تأثير مرض *brevibacillus brevis* على استحثاث الأنزيمات الدفاعية بوساطة مسببات الأمراض النباتية الفطرية (*fusarium oxysporum* f.sp. *Lycopersici*) في الطماطم

المقدمــة

المرض الفطري الذي يسبب ذبول النباتات الناتج عن (FOL) وهو اختصار للاسم العلمي *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* وهو مرض نباتي فطري يعتبر واحد من أكثر الأمراض التي تفسد التربة ويتسبب بمرض في الطماطم، وهذا يتسبب أيضا في خسارة اقتصادية كبيرة (1999). وقد استخدمت طرق عديدة للتحكم في (FOL) في البيوت الزجاجية المستخدمة للزراعة وفي الحقول والمزارع، وبالاضافة الى استخدام مجموعة متنوعة من المضادات (1993)، مقاومة الآفات (1991)، ورش المبيدات (1998)، ولكن الخسائر لازالت فادحة. هذه المشكلة يمكن ان تتفاقم كون ان استخدام المبيدات في محاصيل البيوت الزجاجية منظم بشكل قوي. والصعوبات في التحكم في FOL دفعت بشكل عاجل وفوري إلى البحث عن بدائل اكثر كفاءة، يمكن الاعتماد عليها، على ان تكون مقبولة من الناحية البيئية (2007). ولقد تم تقديم العديد من الاقتراحات كاستراتيجيات للمكافحة البيولوجية لمقاومة الكائنات الممرضة التي تصيب جذور النباتات، ولكن التطبيقات العملية لازالت محدودة، بشكل كبير بسبب عدم وجود الاجابات القاطعة للسؤال الاساسي، بالاضافة الى العلاقة التي قد تنشأ بين وسائل المكافحة البيولوجية مع النباتات والتقنيات الدقيقة التي من الممكن ان تؤثر على الكائنات الممرضة او بالتأثير الغير مباشر على النباتات من خلال التغيرات الايضية المستحثة (1995).

قمع الميكروبات الجرثومية للـ FOL ينتج من التضاد خلال عملية نمو الكائنات الممرضة التي تتغذى عن طريق امتصاص المادة العضوية المنحلة (2005). العديد من وسائل العزل بما فيها *P. aureofaciens*, و *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *P. aeruginosa* و *Bacillus subtilis* و *Serratia marscens* و *Brevibacillus brevis* و الكائنات الغير

ـة في التربة الغنية بالفطريات مثل *Trichoderma* spp معرف إنها تقمع الكائنات
ضة في التربة من خلال مستعمرات بكتيريا الـ rhizosphere (1987 ; تحت الطبع)،
والتضاد antibiosis (1994)، وعملية التخلص من الحديد iron chelation بواسطة إنتاج
بكتيريا siderophore (1992) والاستحثاث للمقاومة المنظمة في المضيف بواسطة تنشيط
المرض المرتبط بالبروتينات وأنزيمات الهيدرولاتيك (2003).

المعالجة باستخدام بكتيريا الـ rhizosphere والفطريات ممكن ان تزيد من حساسية النباتات في الدفاع عن نفسها ضد هجوم الكائنات الممرضة عن طريق إطلاق عدد من آليات الدفاع المختلفة، مثل إنتاج phytoalexins ، وتكوين مركبات الفينوليك (2000 ;1997)، وتراكم الكائنات الممرضة المرتبطة بالبروتينات (2009) وتشكيل الحواجز (1996). كما ان منتجات الدفاع الجينية تشمل العديد من الأنزيمات التي تدخل في مسار phenylpropanoid. انزيم Phenylalanine ammonia-lyase والذي يعرف بالاختصار (PAL) يدخل في تركيب أنزيم phytoalexin، ومركبات الفونوليك، حيث peroxidases (POX) وأكسيد الفينول المتعدد polyphenol oxidases (PPO) يحفز تشكيل الـ lignin (2005). مركبات PRPs مثل β-1,3-glucanases وأنزيم chitinases تعمل على انحلال جدران الخلايا الفطرية بواسطة عمل انزيم اللايتك والذي يكون دوره كمساعد على اطلاق العديد من الوسائل الدفاعية في النباتات (2005).

