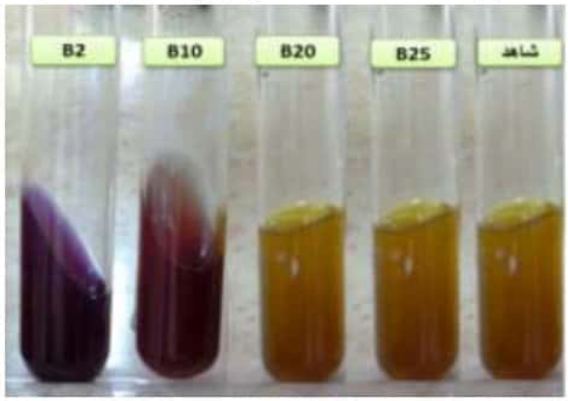
الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner



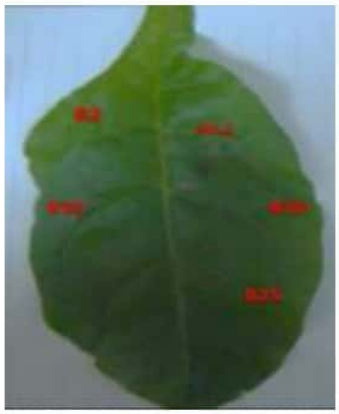
شكل 23 اختبار التنفس حيث يدل تحول لون الأنبوب للأصفر أنّ البكتريا إجبارية التنفس



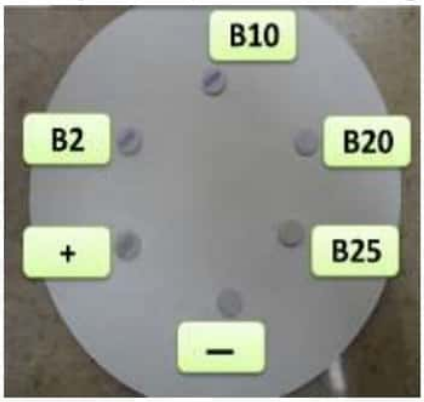
شكل 24 اختبار الكاتلاز يدل تشكل الفقاعات على وجود لأنزيم الكاتالاز عند العزلة البكتيرية



شكل 25 اختبار اليورياز حيث يدل تغير لون الأنبوب إلى إنتاج العزلة البكتيرية لأنزيم اليورياز في الوسط



الشكل26 اختبار فرط الحساسية حيث لم تعط العزلات على أوراق التبغ أي تماوت في الأنسجة



الشكل 27 اختبارأوكسيداز فالعزلتان 01B و B2 أعطت لوناً أزرقاً بينما العزلتان 02B و B25 لم تعط تلون أي لون

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

4-9- اختبارات الانتماء لزمرة PGPR:

4-9 -1- تحلل الفوسفات:

يعد الفوسفات ثاني أهم عامل يحد من نمو النبات، وعلى الرغم من التطبيقات متكررة للأسمدة الفوسفاتية في الحقول الزراعية، إلا أن النباتات تمتص أقل كميات من الأسمدة الفوسفاتية المطبقة والباقي سريعا يتم تحويلها إلى أشكال غير قابلة للذوبان في التربة (Mckenzie and Roberts, 1990).

إنّ البحث عن وسائل آمنة بيئيا وممكنة اقتصادياً يعد خياراً ناجحاً لتحسين إنتاج المحاصيل في التربة منخفضة الفسفور، وفي هذا السياق، اقترحت الكائنات الحية المذيبة للفوسفات، والذي يطلق عليه Phosphate Solubilizing Microorganisms (PSM)، قد توفر الأشكال المتاحة من الفوسفات للنباتات وبالتالي بديل فعال للأسمدة الفوسفاتية الكيماوية (Khan *et al*., 2006)، من بين مختلف PSM البكتريا الجذرية تعتبر البكتيريا المذيبة للفوسفات Phosphate-Solubilizing Bacteria (PSB)، كأسمدة حيوية واعدة لأنها يمكن أنّ تزود النباتات بـ P من مصادر غير متاحة بشكل جيد بواسطة آليات مختلفة (Zaidi *et al*., 2009)، ومنهاالأجناس البكتيرية مثل *Azotobacter*، *Pseudomonas*، *Microbacterium*، *Bacillus* *Rhizobium* (Bhattacharyya and Jha, 2012).

أظهرت النتائج قدرة العزلات B25,B20,B10,B2, على تحلل الفوسفات (الشكل 28) وأعطت معامل إذابة للفوسفات 0.5 مم،0.75 مم، 1.25مم،2.25 مم على التوالي وأظهرت العزلة B20 تفوقاً على باقي العزلات، وقد يُعزى ذلك إلى قدرة البكتريا في إنتاج مركبات عضوية تذيب المعادن مثل الأحماض العضوية Oxalate acid و Citrate acid التي تؤدي إلى خفض حموضة التربة ، وبالتالي تحول الفوسفات الثلاثي إلى أشكال قابلة للذوبان مثل $HPO4^{-2}$ و $H2PO4^{-}$ (Rodrigues *et al*.,2016)، وقد أشار Fu وأخرون (2009) أنّ الأنواع البكتيرية *B.subtilus* و *B.megaterium* و *B.cereus* أثبت كفاءتها في إذابة الفوسفات الموجودة في التربة وبالتالي زيادة كميته في التربة وهذا قد يسهل امتصاصها من قبل النبات.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner



الشكل (28) قدرة العزلات على تحلل الفوسفات

4-9 -2-تحلل البوتاسيوم:

يعد البوتاسيوم العنصر الغذائي الرئيسي الثالث المهم للنباتات. ويتواجد أكثر من 90 ٪ من البوتاسيوم في التربة على شكل صخور غير قابلة للامتصاص من قبل النبات ومعادن السيليكات (Parmar and Sindhu, 2013)، وعند فقدان البوتاسيوم من التربة، تصبح الجذور ضعيفة النمو ونسبة البذور في الثمار قليلة، إضافة إلى ضعف الإنتاج (Kumar DubeyRC, 2012)، فأصبحت الحاجة المتزايدة للبحث عن عوامل مستدامة مثل بكتريا PGPR تعمل على إذابته البوتاسيوم وتحويله إلى شكل متاح للنبات يستطيع امتصاصه (Archana *et al*., 2013)، حيث تفرز بكتريا PGPR أحماض عضوية (Meena *et al*., 2015)، ويمتلك الجنسين *Bcillus* spp و *Pseudomonas* spp القدرة على إفراز الأحماض العضوية و إذابة البوتاسيوم (Bagyalakshmi *et al*., 2012).

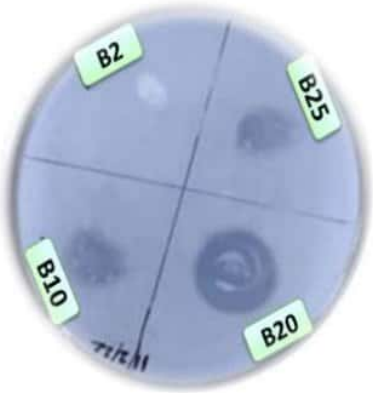
أظهرت النتائج تفاوت العزلات B10,B20,B25 في قدرتها على تحلل البوتاسيوم حيث ظهرت هالات حول العزلات في وسط الزرع (الشكل 29)، بينما العزلة B2 لم تُظهر أي هالة، وكان معامل الإذابة SI للعزلات B10، B25،B20 هو 1mm، 2mm، 0.5mm على التوالي، قد يعود كفاءة العزلتين B20 و B25 التابعة للنوع *B.subtilis* إلى إنتاج بعض الأحماض العضوية مثل Oxalate acid و Citrate acid (yan *et al*., 2013) التي تسرع عملية تجوية المعادن الحاملة للبوتاسيوم مما تسبب في تحرره نتيجة إحلال شوارد الهيدروجين مكان شوارد البوتاسيوم الموجودة في المعادن الحاملة لها مما يؤدي إلى تحرر البوتاسيوم (Fu *et al*.,2009).

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

بين Yadav وآخرون (2020) أنّ سلالات من النوع *P. fluorescens* المعزولة من المحيط الجذري للقمح قادرة على إذابة الفوسفات بنسب متفاوتة وعند معاملة النباتات بها أعطت زيادة في النمو الجذري والخضري للنباتات، كما بينت دراسة Sivasakth وأخرون (2013) تفوق العزلات التابعة للنوع *B. subtilis* في إذابة الفوسفات مقارنة مع العزلات التابعة للنوع *P. fluorescens*

أشار Verma وأخرون (2017) أن الأنواع التابعة للجنس *Bcillus* spp تتمتع بقدرة على إذابة البوتاسيوم مثل *B. subtilis*, *B. mucilaginosus*, *B. globisporus*, *B. edaphicus*, *B. circulans* ، كما أظهر تلقيح شتلات البندورة بالبكتريا *Bacillus mucilaginosus* على إذابة البوتاسيوم إلى زيادة الوزن الرطب النباتات وقوة الشتلات وزيادة النمو(Lin *et al*., 2002; Anjanadevi *et al*., 2016).

أظهر Parmar (2010) أن تلقيح نباتات القمح بالبكتريا الجذرية المحللة للبوتاسيوم أدى إلى زيادة الوزن الجاف للجذور بعد 60 يوم من الزراعة، وقد أفاد الباحثون عن وجود نتائج جيدة على محاصيل القطن و الفليفلة والخيار وفول الصويا عند التلقيح بالبكتريا الجذرية المحللة للبوتاسيوم (Han and Lee ,2005; Sangeett *et al* 2012).



