استخدام الجالكونات في تثبيط أنواع من بكتريا *Erwinia* المعزولة من النباتات

زهراء سالم المشهداني

قسم علوم الحياة / كلية التربية للبنات

جامعة الموصل

الاستلام **القبول**

٢٠١٠ / ٠٦ / ٠٢ ٢٠١٠ / ٠٩ / ١٥

ABSTRACT

Samples collected from different plants (Potato, Carrot, Pear) from many sources shown signs of infection with bacteria. The isolated bacteria causing each disease were identified seven isolates of *Erwinia carotovoa var. carotovora* and five isolates belong to *E.chrysanthemi* that isolated of potato and fore isolates of *E.c.c* that isolated of carrot and fore isolates of *E.amylovora* isolated of Pear *E.c.c.* and *E.ch* caused black stem disease in potato and *E.c.c.* caused Rut Root for carrot and *E.a.* caused fire Blight.Chalcon used as a method for resisting these diseases and have shown that chalcon (acetophenon benzayl dehyde) better than chalcon (aceto phenon para methoxy benzayl dehyde) in resisting thes diseases except *E.amylovora* which have better result in chalcon (aceto phenon Paramethoxy benzayl dehyde) in 5% concentration.

الخلاصة

جمعت عينات من نباتات البطاطا والجزر والسفرجل من مصادر متعددة ظهرت عليها أعراض الإصابة بالبكتريا . كل من البكتريا المعزولة تسبب مرض و تم الحصول على سبع عزلات من *Erwinia carotovora var carotovora* وخمس عزلات تعود الى *E.chrysanthemi* من البطاطا واربع عزلات من *E.c. carotovora* من الجزر واربع عزلات من *E.amylovora* من السفرجل . ان البكتريا *E.c.c* و *E.c.h* تسبب مرض الساق الاسود في البطاطا و *E.carotovora var carotovora* تسبب العفن الطري للجزر

و *E.amylovora* تسبب اللفحة النارية للسفرجل . استخدمت الجالكونات لمقاومة هذه البكتريا وقد تبين ان الجالكون (Acetophenon benzayl dehyde) افضل من الجالكون (Acetophenon Paramethoxybenzayl dehyde)
في مقاومة هذه الأمراض ما عدا البكتريا *E.amylovova* فقد اعطت افضل نتائج مع الجالكون (اسيتوفينون باراميثوكسي بنزل ديهايد) عند التركيز ٥%.

المقدمة

تعد بكتريا *Erwinia* احد أهم الأنواع المسببة لإمراض النبات وتنتمي الى العائلة المعوية Enterobacteriaceae وهي عبارة عن عصيات مستقيمة ابعادها 3.0x1.0x1.0-0.2 مايكروميتر متحركة بواسطة اسواط محيطية Peritrichous وسالبة لصبغة كرام ولاهوائية ولا تكون سبورات وتمتازعن غيرها بقدرتها على انتاج كمية كبيرة من الانزيمات البكتينية Pectic enzymes التي تسبب اهتراء الانسجة البارنكيمية النباتية (١).

علم امراض النبات البكتيرية علم حديث حيث يعتبر العالم Erwin smith (١٨٥٤-١٩٢٧) اول من قام بعزل البكتريا من النبات وكشف ع ن الكثير من امراض النبات وقد لاقت ابحاثة معارضة شديدة في وقتها (٢) و(٣) الا ان الاضرار التى احدثتها والخسائر التى سببتها هذة البكتريا مما ادى الى دراسة هذة المسببات والتعرف عليها ومحاولة ايجاد الطرق المثلى لمقاومتها لذى فقدتم عزل بكتريا *E.c.c* و*E.ch* في المانيا(٤) ومصر حيث سببت خسائر كبيرة في الحاصل (٥) اما بكتريا *E. amylovora* فقد عزلت في مصر عام ١٩٨٢ بعد ان احدثت وبائية كبيرة حيث بلغت نسبة الفقد في الازهار (٧٥- ٨٥) %في محافظة المنوفية و ٩٥% في محافظة البحيرة (٦)وعزلت في المغرب في محافظة مكناس عام ٢٠٠٦ (٧)وفي سوريا عزلت ايضا وعدت المسبب الرئيسي لمرض اللفحة النارية (٨).

مقاومة الامراض البكتيرية التي تصيب النباتات تعتبر صعبة جدا وكثيرا ما يتطلب دمج العديد من الطرق للتغلب على مرض بكتيري معين ومن الاحتياطات الضرورية الواجب اتخاذها هي منع تلوث الحقول اوالمحاصيل الز راعية بالبكتريا الممرضة وذلك عن طريق ادخال وزراعة البذور السليمة وزراعة الاصناف المقاومة ضد بعض الامراض البكتيرية وهي طريقة مفضلة لمقاومة ومنع حدوث خسائر كبيرة (٩) و(١٠).