تلعب PAL دورا مهما في عمليات التخليق البيولوجي للعديد من الدفاعات الكيميائية وفي انتاج الفينوليك والتي تندمج في lignin (2006). كما ان نشاط PAL يحفز التفاعلات بين النباتات والكائنات الممرضة ويتبعها بعد ذلك المعالجة الفطرية. في العام (1999) أفادت دراسة ان مستعمرات بكتيرية rhizosphere نتجت من *P. aeruginosa* 7NSK2 تعمل على زيادة نشاط PAL في جذور الفاصوليا وزيادة تركيز حمض الـ salicylic في الاوراق. والزمن اللازم لتنشيط اليات الدفاع مهم جدا في قمع هجوم الكائنات الممرضة. ونشاط PAL يتغير كثيرا معتمدا ليس فقط على نوع النبات، ولكن ايضا على العمر ومرحلة التطور، والعضو، والنوع، والاغشية النباتية (1973; 2006). نشاط الـ PAL في اغشية النبات ايضا يتغير نتيجة لتأثير عوامل خارجية عدة، مثل التعرض للضوء والرياح وهجوم الكائنات الممرضة، والمعالجة بالمحفزات (Lawton and Lamb 1987, 1989, 1990). وتستجيب PAL بشكل كبير إلى عوامل الإجهاد كما هو موضح عن طريق زيادة محتوى PAL mRNA في أغشية فول الصويا المعالجة باستخدام *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* (1984, 1985, 1987, 1993). (2006)

ت ان نشاط الـ *PAL* في أنواع مختلفة من الطماطم بدرجات مقاومة مختلفة وقابلية للتعرض ض البكتيرية، المتسبب في *Clavibacter michiganensis* ssp. *Michiganensis* بالزيادة أو النقصان حسب درجة المقاومة وبشكل موازي للتغيرات في محتوى الفينول.

يمثل انزيم Peroxidases مركب اخر في الاستجابة المبكرة لهجوم الكائنات الممرضة، ويلعب دورا اساسيا في التكوين البيولوجي للـ lignin والذي من الممكن ان يحد من انتشار الكائن الممرض (1989). انتاج هذا الانزيم في وجود الهيدروجين المانح والبيرواوكسيد الهيدروجين له نشاط مضاد للجراثيم (1983). وزيادة نشاط جدار الخلية المرتبط بالبيرواوكسيد تم اكتشافه في العديد من النباتات، مثل الخيار (2000) و التبغ (1992)، وذلك بعد هجوم الكائنات الممرضة. وفي الفاصوليا، ومستعمرات بكتيريا rhizosphere تنتج نشاط PO (1992).

النباتات العليا تنتج أنزيم chitinases كرد فعل للإصابة بالميكروبات، وبعض الإصابات وكوسيلة دفاعية تجاه الفطريات الممرضة (1985). أنزيم Chitinases و β-1,3-glucanases، وهما مجموعتين لـ PRPs، وتظهر مشاركة نشطة في مكافحة الفطريات. هذه الانزيمات هي مركبات في المقاومة المطلوبة والمنظمة (SAR)، بحيث ان حمض salicylic يعمل كاشارة للجزئيات (2001). هذه الأنزيمات أيضا تتعلق بجزيئات oligomeric في جدار خلية الكائن الممرض الذي يعمل كمستدعي للمضاد الحيوي phytoalexin وتكوين مركب الفونوليك (Keen and Yoshikawa, 1983; Mauch *et al.*, 1988; van 1994).

وجود انزيمات lytic في التحكم البيولوجي تم التحقق منه في الانتاج المفرط لنبات القطن (2003; 2003)، استخراج بعض هذه الانزيمات في النباتات الجينية تعمل على زيادة مقاومتها بشكل كبير ضد كائنات ممرضة مختلفة (2003). وزيادة النشاط والتجمع لهذه الانزيمات يعتمد اساسا على وسيلة الاستحثاث، ولكن ايضا تتأثر بنوع النباتات الجينية، والظروف الفسيولوجية، ونوع الكائن الممرض (2001). وبالاعتماد على أهمية الأنزيمات الدفاعية في مقاومة هجوم الكائنات الممرضة، فان الدراسة الحالية أجريت لتحديد التغيرات في الأنزيمات الدفاعية PAL، PO، و chitinases مع الزمن في وجود وغياب FOL ووسيلة التحكم البيولوجي *Brevibacillus brevis*، وفحص الارتباط بين التغيرات المختلفة في نشاطات الأنزيم وتطور المرض في الطماطم.