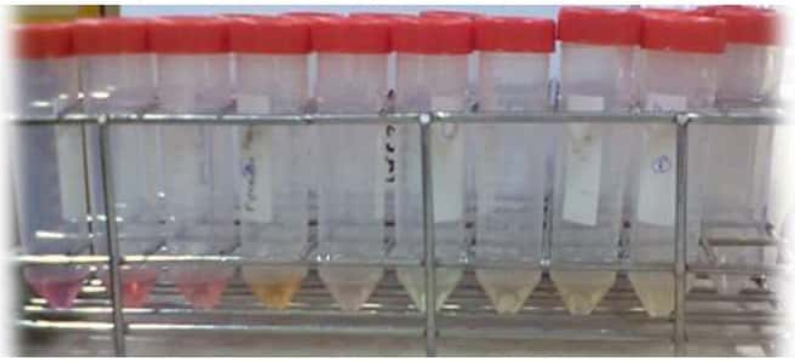
الشكل (29) قدرة العزلات على تحلل البوتاسيوم

4-9 -3-إنتاج هرمون حمض الإندول الخلي:

بيّنت النتائج قدرة العزلات البكتيرية على إنتاج هرمون حمض الإندول الخلي IAA من خلال ظهور اللون الوردي (شكل 30) ولكن تفوقت العزلة B20 في إنتاج هرمون حمض الإندول الخلي بتركيز 20.85

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

ميكروغرام / مل بينما أعطت العزلات B2، B10، B25 تركيز IAA 3.47 ، 4.05 ، 9.59 ميكروغرام / مل على التوالي.



الشكل (30) قدرة العزلات البكتيرية في إنتاج هرمون حمض الإندول الخلي

وفي دراسة (Ei *et al*., 2018) تم عزل 12 سلالة بكتيرية من ترب مختلفة وكانت جميع العزلات لها القدرة على إنتاج حمض الإندول الخلي بتراكيز مختلفة، بينما أنتجت البكتريا المعزولة من المحيط الجذري (PGPR) مستويات منخفضة من الهرمون (Dagnaw *et al*., 2015).

توافقت هذه النتائج مع ما توصلت إليه الدراسات عن قدرة البكتيريا على إنتاج حمض الإندول الخلي IAA فقد أشار Patten و Glick (2002) عن قدرة بكتريا *Pseudomonas putida* على إنتاج IAA وقدرة بكتريا الأجناس التالية *Azotobacter*، *Pseudomonas*، *Bacillus*، *Mesorhizobium* (Reetha *et al*., 2014; Ahmad *et al*., 2005)، كما توافقت مع Buensanteai وآخرون (2008) حيث أثبت أن *B. sabtilis* المعزولة من جذور البطاطا أنتجت كميات من هرمون حمض الإندول الخلي بتراكيز مختلفة.

في حين لم تتوافق مع Sivasakth وآخرون (2013) حيث أعطت عزلات النوع *P. fluorescens* كمية أعلى من هرمون حمض الإندول الخلي بالمقارنة مع عزلات النوع *B. sabtilis*، وفي دراسة (Suresh *et al*., 2010) تراوح إنتاج 10 عزلات من بكتريا *Pseudomonas fluorescens* لهرمون حمض الإندول الخلي من 0 ميكروغرام/ مل إلى 25 ميكروغرام/ مل، وهذا يتفق مع نتائج (Patten and Glick, 2002; Ahmad *et al*., 2005). إنّ كمية IAA المنتجة في ظروف المخبر من قبل البكتريا تعتمد على الأنواع البكتيرية المختلفة أو السلالة المعزولة أو ظروف الوسط (Radwan *et al*., 2022).

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

4-10- كفاءة العزلات البكتيرية المضادة في الحد من الإصابة بالذبول الوعائي على البطيخ والشمام

4-10-1-تقدير نسبة الإصابة وشدة المرض على البطيخ والشمام

أظهرت النتائج فعالية العزلات البكتيرية المدروسة في الحد من الإصابة بالعزلتين FO7 و FO5 فقد بين التحليل الإحصائي عند مستوى ثقة 99% وجود فروق معنوية في كفاءة العزلات في الحد من نسبة الإصابة وشدة المرض للعزلتين FO7 و FO5 (الجدول 9، 10) حيث تفوقت العزلات B20 على باقي العزلات المدروسة في في الحد من نسبة الإصابة بالعزلة الفطرية FO5 على الشمام بنسبة 40% وشدة المرض 11% مقارنة بباقي العزلات، وكذلك أثبت ذات العزلة كفاءتها في الحد من الإصابة بالعزلة الفطرية FO7 على البطيخ بنسبة إصابة 30% وشدة المرض 10% .

4-10-2- دراسة مؤشرات النمو على الشمام والبطيخ:

لُوحظ أنّ مؤشرات النمو في النبات المُعدى بـ FO5 ومعامل بالعزلات البكتيرية كانت أعلى منها في النباتات غير المعاملة، مع وجود فرق معنوي بينها وبين الشاهد المعدى غير معامل بالبكتريا، كما أنّ مؤشرات النمو في النباتات غير المُعداة أعلى مما هي عليه من النباتات المُعداة، أظهرت النتائج وجود فروق معنوية بين العزلات البكتيرية المثبطة للفطر FO5 مخبرياً، فقد تبيّن التفوق المعنوي للعزلة B20 في جميع مؤشرات النمو المدروسة مقارنةً بباقي العزلات البكتيرية، وقد سجلت في النباتات غير المعداة بالفطر أعلى قيمة في ارتفاع النبات وطول الجذر والوزن الرطب والجاف للمجموع الخضري والجذري مقارنةً بباقي المعاملات والشاهد السليم (76.00 سم، 32.83 سم، 48.66 غ، 5.52 غ، 7.43غ، 3.51 غ على التوالي) في حين سجل الشاهد المُعدى بالفطر FO5 أدنى قيمة لارتفاع النبات وطول الجذر (32.48، 19.36 سم على الترتيب)، ومن الجدير بالإشارة إليه أنّ العزلة B20 قد استطاعت أنّ تعزز نمو النبات المعدى بالفطر وتحقق قيماً لمؤشرات النمو المدروسة أفضل أو توزاي مثيلاتها في النبات غير المُعدى دون بكتيريا.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

جدول (9) تأثير العزلات البكتيرية في مؤشرات النمو على الشمام في الأصص

	المؤشر المدروس / المعاملات	ارتفاع النبات (سم)	الوزن الرطب للمجموع الخضري (غ)	الوزن الجاف للمجموع الخضري (غ)	طول الجذر (سم)	الوزن الرطب للمجموع الجذري (غ)	الوزن الجاف للمجموع الجذري (غ)	نسبة الإصابة (%)	شدة المرض (%)
FO5	دون بكتريا	32.48 h	27.13 f	2.15 g	19.36 g	1.13 g	0.52 h	80 a	61 a
	B2	49.07 g	27.36 f	2.39 g	21.53 f	1.64 fg	0.53 h	68 b	25 b
	B10	49.32 g	28.04 f	3.57 f	23.22 e	1.75 f	0.76 g	60 c	27 b
	B20	54.49 e	42.85 c	4.93 d	25.16 cd	3.62 cd	1.38 e	40 e	11 d
	B25	51.84 f	30.42 e	3.93 e	24.04 de	2.63 e	1.07 f	52 d	15 c
دون فطر	دون بكتريا	52.89 ef	41.41 d	4.89 d	24.25 de	3.32 d	1.10 f	0 f	0 e
	B2	62.43 d	43.30 c	5.29 c	25.79 c	3.65 cd	1.56 d	0 f	0 e
	B10	68.46 c	46.19 b	6.39 b	28.43 b	4.09 bc	1.84 c	0 f	0 e
	B20	76.00 a	48.66 a	7.43 a	32.83 a	5.52 a	3.51 a	0 f	0 e
	B25	72.50 b	46.66 b	6.59 b	29.23 b	4.46 b	2.39 b	0 f	0 e
$LSD_{0.05}$		1.71	1.27	0.25	1.47	0.61	0.17	1.88	2.17
CV%		2.3	2.6	4.1	4.5	14.9	9.2	4.9	12.1

الأحرف الصغيرة المختلفة ضمن العمود الواحد تشير إلى فروق معنوية بين المعاملات على مستوى ثقة 95%

بالنسبة للبطيخ، لوحظ أنّ النباتات المعداة بـ FO7 والمعاملة بالعزلات البكتيرية قد تفوقت في جميع مؤشرات النمو على النباتات المعداة بالفطر غير معاملة بالعزلات، كما أن مؤشرات النمو في النباتات غير المُعداة أعلى مماهي عليه من النباتات المُعداة، تبيّن التفوق المعنوي للعزلة B20 في جميع مؤشرات النمو المدروسة على النبات مقارنةً بباقي العزلات البكتيرية، وقد سجلت في النباتات غير المُعداة بالفطر FO7 أعلى ارتفاع للنبات، طول للجذر، وزن رطب و جاف للمجموع الخضري والجذري مقارنةً بباقي المعاملات والشاهد السليم (85.60 سم، 32.53 سم، 52.13 غ، 8.43 غ، ، 6.39 غ، 3.27 غ، على التوالي)؛ في حين سجل الشاهد المعدى بالفطر FO7 أدنى قيمة لارتفاع النبات، طول الجذر، وزن رطب وجاف للمجموع الخضري والجذري (29 سم،

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

18.17 سم، 23.26 غ، 1.79 غ على التوالي، كما لم تظهر النباتات المعداة والمعاملة بالعزلتين B2 و B10 أي اختلاف فيمابينها من حيث مؤشرات النمو الجدول(10).