استخدام المبيدات الكيمياوية في مقاومة الامراض البكتيرية قد اصبح عديم الفاعلية بسبب رشوء صفة الم قاومة في هذه المسببات وكذلك اهتمت منظمة الغذاء والزراعة الدولية (FAO) باصدار الكتيبات التي ترفع درجة الامان عند استخدام المبيدات وكذلك فانه من المفيد وضع

برامج التدريب التي تهدف الى تقليل الاثر الضار لمسببات الامراض البكتيرية وتقليل تلوث التربة (١١).

الجالكونات هي عبارة عن مركبات حلقية وسطية مهمة لتصنيع مركبات غير متجانسة وتعد مادة اولية رئيسية في الكثير من التفاعلات لإعطاء نواتج مهمة في المجال الطبي والصناعي(12).

تهدف الدراسة الى عزل وتشخيص عدة انواع من جنس البكتريا *Erwinia* والتي تسبب امراض خطيرة مثل البكتريا المسببة لمرض الساق الاسود في البطاطا ومرض العفن الطري في الجزر ومرض اللفحة النارية في السفرجل ومن ثم ايجاد أفضل طريقة لمقاومتها عن طريق استخدام الجالكونات.

المواد وطرق العمل

مصادر عزل البكتريا:

أولاً : العزل من درنات البطاطا

تم عزل البكتريا من الدرنات المصابة حيث غسلت الدرنات اولا بماء الحنفية لازالة التربة العالقة نها ثم قطعت الى قطع صغيرة ووضعت في دورق زجاجي وعقمت سطحيا باستخدام هايبوكلوريت الصوديوم ١% لمدة دقيقتين ثم بالماء المقطر المعقم لازالة اثار المادة المعقمة وبعدها نقلت الى قنينة زجاجية صغيرة حاوية على وسط المرق المغذي وحضنت في درجة ٣٧م لمدة (١٨-٢٤) ساعة بعدها نقلت قطرة من المرق المغذي الى وسط اكارالمالكونكي (١٣).

ثانياً: العزل من الجزر

عزلت البكتريا من الجزر وذلك من الاجزاء التي ظهرت عليها الاصابة والتي تكون بشكل مناطق متحللة مائيا حيث اخذت اجزاء منها وعقمت سطحيا بها يبوكلوريت الصوديوم ١% ثم بالماء المقطر بعدها نقلت الى قنينة زجاجية صغيرة حاوية على وسط المرق المغذي وحضنت بدرجة٣٧ م (18-24) ساعة بعدها نقلت قطرة من المرق المغذي الى وسط اكار الماكونكي.

ثالثاً: العزل من ثمار السفرجل

تم عزل مسبب مرض اللفحة النارية للسفرجل من الثمار حيث جمعت عينات حاوية على اجزاء مصابة وغسلت بماء الحنفية للتخلص من اثار التربة العالقة بها ثم قطعت الى قطع صغيرة ووضعت في دورق زجاجي وعقمت سطحيا باستخدام هايبوكلوريت الصوديوم ١% لمدة دقيقتين ثم بالماء المقطر المعقم لازالة اثار المادة المعقمة بعدها نقلت الى قنينة زجاجية صغيرة

حاوية على وسط الحرق المغذي و حضرت بدرجة ٣٧ م ولمدة (١٨-٢٤) ساعة بعدها نقلت قطرة من المرق المغذي الى وسط اكار الماكونكي (١٤).

الأوساط المستخدمة في العزل والتشخيص:

Nutrient Broth(N.B.) (15).ووسط اكار الماكونكي MacConky(M) (16). ووسط الاكار المغذى.Nutrient Agar(N.A.) (17) الاوساط مجهزة من شركة oxoid.

تشخيص البكتريا :

لغرض تشخيص البكتريا النامية على وسط اكارالماكونكي تم اختبار الصفات المظهرية للمستعمرات البكتيرية ثم اجريت الاختبارات التالية:

الفحص المجهري :

يتم ذلك بتحضير اغشية رقيقة من المزارع البكترية الحديثة وصبغها بصبغة كرام لملاحظة الشكل والصبغة.

الاختبارات الكيموحيوية:

تم اجراء العديد من الاختبرات الكيم وحيوية والتي شملت اختبار الاوكسديز وانتاج الاندول وفحص الحركة واختبار فوكس بروس كور واختبار السترات واختبار فينايل ال نين وتخمر الكاربوهيدرات (١٨).

تحضير الجالكونات:

تم تحضير هذه المركبات من رج (0,0043) مول من الاسيتوفينون مع (0,0043) مول من البنزل ديهايد او احد مش تقاتة مع اضافة 3 مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 5% من الايثانول في 10 مل من الايثانول وبعد مرور 3 **ساعات** يرشح المحلول للحصول على الراسب ويغسل عدة مرات بالماء البارد وبعدها يترك ليجف (١٩) حضرت هذه الجالكونات بالتعاون مع قسم علوم الحياة – كلية العلوم.

جدول (١): يوضح بعض الصفات الفيزيائية لمركبات الجالكون المحضرة

اسم المركب	درجة الانصهار	اللون	نسبة الناتج%
1,3 Diphenyl prop-2-ene-1-one	٥٢-٥٤ م	اصفر باهت	37.93
1–phenyl-3-(P-methoxyphenyl) prop-2- ene -1-one	63-65 م	اصفر	70.06

اختبار التاثير المثبط للجالكون:

تم اجراء اختبار الفعالية التثبيطية للجالكو نات المحضرة (١,٢) مع البكتريا على العزلات ال.C التي تم عزلها من البطاطا والجزر والسفرجل. حيث أذيب O,25 غم من الجالكون في ١ مل من DiMethylSulphOxide (DMSO) رج جيدا . اخذ 0,5 مل منها ووزعت على أقراص من أوراق ترشيح معقمة بقطر 0,5 سم الموزعة بواقع (50) قرص لكل جالكون للحصول على التركيز المطلوب.ثم عمل تركيز أخر بنفس الطريقة وبنفس الوقت تم تحضير أطباق بتري حاوية على وسط الماكونكي وزرع الوسط بالبكتريا المعزولة مسبقا بطريقة الصب ثم وزعت الأقراص الحاوية على الجالكونات بواقع ٣ مكررات لكل بكتريا ولكل تركيز و حضنت بدرجة٣٧م ولمدة ٢٤ ساعة فقط إضافة إلى معاملة السيطرة التي عوملت بأقراص معاملة بالماء المقطر (٢٠) اخذت النتائج بحساب قطر مساحة التثبيط بشكل قطرين متعامدين.

النتائج والمناقشة

العزل :

تم الحصول على 20 عزلة بكتيرية ممرضة تعود الى جنس *Erwinia* و بواقع سبع عزلات من النوع *E.carotovora* وخمس عزلات من النوع *E.chrysanthemi* معزولة من البطاطا و 5 عزلات من النوع *E.carotovora* معزولة من الجزر و 4 عزلات من النوع *E.amylovova* معزولة من ثمار السفرجل.

التشخيص:

تم اختبار مستعمرات البكتريا المعزولة على وسط اك ار الماكونكي (M) والتي ظهرت بشكل مستعمرات وردية ص غيرة دائرية ذات حواف ملساء والتي عزلت بشكل مستعمرات نقية على وسط الاكار المائل ثم أجريت الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لها.

صبغة كرام :

اجري هذا الاختبار للتاكد من اشكال الخلايا البكتيرية حيث ظهرت جميع العزلات بشكل عصوي قصير وكانت جميعها سالبة لصبغة كرام (١٣) و(٢١).

الاختبارات الكيموحيوية :

لم تظهر جميع العزلات قدرة على انتاج انزيم ساي تو كروم اوكسديز اما اختبار الاندول فقد اظهرت البكتريا *E.chrysanthemi* نتيجة موجبة لهذا الاختبار بتكوين حلقة حمراء بعكس كل من البكتريا *E. amylovora* و *E. c. var carotovora* اللتان اظهرتا نتيجة سالبة لهذا الاختبار. لهذا يعتبر هذا الاختبار مميزا لبكتريا *E.ch.* ، بينما اظهرت جميع العزلات نتيجة

موجبة لفحص فوكس بروس كور بتكوين اللون الوردي بعد اضافة الكواشف لها اما اختبار السترات فلم تظهر البكتريا *E.ch* اي فعالية لهذا الاختبار عل ى عكس كل من البكتريا *E. amylovora* و *E. c. var carotovora* ويعتبر هذا الاختبار مهما ايضا في التشخيص،بينما اظهرت جميع العزلات نتيجة سالبة لاختبار الفينايل النين.