مواد والطـــرق Materials and methods

مواد الزراعة Plant materials

تشكيلة من بذور الطماطم (Money Maker) تم الحصول عليها من Moles Seed Ltd ، في Colchester في Essex في بريطانيا وحفظت في درجة حرارة 4°C لحين الحاجة اليها. وقد نثرت البذور في حوض متعدد الخلايا يحتوي على الايثيلين المتعدد (LBS Polyethylene, Colne, Lancashire, UK) يحتوي على خليط من التربة الزراعية Shamrock تم الحصول عليها من (Bullrush Horticulture Ltd, Northern Ireland, UK). وبعد عشرين يوم من الانبثاق او البزوغ، تم نقل الشتلات الى اوعية بقطر 9 سم تحتوي على 75 جرام من خليط التربة. تم ري النباتات بانتظام بماء عادية.

التطعيمات Inoculations

تجد وصف تفصيلي لتحضير مزارع تطعيمات الفطريات والبكتيريا في الجزء 2 من هذه الدراسة.

بعد 20 يوم من وجود النبات في وعاء نباتي خاص تم رفع النباتات من الوعاء ثم غسلت جذورها برفق للتخلص من كل العوالق وبقايا التربة وذلك تحت ماء عادي. ثم تم غمس جذور النباتات لتطعيمها عن طريق غمرها لمدة 30 دقيقة في احد المواد التالية: *B. brevis* ومعلق في محلول يحتوي على (10^8 CFU ml^{-1})، FOL في ماء مقطر (5 (1/ 4^{th} strength ringer solution; x 10^6 conidia ml^{-1})، وخليط من *B. brevis* (10^8 CFU ml^{-1}) + *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (5 x 10^6 conidia ml^{-1})، أو ماء مقطر (تحت الطبع). في المعالجة المشتركة، تم غمر الجذور اولا في *B. brevis* لمدة 30 دقيقة ثم بعد ذلك تم نقلها الى محلول فطريات FOL conidia لمدة 30 دقيقة اضافية. وبعد التطعيم، تم اعادة زراعة النباتات في وعاء خاص قطره 9 cm وكل وعاء احتوى على 75 g من خليط تربة جديد وتم ترتيبها على منصة في منزل زجاجي. كما تم استخدام 45 نبتة لكل معالجة، واعطي 5 نباتات لكل يوم من ايام الفحص والتقييم. تم حصد النباتات عند الايام 0، 1، 2، 4، 6، 7، 14، 21، و 28 بعد المعالجة، تم غسل الجذور للتخلص من العوالق المتبقية من التربة ومن ثم تجميدها في سائل النيتروجين ثم حفظت عند درجة حرارة 80◦C- لحين استخدامها.

الأعراض Assessment of Symptoms

تقييم تطور المرض في النباتات تم على مراحل تفصل كل مرحلة عن الاخرى 7 ايام لمدة 28 يوم، وعلى التدريج من 0-3، حيث 0 تعادل نبات صحي، و 1 تعادل ذبول محدود واصفرار في الاوراق، و 2 تعادل ذبول شديد واصفرار للاوراق، و 3 تعادل موت النبات. وتم تسجيل تطور المرض بمقدار المرض النسبي % وذلك باستخدام الطريقة التالية:

% المرض = (قياس المرض في المعاجلة / اكبر قياس ممكن) x 100

استخلاص البروتين من اغشية النبات Extraction of Proteins from Plant Tissues

لعزل وتحديد الانزيمات الدفاعية في النبات، تم استخلاص البروتين الكلي من جذور الطماطم المجمدة. ولتحديد نشاطات كل من PAL، POX وأنزيم chitinase، فان الأغشية المجمدة في سائل النيتروجين، طحنت وحولت الى بودرة دقيقة باستخدام خلاط خاص به مدقة للطحن، ثم تم استخلاصها في فوسفات الصوديوم عند قيم مختلفة من pH مناسبة للانزيم تحت الدراسة (انظر ادناه).