الجدول (10): تأثير العزلات البكتيرية في مؤشرات النمو على البطيخ في الأصص

الفطر الممرض	المؤشر المدروس / المعاملات	ارتفاع النبات (سم)	الوزن الرطب للمجموع الخضري (غ)	الوزن الجاف للمجموع الخضري (غ)	طول الجذر (سم)	الوزن الرطب للمجموع الجذري (غ)	الوزن الجاف للمجموع الجذري (غ)	نسبة الإصابة (%)	شدة المرض (%)
FO7	دون بكتريا	29.00 h	23.26 h	1.79 g	18.17 g	1.83 f	0.88 g	96 f	61 f
	B2	41.83 g	29.79 g	3.73 f	22.82 f	2.32 ef	0.94 fg	60 e	21 e
	B10	42.47 g	29.9 g	3.95 f	23.22 f	2.68 e	0.96 fg	56 d	17 d
	B20	57.25 e	39.81 d	5.70 d	27.35 d	4.55 c	2.12 d	30 b	10 b
	B25	43.93 g	32.56 f	4.65 e	24.63 e	3.46 d	1.17 f	52 c	14 c
دون فطر	دون بكتريا	53.68 f	34.83 e	5.68 d	26.72 d	3.77 d	1.61 e	0 a	0 a
	B2	61.54 d	42.46 c	6.00 d	28.51 c	4.61 c	2.28 cd	0 a	0 a
	B10	65.64 c	48.81 b	6.49 c	30.09 b	4.96 bc	2.54 bc	0 a	0 a
	B20	85.60 a	52.13 a	8.43 a	32.53 a	6.39 a	3.27 a	0 a	0 a
	B25	77.38 b	49.50 b	7.48 b	30.28 b	5.27 b	2.59 b	0 a	0 a
$LSD_{0.05}$		2.14	1.65	0.35	1.11	0.50	0.27	2.43	2.60
CV%		3	3.4	5	3.3	9.7	11.5	6.2	16.5

الأحرف الصغيرة المختلفة ضمن العمود الواحد تشير إلى فروق معنوية بين المعاملات على مستوى ثقة 95%

أشارت دراسات عدة إلى دور النوع *B. subtilis* و *P. fluorescens* في تثبيط العديد من المسببات المرضية للمحاصيل الزراعية مخبراً وحقلياً (Bai *et al.*, 2003) وذلك لامتلاكها العديد من المركبات المحفزة للنمو مثل حمض الإندول الخلي وأيضاً القدرة على توفير الفوسفات ممايعكس إيجاباً على نمو المحاصيل وإنتاجيتها (Kloepper *et al.*, 1980)، فقد ثبتت كفاءة الأنواع التابعة للجنس *Bacillus* في قدرتها على تثبيط النمو الفطري للنوع *F. oxysporum* (Marten *et al.*, 2000)، كما توافقت النتائج مع ماتوصل إليه Gajbhiye وأخرون (2010) حيث أعطت الأنواع التابعة *للجنس Bacillus* وخاصة النوع *B. subtilis* أعلى

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

نسبة للتثبيط 77.5% تجاه فطر *F. oxysporum* بعد 7 أيام، كما أثبت كل من (Siddiqui *et al*., 2005; Li *et al*., 2012) أن العزلة *B. subtilis* أفضل وأكثر كفاءة في تثبيط النوع *F. oxysporum* ، كما توافقت مع Zhao وأخرون (2011) حيث استخدم بكتريا *B. subtilis* في تثبيط ذبول الخيار واستطاعت البكتريا من خفض نسبة الإصابة بالذبول في حقول الخيار المزروعة ، كما بينت دراسات عدة أن النوع *B. subtilis* تنشط المقاومة الجهازية المستحثة ISR في العديد من المحاصيل فقد أثبت Garcia وآخرون (2013) أن معاملة جذور البطيخ بسلالات من *B .subtilis* نشطت المقاومة الجهازية للنبات ضد البياض الدقيقي من خلال تخفيز إشارات حمض السالسليك والياسمين، كما استطاعت أنواع من الجنس *Bacillus* كالنوعين *B. subtilis* و *B. simplex* من تثبيط نمو فطر فوزاريوم مخبرياً بنسبة تراوحت ما بين 60% إلى 70 % بالمقارنة مع الشاهد (Khan *et al*., 2018)، كما قام Chen وآخرون (2010) باستخدام عزلات بكتيرية في تثبيط نمو ذبول الخيار وبالتحليل والاختبارات البيوكيميائية تبين أنها تابعة للنوع *B. subtilis*، كما أعطت *B. subtilis* نسبة تثبيط تجاه فوزاريوم مابين 35% إلى 63% مخبرياً ومسافة تضاد تراوحت مابين 1.47 و 2.27 مم (Zhang *et al*., 2008)، كما توافقت مع نتائج Mohammed وآخرون (2019) والتي أثبتت قدرة *Bacillus* التضادية تجاه الفطر المسبب لذبول فوزاريوم مخبرياً، وكذلك توافقت مع نتائج الخليف وآخرون (2024) والتي أثبتت قدرة التضادية للنوع B. *subtilis* و *P. fluorescens* تجاه الفطر المسبب لذبول فوزاريوم مخبرياً، وقد يُعزى سبب اختلاف كفاءة عزلات البكتيرية في خفض نمو عزلات الفطر الممرض إلى اختلاف مقدرتها في إنتاج المضادات الحيوية وخاصة النوع *B. sabtilis* من حيث إنتاج الأنزيمات والمركبات العضوية وسيانيد الهيدروجين، فضلا عن تنافس البكتيريا مع الفطر الممرض على المواد الغذائية (Babu *et al*., 2015; Hernandez-Leon *et al*., 2015).

بينت الدراسات أن *P. fluorescens* تنتج المضاد الفطري ثنائي استيل فلورو جلوسيتول 2,4,DAPG (Walsh *et al*.,2001)، كما تتميز بقدرتها على إنتاج هرمون حمض الإندول الخلي مما يزيد من النمو الجذري وحجمه وعدد الشعيرات الجذرية وبالتالي زيادة تأمين العناصر الغذائية للنبات (Khare and Arora, 2010)،

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

كما تنتج *P.fluorescens* العديد من المركبات الطيارة كالأمونيا وسيانيد الهيدروجين حيث أعطت سلالات من *P. fluorescens* كفاءة عالية في تثبيط ذبول الفجل *Fusarium oxysporum* وزيادة الإنتاج كماً ونوعاً (De Boer *et al.*,1999).

تنتج معظم أنواع الجنس *Bacillus* هرمون IAA وبكميات مختلفة تبعاً لمصدر الكربون في التربة فقد توصل (Wahyudi *et al.*,2011) إلى تشخيص 14 عزلة تابعة للجنس *bacillus* تقوم بإنتاج هرمون IAA وتعمل على تحفيز نمو النبات وتزيد من أعداد الجذور الجانبية، بعض عزلات من *B.subtilis* لاتنتج IAA في حال عدم توفر التريتوفان في الترب المحيطة بالمجموع الجذري (Idris *et al.*, 2007).

توافقت النتائج مع ما أشار إليه Idris وآخرون (2007) أنّ استعمار جذور النبات ببكتيريا PGPR يحسن نمو النبات ويحفز مقاومة جهازية طويلة الأمد ضد طيف واسع من الممرضات النباتية وهذا ما أشارإليه Ryun وأخرون (2007) أنّ خليط من سلالتين من نوع *Bacillis* كمحفز حيوي من أجل حماية النبات من الأمراض البكتيرية والفيروسية من جهة وتحسين نمو النبات من جهة أخرى، حيث أوصى باستخدام *Bacillus subtilis* كواحد من عوامل المكافحة البيولوجية لكبح المرض في أربعة محاصيل عبر تحفيز المقاومة الجهازية المستحثة Induced Systemic Resistance (ISR) وتحسين نمو النبات، كما أدى تغطيس بذور البازلاء بمعلق بكتيري يحوي مكون *P. fluorescens* و *Rhizobium leguminosarum* إلى تحسين مؤشرات النمو .

تُعزى الزيادة في الوزن الرطب والجاف للمجموع الجذري إلى دور البكتريا في إنتاج IAA وبعض الأوكسينات وإذابة الفوسفور المعدني غير الذواب وإتاحة الفوسفات للنباتات و الزيادة العددية للبكتريا في المحيط الجذري مما زاد في إذابة الأحماض العضوية وإنتاج IAA مما يسهم في تطور في تطور المجموع الجذري وتفرعاته وزيادة مساحة الجذر وعدد الشعيرات الجذرية، وهذا ينعكس على زيادة في الوزن الرطب والجاف للمجموع الخضري (Zaki *et al.*, 2012 ; Montiel *et al.*, 2018).