اظهرت جميع عزلات البكتريا *E. c. var carotovora* قدرتها على تخمير جميع السكريات الداخلة في الدراسة اما البكتريا *E.chrysanthemi* فقد اظهرت قدرتها على تخمير سكري المانيتول والمانوز فقط , بينما اظهرت البكتريا *E. amylovora*. قدرتها على تخمير سكري التريهالوز فقط واظهرت نتيجة سالبة لبقية السكريات (22) كما موضح في الجدول (٢) وتتفق هذة النتائج مع م جلة American Phytopathological Society APS PRESS (٢٣).

الجدول ٢ : استجابة عدة انواع من بكتريا *Erwinia* للاختبارات الكيموحيوية

الاختبارات	*E.c.carotovora*	*E.chrysanthemi*	*E. amylovora*
صبغة كرام	–	–	–
الاوكسديز	–	–	–
انتاج الاندول	–	+	–
فحص الحركة	+	+	+
فوكس بروس كور	+	+	+
انتاج السترات	+	–	+
فينايل النين	–	–	–
سكر التريهالوز	+	–	+
سكر اللاكتوز	+	–	–
سكر المانيتول	+	+	–
سكر المانوز	+	+	–

اختبار التأثير المثبط للجالكون:

يوضح الجدول (٣) تاثير الجالكون (اسيتوفينون بنزل ديهايد) على نمو البكتريا وذلك عند قياس قطر مساحة التثبيط اذ اظهر التركيز 2.5% و٥% تاثيرا تثبيطيا لكل من البكتريا *E.c.c* و *E.ch* المعزولة البطاطا و *E.c.c* المعزولة من الجزر و *E.amylovora* المعزولة من السفرجل ولكن يمكن ملاحظة ان التركيز ٢.٥% اعطى مساحة تثبيط اقل من التركيز ٥%

بالنسبة لنفس الن وع من البكتريا كما موضح في الجدول لذى يمكن استخدام التراكيز العالية للحصول على تثبيط اكبر للبكتريا.

ويوضح الجدول (٤) تأثير الجالكون (اسيتوفينون باراميثوكسي بنزل ديهايد) على البكتريا حيث اظهر التركيز 2.5 و5 تاثيرا تثبيطيا على البكتريا المعزولة و لكن بنسبة اقل من الجالكون الاول حيث اظهرا لهركب (اسيتوفينون بنزل ديهايد) قابلية اكبر لتثبيط البكتريا، لذا وصفت الجالكونات انها مضادة للبكتريا (٢٤) ما عدا البكتريا *E.amylovora* المعزولة من السفرجل فقد أظهرت قدرة تثبيطية كبيرة جدا عند الجالكون (اسيتوفينون با رامبثوكسي بنزل ديهايد) بنسبة ٤٣.

مما تقدم من الجدول ٣ و ٤ نتبين امكانية استخدام الجالكون (اسيتوفينون بنزل ديهايد) لتثبيط نمو البكتريا *E.c.c* والبكتريا *E.ch* بينما يمكن استخدام الجالكون (اسيتوفينون باراميثوكسي بنزل ديهايد) في تثبيط البكتريا *E.amylovora* بنجاح.

الجدول٣ : حساسية البكتريا للجالكون (اسيتوفينون بنزل ديهايد).

البكتريا	النبات المعزولة منه	التركيز ملغم/مل	
		2.5	5
E.c..carotovora	بطاطا	* 8.6	13
E. chrysanthemi	بطاطا	9.3	11.6
E.c. carotovora	جزر	8.4	12.6
E.amylovora	السفرجل	9.6	14

*يمثل معدل ثلاث مكررات

الجدول ٤: حساسية البكتريا للجالكون (اسيتوفينون باراميثوكسي بنزل ديهايد)

البكتريا	النبات المعزولة منه	التركيز ملغم/مل	
		2.5	5
E.c..carotovora	بطاطا	*7.3	10.6
E.chrysanthemi	بطاطا	8.3	10.3
E.c..carotovora	جزر	٧.6	11
E.amylovora	السفرجل	43	12.3

*يمثل معدل ثلاث مكررات.

المصادر

1) Agrios, G. N.. Plant pathology.3 rd. ed. Academic press, INC. United kingdom P.510-520 (1988).

٢) إبراهيم ، إسماعيل علي وحسين العروسي وسمير ميخائيل ومحمد علي عبد الرحيم أمراض النبات. دار المطبوعات الجديدة. مصر الطبعة الثانية ص٥٩٨ (١٩٧٤).

٣) ابو بكر، صدر الدين نور الدين ، الافات والامراض النباتية (الجزء الاول) منهاج الدورات التدريبية لوقاية النبات في محافظة دهوك واربيل والسليمانية ص ٣٢٠. (2003)

4) Fick, W., Naumann, K., Shadow, K. Muller, H. J. and Zielke, R. Dielebensdauer von *pectobacterium carotovorum var atrosepticum* (van Hall) Dowson auf demp flanzgnt And boden. Phytopathol. P. Flanzen schutz. 9:281- 293.(1973).

5) El-Goorani, M. A. and EL-Kazzaz, M. K. Occurrence ofa blackleg dray rot of potato egypt Through imported the tubers.P.I.DIS Reptre.59:171- 174 (1975).

٦) سعيد، شلبي،. مرض اللفحة النارية في التفاح والكمثرى.
http://Khair baladna.Y007.Com\montada F5\topict17.htm2008.

٧) اشباني ، الحسن وعبد اللطيف بن بو عزة ونجاة هانو ، تشخيص المجموعة البكتيرية *Erwinia amylovora* المسببة للفحة النارية . المركز الج مهوري للبحث الزراعي بمكناس الوحدة العلمية لوقاية النبات. مختبر امراض النبات البكتيري والمكافحة الاحيائية. المدينة الجديدة مكناس المغرب (٢٠٠٩).

٨) امونة، حسان وانطونيوس داءود ومحمد عماد الدين عرابي وامينة شعيب ، دراسة لمرض اللفحة النارية على اشجار التفاحيات في سوريا ، هيئة الطاقة الذرية السورية . قسم وقاية البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية ص ب ٦٠٩١ (٢٠٠٩).

٩) بغدادي ومنيسي ، حسن احمد وفيصل عبد العزيز . الفاكهة وطرق انتاجها ، دار المطبوعات الجديدة–مصر (١٩٦٤).

١٠) نصر، عبد الله. اكثار اشجار الفاكهة. دار المطبوعات الجديدة –مصر (١٩٧١).

١١) داؤد، عاطف، افات وامراض التفاحيات اللفحة النارية في التفاحيات ، مجلة شمس، العدد ٦٥ (٢٠٠٣).

12) Parsad, Y. R., Rao, A. L. and Rambabu, R. Synthesis and antimicrobialactivity of some chalcon derivatives. *E.* Journal of Chemistry, 5(3): 461-466 (2008).

١٣) المشهداني ، زهراء سالم ، عزل وتشخيص بكتريا مرض الساق الاسود في البطاطا ومقاومتها كيميائيا. رسالة ماجستير–كلية العلوم–جامعة الموصل (٢٠٠٠).

14) Maher, E. A., Deoer, H. and Kelman, A. Serogroups of *Erwinia carotovora* involved in systemic infiction of potato plant and infestation of progeny tubers.Amer.Potato j.63: 1-4 (1986).

15) Elphinston, J. G. and perombelon, M. C. Contamination of potato by *Erwinia carotovora* during grading. Plant Pathology. 35: 25-33. (1986).

16) Kloepper, J. W., Effect of seed pice inoculation with plant growth. promoting rhizobacteria of population of *Erwinia carotovora* on plant root and in a doughter tubers. Phytopathology. 73: 217-219(1983).

17) DeBoer, S. H., and Ward, L. J.. PCR detection of *Erwinia carotovora*. subsp. atroseptica associated with potato tissue. Phytopathology 85 : 854-858. (1995).

18) Baker, F. J. and Breach. M. R. and Medical Microbiolog Techniques. London –Boston (1980).

19) Won, Liu, C. T, Tuso, L. T, Weng, J. R; K, H. H; Wang, J. P. and Lin, C. W. Synthetic chalcones as potential antiinflamatory and cancer chemopreventive agent. Europ. j. Med. chem., 40: 103-112 (2005).

٢٠) عبد الجبار ، لينا عامل . تاثير بعض ا لمركبات المحضرة محليا في بعض الفطريات رسالة ماجستير – كلية العلوم – قسم علوم الحياة (٢٠١٠).

٢١) حرمة ، محمد . استخدام مواد نحاسية في المعالجة الكيميائية لمرض اللفحة النارية C:\Documents and settings/umalqura/MyDocuments.htm(2008) امراض النبات – المنتدى العربي الموحد.

22) Schaad, N. W. Laboratory Guide for identification of plant pathogenic Bacteria.2nd Edintion the American phytopathological society st.paul.Minnesota p.39-4 (1988).

23) Saettler, A. W., schaad N. W. and D. A. Roth. Detectio of Bacteria in seed. The American Phytopathological society stipaul. Miunesota (1995).

24) Baez, D. H., Delosrios, C. Crescente, O. and Casert, A.. Antibacterial and chemical evaluation of *chromolaena moritziaana*. J. Ethnopharmacol., 59: 203-206. (1998).