نشاط انزيم Phenylalanine ammonia-lyase تم دراسته طبقا لـ (2006). الاغشية المتجانسة (0.1g) اضيفت الى 1ml من 50 mM فوسفات الصوديوم، pH 7 وتم تحريكه لمدة 30 ثانية. ثم وضع في طارد مركزي من نوع (Biofuge Fresco) عند 8000 x h لمدة 30 دقيقة. 1 ml من PAL 30 mM (في فوسفات الصوديوم) اضيف كقاعدة للخليط التي تم وضعها في حوض مائي عند درجة حرارة 27°C لمدة ساعة. تم قياس امتصاص الخليط عند 290nm باستخدام جهاز مقياس الطيف الضوئي (spectrophotometer (CECIL, CE1010)). ومقدار الوحدة من نشاط الانزيم عرف على انه مقدار الانزيم الذي يحرر 1 µmol من حمض trans-cinnamic لكل دقيقة لكل mg بروتين تحت ظروف الفحص القياسية.

تم فحص نشاط أنزيم Peroxidase باستخدام جهاز guaiacol من (Sigma) كمزود بالهيدروجين (1995). ومقدار 1 g من الأغشية المتجانسة أضيفت إلى 1ml 10mM فوسفات الصوديوم البارد، pH 6، وأضيف له 0.1 g polyvinylpolypyrrolidone. ثم رج الخليط بقوة

30 ثانية ومن ثم وضع في طارد مركزي عند سرعة 8000 x g لمدة 30 دقيقة. والخليط اشتمل على 0.1 ml مادة طافية على السطح، 0.25% من guaiacol (v/v) و100mM بيرواكسيد الهيدروجين في 1mM من فوسفات الصوديوم، pH 6. تم وضع الخليط في حاضنة عند درجة حرارة 28±2 ºC لمدة 30 دقيقة ومن ثم خفف ليعطي التغير في الامتصاص بمقدار 0.2-0.5 units min^{-1} عند 470nm. نشاط انزيم Peroxidase عبر عنه بالزيادة في الامتصاص عند 470nm min^{-1} g^{-1} لوزن صافي لكل mg بروتين لكل دقيقة.

تم تقدير نشاط أنزيم Chitinase باستخدام طريقة (2006). حيث تم تحضير Colloidal chitin طبقا لـ Hsu و Lockwood (1975). تم اذابة 40 g من مسحوق chitin النقي (Sigma) في 400 ml conc. HCl عن طريق التحريك لمدة 30 إلى 50 دقيقة. يتحول Chitin بشكل سريع الى محلول رغوي عن طريق اضافة محلول حمضي ببطء الى 2 l من ماء بارد (5◦C). تم جمعت المواد المعلقة باستخدام ورق ترشيح من نوع Whatman درجة 3 في الفراغ قبل غسلها في 5 l ماء عادي ومن ثم تم إعادة ترشيحها. تكررت عملية الغسل الغسل حتى اصبحت الـ pH تقريبا 3.5. والمحتوى المائي للـ colloidal chitin تم تحديده عن طريق التجفيف عند درجة حرارة 100◦C. وقبل الاستخدام، تم وضع الـ chitin مرة أخرى في الماء وطحن في خلاط من نوع Wareing Blender يعمل بسرعة كبيرة لمدة 10 دقائق. تم حفظ المحلول في درجة حرارة الغرفة في وعاء عادي.

اختبار أنزيم Chitinase Chitinase assay

لاستخلاص أنزيم Chitinase ، تم مزج متجانس لـ *1 g* من الأغشية في *1mM* من فوسفات الصوديوم، *pH 6.5*. ثم تم وضع المزيج في طارد مركزي بسرعة *13500 x g* لمدة 30 دقيقة عند درجة حرارة 4°C. مقدار 1 ml من المادة التي طفت على السطح تم تحضينها في حجم مساوي من 10% (w/v) colloidal chitin عند درجة حرارة 50°C لمدة ساعة واحدة. أوقف التفاعل بإضافة 1.0ml من NaOH وغليه لمدة 5 دقائق. وأخذت 1 ml من المادة الطافية على السطح ووضعت في طارد مركزي بسرعة 1500 x g لمدة 10 دقائق وخلطت مع 1.0 ml حمض dinitrosalicylic (DNS) وتم غلي الخليط لمدة 5 دقائق. اضيف مقدار 5 ml ماء مقطر الى المحلول وتم قياس الامتصاص عند 540 nm. حيث عرفت وحدة نشاط الأنزيم chitinase

إنها مقدار الأنزيم اللازم لتحفيز وتحرير 1µmol من *N*-acetyl-*D*-glucosaı (NAG) لكل mg بروتين في الساعة عند درجة حرارة 50◦C، 6.5 pH.