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

الفصل الخامس

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendations

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

5- الاستنتاجات:

1. تم الكشف عن وجود عدة أشكال مختلفة من فطر ذبول القرعيات متخصصة في إصابة العائل المضيف.
2. وجود تباينات مورفولوجية بين العزلات من حيث مظهر المستعمرة والصبغة التي تنتجها في وسط الزرع بالإضافة للتباين في الإمراضية، ولعل هذه الاختلافات مرتبطة إلى حد ما بالمنطقة الجغرافية التي أخذت منها العزلات والصنف النباتي.
3. كانت العزلة الفطرية المعزولة من البطيخ في منطقة درعا والعزلة الفطرية المعزولة من الشمام في دير الزور هما الأكثر شراسة بين باقي عزلات النوع الفطري.
4. أعطى النوعان البكتيريان *Pseudomonas fluorescens* و *Bacillus sabtilis* كفاءة عالية في تثبيط ذبول فوزاريوم البطيخ والشمام مخبرياً و نصف حقلياً، كما أحدثا زيادة في مؤشرات النمو المدروسة بنسب متفاوتة.
5. أبدت العزلة البكتيرية *B20* التابعة للنوع *Bacillus sabtilis* كفاءتها في الحد من الإصابة بذبول البطيخ والشمام في الأصص.
6. أدت معاملة النبات المُعدى بالفطر بالبكتريا إلى زيادة في الوزن الجاف للمجموع الخضري و الجذري لنبات البطيخ والشمام عند تطبيقها في الأصص، مما يشير إلى أنها زادت التمثيل الغذائي وليس امتصاص الماء فقط.
7. حققت العزلة *B20* أعلى قيم لمؤشرات النمو على النباتات مما يشجع اقتراح إدخالها في المخصبات الحيوية والحد من الإصابة بفطر الفوزاريوم.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

6- التوصيات:

1. التوسع في دراسة مرض ذبول الفوزاريوم على البطيخ والشمام في مختلف مناطق القطر ورصدها بصورة دورية.
2. تحديد سلالات الفطر المسبب لذبول البطيخ من خلال اختبارات الأصناف التفريقية والاختبارات الجزيئية.
3. إجراء الاختبارات الحقلية للعزلة *B20* على البطيخ والشمام وتحديد التركسز الأمثل.
4. دراسة العوامل المثلى للنمو والإنتاج الكمي والتركيز الأمثل و أيضاً الاختبارات الجزيئية على العزلة *B20* من أجل تطوير مستحضرات مكافحة حيوية أو مخصبات زراعية.
5. التحقق من إمكانية العزلات البكتيرية المعزولة من المحيط الجذري في إنتاج مركبات السيدروفور.
6. إجراء تجارب التطبيق المشترك للنوعين *B.subtilis* و *P. fluorescens* وإمكانية استخدامه كتأزر ميكروبي فعال في الحد من الإصابة بذبول القرعيات.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

7- المراجع:

7-1- المراجع العربية:

المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية. (2022) وازرة الزراعة والإصلاح الزراعي. مديرية الإحصاء والتخطيط، قسم الإحصاء، دمشق، الجمهورية العربية السورية.

الخليف، ريم عبود، محمد فواز العظمة، محمود أبو غرة، (2023)، **القدرة التضادية لعزلات محلية من بكتيريا المحيط الجذري تجاه الفطر** *Fusarium solani* **المسبب لذبول البندورة في الزجاج، مجلة جامعة دمشق**، قيد النشر.

زيدان، ليلى. (2014) **تعريف مورفولوجي وجزيئي لعزلات من الجنس *Fusarium* على القمح والكشف عن المورثات المسؤولة عن إنتاج السموم الفطرية**، أطروحة دكتوراه ، كلية الزراعة، قسم وقاية النبات، جامعة دمشق.

7-2- المراجع الأجنبية:

Agrios, G.N. (2005). **Plant Pathology**. 5th ed. Academic Press, San Diego. pp. 922 .

Ajilogba, F.C., Babalola, O.O. and Ahmad, A. (2013) Antagonistic Effects of Bacillus Species in Biocontrol of Tomato Fusarium Wilt. **Ethno Med**, 7(3), 205-216.

Akbar, A., Hussain, S., Ullah, K., Fahim, M. and Ali, GS. (2018) Detection, virulence and genetic diversity of *Fusarium* species infecting tomato in Northern Pakistan. **PLoS ONE**. 13(9),1-21

Alabouvette C., C. Olivain, Q. Migheli, and C. Steinberg. (2009). Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. **New Phytol**. 184:517–544.

Alabouvette, C., and Couteaudier, Y. (1992). Biological control of Fusarium wilts with nonpathogenic Fusaria. Biological Control of Plant Diseases: **Progress and Challenges for the Future**, 415-426.

Alizadeh, H., Behboudi, K., Ahmadzadeh, M., Javan-Nikkhah, M., Zamioudis, C., Pieterse, C. M., and Bakker, P. A. (2013). Induced systemic resistance in cucumber and Arabidopsis thaliana by the combination of Trichoderma harzianum Tr6 and Pseudomonas sp. Ps14. **Biological control**, 65(1), 14-23.

Al-Tuwaijri, M. M. (2015). Studies on Fusarium wilt disease of cucumber. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, 5(2), 110-119.

Amaradasa, B. Beckham, S. , Dufault, K., Sanchez, N. Ertek, T., Iriarte, T. S and Ji, P. (2018). First report of Fusarium oxysporum f. sp. niveum race 3 causing wilt of watermelon in Florida, USA. **Plant Disease**, 102(5), 1029-1029.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

Amaradasa, B. Beckham, S. , Dufault, K., Sanchez, N. Ertek, T., Iriarte, T. S and Ji, P. (2018). First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* race 3 causing wilt of watermelon in Florida, USA. **Plant Disease**, 102(5), 1029-1029.

Anand, T., Raguchander, T., Karthikeyan, G., Prakasam, V., and Samiyappan, R. (2007). Chemically and biologically mediated systemic resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.) against Pseudoperonospora cubensis and Erysiphe cichoracearum. **Phytopathologia mediterranea**, 46(3), 259-271.

Anoua, B., Jaillard, B., ruiz, J., Bénet, J. C., et Cousin, B. (1997). Couplage entre transfert de matière et réactions chimiques dans un sol. Partie 2: Application à la modélisation des transferts de matière dans la rhizosphère. Entropie, 33(207).

Archana, D. S., Nandish, M. S., Savalagi, V. P., and Alagawadi, A. R. (2013). Characterization of potassium solubilizing bacteria (KSB) from rhizosphere soil. **Bioinfolet-A Quarterly Journal of Life Sciences,** 10(1b), 248-257.

Aris, A., Ab Easa Hasan, Z., Shohaimi, S., Baity Saidi, N., Ain Izzati, N., and Zainudin, M. (2020). Morphological, phylogenetic and pathogenicity characterisation of *Fusarium* species associated with wilt disease of pumpkin (*Cucurbita pepo*). Asian Journal of Agriculture and Biology, 8(1).

Armstrong, G.M. and Armstrong, J. K. (1981). Formae speciales and races of *Fusarium oxysprum* causing wilt diseases. In: Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy, Nelson, P.E., Toussoun, T.A. and Cook, R.J. (eds). University Park, PA, USA: State University Press. Pp. 391-399.

Aryal, S. (2022). Oxidase Test-Principle, Uses, Procedure, Types, Result Interpretation, Examples and Limitations.

Babalola, O. O. (2010). Beneficial bacteria of agricultural importance. **Biotechnology letters**, 32, 1559-1570.

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.

Bagyalakshmi, B., Ponmurugan, P., and Marimuthu, S. (2012). Influence of potassium solubilizing bacteria on crop productivity and quality of tea (Camellia sinensis). **Afr J Agric Res**, *7*(30), 4250-4259.

Bai, Y., Zhou, X., and Smith, D. L. (2003). Enhanced soybean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum*. **Crop science**, 43(5), 1774-1781.

Bailey, W. R., Scott, E, G., (1974). **Diagnostic microbiology**, 4th ed. Mosby, St. Louis, MO.

Barra, P. J., Inostroza, N. G., Acuña, J. J., Mora, M. L., Crowley, D. E., and Jorquera, M. A. (2016). Formulation of bacterial consortia from avocado (*Persea americana* Mill.) and their effect on growth, biomass and superoxide dismutase activity of wheat seedlings under salt stress. **Appl. Soil Ecol.** 102, 80–91.

Barry AL, Feeney KL.(1967) Two quick methods for Voges-Proskauer test. **Appl Microbiol.** 15(5):1138-41

Beauchamp, C. J., Dion, P., Kloepper, J. W., and Antoun, H. (1991). Physiological characterization of opine-utilizing rhizobacteria for traits related to plant growth-promoting activity. **Plant and soil**, 132, 273-279.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

Bergey, D.H., Holt, J.G., and R.K. Noel, (2005). **Bergey' s Manual of Systematic, Bacteriology**, Vol.1, 9th Edn (Baltimore, MD: Williams and Wilkins), 1935–2045

Bharucha, U., Patel, K. and Trivedi U.B. (2013). Optimization of Indole Acetic Acid Production by Pseudomonas putida UB1 and its effect as plant growth-promoting rhizobacteria on Mustard (Brassica nigra). **Agriculture. Res**. 2(3): 215-221.

Bhattacharyya, P. N., and Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 28, 1327-1350

Biles, C.L., R.D. Martyn, and D. Netzer. (1990). In vitro inhibitory activity of xylem exudates from cucurbits towards *Fusarium oxysporum* microconidia. **Phytoparasitica** 18:41–49.

Biswas, R., Ghosal, S., Chattopadhyay, A., and Datta, S. (2017). A comprehensive review on watermelon seed oil–An underutilized product. **IOSR J Pharm**, *7*(11), 01-07.

Booth, C. (1971).**The genus Fusarium**. Kew, Surrey, UK. Commonwealth Mycological Institute. 237pp

Boualem, A., A. Lemhemdi, M.A. Sari, S. Pignoly, C. Troadec, F.A. Choucha, I. Solmaz, N. Sari, C. Dogimont, and A. Bendahmane.(2016) . The andromonoecious sex determination gene predates the separation of *Cucumis* and *Citrullus* genera. **PLoS One** 11(5):1–13.

Boughalleb N, Tarchoun N, El Mbarki A, El Mahjoub M. (2007). Resistance Evaluation of Nine Cucurbit Rootstocks and Grafted Watermelon *Citrullus lanatus* L.) Varieties Against Fusarium Wilt and Fusarium Crown and Root Rot. **Journal of Plant Sciences** 2, 102–107.

Boughalleb, N., and M. El Mahjoub. (2006). In vitro determination of Fusarium spp. Infection on watermelon seeds and their localization. **Plant Pathol**. J. 5:178–182.

Burgess, L.W., Summerell, B.A., Bullock, S., Gott, K.P. and Backhouse, D.(1994). **Laboratory Manual for *Fusarium* Research**; University of Sydney. Sydney, Australia. 132 p.

Cafri, D., Katan, J., and Katan, T. (2005). Cross-pathogenicity between formae speciales of *Fusarium oxysporum*, the pathogens of cucumber and melon. **Jornal of Phytopathology**. 153: 615–622.

Champaco, E. R., Martyn, R. D., and Miller, M. E. (1993). Comparison of *Fusarium solani* and *F. oxysporum* as causal agents of fruit rot and root rot of muskmelon. **HortScience**, 28(12), 1174-1177.

Chauhan, S.K,(1963). Influence of different soils temperatures on the incidence of *Fusarium* wilt of gram (*C. arietinum* L.) Proc. **Indian. Acad. Sci**. 8, 33:552-554.

Chen, F., Wang, M., Zheng, Y., Luo, J., Yang, X., and Wang, X. (2010). Quantitative changes of plant defense enzymes and phytohormone in biocontrol of cucumber Fusarium wilt by *Bacillus subtilis* B579. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 26, 675-684

Chikh-Rouhou, H., González-Torres, R., Alvarez, J. M., and Oumouloud, A. (2010). Screening and morphological characterization of melons for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1.2. **HortScience**, 45(7), 1021-1025.

Ciampi, L., Nissen, J., Venegas, E., Fuentes, R., Costa, M., Schöbitz, R., and Alvarado, P. (2009). Identification of two species of Fusarium link that cause wilting of colored

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

callas (*Zantedeschia aethiopica* (L.) Spreng.) cultivated under greenhouse conditions in Chile. **Chilean journal of agricultural research**, 69(4), 516-525

Colwell and Grigorova. (1987). **Methods in microbiology**. current methods for classification and identification of microorganisms. 19 .1-67

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., and Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. Applied and **environmental microbiology**, 71(9), 4951-4959.

Crown, S.T. and Gen, J., (1998). Micromethod for the methyl red test. **Microbiol**. 9 p. 101-109.

Cumagun, C.J.R., Aguirre, J.A., Relevante, C.A., and Balatero, C.H.(2010). Pathogenicity and aggressiveness of *Fusarium oxysporum* Schl. in bottle gourd and bitter gourd. **Plant Protection**. Sci. 46:51–58.

Da Costa, T. E., Maia, V. R. O., da Silva Neto, J. A., da Silva, R. M., Negreiros, A. M. P., Sales Jr, R., and Holanda, I. S. A. (2023). Respuesta de cultivares de melón a infección por Macrophomina pseudophaseolina y su efecto en la expresión proteica. **bioagro**, 35(3), 217-227.

Davis, A.R., P. Perkins-Veazie, Y. Sakata, S. Lopez-Galarza, J.V. Maroto, S.-G. Lee, Y.-C .Huh, Z. Sun, A. Miguel, S.R. King, R. Cohen, and J.-M. Lee. (2008). Cucurbit grafting. Crit .Rev. **Plant Sci**. 27:50–74.

Davis, D. (1966). Cross-infection in Fusarium wilt diseases. **Phytopathology**. 56:825–828.

De Boer, M., van der Sluis, I., van Loon, L. C., and Bakker, P. A. (1999). Combining fluorescent Pseudomonas spp. strains to enhance suppression of fusarium wilt of radish. **European Journal of Plant Pathology**, 105, 201-210.

Dela Cruz, T. E. (2012). Gelatin Hydrolysis Test Protocol. Retrieved from **American Society for Microbiology**. 1-10

Deubel, A., and Merbach, W. (2005). Influence of microorganisms on phosphorus bioavailability in soils. In **Microorganisms in soils: roles in genesis and functions** (pp. 177-191). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Edi-Premono, M., M.A.Moawad and P.L.G. Vleck. (1996). Effect of phosphate Pseudomonas putida on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. **Indonesian Journal of Crop Sci**. 11:13-3

Egel, D. S. and Martyn, R. D. (2013). Fusarium wilt of watermelon and other cucurbits. **The Plant Health Instructor**, 10, 1094

Egel, D. S. and Martyn, R. D. (2013). Fusarium wilt of watermelon and other cucurbits. **The Plant Health Instructor**, 10, 1094

Erickson, D. L., Smith, B. D., Clarke, A. C., Sandweiss, D. H., and Tuross, N. (2005). An Asian origin for a 10,000-year-old domesticated plant in the Americas. **Proceedings of the National Academy of Sciences,** 102(51), 18315-18320.

Everts, K. L., Egel, D. S., Langston, D., and Zhou, X. G. (2014). Chemical management of Fusarium wilt of watermelon. **Crop Protection**, 66, 114-119.

Facklam, R., and Elliott, J. A. (1995). Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. **Clinical microbiology reviews**, 8(4), 479-495

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

Fourie, G., E.T. Steenkamp, R.C. Ploetz, T.R. Gordon, and A. Vijoen. (2011). Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* formae speciales cubense within the *Fusarium oxysporum* complex. **Infect. Genet. Evol**. 11:533–542.

Freeman, S., A. Zveibil, H. Vintal, and M. Maymon. (2002). Isolation of nonpathogenic mutants of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* for biological control of Fusarium wilt in cucurbits. **Phytopathology** 92:164–168.

Fu, Q., P. Lu; H. konishi; R. Dilmore; H.Xu W. E. Seyfried and C. Zhu. (2009). Coupled alkali-fedspar dissolution and secondary mineral precipitation in bath s ystems : 1. New experiments at 200C and 300 bars . **Chemical Geology**. 258(3):125-135.

Fulton, J. C., Amaradasa, B. S., Ertek, T. S., Iriarte, F. B., Sanchez, T., Ji, P., and Dufault, N. S. (2021). Phylogenetic and phenotypic characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* isolates from Florida-grown watermelon. **PLoS One**, 16(3), e0248364.

Gajbhiye, A., Rai, A. R., Meshram, S. U., and Dongre, A. B. (2010). Isolation, evaluation and characterization of *Bacillus subtilis* from cotton rhizospheric soil with biocontrol activity against *Fusarium oxysporum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 26, 1187-1194.

Gao, H., Beckman, C.H., and Mueller, W.C., (1995). The rate of vascular colonization as a measure of the genotypic interaction between various cultivars of tomato and various formae speciales. Physiol. Mol. **Plant Pathology**. 46:29–43.

Garcia-Gutierrez, M.S., Ortega-Álvaro, A., Busquets-García, A., Pérez-Ortiz, J.M., Caltana, L., Ricatti, M.J., Manzanares, J., (2013). Synaptic plasticity alterations associated with memory impairment induced by deletion of CB2 cannabinoid receptors. **Neuropharmacology** 73, 388–396.

Geiser, D. M., Aoki, T., Bacon, C. W., Baker, S. E., Bhattacharyya, M. K., Brandt, M. E., and Zhang, N. (2013). One fungus, one name: defining the genus Fusarium in a scientifically robust way that preserves longstanding use. **Phytopathology**, 103(5), 400-408

Gerlagh, M., and W.J. Blok. (1988). *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucurbitacearum* n. f. embracing all formae speciales of F. oxysporum attacking cucurbitaceous crops. Neth. J. **Plant Pathology**. 94:17–31.

Gordon, T. R. (2017). *Fusarium oxysporum* and the Fusarium wilt syndrome. **Annual review of phytopathology**, 55, 23-39.

Gupta, V.P., Bochow, H., Dolej, S., Fischer, I.(2000) Plant growth-promoting *Bacillus subtilis* strain as potential inducer of systemic resistance in tomato against *Fusarium* wilt. **Z Pflanzenk Pflanzen**. 107(2):145-199.

Haas, D., and Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. **Nature reviews microbiology**, 3(4), 307-319.

Hamed, E. R., AbdEl-Sayed, M. H. F., and Shehata, H. S. (2009). Suppression of Fusarium wilt of watermelon by biological and chemical control. J. Appl. Sci. Res, 5(10), 1816-1825.

Han, H. S., and Lee, K. D. (2005). Physiological responses of soybean-inoculation of Bradyrhizobium japonicum with PGPR in saline soil conditions. **Res J Agric Biol Sci**, 1(3), 216-221.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

Heil, M., and Bostock, R. M. (2002). Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. **Annals of botany**, 89(5), 503-512.

Helman, Y., Burdman, S., and Okon, Y. (2011). Plant growth promotion by rhizosphere bacteria through direct effects. **Beneficial microorganisms in multicellular life forms**, 89-103.

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.

Hudson, O., Fulton, J. C., Dong, A. K., Dufault, N. S., and Ali, M. E. (2021). *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* molecular diagnostics past, present and future. **International Journal of Molecular Sciences**, 22(18), 9735.

Idris, E. E., Iglesias, D. J., Talon, M., and Borriss, R. (2007). Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Molecular plant-microbe interactions**, 20(6), 619-626.