تقدير البروتين Protein Estimation

تم تقدير تركيز البروتين باستخدام طريقة Bradford (1976). 100 mg صبغة Coomassie Brilliant Blue اذيبت في 50ml 95% من الايثانول، 100 ml 85% من حمض الفسفوريك والخليط خفف في ماء مقطر 1 l. تم ترشيح المحلول ثلاث مرات من خلال ورق ترشيح من نوع Whatman بدرجة No. 1. ولتقدير محتوى البروتين في عصارة النبات، تم اضافة مقدار 0.1 ml من عصارة النبات الى 0.9 ml من استات الصوديوم (sodium acetate) و 2 ml من كاشف صبغي (dye reagent) ثم تم خلطه بشكل جيد. اتبع ذلك بعملية التطعيم في درجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق، وتم قياس مقدار الامتصاص عند 595 nm. وقدر تركيز البروتين بمقارنته مع منحنى قياسي اعد باستخدام 0-0.3 mg ml^{-1} من بروتين bovine serum albumin والذي يعرف بـ (BSA).

التحليل الاحصائي Statistical Analysis

متوسط بيانات نشاط الانزيم من كل التجارب المكررة تم تحليله باستخدام طريقة ANOVA ثنائية الاتجاه مع اعتبار ان المعالجات والايام هما العاملين المستخدمين في الطريقة. البيانات التي تم الحصول عليها لتقييم المرض تم تحليلها باستخدام فحص المدى المزدوج Duncan's.

RESULTS ـــج

نشاط انزيم Phenylalanine Ammonia-Lyase

زيادة كبيرة (p = 0.001) في نشاط PAL لوحظ خلال 24 ساعة من المعالجة بواسطة FOL (Figure 3.1a)، بالمقارنة مع النباتات تحت السيطرة، واستمرت الزيادة حتى اليوم 6. والزيادة في نشاط PAL (p = 0.05) لوحظ ايضا في النباتات المعالجة بواسطة كلا من FOL و *B. brevis*، وبالرغم من ان الفرق بين هذه المعالجة والتي تحت السيطرة لم يكن واضحا حتى الساعة 48 بعد المعالجة. في النباتات المعالجة بواسطة *B. brevis*، فان نشاط PAL كان اكبر كثيرا من نشاطه في النباتات تحت السيطرة فقط في الايام 6 بعد المعالجة (p=0.05).

في التجربة الثانية، تم تسجيل نشاط PAL عند 4 نقاط زمنية من 7 الى 28 يوم بعد المعالجة، خلال فترات زمنية تفصل كل فترة عن الاخرى 7 ايام (Fig 3.1b). نشاط PAL تغير بشكل كبير في كل المعالجات (p = 0.01). النشاط الاعلى كان موجودا في النباتات المطعمة بـ FOL فقط وتلك التي اشترك معها *B. brevis* (p = 0.001). والزيادة في نشاط *PAL* ايضا حدث حتى 21 يوم بعد المعالجة بـ *B. brevis* بالمقارنة مع تلك التي تحت السيطرة (p = > 0.05).

نشاط انزيم Peroxidase

نشاط انزيم Peroxidase في نباتات الطماطم بمعالجات مختلفة بعد الايام من 0 الى 28 يوم موضحة في الشكل 2.3 a و b. ولا يوجد فروقات ذات اهمية في نشاط انزيم Peroxidase لوحظت لمختلف المعالجات من اليوم 0 الى اليوم 2 (p = >0.05; Figure 3.2a). زيادة كبيرة في نشاط انزيم Peroxidase (p = 0.001) للنباتات المعالجة بـ FOL لوحظت في اليوم 4، وذلك بالمقارنة مع المعالجات الاخرى. كما لا يوجد اختلاف يذكر في نشاط الانزيم بين المعالجات الاخرى والتي تحت السيطرة لوحظت عن أي زمن (p = >0.05).

لا يوجد تغير واضح في نشاط الانزيم في أي معالجة غير تلك التي تحت السيطرة بين اليوم 7 واليوم 28 (Figure 3.2b). النشاط في النباتات التي عولجت بواسطة FOL فقط كانت

بشكل ملحوظ من المعالجات الاخرى عند اليوم 7، ولكن قلت الى اليوم 28. القيم المسجلة انزيم Peroxidase في النباتات تحت السيطرة اظهرت زيادة خلال فترة الزمن.

نشاط أنزيم Chitinase

اظهر نشاط أنزيم Chitinase زيادة عامة في كل المعالجات المختلفة، من اليوم 0 والى اليوم 6 (الشكل 3.3 a). في النباتات المعالجة فقط بـ FOL، او تلك التي اشتركت مع *B. brevis* ، النشاط كان متشابها على كل الفترات الزمنية، وكان اكثر ما يمكن في جذور النباتات تحت السيطرة او في تلك التي عولجت بـ *B. brevis* فقط عند اليوم الرابع والسادس بعد المعالجة. في النباتات تحت السيطرة، النشاط كان كبيرا ($p=0.05$) عند اليوم الثاني بعد المعالجة، بالمقارنة مع كل المعالجات الاخرى.

نشاط كبير وملحوظ لأنزيم chitinase وجد في كل المعالجات بالمقارنة مع النباتات تحت السيطرة ($p = 0.001$) عند اليوم 7، والذي بعد ذلك قل النشاط لكل المعالجات. لا يوجد تغيرات ملحوظة في نشاط أنزيم chitinase بعد اليوم 14 وزيادة.

أعراض المرض Disease symptoms

عند كل نقاط الزمن، فان اعلى مقدار للمرض ($p = 0.001$) تم الحصول عليه للنباتات المعالجة بواسطة FOL فقط (الجدول 1.3). اعراض المرض ازادادت بشكل كبير مع الزمن على النباتات التي عولجت بـ FOL فقط. بالمقارنة مع النباتات المعالجة بـ FOL، و النباتات المعالجة بـ *B. brevis* و *FOL* ظهرت أعراض مرضية اقل. بعض الاعراض ايضا كانت واضحة بعد اليوم 21 على النباتات التي عولجت بـ *B. brevis* فقط، أو على النباتات تحت السيطرة.

ل 1.3/ متوسط المرض (%) في نباتات الطماطم لمعالجات مختلفة على فترات وصلت لـ 28 يوم.

Serial no.	Treatments	Average Disease (%) ± SE in different treatme...				
		0	7	14	21	28
1	control	0	0	0	20 ± 1.52 e	33.33 ± 1.04 d
2	B.B	0	0	0	13.33 ± 0.72 e	13.33 ± 1.31 e
3	B.B+ FOL	0	0	13.33 ± 1.34 e	20 ± 1.2 e	33.33 ± 2.21 d
4	FOL	0	33.33± 1.62 d	46.66 ± 2.0 c	66.66 ± 2.5 b	94.33 ± 2.24 a

a: تطور المرض سجل على مقياس مطلق من 0-3، حيث 0 تعادل نبات صحي، و 1 تعادل ذبول محدود واصفرار في الاوراق، و 2 تعادل ذبول شديد واصفرار للاوراق، و 3 تعادل موت النبات. تم تسجيل تطور المرض بمقدار المرض النسبي وذلك باستخدام الطريقة التي وصفت اعلاه. الاعداد التي اتبعت بنفس الحرف لا تظهر فروق مهمة ($p > 0.05$)

مناقشـــــــة DISCUSSION

النتائج التي حصلنا عليها في هذا العمل تقترح ان PAL، وبدرجة اقل أنزيم peroxidases والأنزيم الهضمي chitinase، من الممكن ان يكون له تأثير كبير في استجابة جذور الطماطم للتطعيم بواسطة FOL. وبصفة عامة، الاستجابة التي وجدناها هنا تشير الى ان نشاط هذه الانزيمات ازداد في النباتات المطعمة بـ FOL حتى اذا كانت هذه النباتات قد عولجت بعامل المكافحة البيولوجية *B. brevis*. وقد حدثت الاستجابة بشكل أسرع مع استخدام PAL من أنزيم peroxidase، وبعد ذلك استمرت الاستجابة أكثر للأنزيم الهضمي chitinase.

الزيادة في نشاط PAL في النباتات هو رد فعل طبيعي تجاه هجوم الكائنات الممرضة وكذلك هذا له علاقة بالمقاومة المستحثة بواسطة JA (2006)، SA (2006)، وكذلك الفطريات

(2005). كذلك النشاط العالي لـ PAL في FOL (بمفرده او مع *B. brevis*) يشير إلى ان ـ في المقاومة المطلوبة في نباتات الطماطم من الممكن ان تعود الى FOL المستحث بواسطة جينات PAL بغض النظر عن وجود *B. brevis* . حيث، الكائنات الممرضة قد تنشط *PAL* عن طريق زيادة تجمعات *PAL mRNA*، وتكوين بروتين *PAL* جديد سيعزز بشكل ملحوظ عملية تجمع phenylpropanoids مثل أحماض الفينول (2006). واخيرا، النتائج تقترح ان تجمع PAL يكون اسرع بكثير ومتماسك بشكل ملحوظ في جذور نباتات الطماطم المصابة، وبالاخص في تلك المعالجة بالكائن الممرض او الكائن الممرض plus B. brevis. وهذا التجمع لمركبات الفينول والنشاط المرتفع لانزيم التخشب في هذه النباتات من الممكن ان يتكون في الاشارات الدفاعية المنشطة بوساطة الكائن الممرض وعامل المكافحة البيولوجية والتي تؤدي الى تنشيط نظام الدفاع في الطماطم ضد هجوم FOL، وعليه فان هذا يقلل من تطور المرض ويحافظ على صحة النبات.

وبالرغم من ان تجمع الـ PAL يبدو بغض النظر عن وجود *B. brevis* ، النباتات المعالجة بواسطة *B. brevis* كانت لا تزال قادرة على مقاومة الكائنات الممرضة كما هو متوقع بتطور اقل ومتأخر لأعراض المرض. هذه النتيجة توضح ان البكتيريا من الممكن ان تكون قادرة على قمع حدوث المرض الناتج عن بعض التقينات الاخرى التي من الممكن ان تكون دفاعية او *ISR* او كلاهما.

انزيم الـ Peroxidase مهم في الدفاع ضد الكائنات الممرضة، من خلال دورها في اكسدة مركبات الفينول وتحويلها الى quinines، وهذا يتسبب في زيادة نشاط مضادات الميكروبات. ولهذا، من الممكن ان تدخل بشكل مباشر في ايقاف تطور الكائنات الممرضة (2004، 2006)، وتعجل موت الخلية القريبة من مكان الاصابة، وتمنع من تقدم العدوى و / أو بتوليد بيئة ملوثة والتي تمنع نمو الكائنات الممرضة (1995). نشاط انزيم Peroxidase في انواع مختلفة من نباتات الطماطم في الدراسة الحالية تغير مع الزمن، وكان النشاط الاكبر في النباتات تحت السيطرة. هذا النشاط الكبير لانزيم peroxidase في النباتات control plants من المحتمل انه يعود إلى خلطة السماد المستخدمة، حيث افادت العديد من الدراسات ان التربة المستخدمة لنمو النباتات تدخل في تفعيل انزيمات الدفاع المتعددة في النباتات (2007).

من المهم ان نعتبر ان النباتات الملقحة بكلا من *B. brevis* + FOL تظهر نشاط ثابت ومستمر لانزيم peroxidase عند فترات زمنية مختلفة وهذا يقترح الدور المحتمل لـ *B. brevis* في استحثاث المورث الجيني POX وبالتالي فانه يحمي النبات ضد تعاقب المرض المحتمل. افادت

، علمية ان العديد من سلالات البكتيريا الغير ممرضة تستحث المورث الجيني POX في ت المختلفة، على سبيل المثال الارز (2001، 2008)، نبات المطور جينيا والذي يعرف بالعربية الكاذبة أرابيدوبسس *Arabidopsis* (2007)، والخيار (2000) والطماطم (2004) والقطن (1995).

الـ Chitinase هو أنزيم أخر مهم له علاقة بوسائل الدفاع في النبات ضد العدوى من خلال قدرته على تحليل جدران الخلايا الفطرية. والنتائج التي حصلنا عليها هنا أظهرت ان إصابة نباتات الطماطم بـ FOL تعمل على زيادة نشاط أنزيم chitinase بشكل كبير يصل لـ 7 أيام، وبعد ذلك يتناقص النشاط. وبالمقارنة بين المعالجات، فان FOL بمفرده او في حالة وجوده مع *B. brevis* يسبب زيادة كبيرة في نشاط أنزيم chitinase بشكل ملحوظ خلال مراحل مختلفة للنمو حتى 7 أيام، بالمقارنة مع نباتات معالجة بواسطة *B. brevis* حيث وجد ان نشاط أنزيم chitinase يتناقص خلال يوم إلى يومين، وهذا من المحتمل بسبب قمع التغذية العكسية لجين أنزيم chitinase النباتي بواسطة أنزيم chitinase الخارجي الناتج بواسطة *B. brevis* أو القمع المحفز الناتج عن تجمع جزيئات chitin الأحادية بواسطة نشاط أنزيم chitinase البكتيري الناتج بواسطة لقاح الـ *B. brevis* (2007). وبالرغم من ان هذا النقصان في نشاط أنزيم chitinase ، في النباتات المعالجة بـ *B. brevis* من أعراض المرض كانت اقل حدة، وهذا يقترح إمكانية وجود مقاومة متوسطة ناتج أنزيم chitinase المحضر خارجيا بواسطة *B. brevis* . نتائج مشابهة تم نشرها في بحث علمي (2006)، حيث عرض في البحث العلاقة بين أنزيم chitinase ومقاومة البطيخ لإصابة *Fusarium oxysporum*، بالاشتراك مع بروتين isoforms محدد لهذه الأنزيمات الناتجة عن أنزيمات chitinolytic البكتيرية. بوليمرات أنزيم Chitinase hydrolysed الناتج من الخلايا الفطرية الجدارية، وأجزاء من جدار الخلية اظهر انه يستحث تفاعل دفاعي في النباتات عن طريق الانتقال على الجينات المسئولة عن تركيب PRPs (2007). لوحظ نشاط عالي لأنزيم chitinase في النباتات التي تحت السيطرة في البداية، وهذا من المحتمل ان يكون بسبب العوامل المستحثة الموجودة في خلطة التربة (2002, 2003; 2006, 2008).

ومع انه في الدراسة الحالية لم يتم إثبات الدور المحتمل لخلطة التربة في استحثاث أنزيمات دفاعية، إلا ان النشاط المتزايد لأنزيم chitinase ، و POX و PAL لوحظ عند فترات زمنية مختلفة في نباتات الطماطم التي نمت في خلطة التربة وهذا كان متلازما مع الحالة الصحية للبنات. أعمال سابقة أثبتت ان خلطة التربة يمكن ان تعزز القدرات الدفاعية للنباتات ضد الانتقال الجيني β-glucuronidase (GUS) والذي يظهر إجهاد على جذور الفطريات الممرضة *Fusarium*

Septoria lycopersici الفطريات الممرضة (2006). *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* التي تصيب اوراق النباتات استخدمت لتقييم الاستحثاث في المقاومة المنظمة في البناتات التي تنمو في خلطة التربة بالمقارنة مع النباتات التي تنمو في تربة رطبة مكونة من انسجة النباتات والتي تعرف باسم peat .

لوحظ ان مقدرة خلطة التربة على تغير نسق انماط بعض جينات PR في جذور نباتات الطماطم (1997; 2005) والتي تزودنا بفرصة للمزيد من الدراسات المستقبلية لفحص خلاياها الموضعية وتقترح قواعد مفترضة لهذه الجينات في الانظمة الدفاعية للنباتات، بدون ان نتعامل مع التعقيدات المتأصلة للحالة المرضية التي تصيب الاغشية النباتية.

بصفة عامة، الدراسة الحالية وضحت نماذج النشاط للانزيمات الدفاعية المهمة لبناتات الطماطم والتي اصيبت باعراض FOL في وجود وعدم وجود *B. brevis* وأظهرت استحثاث هذه الأنزيمات في نبات الطماطم كنتيجة للتطعيم المسبق بـ *B. brevis* وهذا يمكن ان يلعب دورا في التحكم البيولوجي ضد الكائنات الممرضة وذلك بشكل مباشر عن طريق التضاد والتنافر وبشكل غير مباشر عن طريق اطلاق oligosaccharides من خلايا جدار الكائن الممرض والذي يحدث تفاعلات دفاعية (1999; 2004). دراسات اضافية في هذا المجال وبالتحديد بالنسبة لاستحثاث PAL عن طريق التطعيم بـ *B. brevis* سوف تنفذ لتوضيح وشرح احتمالات استخدام البكتيريا كوسط تحكم بيولوجي محتمل للتحكم في *FOL* من خلال تعزيز تراكم *PAL*. واضافة الى ذلك تحليل البروتين سوف يستخدم لفحص البروتين المضيف المستحث بواسطة *B. brevis* والدور الذي يلعبه في التحكم بالمرض.

تمت الترجمة في المركز العلمي للترجمة

www.trgma.com

13-7-2009