Ismail, H. I., Chan, K. W., Mariod, A. A., and Ismail, M. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of cantaloupe (*Cucumis melo*) methanolic extracts. **Food chemistry**, 119(2), 643-647.

Jamiolkowska, A., Wagner, A., and Sawicki, K. (2011). Fungi colonizing roots of zucchini (*Cucurbita pepo* L. var. *giromontina*) plants and pathogenicity of *Fusarium* spp. to zucchini seedlings. **Acta Agrobotanica**, 64(1).

Jensen, B.D., F.M. Touré, and M. Ag. (2011). Watermelons in the sand of Sahara: Cultivation and use of indigenous landraces in the Tombouctou Region of Mali. **Ethnobotany Res**. Appl. 9:151–162.

Jha, C. K., and Saraf, M. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. **Journal of Agricultural Research and Development**, 5(2), 108-119.

Jiménez Díaz, R. M., and Jiménez-Gasco, M. D. M. (2011). Integrated management of Fusarium wilt diseases

Joffe, A. Z. and Palti, J. (1975). Taxonomic study of Fusaria of the Sporotrichiella section used in recent toxicological work. Appl. Microbiol. 29, 575-579.

Johansson, P. M. (2003). Biocontrol of Fusarium in wheat: introducing bacteria to a system of complex interactions (No. 403, pp. 74-pp). **Swedish University of Agricultural Sciences**.

Joseph, B.; R. RanjanPatra and R. Lawrence. (2007). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). **International journal of plant production**. 1(2):141-152.

Khan, N., Martínez-Hidalgo, P., Ice, T. A., Maymon, M., Humm, E. A., Nejat, N.,and Hirsch, A. M. (2018). Antifungal activity of Bacillus species against Fusarium and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol. **Frontiers in microbiology**, 9, 2363.

Khare, E., and Arora, N. K. (2010). Effect of indole-3-acetic acid (IAA) produced by Pseudomonas aeruginosa in suppression of charcoal rot disease of chickpea. **Current microbiology**, 61, 64-68.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

Kim, D. H., Martyn, R. D., and Magill, C. W. (1993). Chromosomal polymorphism in *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. **phytopathology-new york** and baltimore then st paul-, 83, 1209-1209.

king, E. O.; M. K. Ward; and D. E. Raney, (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. 44: 301-307

King, S.R., A.R. Davis, W. Liu, and A. Levi. (2008). Grafting for disease resistance. **HortScience** .43:1673–1676.

Klement, Z., and Goodman, R. N. (1967). The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, 5(1), 17-44.

Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., and Schroth, M. N. (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. **Nature**, 286 (5776), 885-886.

Kloepper, J.W, (2003). A review of mechanisms for plant growth promotion by PGPR In: Reddy, M.S., Anandaraj, M., Eapen, S.J., Sarma, Y.R., Kloepper, J.W. (Eds.), Abstracts and Short Papers. 6th International PGPR Workshop, 5–10 October 2003, Indian Institute of Spices Research, Calicut, India, pp. 81–92.

Larkin, R. P., and Fravel, D. R. (2002). Effects of varying environmental conditions on biological control of Fusarium wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium* spp. **Phytopathology**, 92(11), 1160-1166.

Lelliot RA, Billing E, Hayward AC (1966). A determinative scheme for the Fluorescent Plant Pathogenic *Pseudomonads*. **J. App. Bacteriol**. 29. 70-489.

Lelliott, R. A., Billing, E., and Hayward, A. C. (1966). A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. **Journal of Applied Microbiology**, 29(3), 470-489.

Leslie, J.F. and Summerell, B.A. (2006). **The Fusarium Laboratory Manual**. Blackwell., Oxford. 388 p.

Li, L., Ma, J., Li, Y., Wang, Z., Gao, T., and Wang, Q. (2012). Screening and partial characterization of Bacillus with potential applications in biocontrol of cucumber Fusarium wilt. **Crop protection**, 35, 29-35.

Lievens, B., M. Rep, and B.P.H.J. Thomma. (2008). Recent developments in the molecular discrimination of formae speciales of *Fusarium oxysporum*. **Pest Manag. Sci**. 64: 781–788.

Loganathan, M., Rai, A. B., Ramesh, R., Sharma, B. K., Rai, R. K., and Rai, M. (2009). Vascular wilt diseases-a menace in vegetable crops. **Vegetable Science**, 36(1), 1-13

Loper JE, and Henkels MD (1999). Utilization of Heterologous siderophores enhances levels of Iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. Appl. Environ. **Microbiol**. 65(12):5357–5363.

Louden, B. C., Haarmann, D., and Lynne, A. M. (2011). Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. **Journal of microbiology & biology education**, 12(1), 51-53

Lyu, Z., Xu, W., Wang, Z., Wang, C., Liu, Z., Chen, W., and Shi, Y. (2018). Isolation, identification, and inhibition charateristics of a *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* inhibiting strain. **Acta Agriculturae Zhejiangensis**, 30(12), 2065-2071

Mahmoud, A. F. (2016). Occurrence of Fusarium wilt on summer squash caused by Fusarium oxysporum in Assiut, Egypt. **Journal of Phytopathology and Disease Management**, 34-45.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

Mandeel, Q.A. (2007). Modeling competition for infection sites on roots by nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. **Mycopathologia** 163 (1): 9-20.

Mar,M.D., E.P.A. Jimenez-Gasco and R. M.Jimenz-Diaz ,(2001). Identification of pathogenic races 0,1B/C,5and 6 of Fusarium oxysporum f.sp.ciceris with random amplified polymorphic DNA (RAPD).**European Journal of Plant Pathology** .107:237-248.

Marten, P., Smalla, K., and Berg, G. (2000). Genotypic and phenotypic differentiation of an antifungal biocontrol strain belonging to *Bacillus subtilis*. **Journal of applied microbiology**, 89(3), 463-471.

Martyn, R. D. (2014). Fusarium wilt of watermelon: 120 years of research. **Horticultural reviews**: volume 42, 349-442.

Martyn, R. D., and Netzer, D. (1991). Resistance to races 0, 1, and 2 of Fusarium wilt of watermelon in *Citrullus* sp. PI-296341-FR. **HortScience**, 26(4), 429-432.

Martyn, R.D. (2012). Fusarium wilt of watermelon: A historical review. p. 136–156. In: N. Sari, I. Solmaz, and V. Aras (eds.), Proc. Xth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of *Cucurbitaceae*, Antalya, Turkey, 15–18 Oct 2012. Cukurova Univ. Publ.

Martyn, R.D. 1996. Fusarium wilt of watermelon. p. 13–14. In: T.A. Zitter, D.L. Hopkins, and C.E. Thomas (eds.), **Compendium of cucurbit diseases**. APS Press, St. Paul, MN.

Martyn, R.D., and D.J. Vakalounakis. (2012). **Fusarium wilt of greenhouse cucurbits** : Melon, watermelon and cucumber. p. 159 –174.

Martyn, R.D., and McLaughlin, R.J. (1983). The effect of inoculum concentration on the apparent resistance of watermelon to *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. **Plant Disease**. 67:493–495..

McKinney, H.H. (1923). Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedings by Helminthosporium sativum. **Journal of Agricultural Research**, 26:195-217.

McKinney, H.H. (1923). Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedings by Helminthosporium sativum. **Journal of Agricultural Research**, 26:195-217.

McMillan, R.T., (1986). Cross pathogenicity studies with isolates of *Fusarium oxysporum* from either cucumber or watermelon pathogenic to both crop species. **Annals of applied Biology**. 109: 101–105.

Meena, V. S., Maurya, B. R., Verma, J. P., Aeron, A., Kumar, A., Kim, K., and Bajpai, V. K. (2015). Potassium solubilizing rhizobacteria (KSR): isolation, identification, and K-release dynamics from waste mica. **Ecological Engineering**, 81, 340-347.

Meena, V. S., Maurya, B. R., Verma, J. P., Aeron, A., Kumar, A., Kim, K., and Bajpai, V. K. (2015). Potassium solubilizing rhizobacteria (KSR): isolation, identification, and K-release dynamics from waste mica. **Ecological Engineering**, 81, 340-347.

Miguel, A., and Camacho Ferre, F. (2014). Grafting horticultural plants as technique for the control of soil pathogens. Organisms for the Control of Pathogens in Protected Crops. **Cultural Practices for Sustainable Agriculture,** 467-502.

Mohammed, B. L., and Toama, F. N. (2019). Biological control of Fusarium wilt in tomato by endophytic rhizobactria. **Energy Procedia**, 157, 171-179.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

Mohsen L.Y.,Al-Janabi J. K. A., and Jebor M. A.(2016).The effect of some environmental conditions on the growth and activity of the external enzymes for five sp. of *Fusarium*. **Journal of Babylon University/Pure and Applied Sciences**. 24 (3)

Montiel, L. G. H, Roberto G. C. C, Doris G. C.R., César J. C. C., Librado V.H, Félix A. B. M..Effect of microcapsules of *Pseudomonas putida* on growth and yield of red pepper. **Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas special**.2018. volume number 20.

Morgan, J. A. W., Bending, G. D.,and White, P. J. (2005). Biological costs and benefits to plant–microbe interactions in the rhizosphere. **Journal of experimental botany**, 56(417), 1729-1739

Murray, K. J., and Tebo, B. M. (2007). Cr (III) is indirectly oxidized by the Mn (II)-oxidizing bacterium Bacillus sp. strain SG-1. **Environmental science & technology**, *41*(2), 528-533.

Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L. and Pfaller. M.A.(2007). **Manual of Clinical Microbiology**. 9th ed. ASM Press, Washington, D.C.pp.2488.

Naiki,T. (1986). Quantitative comparison of nuclear DNA content among formae speciales of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* .**research Bulletin of the faculty of agriculture** - Gifu University ,No:51 p. 29-33.

Namiki, F., T. Shiomi, T. Kayamura, and T. Tsuge. (1994). Characterization of the formae speciales of *Fusarium oxysporum* causing wilts of cucurbits by DNA fingerprinting with nuclear repetitive DNA sequences. **Appl. Environ. Microbiol.** 60: 2684– 2691

Naz, A., Butt, M. S., Sultan, M. T., Qayyum, M. M. N., and Niaz, R. S. (2014). Watermelon lycopene and allied health claims. **EXCLI journal**, 13, 650.

Nel, B., Steinberg, C., Labuschagne, N., and Viljoen, A. (2007). Evaluation of fungicides and sterilants for potential application in the management of Fusarium wilt of banana. **Crop Protection**, 26(4), 697-705.

Nelson, P., Burgess, L. W., and B. A., Summerall, (1990). Some morphological and physiological characters of *Fusarium* species in sections Liseola and Elegans and similar species. **Mycologia** 82:99-106.

Nelson, P.E., Toussoun, Marasas. T.A., and, W.O., (1983). ***Fusarium* species. An Illustrated Guide for Identification**. Pennsylvania State University Press. University Park. USA. 193 pp .

Nene, Y.L and M.V. Reddy, (1987) .Chickpea diseases and their control pp 233- 270. In: **the Chickpea**., Saxena M.C and Singh K.B (eds), C.A.B. International Oxon , UK.

Ngoma, L., Esau, B., and Babalola, O. O. (2013). Isolation and characterization of beneficial indigenous endophytic bacteria for plant growth promoting activity in Molelwane Farm, Mafikeng, South Africa. **African journal of Biotechnology**, 12(26).

Nirenberg, H, (1982). **The Genus *Fusarium* – A Pictorial Atlas**. Paul Parey. Berlin. Germany. 406pp.

Norini, M. P. (2007). Ecodynamics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) and of microbial communities in soils polluted with PAH and heavy metals before and after treatment with biopile and thermal desorption: influence of the rhizosphere and of mycorrhizal colonization.

Ojuederie, O. B., Olanrewaju, O. S., and Babalola, O. O. (2019). Plant growth promoting rhizobacterial mitigation of drought stress in crop plants: implications for sustainable agriculture. **Agronomy**, 9(11), 712.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

Okungbowa, F. I., and Shittu, H. O. (2012). Fusarium wilts: An overview. **Environ. Res. J**, 6(2), 83-102.

Olanrewaju, O. S., and Babalola, O. O. (2022). Plant growth-promoting rhizobacteria for orphan legume production: Focus on yield and disease resistance in Bambara groundnut. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, 6, 922156.

Otzen, D. E. (2017). Biosurfactants and surfactants interacting with membranes and proteins: same but different. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1859(4), 639-649.

Pal, K. K., and Gardener, B. M. (2006). Biological control of plant pathogens. **The plant health instructor**, 2(5), 1117-1142

Parmar P, Sindhu SS (2013). Potassium Solubilization by Rhizosphere Bacteria: Influence of Nutritional and Environmental Conditions. **J Microbiol Res** 3.

Perincherry, L., Lalak-Kańczugowska, J., and Stępień, Ł. (2019). *Fusarium*-produced mycotoxins in plant-pathogen interactions. Toxins, 11(11), 664.

Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., Nybroe, O., and Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. **FEMS microbiology reviews**, 34(6), 1037-1062.

Rahjoo, V., Zad, J., Javan-Nikkhah, M., Gohari, A. M., Okhovvat, S. M., Bihamta, M. R., and Klemsdal, S. S. (2008). Morphological and molecular identification of Fusarium isolated from maize ears in Iran. **Journal of Plant Pathology**, 463-468.

Ravikumar, R.L., B.S.Patil., C.D. Soregaon and S.G. Hegde, (2007). Genetic evidence for gametophytic selection of wilt resistant alleles in chickpea. **Theor. Appl. Genet**., 114, 619–625.

Reid, J., (1958). Studies on the Fusaria which cause wilt in melons. I. The occurrence and distribution of races of the muskmelon and watermelon Fusaria and a histological study of the colonization of muskmelon plants susceptible or resistant to Fusarium wilt. **Canadian Journal of Botany** 36: 393–410.

Rimando AM; Perkins-Veazie PM (2005). "Determination of citrulline in watermelon rind". J Chromatogr A. 1078 (1–2): 196–200. doi:10.1016/j.chroma.2005.05.009. **PMID** 16007998. Archived from the original on 1 May 2021. Retrieved 29 December 2018.

Roberts, P., Dufault, N., Hochmuth, R., Vallad, G., and Paret, M. (2019). Fusarium Wilt (Fusarium oxysporum f. sp. niveum) of Watermelon: PP352, 10/2019. **EDIS**, 2019(5), 4-4.

Ruoff, K.I. Whiley, R.A. and Beighton, D. (1999). In Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C. and Yolken, R.H. (ed.), **Manual of clinical microbiology**, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C

Ryan, P. R., Dessaux, Y., Thomashow, L. S., and Weller, D. M. (2009). Rhizosphere engineering and management for sustainable agriculture.

Saremi, H., Okhovvat, S. M., and Ashrafi, S. J. (2011). Fusarium diseases as the main soil borne fungal pathogen on plants and their control management with soil solarization in Iran. **African Journal of Biotechnology**, 10(80), 18391-18398.

Sattar, A., Naveed, M., Ali, M., Zahir, Z. A., Nadeem, S. M., Yaseen, M., and Meena, H. N. (2019). Perspectives of potassium solubilizing microbes in sustainable food production system: A review. **Applied soil ecology**, 133, 146-159

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

Sharma,M., R. k. varshney., J. N. Ro., S. Kannan ., D. Hoisington and S. Pande, (2009).Genetic diversity in indian isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp.*ciceris*,Chickpea wilt Pathogen.African. **Journal of Biotechnology**.Vol 8(6),pp.1016-1023.

Shields, P. and Cathcart, L. (2011) Motility test medium protocol. **American Society for Microbiology** .1-10

Siddiqui S, Siddiqui ZA, Ahmad I .(2005). Evaluation of Pseudomonads fluorescent and Bacillus isolates for the biocontrol of a wilt disease complex of pigeonpea. **World J Microbiol Biotechnol** 21(5):729–732.

Singh, A.K. 1990. Cytogenetics and evolution in the Cucurbitaceae. p. 10–28. In: D.M. Bates, R.W. Robinson, and C. Jeffrey (eds.), **Biology and utilization of the *Cucurbitaceae***. Comstock Publ. Assoc., Ithaca, NY.

Sivasakthi, S., Kanchana, D., Usharani, G., and Saranraj, P. (2013). Production of plant growth promoting substance by Pseudomonas fluorescens and Bacillus subtilis isolates from paddy rhizosphere soil of Cuddalore District, Tamil Nadu, India. **International jornal Microbiol**. Res, 4(3), 227-233.

Smith, S. N. (2007). An overview of ecological and habitat aspects in the genus Fusarium with special emphasis on the soil-borne pathogenic forms. Plant Pathol Bull, 16, 97-120.

Snyder, W.C and S.N. Smith, (1981). Current status. In: Fungal Wilt Diseases of Plants, Mace, M.E., Bell, A.A. and Beckman, C.H. (eds.). Academic Press. New York.

Snyder, W.C., and H.N. Hansen. (1940). The species concept in Fusarium. **Am**. **J. Bot**. 27: 64–67.

Sokolova, M. G., Akimova, G. P., and Vaishlya, O. B. (2011). Effect of phytohormones synthesized by rhizosphere bacteria on plants. Applied **Biochemistry and Microbiology**, 47, 274-278.

Srinivas, C., Devi, D. N., Murthy, K. N., Mohan, C. D., Lakshmeesha, T. R., Singh, B., and Srivastava, R. K. (2019). Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity–A review. **Saudi journal of biological sciences**, 26(7), 1315-1324.

Summerell, B. A., Salleh, B., and Leslie, J. F. (2003). A utilitarian approach to Fusarium identification**. Plant disease**, 87(2), 117-128.

Suslow, T. V., Schrot, H. M. N. and Isaka, M. (1982). Application of rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. **Phytopathology**. 72: 917-918.

Swain, H. and S. Abhijita. (2013). nitrogen fixation and its improvement through genetic engineering. **Journal of Global Biosciences**. 2(5): 98-112.

Tille, P.M.(2014).**Baily and scott's diagnostic microbiology**. thirteen.edition. Mosby, inc.,an affiliate of Elsevier inc.3251 Riverport Lane. st. Louis. Missouri 63043.

Vakalounakis, D.J., A.G. Doulis, and E. Klironomow.(2005). Characterization of *Fusarim oxysporum* f. sp. *radicis*-cucumeri*n*um attacking melon under natural conditions in Greece. **Plant Pathology**. 54:339–346.

Van der Ent, S., Van Wees, S. C., and Pieterse, C. M. (2009). Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. **Phytochemistry**, 70(13-14), 1581-1588.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

Van Peer, R., Niemann, G. J., and Schippers, B. (1991). Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by Pseudomonas sp. strain WCS 417 r. **Phytopathology**, 81(7), 728-734

Vasileva, K., Zh, I., and Tringovska, I. (2019). Evaluation of bacterial isolates for stimulating the growth of young melon (*Cucumis melo* L.) plants. **Mechanization in agriculture and Conserving of the resources**, 65(6), 217-219.

Verma, P., Yadav, A. N., Khannam, K. S., Saxena, A. K., and Suman, A. (2017). Potassium-solubilizing microbes: diversity, distribution, and role in plant growth promotion. Microorganisms for green revolution: Volume 1: **Microbes for sustainable crop production**, 125-149.

Vries. Y. P. de (2011) ***Bacillus cereus* spore formation, structure, and germination**, Ph.D. thesis. Wageningen University, Wageningen, the Netherlands – with summary in Frisian and Dutch – 128 p.

Wahyudi, A. T., Astuti, R. P., Widyawati, A., Meryandini, A., and Nawangsih, A. A. (2011). Characterization of Bacillus sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting rhizobacteria. ***J Microbiol Antimicrob*, *3*(2), 34-40.

Walker, J. C. (1971). Fusarium wilt of tomato. Monogr. 6. The Am. Phytopathol. Soc., St. Paul, MN

Walsh, U. F., Morrissey, J. P., and O'Gara, F. (2001). Pseudomonas for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. **Current Opinion in Biotechnology**, 12(3), 289-295

Watanabe, T. (2002). Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi, Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species. **CRC Press**. 486 pp.

Wu, H. S., Luo, J., Raza, W., Liu, Y. X., Gu, M., Chen, G., and Shen, Q. R. (2010). Effect of exogenously added ferulic acid on in vitro Fusarium oxysporum f. sp. niveum. **Scientia Horticulturae**, 124(4), 448-453.

Xu, W.; Wang, H.; Lv, Z.; Shi, Y.; Wang, Z. Antifungal activity and functional components of cell-free supernatant from Bacillus amyloliquefaciens LZN01 inhibit *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveumgrowth*. **Biotechnol. Biotechnol. Equip**. 2019, 33, 1042–1052.

Yadav, A., Yadav, K., and Vashistha, A. (2016). Phosphate solubilizing activity of Pseudomonas fluorescens PSM1 isolated from wheat rhizosphere. **Journal of Applied and Natural Science**, 8(1), 93-96.

Yan, Z., Zheng, X. W., Chen, J. Y., Han, J. S., and Han, B. Z. (2013). Effect of different Bacillus strains on the profile of organic acids in a liquid culture of Daqu. **Journal of the Institute of Brewing,** *119*(1-2), 78-83.

Yao, D., Ji, Z., Wang, C., Qi, G., Zhang, L., Ma, X., and Chen, S. (2012). Co-producing iturin A and poly-γ-glutamic acid from rapeseed meal under solid state fermentation by the newly isolated *Bacillus subtilis* strain 3-10. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 28, 985-991.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

Yetişir, H., Kurt, Ş., Sari, N., and Tok, F. M. (2007). Rootstock potential of Turkish Lagenaria siceraria germplasm for watermelon: plant growth, graft compatibility, and resistance to *Fusarium*. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, *31*(6), 381-388.

Zaidi, A., Khan, M., Ahemad, M., and Oves, M. (2009). Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. **Acta microbiologica et immunologica Hungarica**, 56(3), 263-284.

Zaim, S., Belabid, L., and Bellahcene, M. (2013). Biocontrol of chickpea Fusarium wilt by *Bacillus* spp. rhizobacteria. **Journal of plant protection research**.

Zaki, M.F., Z.F. Fawzy; A.A. Ahmed and A.S. Tantawy. (2012). Application of phosphate dissolving bacteria for improving growth and productivity of two sweet pepper (*capsicum annuum*) Cultivars under newly reclaimed soil . **Australian Journal of Basic and Applied Sciences** , 6(3): 826-839.

Zandi, P., and Basu, S. K. (2016). Role of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) as biofertilizers in stabilizing agricultural ecosystems. **Organic farming for sustainable agriculture**, 71-87.

Zeller, K. A., Summerell, B. A. and Leslie, J. F.(2003). Gibberella konza (Fusarium konzum) sp. nov. from prairie grasses, a new species in the Gibberella fujikuroispecies complex. Mycologia. 95: 943-954.

Zhang, S., Raza, W., Yang, X., Hu, J., Huang, Q., Xu, Y. and Shen, Q. (2008). Control of Fusarium wilt disease of cucumber plants with the application of a bioorganic fertilizer. **Biology and Fertility of Soils**, 44, 1073-1080.

Zhao, B., Yan, J., Zhang, S., Liu, X., and Gao, Z. (2014). Phylogeny and pathogenicity of Fusarium spp. isolated from greenhouse melon soil in Liaoning Province. **Saudi Journal of Biological Sciences**, *21*(4), 374-379.

Zhao, Q., Dong, C., Yang, X., Mei, X., Ran, W., Shen, Q., and Xu, Y. (2011). Biocontrol of Fusarium wilt disease for Cucumis melo using bio-organic fertilizer. Applied **Soil Ecology**, 47(1), 67-75.

Zhou, X. G., Everts, K. L., and Bruton, B. D. (2010). Race 3, a new and highly virulent race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* causing Fusarium wilt in watermelon. **Plant disease**, 94(1), 92-98.

Zhou, X.G. and Everts, K.L.. (2007). Characterization of a regional population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* by race, cross pathogenicity, and vegetative compatibility. **Phytopathology** 97:461–469

Zitter ,T.A., Hopkins, D.L. and Thomas ,C.E.(1996). Compendium of cucurbit diseases APS press ,st. Panl.MN., p.11-17.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

Abstract

The research was carried out in the Biodiversity Laboratory of National Commission for Biotechnology and Plant Diseases Laboratory,Faculty of agriculture, Damascus University during 2020-2024 for isolating and identifying some of the causes of cucurbit wilt and bacterial isolates from the rhizosphere of cucurbits and testing their antagonistic ability against the cause of Fusarium vascular wilt. 30 samples were collected from different squash families; Cucumber, zucchini, Sweetmelon, and watermelon from four governorates; Damascus, Damascus countryside, Daraa,and Deir ez-Zor. The fungal pathogens were isolated, described morphologically, their pathogenicity was studied, and the percentage of infection and its severity of each isolate on its host were calculated. It was found that 10 fungal isolates belong to the species *Fusarium oxysoporum*, then their host specialization and formae specials were determined.Both the isolates FO1 and FO2 belonged to the form *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* and isolates FO5 and FO6 belong to the form *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* while isolates FO7, FO8, FO9 and FO10 were of the form *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*, and the diameter of the fungal culture ranged between 3.8 cm and 6.8 cm after seven days of incubation in PDA medium at 27±3 C°, while the infection severity ranged between 12% and 69.3%, with isolate FO7 taken from watermelon in Daraa being the highest. In terms of infection rate and disease severity, it is followed by isolate FO5, from Sweetmelon from the Deir ez-Zor region, according to the infection scale. 40 bacterial isolates showed an antagonistic ability towards its pathogenic forms; FO7 and FO5 but the 4 bacterial isolates B20, B2, B10, and B25 were chosen that showed superiority in inhibiting the two pathogenic forms FO7 and FO5 in the laboratory. The biochemical identification of the bacterial isolates showed that, the two isolates B2 and B10 belonged to the species *Pseudomonas fluorescens*, and the two isolates B20 and B25 belonged to *Bacillus subtilis*. in the pot experiment, Watermelon and Sweetmelon compared to the control infected with the fungus not treated with bacteria. Isolate B20 had the best inhibition rat of both pathogenic fungi FO5 and FO7, as the infection rate on Sweetmelon and Watermelon decreased by 40% and 30%, respectively, and the severity of the disease was 10% and 11%, respectively, compared to the rest. isolates, while the control infection with the

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

pathogenic fungus had an infection rate of 80% on Watermelon and 96% on Sweetmelon. also The results showed the effect of bacterial isolates on some growth indicators of watermelon plants in pots. The significant superiority of isolate B20 was demonstrated in all the studied growth indicators of Watermelon plants compared to the rest of the bacterial isolates. Plant treated with bacterial isolate B20 only recorded the highest of stem height, wet and dry weight of the shoot, length. the root wet and dry weight of the root system, compared to the rest of the treatments and the healthy control (85.60 cm, 52.13 g, 8.43 cm, 32.53 cm, 6.39 g, 3.27 g, respectively). For Sweetmelon, treatment with bacterial isolate B20 only recorded the highest plant height, weight. Wet and dry weight of the shoot, root length, wet weight and dry weight of the root, compared to the rest treatments with the healthy control (76.00 cm, 48.66 g, 7.43 g, 32.83 cm, 5.52 g, 3.51 g, respectively). The ability of the isolates to degrade phosphate and potassium to produce the hormone indole acetic acid was also tested, as isolate B20 ability to decompose phosphate and potassium and had a remarkable efficiency in producing the hormone indole acetic acid. These results open the way for further testing of the selected bacterial isolates in inhibiting the causes of Fusarium vascular wilt disease for later use in the production of biofertilizers.

Keywords: Fusarium vascular wilt, Watermelon, *baciluus subtilis*, cucurbit wilt, *Pseudomonas fluorescens,*Sweetmelon

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

Syrian Arab Republic

Damascus University

Faculty of Agriculture Engineering

Department of Plant Protection

Inhibition of some wilt diseases of cucurbits using local isolates of Plant Growth Promoting Rhizobacteria

A thesis submitted for the degree of PhD in Agriculture Engineering, Plant Protection

by

Eng. Faten Aoad Alalouche

Supervisors

Supervisor
Prof. Mohammad Fawaz Azmeh
Professor in

Plant protection Department

Damascus University

Associate Supervisor
Prof. Mahmoud abu Ghoura
Professor in

Plant protection Department

Damascus University

2024

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner