استخدام الزراعة البينيَّة والتصنيع الحيوي للجُسَيمات النانوية في السيطرة على مُسبب مَرض الذُبول الفيوزارمي *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* على الطماطة

يقدم بواسطة: **شاكر اسماعيل الديمي**

بأشراف: أ.د. حليمة زغير حسين

قسم وقاية النبات
جامعة بغداد

الفصل الاول

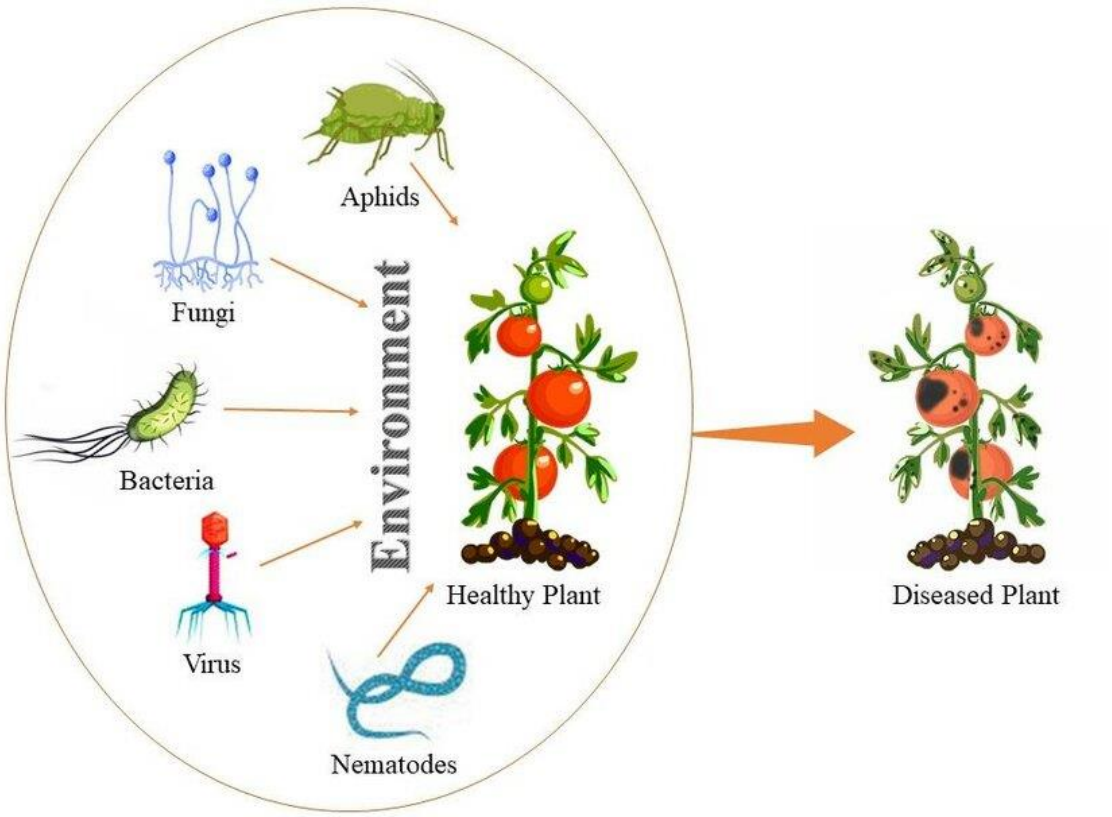
المقدمة

الطماطة

تعد الطماطة (*Solanum lycopersicum*) مِنْ الخضروات واسعة الانتشار ويمكن أن ينمو هذا المحصول ويستهلك على نطاق واسع فِي جميع أنحاء العالم

يواجه الإنتاج العالمي للطماطة العديد مِنْ التحديات

تسبب هذه العوامل انخفاضًا فِي نمو وإنتاجية الطماطة



مَرَّض الذُبول الفيوزارمي مِنْ بين أخطر الامراض التي يتعرض لها النبات والتي تؤثر في سلامته

ويصيب نبات الطماطة اينما زرع سواء فِي الحقل ام البيوت المحمية

إذ يؤثر المَرَّض في جودة الثِمَار ويقلل المحصول بين ٥٠٪ و ٦٠٪ وقد تصل الخسارة الى ١٠٠% عِنْدَما تكون الظُرُوف ملائمة للمُسبب المَرَضِيّ.

النظام المَرَضِيّ بين نبات الطماطة والفِطْر المُمْرض Fol كان موضوعَ دراسات متعددة بسببَ أهمية المحصول فِي جميع أنحاء

وبما إنَّ الزراعة هي الدعامة الأساسية للاقتصاد لتوفر الغذاء لِذلّك تواجه مجموعة واسعة مِن التحديات

توقع تقرير حديث للأمم المتحدة إنَّ يصبح عدد سكان العالم ٨.٥ مليار بحلول عام ٢٠٣٠ ونحو ٩ مليارات بحلول عام ٢٠٥٠ وذَلِكَ لتلبية مطالب السكان الذين يتزايد عددهم باستمرار هناك حاجة ملحة لزيادة إنتاج الغذاء بأكثر مِنْ ٥٠٪

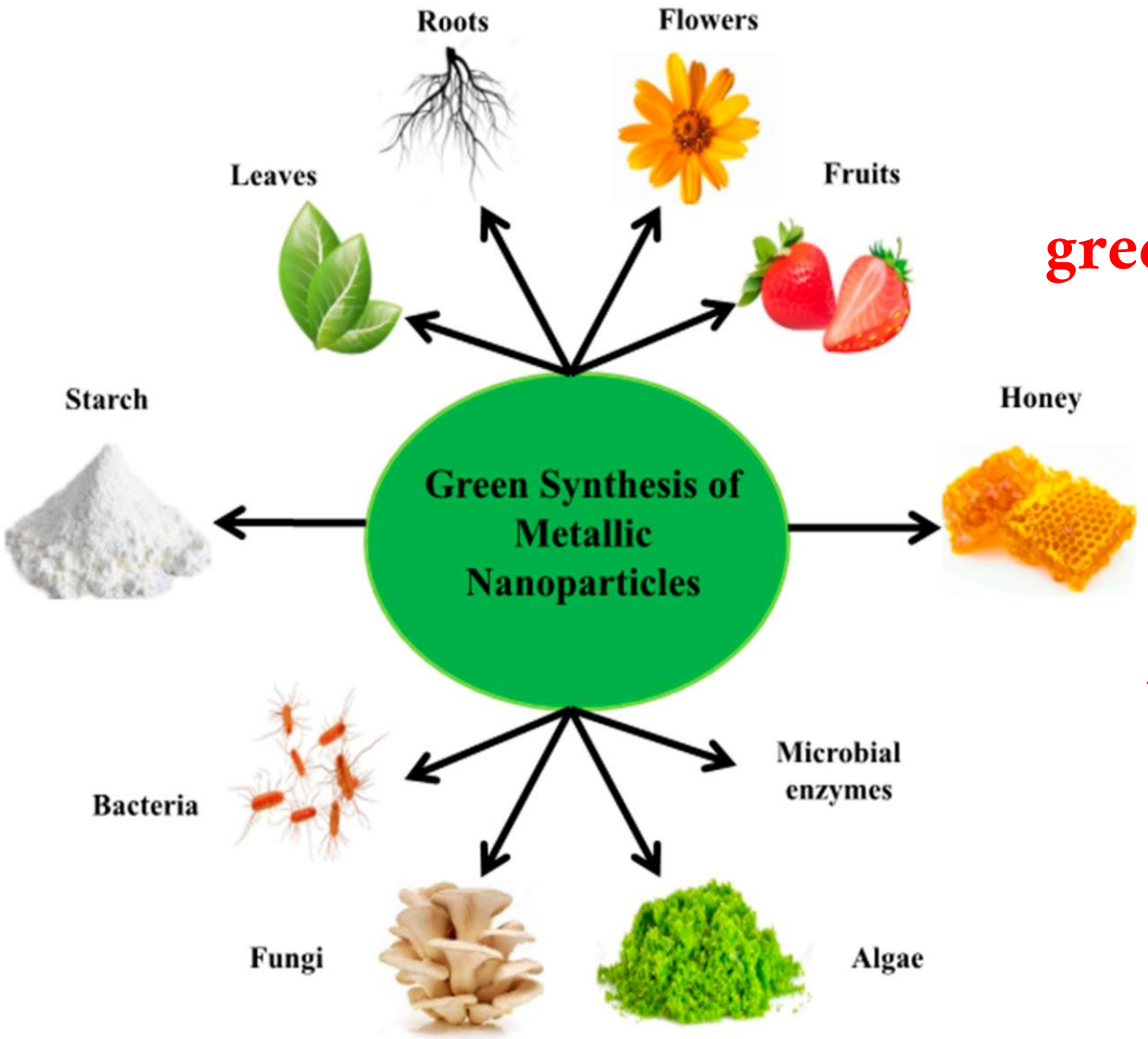
تتطور التقانات والاستراتيجيات الأحدث باستمرار

ومنها اِسْتِعْمَال الجُسَيمات النانوية المُصنّعة حيويًا

بالطريقة الخضراء **green nanoparticle synthesis**

لإحداث ثورة فِي ممارسات الزراعة الحديثة

والتركيز الرئيس هو التصنيع الحيوي لـ **MgO NPs**
بِاسْتِعْمَال مصادر صديقة للبيئة كالبكتريا



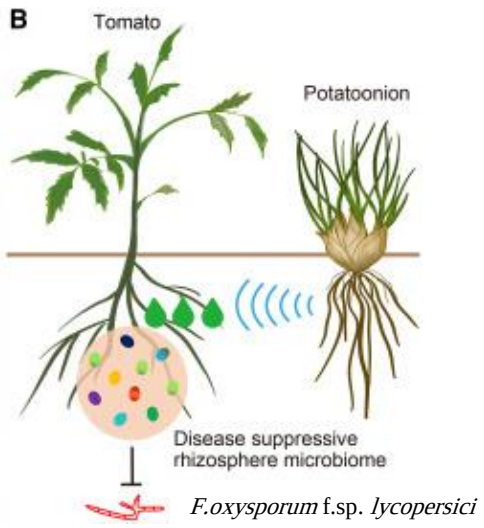
القطاع الزراعي يعد نشاطًا اقتصاديًا مهمًا لمواجهة الأزمات

الزراعة التقليدية او المحصول الأحادي تؤدي الى:

استنفاد الموارد الطبيعية، تلوث البيئة و تراكم المواد السامة للكَائِنَاتُ الْحَيَّةُ الدقيقة الضارة

إحدى الاستراتيجيات الزراعة المستدامة هي اِسْتِعْمَال الزراعة البينيَّة أي زراعة محصولين أو أكثر فِي نفس الحقل في موسم النمو

والتي أمكن اِسْتِعْمَالها أو اِسْتِعْمَال مركباتها الأليلوباثية فِي السيطرة والحَدّ مِنْ المُسببات المَرَضِيّة النباتية.

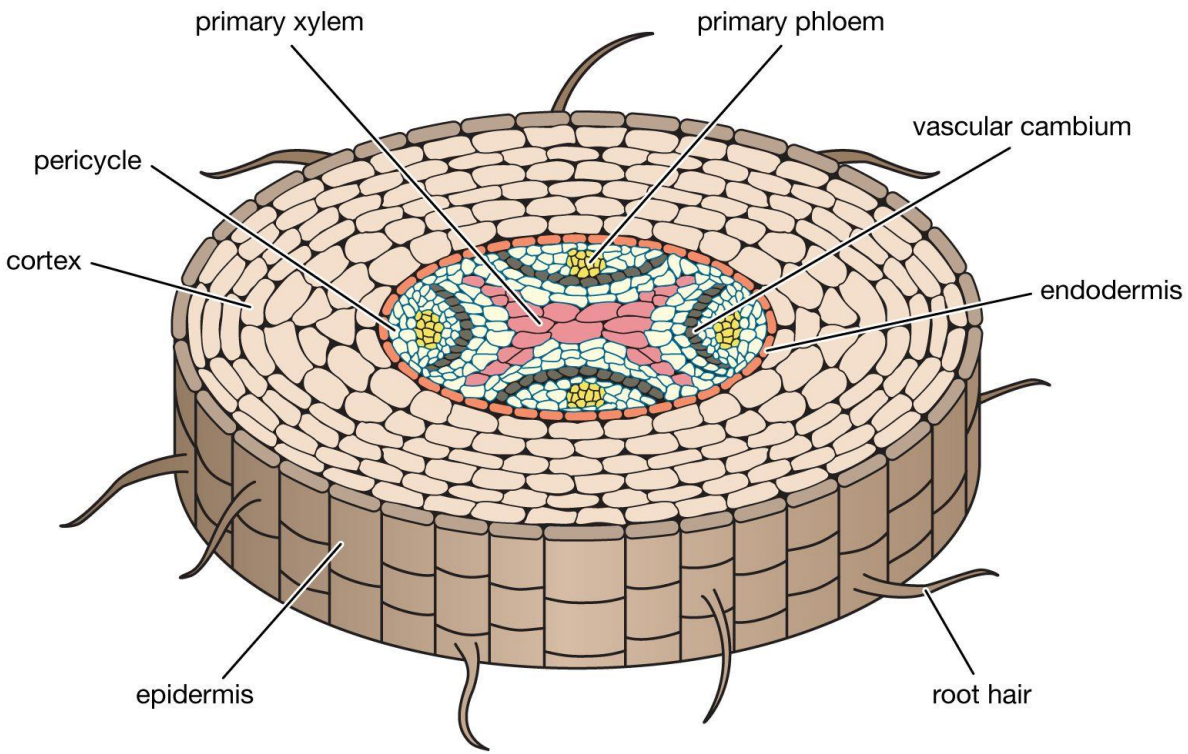


من وجهة نظر التَّشْرِيحُ المَرَضِيّ

يمكن إنَّ يحدث الدفاع من خلال الخصائص الهيكلية و الكيميائية الحيوية
كوجود دفاعات قبل التعرض للاصابة أو مُسْتَحَثّه التي تحدث فِي أوقات مختلفة

إذ تهدف الدراسات النسيجية المرضية أيضًا إلى اظهار تراكيب وتَمَرُكُز الكَائِنَاتُ الْحَيَّةُ المُسببة للأمراض النباتية، مما يوفر تفاصيل قيمة عن عملية الاختراق والاستعمار

ويمكن إنَّ يوفر معلومات قيمة حول
سبب حدوث المَرَّض ، تطوره و مدى انتشاره
ويمكن إنَّ يساعد أيضًا فِي تحديد أفضل مسار للعلاج



© Encyclopædia Britannica, Inc.

لِذلّك هدفت الدراسة الى

التصنيع الحيوي لـ MgO NPs

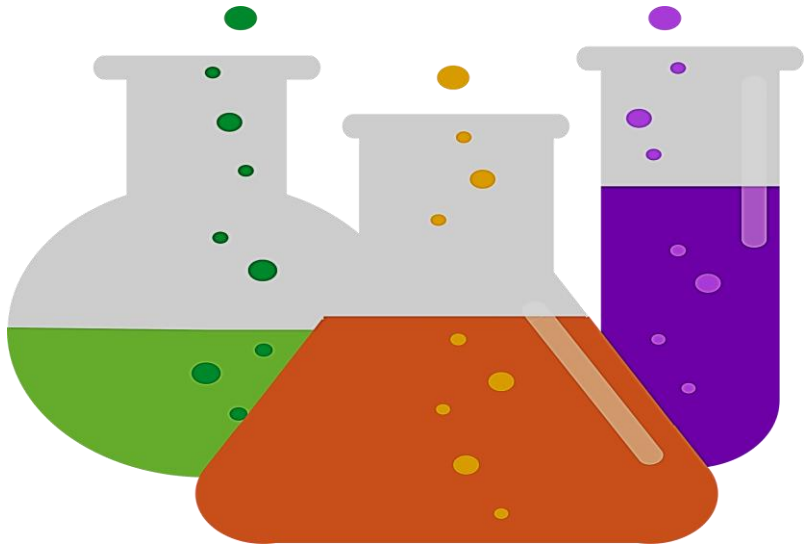
بواسطة بكتيريا PGPR بطريقة آمنة وصديقة بيئيًا واختبار فَّعاليتها في الحَدّ مِنْ الإصابة بمَرَّض الذُبول الفيوزارمي

تقويم كفاءة الزراعة البينيَّة لنباتات الثوم مع الطماطة وافرازات جذورها في السيطرة على مُسبب مَرَّض الذُبول الفيوزارمي

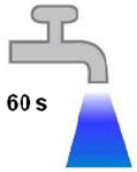
دراسة التَّشْرِيح المَرَضِيّ

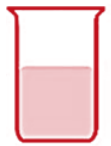
للمقاطع النَّسِيجِيّة لجذور وسيقان نبات الطماطة المصابة بمَرَّض الذُبول الفيوزارمي

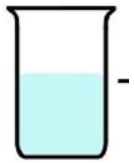
منهجية البحث
&
النتائج والمناقشة

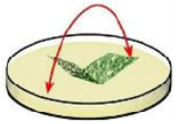


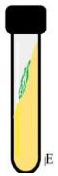
العزل والتشخيص المظهري للفِطْر المُمْرض









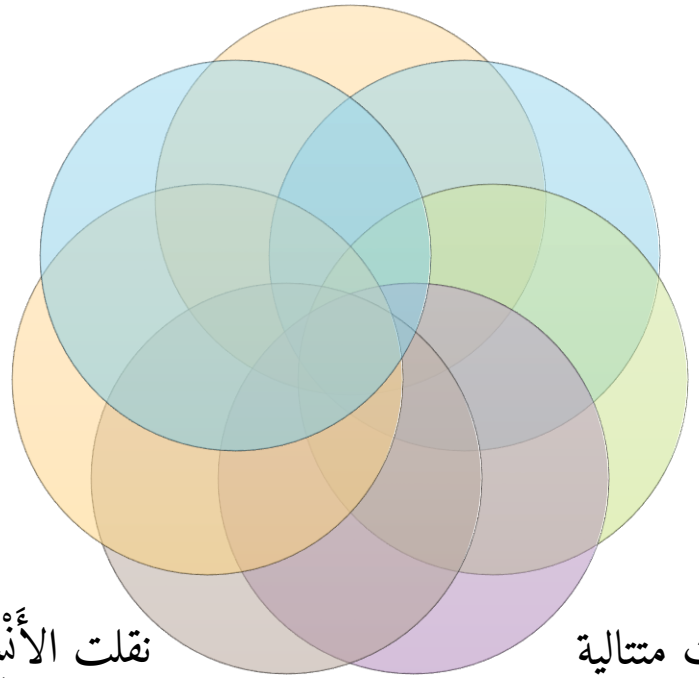


جمع عينات مِنْ نباتات
طماطة مصابة

غسلت الجذور والسيقان
بماء الصنبور الجاري
وقطعت بحجم ٥ - ١٠
mm

شخصت مظهريا

اعتمادًا على المفاتيح
التصنيفية بواسطة Leslie و
Summerell (2006).



عقم سطح الأَنْسِجَة
باستخدام كحول إيثانول
٧٠٪ لمدة دقيقة واحدة

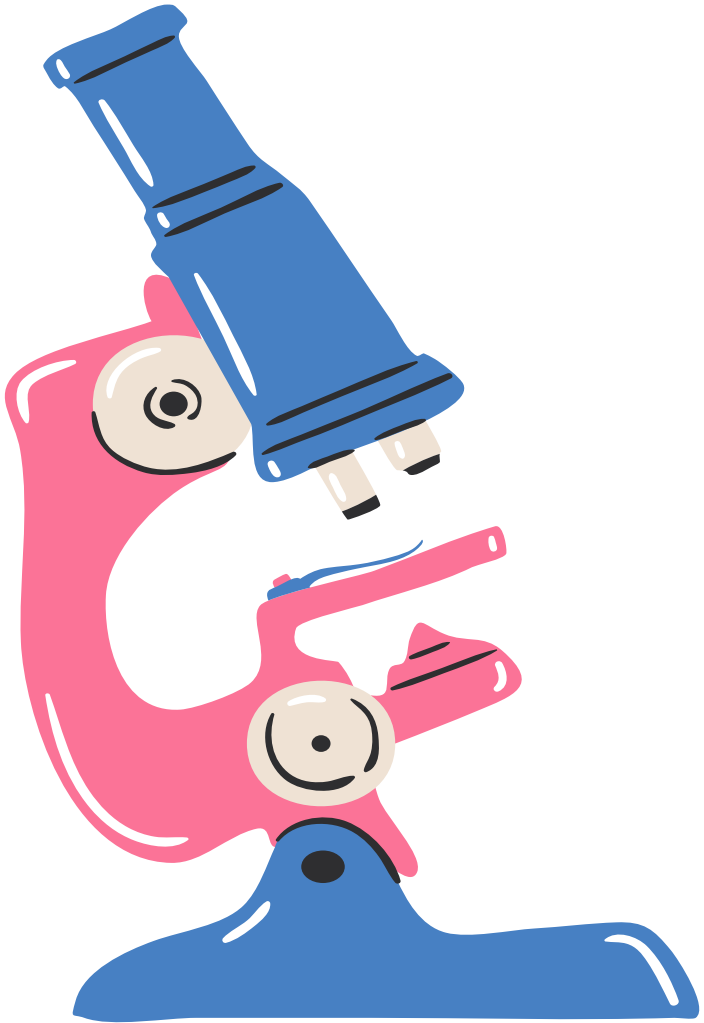
نقلت الخيوط الفِطْرية النامية إلى وسط
PDAجديد. وحفظت العزْلَات فِي
انابيب مائلة عند ٤ مْ

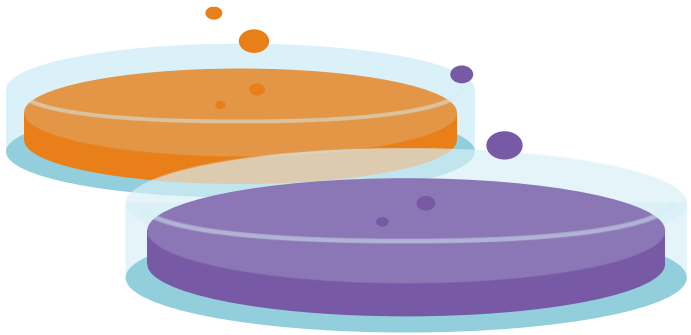
وغسلت ثلاث مرات متتالية
بالماء المقطر المعقم وجففت
باستخدام Whatman
No.1٠

نقلت الأَنْسِجَة الى أطباق بتري تحوي
PDA وحضنت عند ٢٥ ± ٢ مº لمدة
ستة أَيَّام مع إجراء فحوصات دورية لظهور
النمو

نتيجة العزل والتشخيص المظهري للفِطْر المُمْرض

تم الحصول على ٢١ عزلة ٢٠ عزلة منها تعود للفِطْر الممرض Fol،
يمتلك تنوعًا مِنْ حيث الصفات المزرعية والمظهرية
ذو مظهر قطني ناعم أو جيلاتيني وتباين لونه مِنْ الأبيض إلى الوردي
مع عزلات ذات صبغة أرجوانية فِي كثير مِنْ الأحيان أو برتقالية قليلاً على وسط PDA
وانتجت العزلات نوعين مِنْ الابواغ هي Macroconidia و Microconidia.





ولأول مرة يتم تمييز عزلة جديدة لفطر ممرض يصيب نبات الطماطة في العراق تعود للفطر الممرض

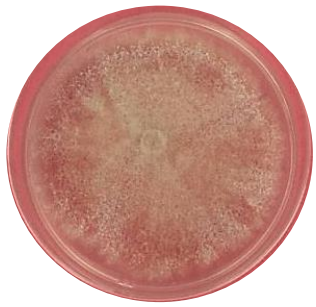
Fusarium falciforme

الغزل الفطري ذو لون ابيض إلى كريمي على الوسط الغذائي PDA

شاكر الدليمي

SH-4

SH-3



SH-2

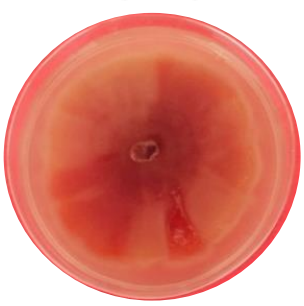
SH-1

SH-8

SH-7

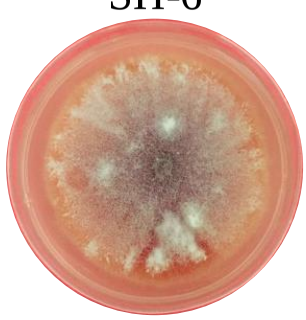
SH-6

SH-5



SH-12

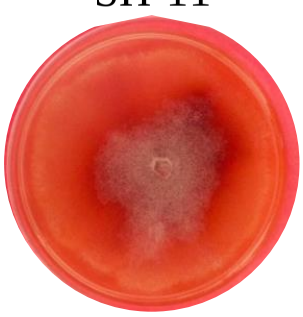
SH-11



SH-10

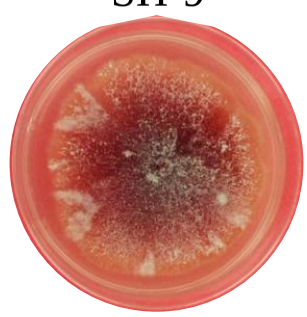
SH-9

SH-16



SH-15

SH-14



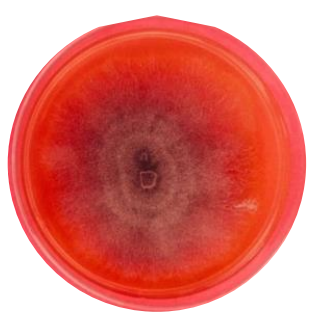
SH-13

SH-19

SH-18

SH-17

SH-21



SH-20

اختبار إمراضية الفِطْر المُمْرض

وحسبت اعداد الابواغ بواسطة hemocytometer وخفف المعلق المرشح بالماء المقطر المعقم وصولاً الى التركيز ٢×١٠٦ $spore.ml^{-1}$.

ثم تمت تصفية المعلق غير المتجانس باستخدام قطعة قماش (الشاش) لإزالة الحصيرة الفِطْرية

تعليق أطباق بتري والتي تحتوي على المزرعة بالماء المقطر المعقم.

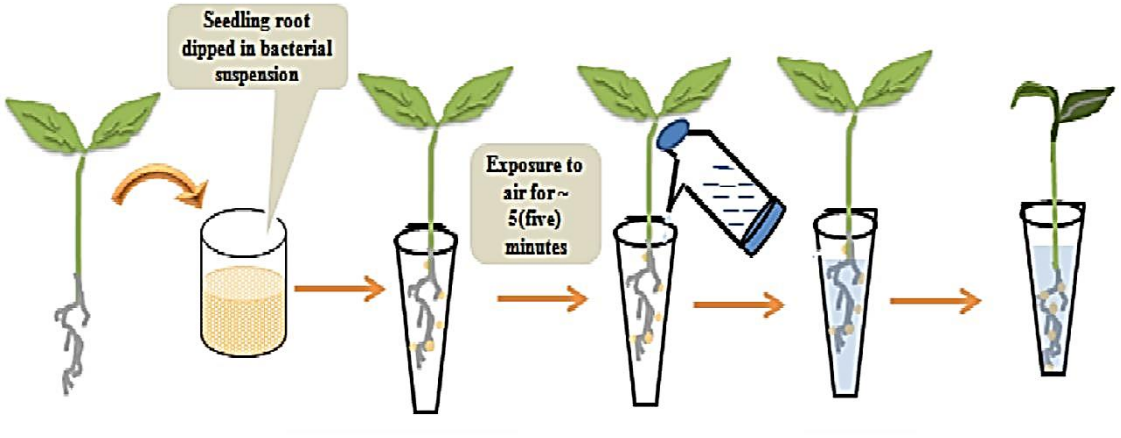
جمع الابواغ برفق باستخدام مفرشة زجاجية

اخذت شتلات طماطة سليمة عمرها ثلاثين يومًا وغسلها برفق تحت ماء الصنبور الجاري

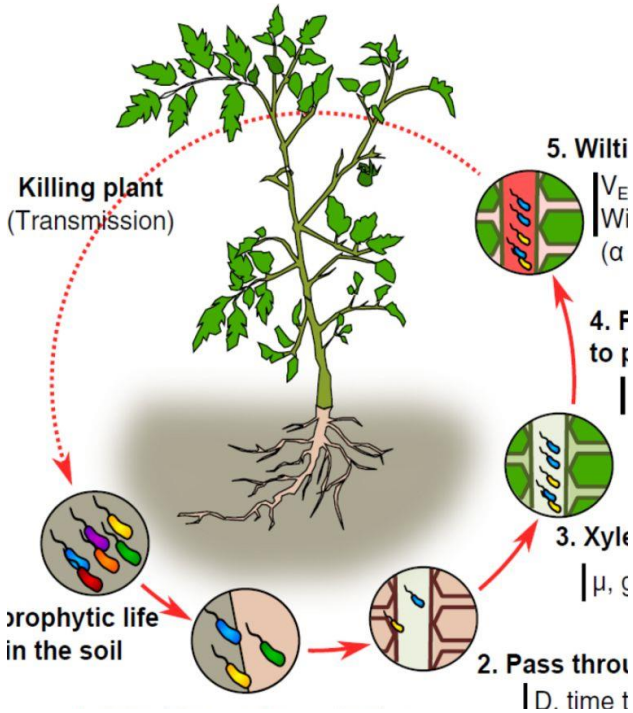
تم قص الجزء العلوي مِنْ الجذر وغمس الجذر فِي المعلق البوغي (٢×١٠^{٦} spore،ml^{-1}) لمدة ٣٠ دقيقة

ونقلت الشتلاتَ للزراعة فِي اصص (قطرها ١٩ سم) معقمة تحتوي على تربة ورمل مخلوط بنسبة ١:٢ (معقمة لمرتين متتالية).

زرعت ٤ شتلات لكل وعاء وتمت متابعتها



تقويم شِدّة مَرَّض الذُبول الفيوزارمي بَعَد ٣٠ يومًا مِنْ التلقيح
وفقًا لما ذكره Fujikawa واخرون (٢٠٢١) حسب المقياس التالي مع بعض التعديل:



٠ : النبات سليم.

١ : اكثر مِنْ ٠ - ٢٥ ٪ مِنْ الأوراق صفراء أو ذابلة.

٢ : اكثر مِنْ ٢٦ -٥٠ ٪ مِنْ الأوراق صفراء أو ذابلة.

٣ : اكثر مِنْ ٥١ -٧٥ ٪ مِنْ الأوراق صفراء أو ذابلة.

٤ : اكثر مِنْ ٧٦ -١٠٠ ٪ مِنْ الأوراق صفراء أو ذابلة.

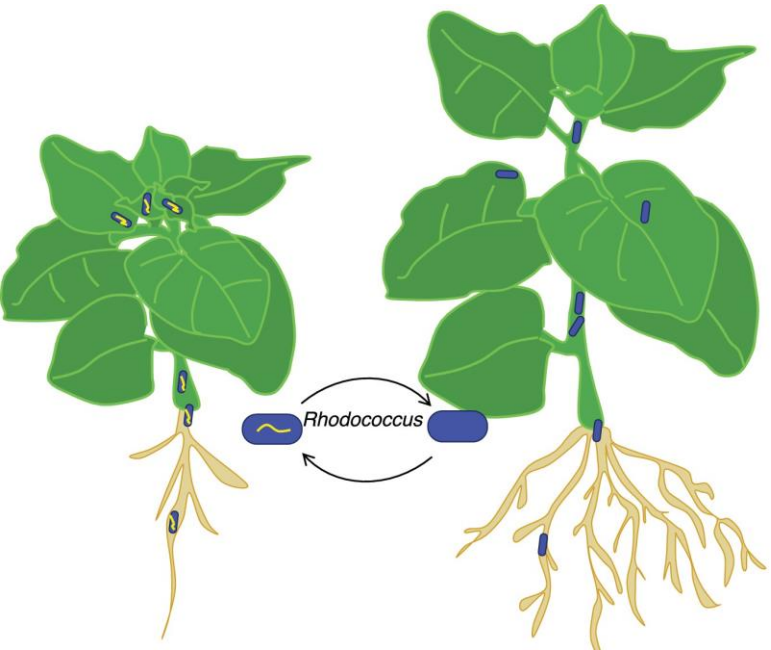
٥ : جفاف النبات وموته.

تم حساب مؤشر المرض Disease index (DI) وفقًا للصيغة التالية: DI = [مجموع (درجة التقويم × عدد النباتات المُصنّفة)/ (العدد الإجمالي للنباتات × ٥)] × ١٠٠

★★★★

وبناءً على شدة المرض، صُنفت ضراوة كل عزلة على أنها

- عالية الضراوة (>٥٠%).
- متوسطة الضراوة virulent (٢٥-50٪)
- منخفضة الضراوة virulent (<٢٥%)



★★★★

وتم اختيار العزلة التي اظهرت اقوى إمراضية على نبات الطماطة

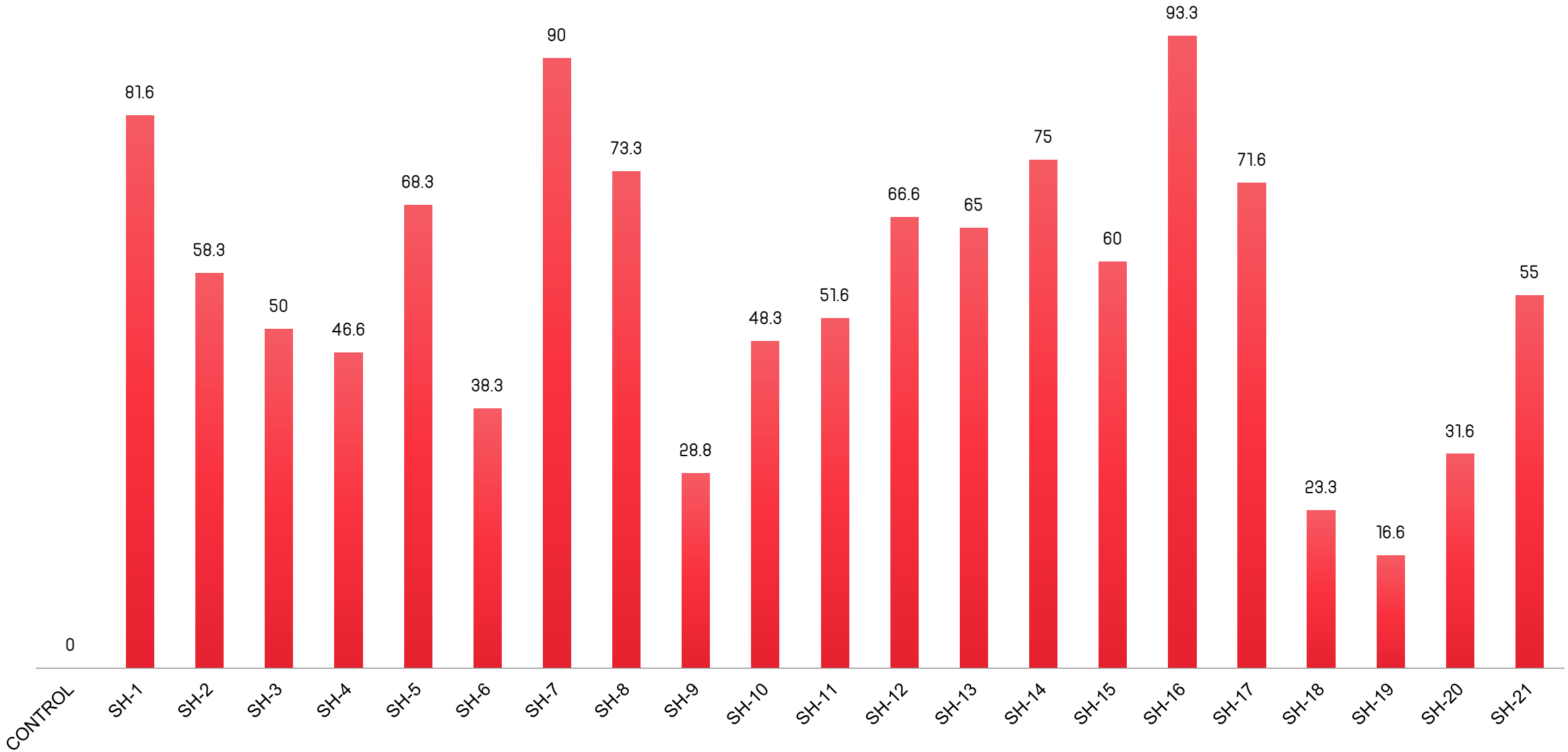
لوحظت أعراض مَرَّض الذُبول الفيوزارمي فِي جميع عزلات Fol بَعَد ١٥- ٢٠ يومًا، لكن بَعَد ٣٠ يومًا ظهرت الاعراض النموذجية للمرض

أعراض مختلفة مثل اصفرار الأوراق السفلية متبوعًا بتدلي الأوراق فِي النباتات الملقحة بالمُسبب المَرَضِيّ. وفي الحالات الشديدة لوحظ وتلون بني لحزم الأوعية عِنْدَ قطع السيقان طوليًا يليه ذُبول وموت الشتلات

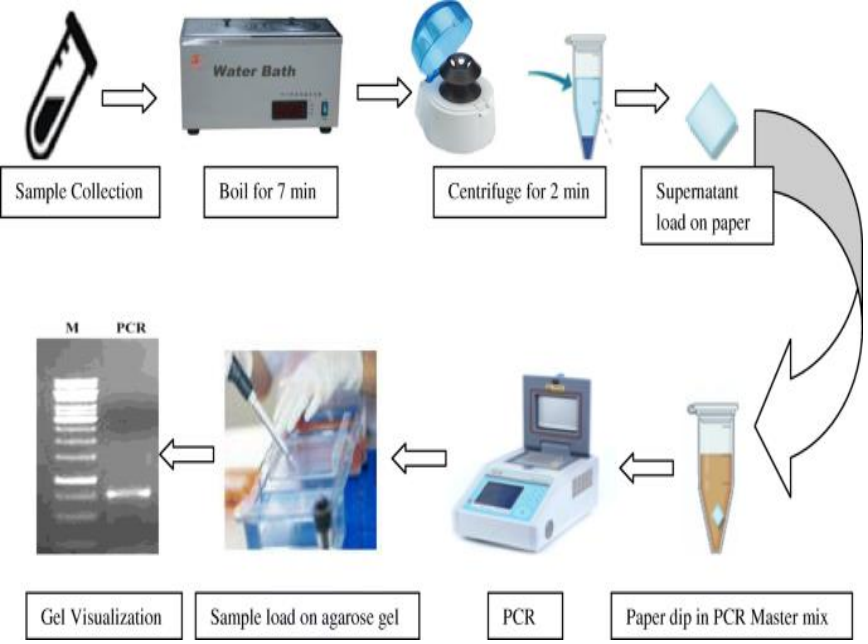
وتم إثبات فرضية كوخ، إذ أمكن إعادة عَزَلَها مِنْ الأَنْسِجَة المصابة

احدى عزلات الفِطْر الممرض SH-16 ذ بلغ مؤشر المرض عندها ٩٣,٣ %.

العزلة SH-7 بلغ مؤشر المرض فيها ٩٠% وكانت اعراض المميزة لها هي الذبول، اسوداد الأنسجة الوعائية وجفاف وموت الاوراق وقد يموت النبات بأكمله، مع ملاحظة ظهور تعفن في منطقة التاج والجذور.



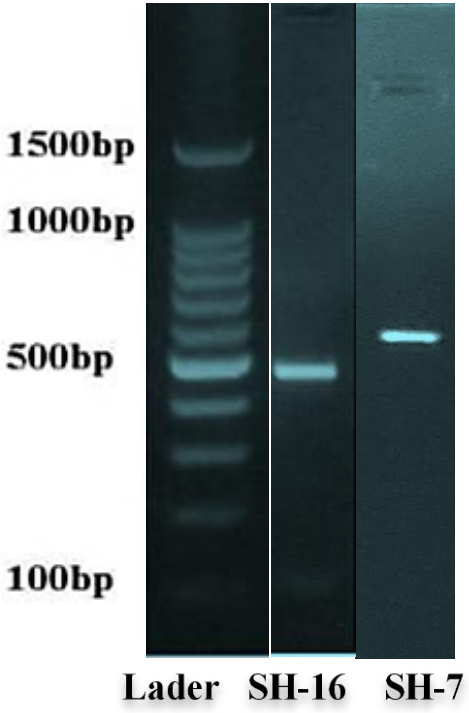
الشكل. المؤشر مرض الذبول الفيوزارمي على نبات الطماطة



التشخيص الجزيئي

- استخلاص الحامض النووي DNA
- تضخيم منطقة ITS
- الترحيل الكهربائي
- تحليل تتابع منطقة ITS

الترحيل الكهربائي



إذ أدى تضخيم منطقة rDNA

لعزلتين SH-16 و SH-7 إلى

إنتاج amplicon ذات وزن جزيئي

490 bp و 544 bp

اظهر الترحيل الكهربائي للتتابع

النيوكليوتيدي على هلام الأكاروز

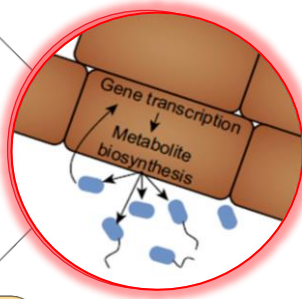
وجود حزمة واحدة للعزلتين

تحليل تتابع منطقة ITS

وتمت مقارنة هذه التتابعات باستخدام nucleotide BLAST في GenBank.

ت	العزلة	نسبة التطابق	bp	رقم الانضمام
١	*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*	%99.38	490	OQ244516
٢	*Fusarium falciforme*	%99.61	544	OP297938

عزل وتنقية البكتيريا الجذرية المحفزة لنمو النبات

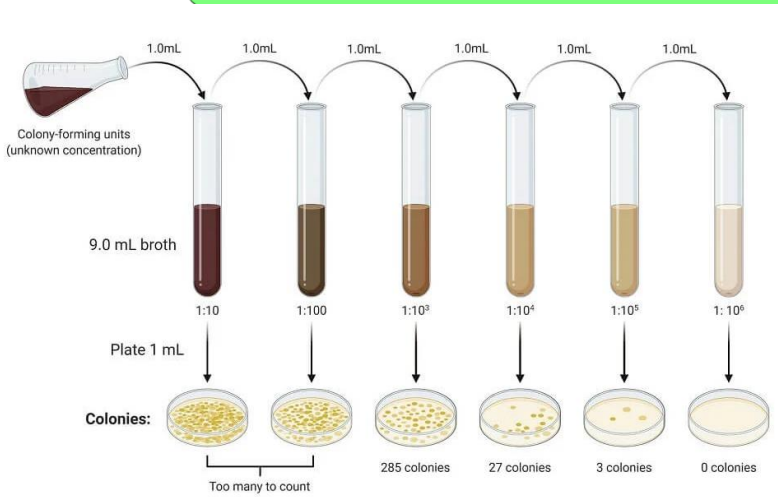


جُمِعَتْ عينات التربة مِنْ عدة مواقع مختلفة فِي بغداد والانبار لعزل بكتيريا PGPR لنباتات الطماطة السليمة

تم نقل العينات إلى المختبر وحفظت فِي الثلاجة عند ٤ م° حتى بدء التحليل.

واجريت سلسلة تخافيف مِنْ تربة Rhizosphere مِنْ 1×10^{-1} إلى 1×10^{-8}،

وتم نشر ١٠٠ µl مِنْ التخفيفين الاخيرة على وسط NA



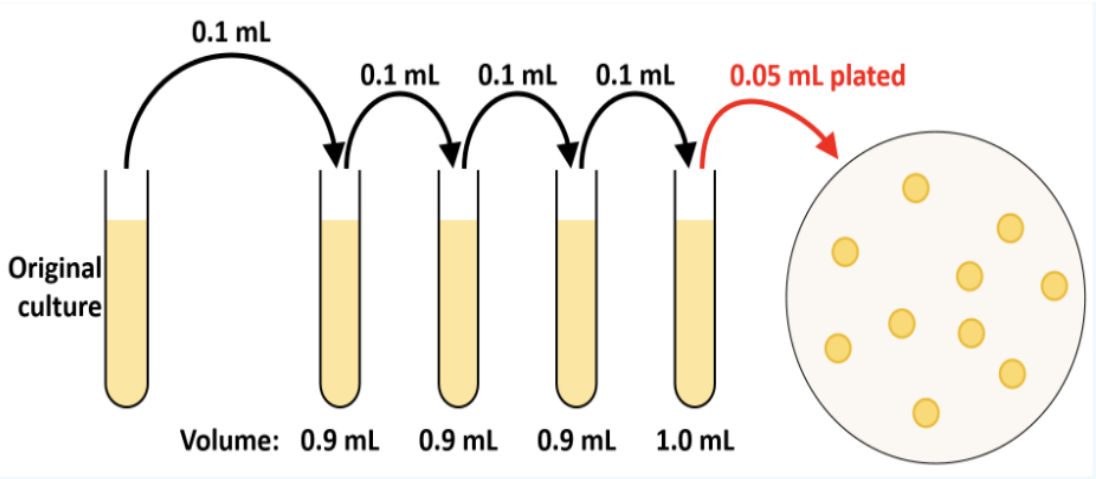
واجري تنقية للْمُسْتَعْمرات،

وحضنت الأطباق فِي درجة حرارة 28±2 م° ولمدة ي

وتم نقل العزلَات النقية فِي انابيب مائلة (Slant)

الفَّعالية التَضادّية لعزْلَات PGPR ضِدّ الفِطْر المُمْرض

تم تنمية وتنشيط البكتيريا لمدة ٢٤ ساعة على الوسط الغذائي NB تحت درجة حرارة ٢٨ ± ٢ م°، واجريت سلسلة تخافيف لحد ١٠^-٨، أخذ ١ ml مِنْ التخفيف الاخير وصب على الوسط الغذائي NA وبثلاثة مكررات، حضنت الأطباق الملقحة تحت درجة حرارة ٢٨±٢ م° لمدة يوم واحد (٢٤ ساعة)، وتم حساب الكثافة العددية لكل ml بِإتِّبَاع طريقة العد المباشر حسب المعادلة الاتية:



عدد الْمُسْتَعْمرات = عدد الْمُسْتَعْمرات فِي الطبق × مقلوب التخفيف

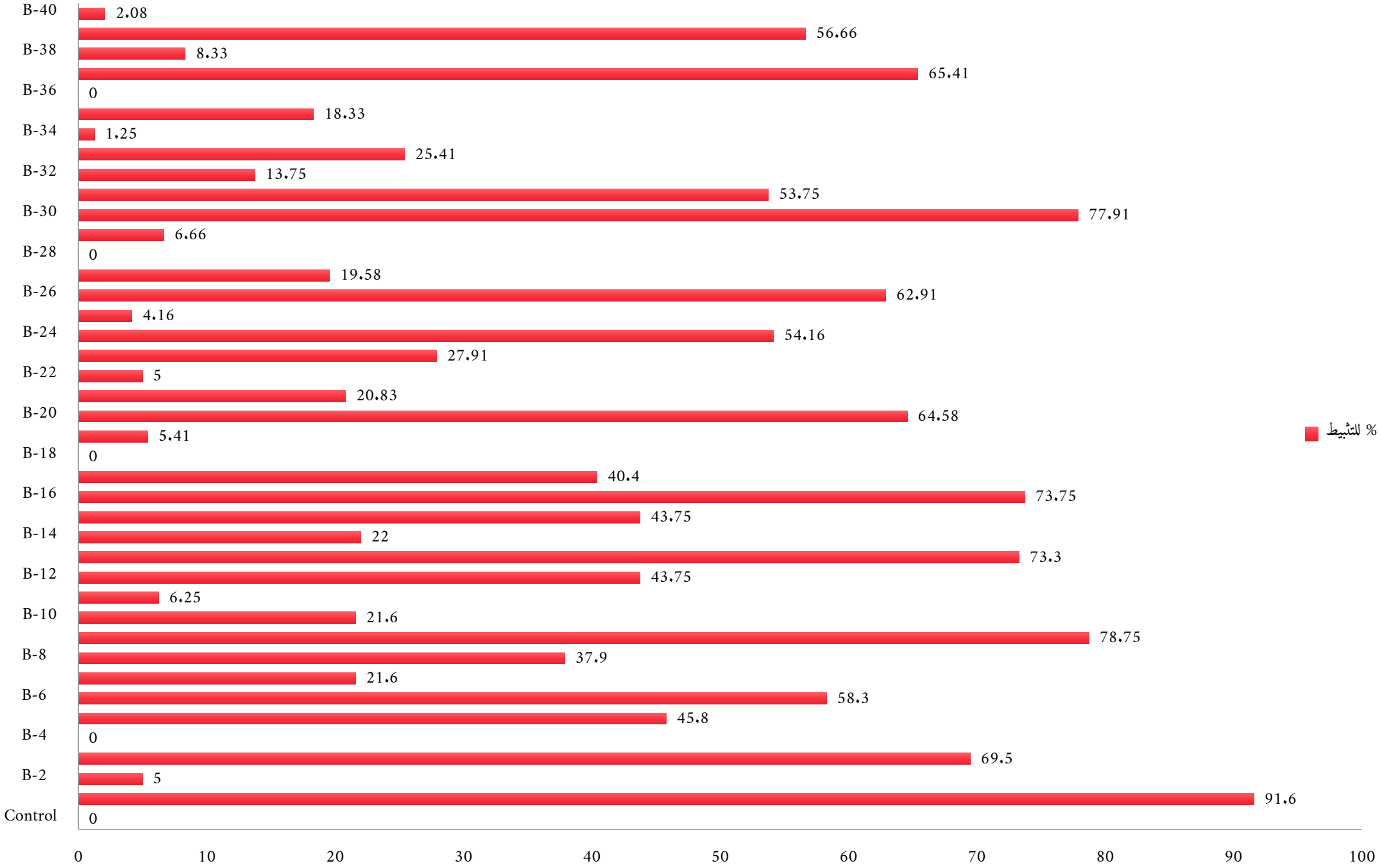
- ونتيجة لِذُلّك تكون الكثافة العددية للعزلة البكتيرية: 40×10^{8} $CFU.ml^{-1}$

وبَعدَّهَا اخذ ١٠٠ µL مِنْ المزرعة البكتيرية النامية لمدة يوم مع ١٠^٨ CFU.ml^-1 ونشرت بشكل متجانس على الوسط غذائي PDA

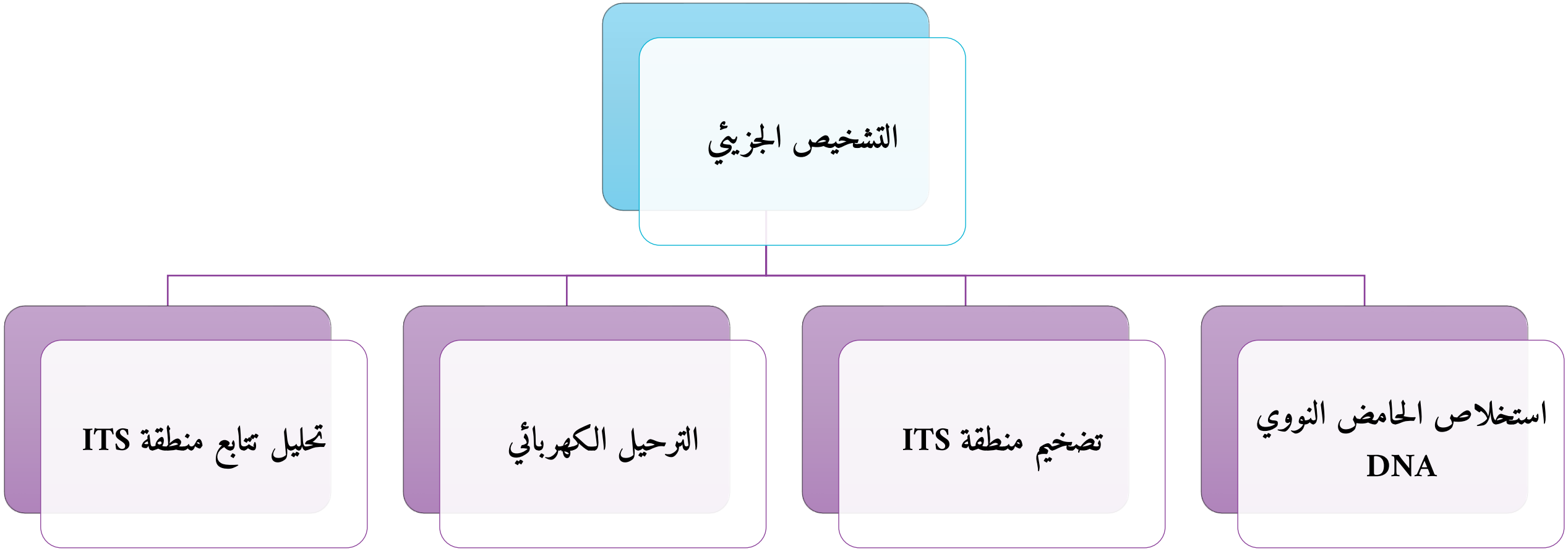
واخذ قرص بقطر ٠,٥ cm بعمر ٦ أَيَّام مِنْ مزرعة الفِطْر المُمْرض ووضع فِي منتصف الطبق وحضنت الاطباق بدرجة حرارة ٢٨ مº لمدة ٦ أَيَّام، وأجريت العملية بثلاثة مكررات، وحسبت النسبة المئوية للتَّثْبِيط بواسطة مقارنة النمو الخيطي للفِطْر المُمْرض مع النمو الخيطي فِي اطباق معاملة السيطرة وفق المعادلة الاتية:

$$\% \text{ للتَّثْبِيط} = \frac{T-C}{C} \times 100$$

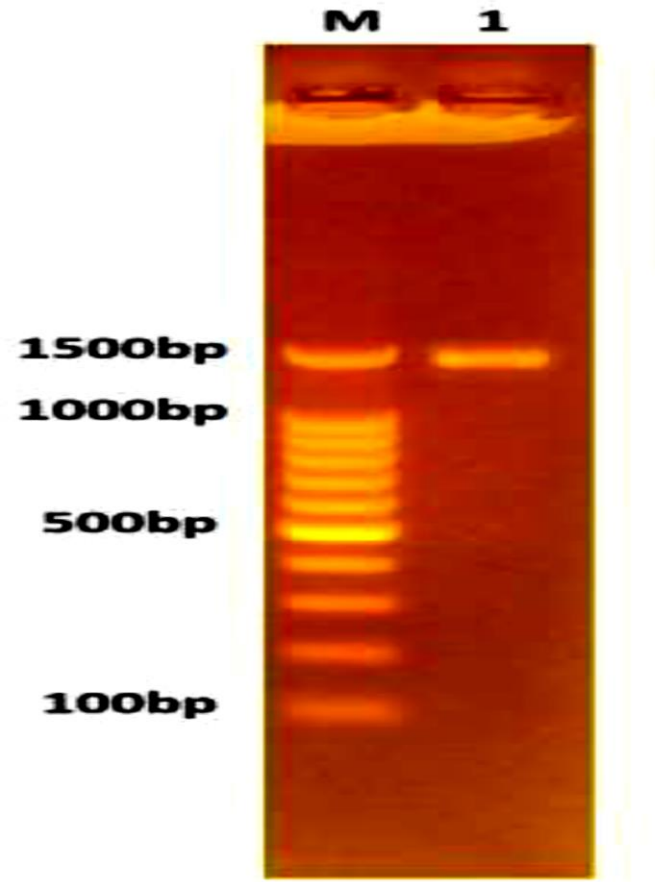
- ووفقاً لهذه النتائج انتخبت عزلة بكتيرية واحدة اظهرت مقدرة تَضادّية عالية على تَثْبِيط الفِطْر المُمْرض لإجراء التجارب اللاحقة.


B-40
2.08
56.66
B-38
8.33
65.41
B-36
0
18.33
B-34
1.25
25.41
B-32
13.75
53.75
B-30
77.91
6.66
B-28
0
19.58
B-26
62.91
4.16
B-24
54.16
27.91
B-22
5
20.83
B-20
64.58
5.41
B-18
0
40.4
B-16
73.75
43.75
B-14
22
73.3
B-12
43.75
6.25
B-10
21.6
78.75
B-8
37.9
21.6
B-6
58.3
45.8
B-4
0
69.5
B-2
5
91.6
Control
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
% للتثبيط

التشخيص الجزيئي لعزلة PGPR



الترحيل الكهربائي



تم تأكيد المنتجات المضخمة بَعَد ترحيلها كهربائيًا على هلام الاكاروز ١% وجود جين 16S RNA للعزلة البكتيرية وكان حجم amplicon ١٠٤٩ bp

تحليل تتابع منطقة 16S rRNA

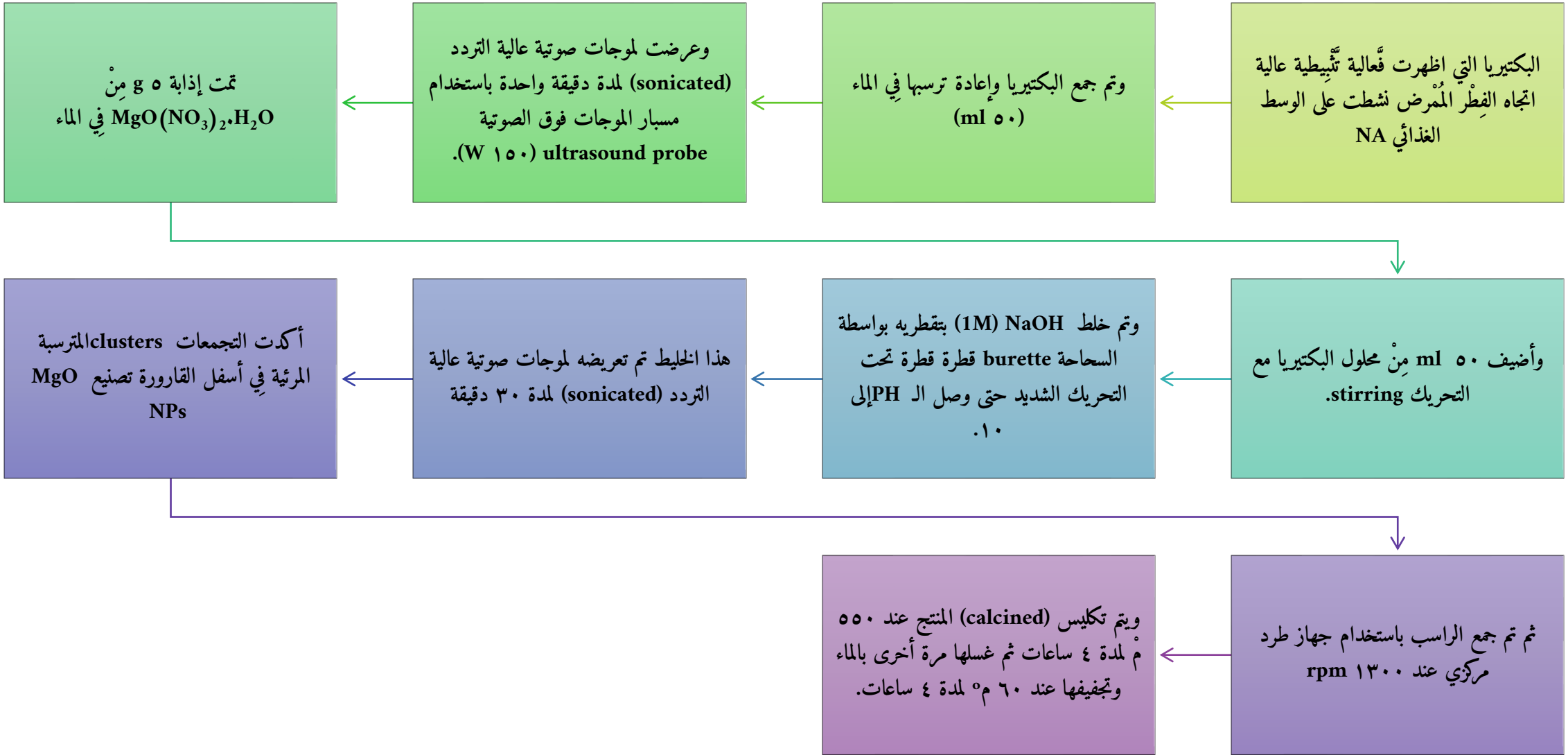
أُرسلت عينة ناتج PCR إلى شركة Macrogenالكورية للحصول على تتابع القواعد الناتروجينية،

تمت مقارنة هذه التتابعات من منطقة جين 16S rRNA مع تتابعات العزلات البكتيرية العالمية المتوفرة في NCBI

اظهرت نتيجة تحليل التتابع العزلة B-1 لها نسبة تطابق بنسبة ٩٩,٩% مع *Bacillus licheniformis*.

وتم إيداع التسلسل فِي GeneBank تحت رقم الانضمام OQ195265.

التصنيع الحيوي الاخضر للـ MgO NPs وتوصيفها



واجريت عدة تحاليل لتوصيف هذه الجُسَيمات

التحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-Vis

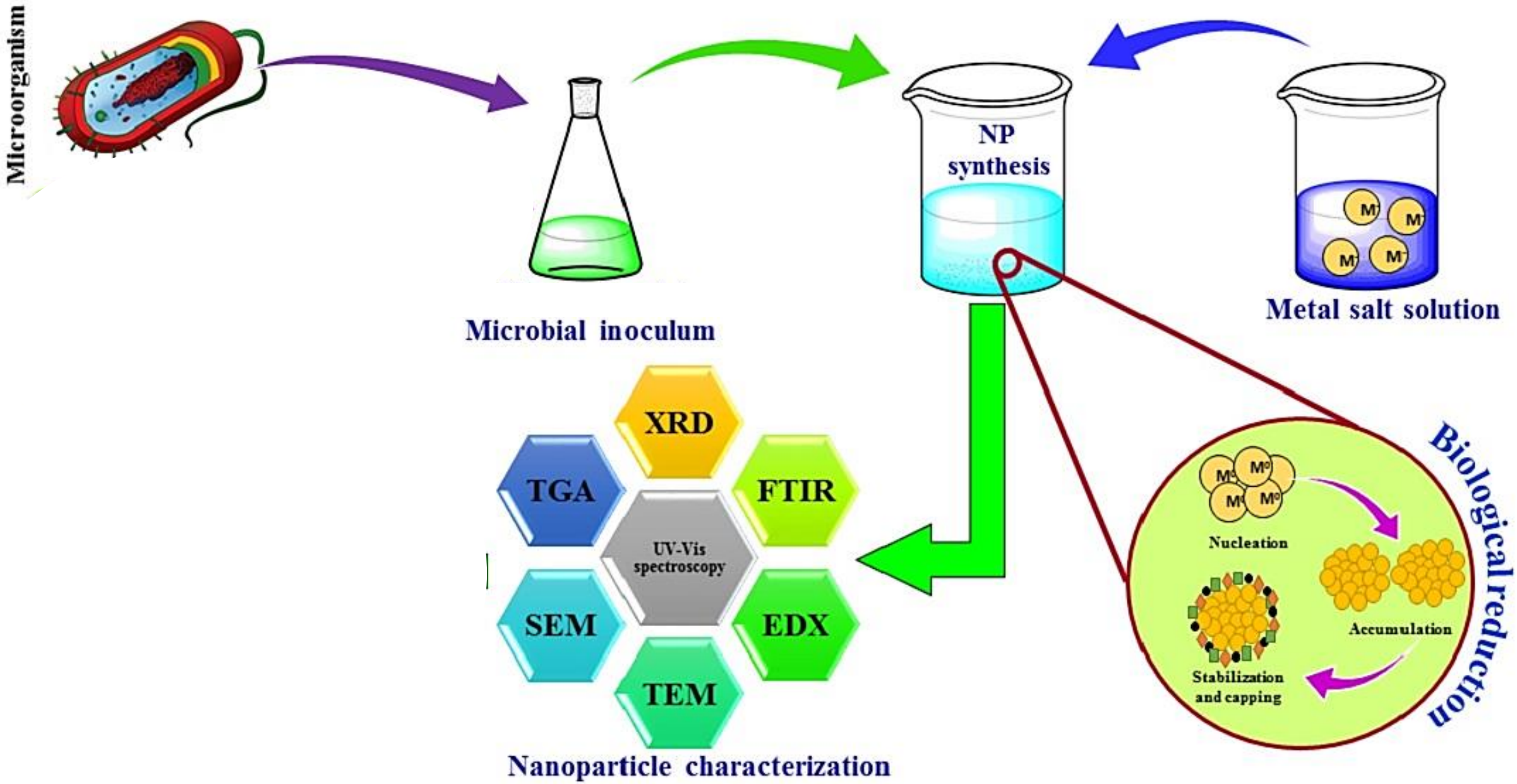
التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء الفلورية FTIR

تحليل حيود الأشعة السينية XRD

المجهري الألكتروني الماسح SEM

المجهر الألكتروني النافذ TEM.

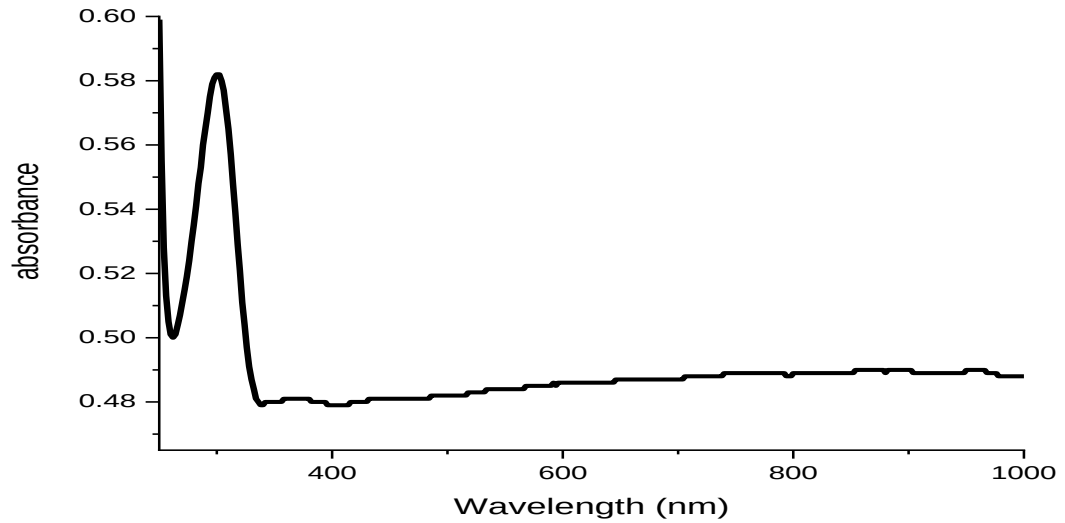
الفحص بواسطة مجهر القوة الذرية AFM


Microorganism
Microbial inoculum
NP synthesis
Metal salt solution
XRD
TGA
FTIR
UV-Vis spectroscopy
SEM
EDX
TEM
Nanoparticle characterization
Nucleation
Accumulation
Stabilization and capping
Biological reduction

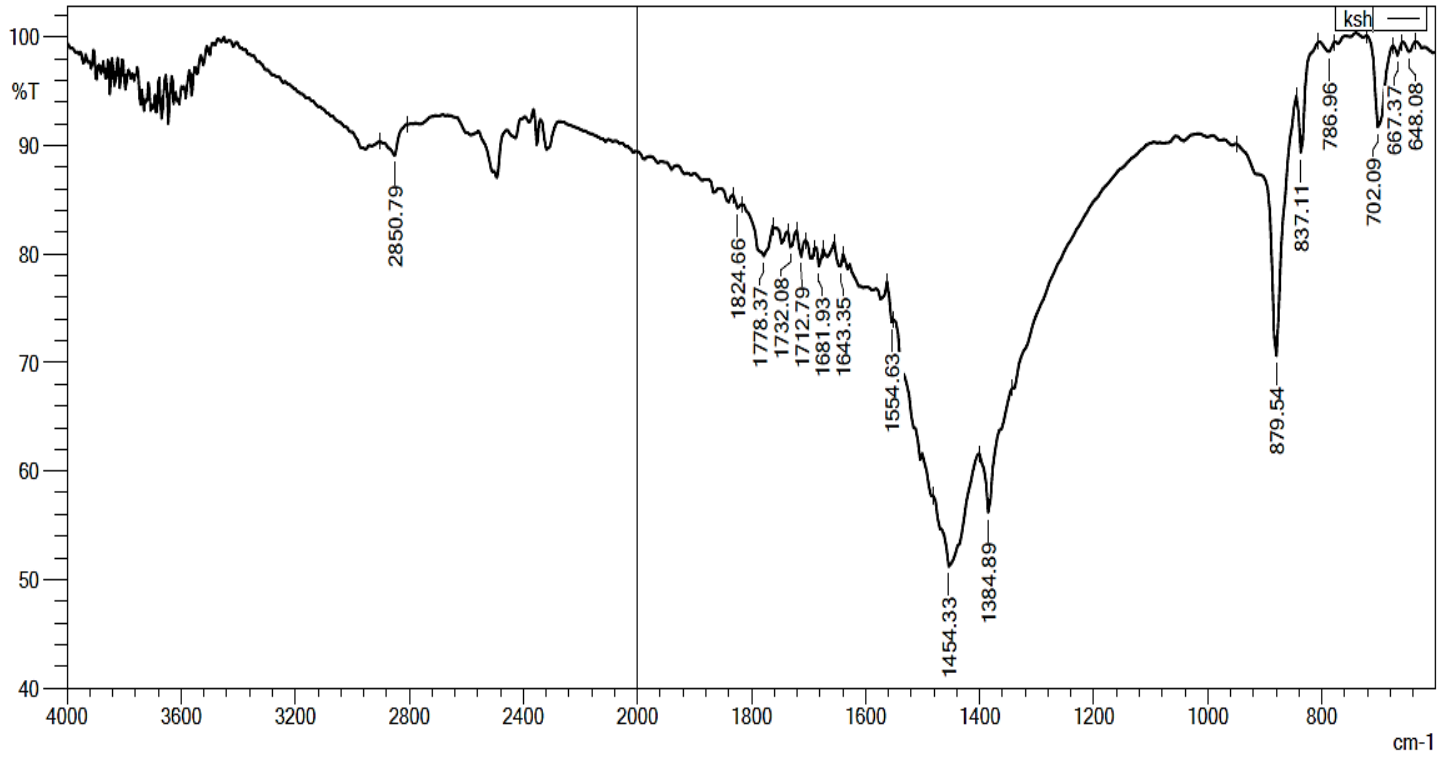
التحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية والمرئية (UV-Vis)

تشير التغيرات اللونية إلى التكوين الفعال لـ MgO NPs

لوحظ ذروة للطول الموجي لـ MgO NPsبدرجة حرارة الغرفة عِنْدَ ٣٠٢ nmمع أقصى امتصاص هو ٠,٥٨



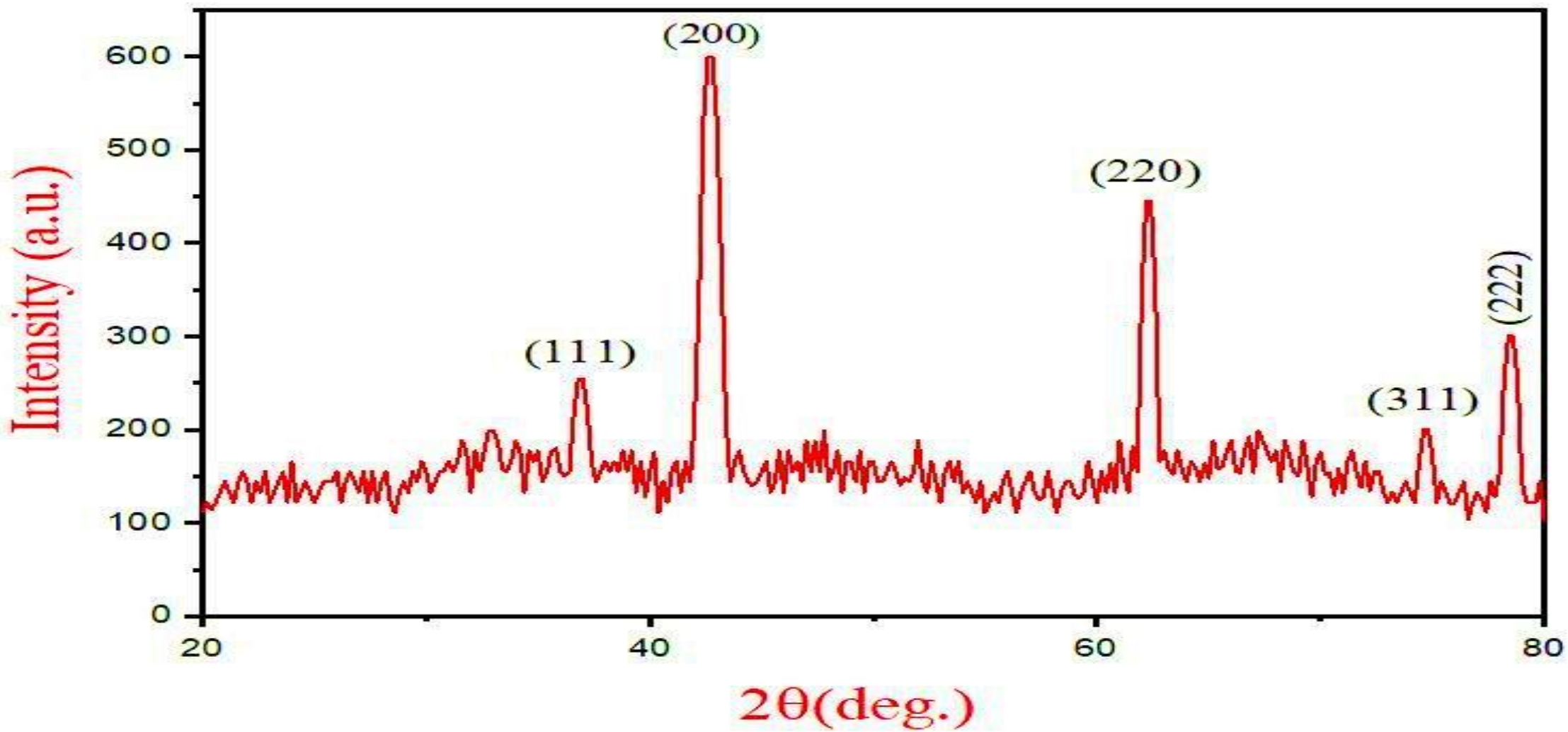
التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء الفلورية FTIR



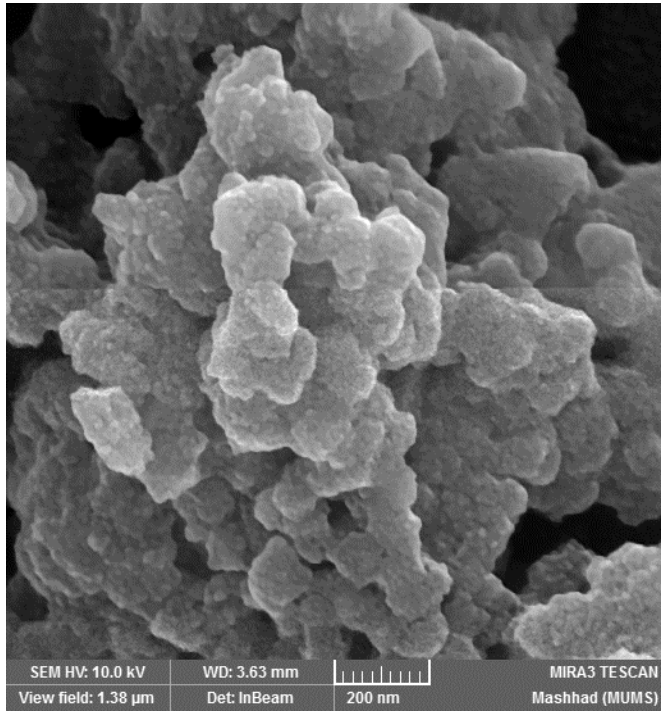
إذ تم تسجيل قمم امتصاص عديدة وتحديد المجموعات الوظيفية المسؤولة عن اختزال وتغطية MgO NPs

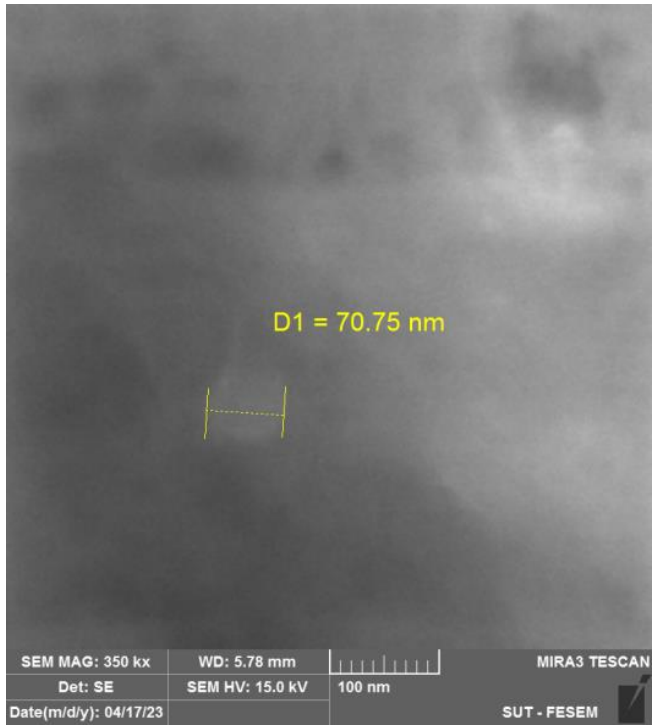
تم استخدام FTIR للتحقيق في الكيمياء السطحية أو لتحديد المجموعات الوظيفية functional groups الموجودة مع MgO NPs

تحليل حيود الأشعة السينية XRD



تحليل SEM





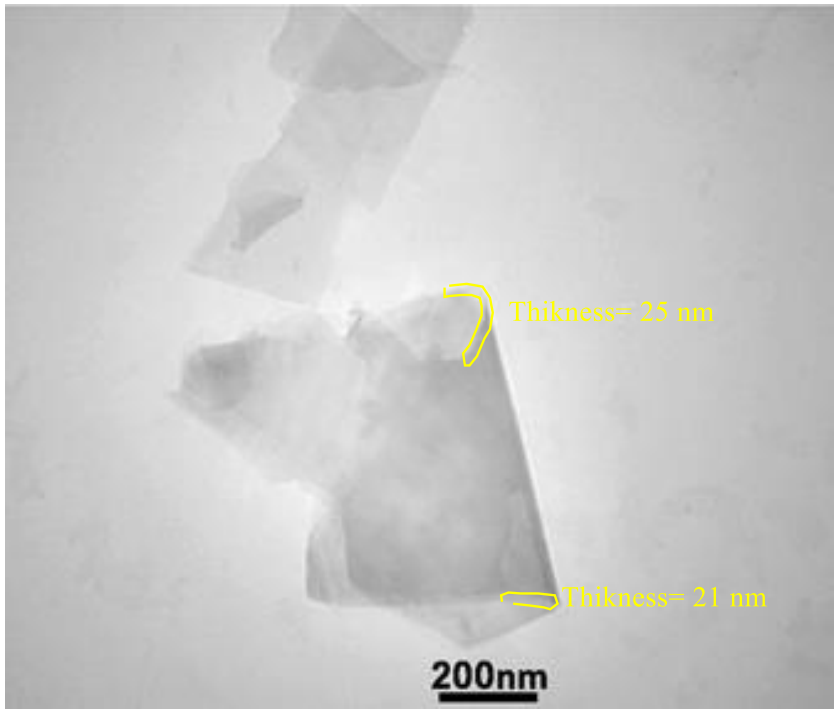
الشكل المظهري لجسيمات MgO NPs

تمتلك أشكالًا كروية spherical في البنية

مع تفاعل متكتل

ويبلغ متوسط حجم الجسيمات النانوية 70 nm.

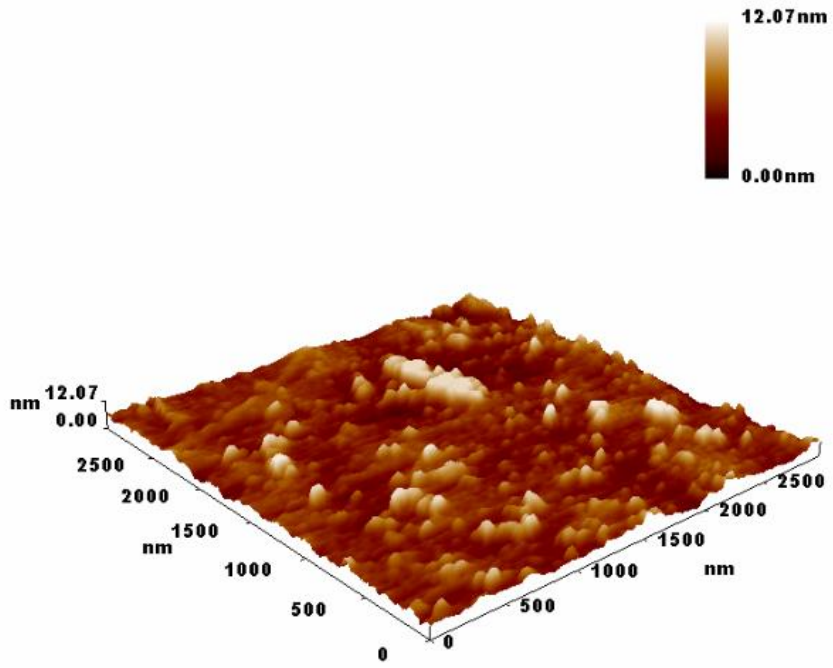
تحليل TEM



إذ تم تحليل العينة المعدة باستعمال المجهر TEM مِنْ أجل تحديد حجم الجُسَيمات والشكل المتوقع

كانت الملاحظات الهيكلية العامة للجسيمات النانوية MgO **هيكل يشبه الورقة -sheet like** بسمك ٢١ و ٢٥ nm.

تحليل مجهر القوة الذرية AFM



استعمال المجهر AFM فِي قياس حجوم الجُسَيمات النانوية MgO NPs المُصنّعة بَعَد ٥ أشهر

ويبين الشكل صورة ثلاثية الأبْعاد للجسيمات، وأن ارتفاع تجمعات الجُسَيمات كان بحدود ١٢ nm،

ويبين الجدول أن معدل أقطار جُسَيمات MgO NPs بلغ 53.83 nm،

Avg. Diameter:53.83 nm <=10% Diameter:15.00 nm
<=50% Diameter:45.00 nm <=90% Diameter:95.00 nm

Diameter(nm) <	Volume(%)	Cumulation(%)	Diameter(nm) <	Volume(%)	Cumulation(%)	Diameter(nm) <	Volume(%)	Cumulation(%)
10.00	0.72	0.72	85.00	2.87	84.31	160.00	0.23	98.94
15.00	4.94	5.66	90.00	2.00	86.31	165.00	0.11	99.06
20.00	6.41	12.07	95.00	2.19	88.49	170.00	0.19	99.25
25.00	8.07	20.14	100.00	1.85	90.34	175.00	0.08	99.32
30.00	7.32	27.46	105.00	1.36	91.70	180.00	0.15	99.47
35.00	7.73	35.19	110.00	1.06	92.76	185.00	0.11	99.59
40.00	5.96	41.15	115.00	1.24	94.00	190.00	0.04	99.62
45.00	7.88	49.04	120.00	1.02	95.02	195.00	0.04	99.66
50.00	6.53	55.56	125.00	0.83	95.85	200.00	0.08	99.74
55.00	5.02	60.58	130.00	0.64	96.49	205.00	0.04	99.77
60.00	5.13	65.71	135.00	0.72	97.21	210.00	0.04	99.81
65.00	4.53	70.24	140.00	0.53	97.74	215.00	0.08	99.89
70.00	4.38	74.61	145.00	0.26	98.00	250.00	0.04	99.92
75.00	3.36	77.97	150.00	0.30	98.30	260.00	0.04	99.96
80.00	3.47	81.44	155.00	0.41	98.72	330.00	0.04	100.00

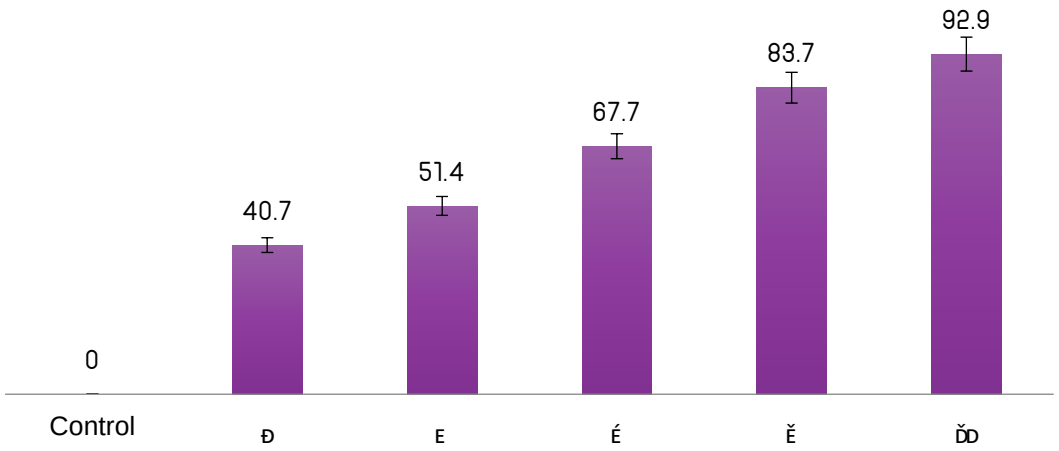
فَّعالية MgO NPs فِي تَّثْبِيط نمو الفِطْر المُمْرض مختبريًا

حضرت خمسة تراكيز مِنْ MgO NPsوهي 2 ، 4 ، 6، 8 و 10 $mg.ml^{-1}$

ولقح مركز الأطباق تحوي PDA لكل تركيز بقرص قطره 0.5 cmأخذ مِنْ حافة مزرعة الفِطْر بعمر 6 أَيَّام بثلاثة مكررات

وتم حساب النسبة المئوية لتَّثْبِيط الفِطْريات على أساس نسبة تَّثْبِيط النمو الشعاعي (IRG) :

$$IRG= \left(\frac{R1-R2}{R1}\right) \times 100$$



الشكل 4-12. النسبة المئوية لتَّثْبِيط النمو الشعاعي للفطر الممرض بواسطة MgO
LSD: 4.7 ، NPs

تأثير افرازات جذور الثوم في نمو الفِطْر المُمْرض مختبريًا

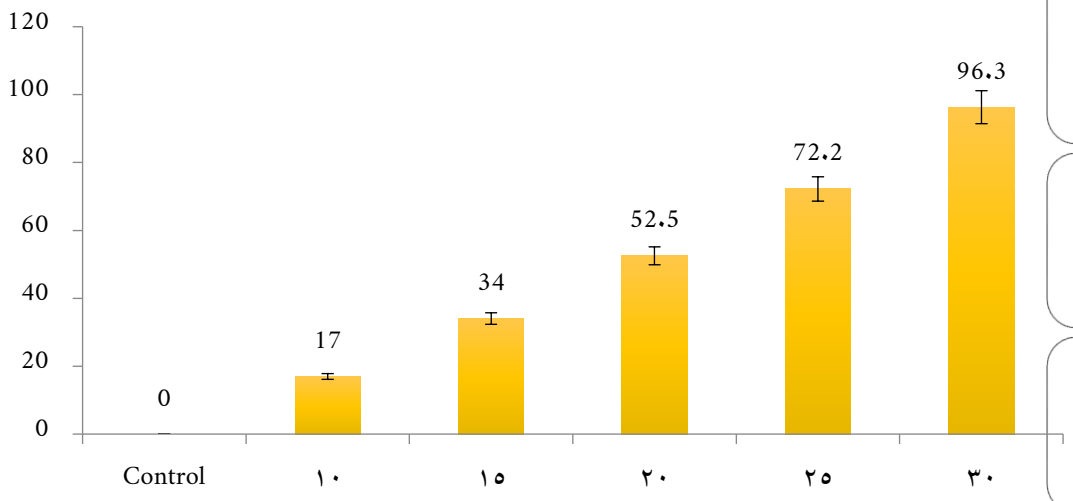
فسقة ثوم عقمت بمحلول معقم (هايبوكلورات الصوديوم) بتركيز ١% لمدة دقيقتين وغسلت بَعَّدهَا

ووضعت على مشبك بلاستيكي معقم بالايثانول ٧٠%. في قنينة معقمة (سعة ٥٠ ml) تحتوي على ماء مقطر معقم اذ إنَّ الماء يلامس الفسقة لضمان انباتها.

بَعَد ٢٥ يومًا مِنْ الانبات طردت الافرازات (بسرعة ٣٠٠٠ rpm) لترسيب الشوائب

ورشح عبر المرشح الدقيق (Millipore ٠,٢٢ µl) تم تخزين افرازات الجذر في -٢٠ مْ حتى الاستخدام.

ثم اختبرت عدة تراكيز لتَّثْبِيط الفِطْر المُمْرض (١٠ ، ١٥ ، ٢٠ ، ٢٥ و ٣٠ $\mu l.ml^{-1}$)

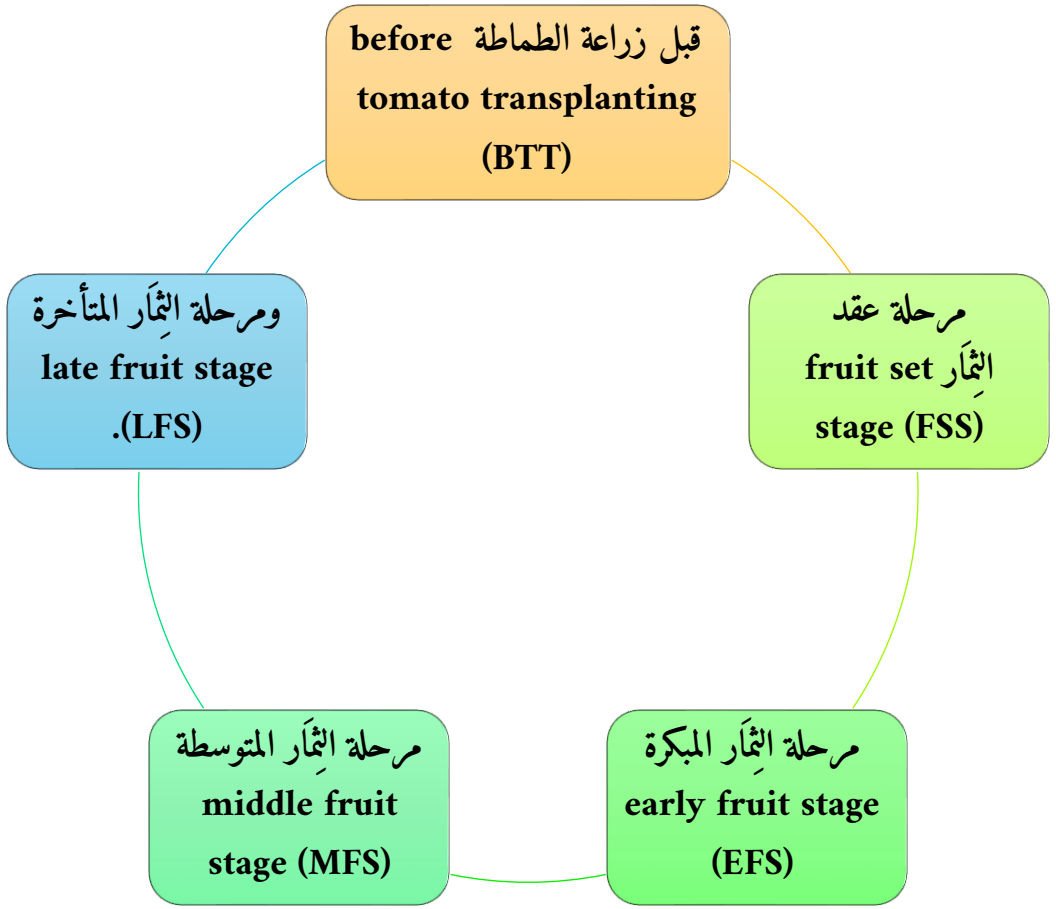


الشكل 4-13. النسبة المئوية لتَّثْبِيط النمو الشعاعي للفطر الممرض بواسطة افرازات جذور الثوم،

LSD: 3.9

تأثير زراعة الثوم في التجمعات البكتيرية فِي وسط الاستزراع

جُمعت عينات مِنْ التربة فِي مراحل نمو مختلفة لمحصول الطماطة على بَعَد ٥ cm مِنْ نبات الطماطة وعمق ١٥ cm:

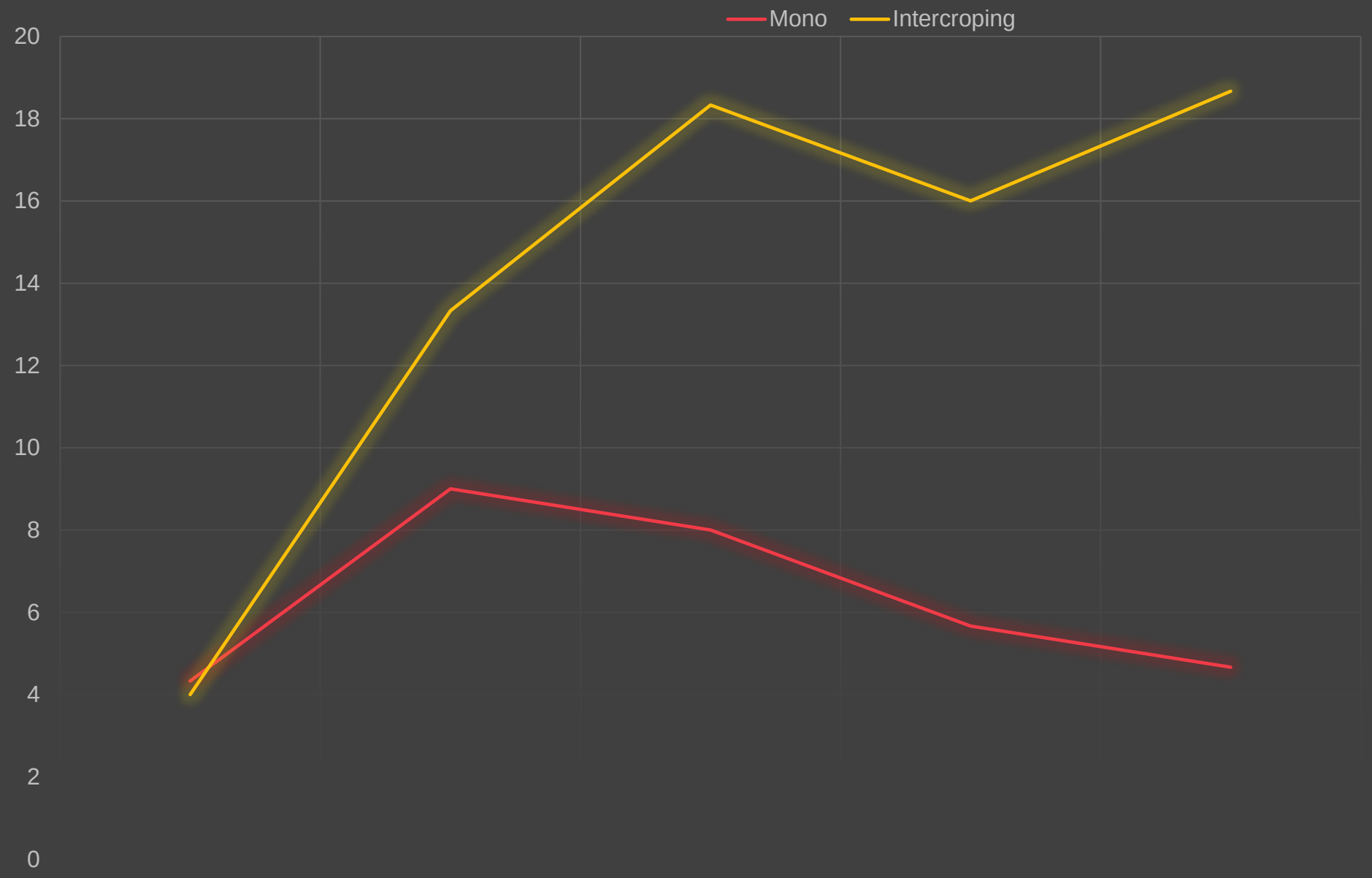


تم خلط العينات لتحليل استكشاف الكَائِنَاتُ الدقيقة المهمة زراعياً Agriculturally Important Microbes (AIMs)،

وتم وزن 5 g مِنْ كُلِّ عينة مركبة ووضعها فِي دورق زجاجي سعة 200 ml مع 45 ml مِنْ الماء المقطر المعقم.

لقحت اطباق حاوية على الوسط الغذائي NA بالتخفيف 10^{-5}.

تم قياس عدد البكتيريا، بحساب وحدات تكوين الْمُسْتَعْمرات CFU



الشكل 4-14. تأثير زراعة الثوم مع الطماطة على اعداد بكتيريا PGPR

L.S.D. Mono= 2.1 ; Intro= 2.2

كَفاءَةُ الزراعة البينيَّة و MgO NPs فِي الحد من المسبب المَرَّضي

تجربة الاصص

عقمت التربة المزيجية لمرتين متتالية ووزعت فِي أصص بلاستيكية قطرها ١٩ سم

زرعت شتلات طماطة بعمر ٣٠ يوماً صنف نيوتن بواقع اربع شتلات لكل أصيص بعد تغطيسها بالمعلق البوغي للفِطْر المُمْرض (بتركيز 2×10^{6} spore.ml^{-1}) لمدة نصف ساعة.

وبَعَد ثلاثة أَيَّام زرعت شتلات مِنْ الثوم المحلي بحدود ٤ فصوص لكل اصيص.

وتم اضافة ٥٠ ml مِنْ MgO NPs وافرازات جذور الثوم مع باقي المُعاملات.

Control	(F) Fol المُسبب	(M) MgO NPs
(G) نبات الثوم	(R) افرازات جذور الثوم	(FM) MgO NPs + المُسبب
(FG) المُسبب + نبات الثوم	(FR) المُسبب + افرازات جذور الثوم	(FMG) المُسبب + MgO NPs + نبات الثوم
(FMR) المُسبب + MgO NPs + افرازات الجذور	(FGR) المُسبب + نبات الثوم + افرازات الجذور	(FMGR) المُسبب + MgO NPs + نبات الثوم + افرازات الجذور

حساب مؤشر المرض ونسبة الاصابة بمَرَّض الذُبول الفيوزارمي

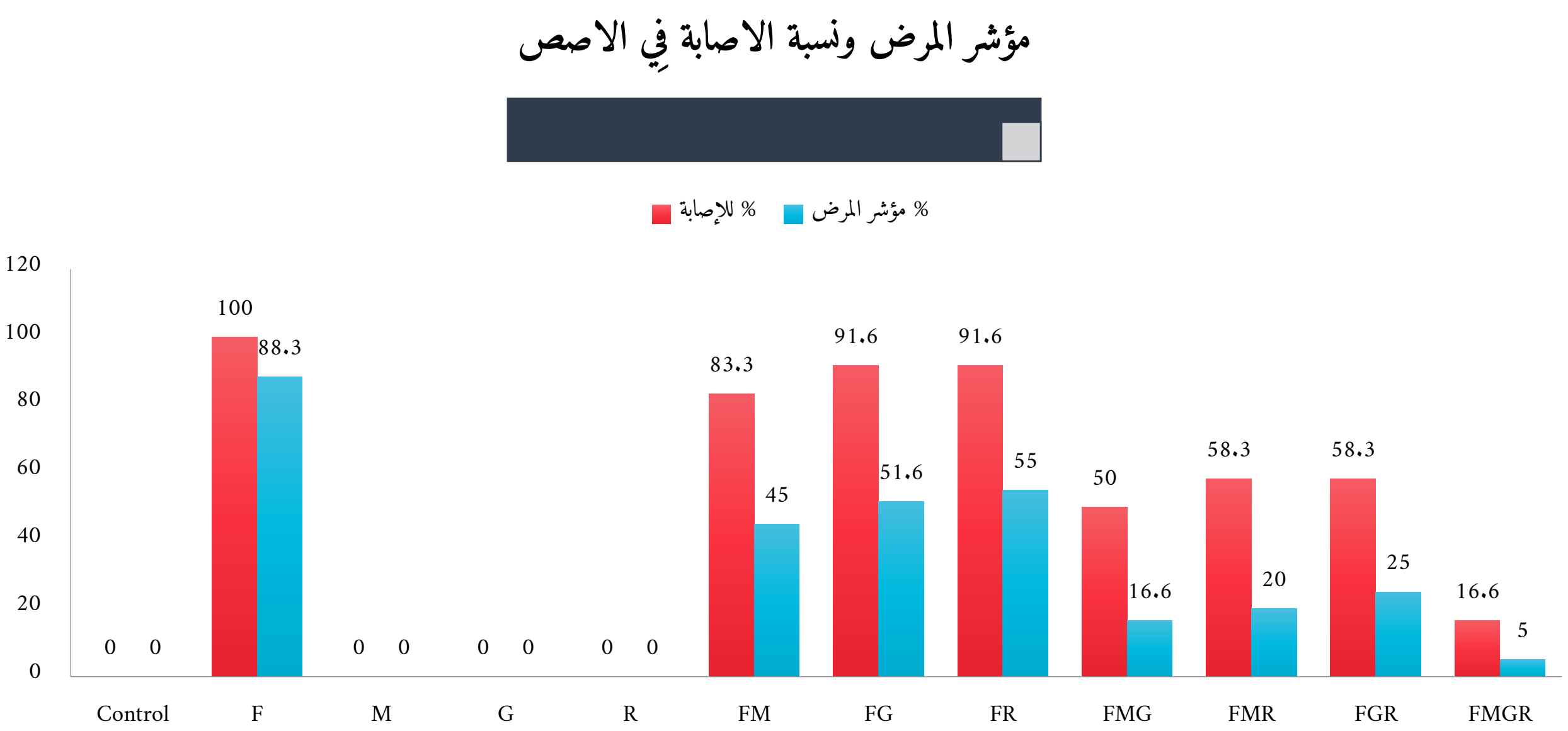
حسبت بَعَد ٣٥ يومًا مِنْ إضافة اللقاح الفِطْري في تجربة الاصص

وحسبت نسبة الإصابة ومؤشر المرض بعد ٩٠ يومًا في تجربة البيت البلاستيكي

وحسبت النسبة المئوية للإصابة وفق المعادلة التالية:

$$\text{النسبة المئوية للإصابة} = \frac{\text{عدد النباتات المصابة}}{\text{العدد الكلي للنباتات المفحوصة}} \times ١٠٠$$

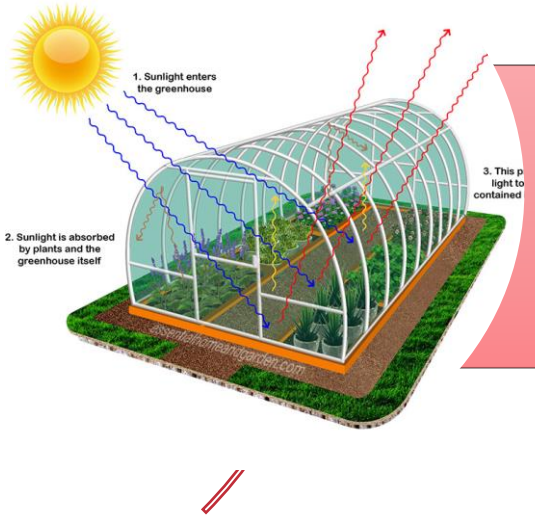
تم تقدير مؤشر على المجموع الخضري المذكور بواسطة Chenواخرون (٢٠١٩)



الشكل. النسبة المئوية للاصابة ومؤشر مرض الذبول الفيوزارمي على الطماطة في الاصص

LSD: Index Disease 17.20, % of Infection 11.15

تجربة البيت البلاستيكي



تم اعداد وتقسيم البيت على ٥ مساطب كُلِّ مسطبة بعرض ٣٠ cm والمسافة بين مسطبتين ٧٥ سم، ثم مدت أنابيب التنقيط بواقع انبوب لكل مسطبة، وكانت المسافة بين منقط واخر ٢٠ سم.

الطريقة الاولى:

لقحت شتلات الطماطة بعمر ٣٠ يوماً بالفِطْر المُمْرض (Folبتركيز ٢×١٠٦ spore.ml-1)

وبعد ٣ ايام زرعت فصوص الثوم بحدود ٤ فصوص بين شتلة واخرى واضيف ٥٠ mlلكل مِنْ MgO NPsوافرازات جذور الثوم سقياً على التوالي.

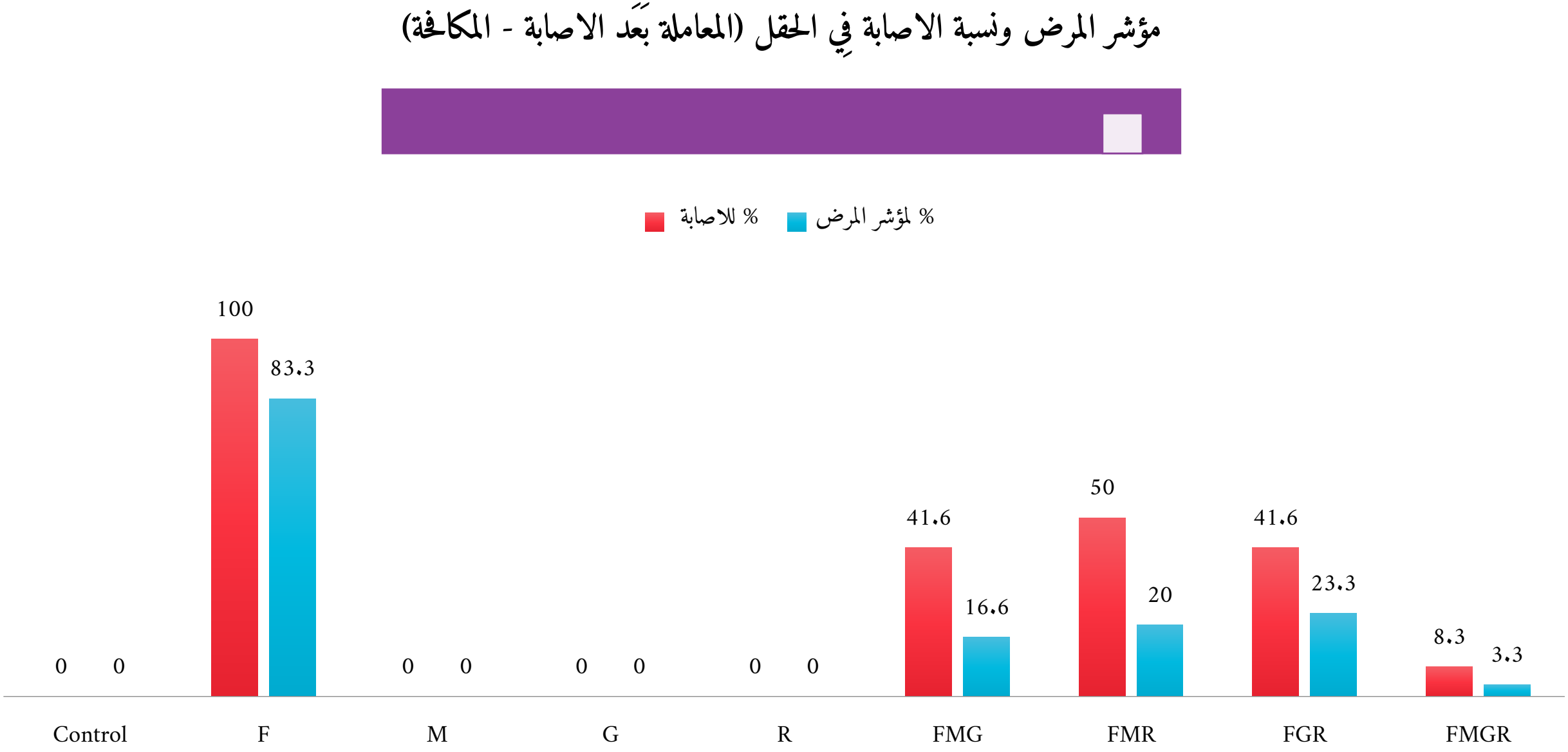
الطريقة الثانية

زرعت شتلات الطماطة بعمر ٣٠ يومًا ،

وبعد ٣ ايام زرعت فصوص الثوم واضيف ٥٠ ml لكل مِنْ MgO NPs وافرازات جذور الثوم سقياً على التوالي،

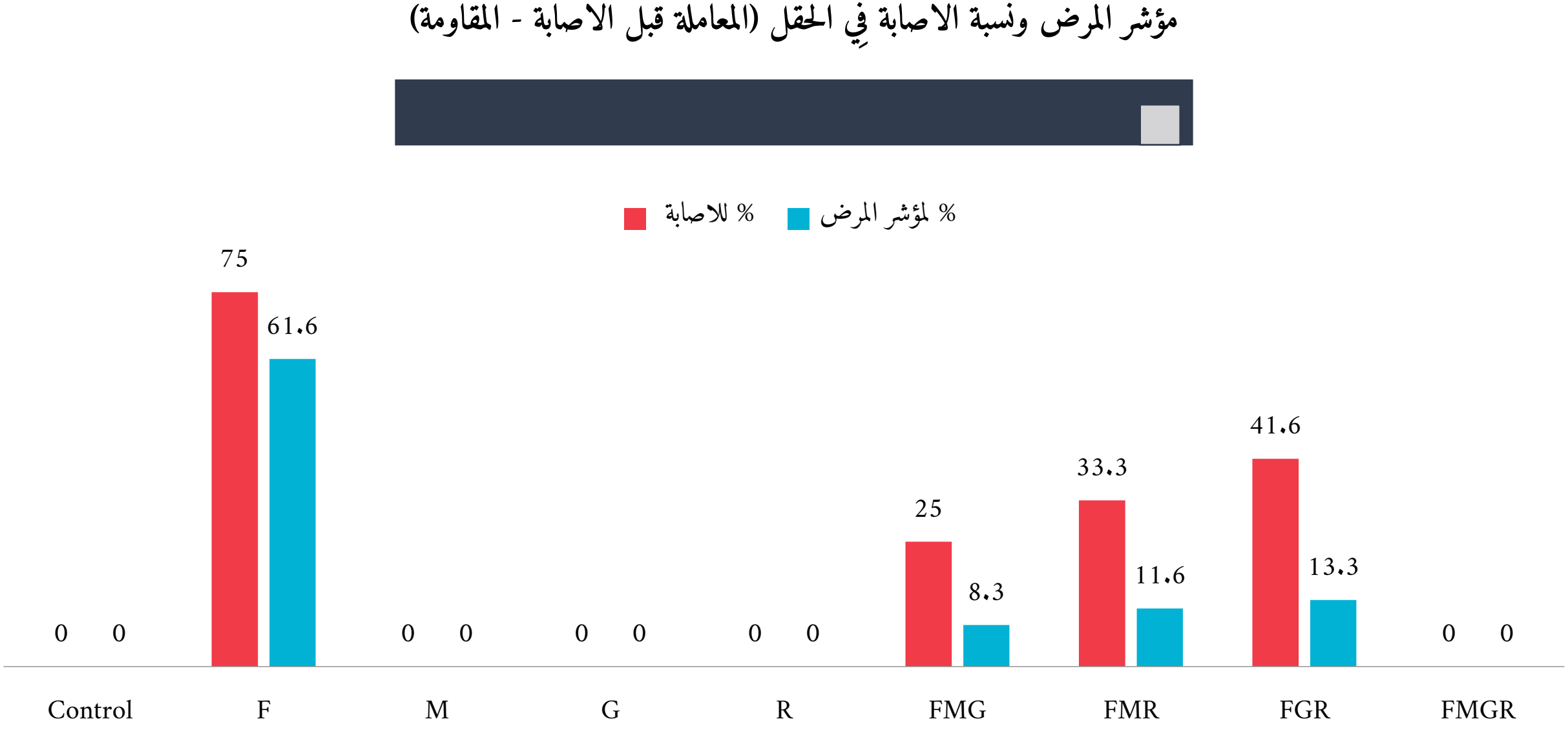
ثم لقحت شتلات الطماطة بالمعلق البوغي للفِطْر المُمْرض (بتركيز ٢×10^6 spore.ml^{-1}) بعد ٣ ايام

Control	المُسبب (F) Fol	(M) MgO NPs
نبات الثوم (G)	افرازات جذور الثوم (R)	المُسبب + MgO NPs + نبات الثوم (FMG)
المُسبب + MgO NPs + افرازات الجذور (FMR)	المُسبب + نبات الثوم + افرازات الجذور (FGR)	المُسبب + MgO NPs + نبات الثوم + افرازات الجذور (FMGR)



الشكل 4-16. النسبة المئوية للاصابة ومؤشر مرض الذبول الفيوزارمي على الطماطة في الحقل (المعاملة بعد الاصابة - المكافحة)

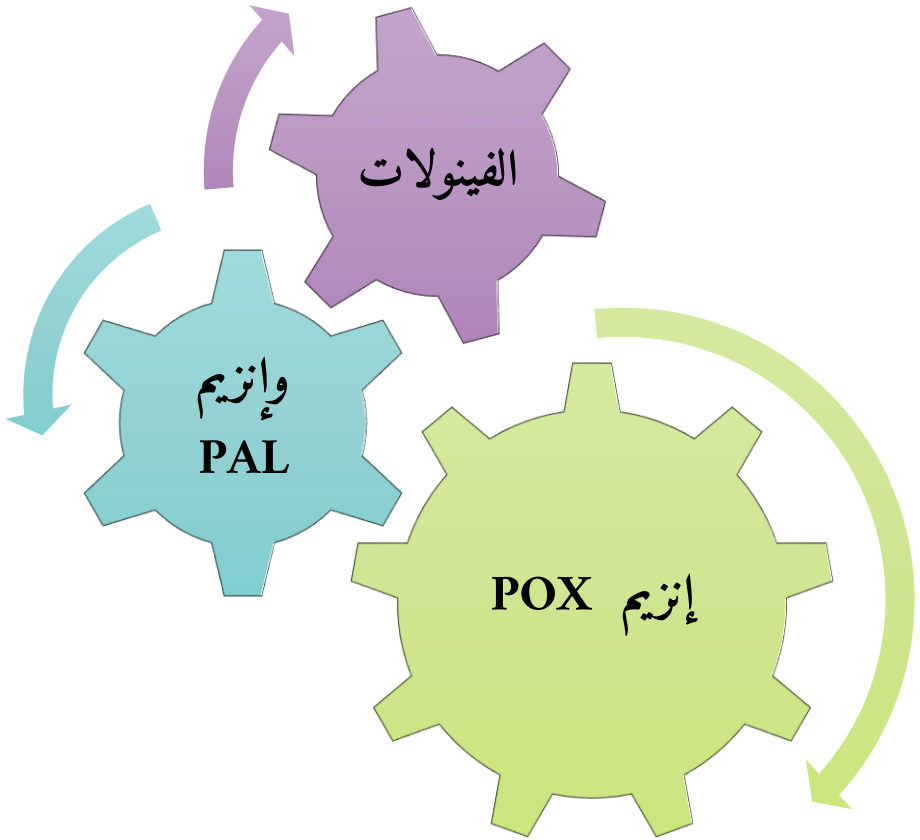
LSD: Index Disease 8.5, % of Infection 9.2



الشكل. النسبة المئوية للاصابة ومؤشر مرض الذبول الفيوزارمي على الطماطة في الحقل (المعاملة قبل الاصابة - المقاومة)

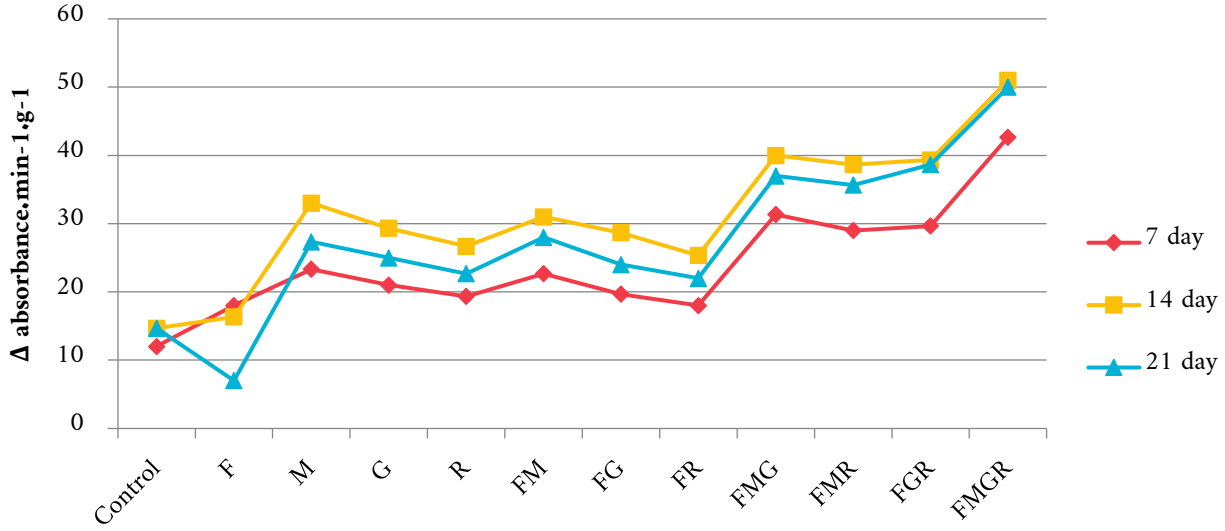
LSD: Index Disease 7.4, % of Infection 17.6

التقويم البيوكيميائي لاستجابة دفاعات النبات في تحفيز المقاومة الجهازية المستحثة

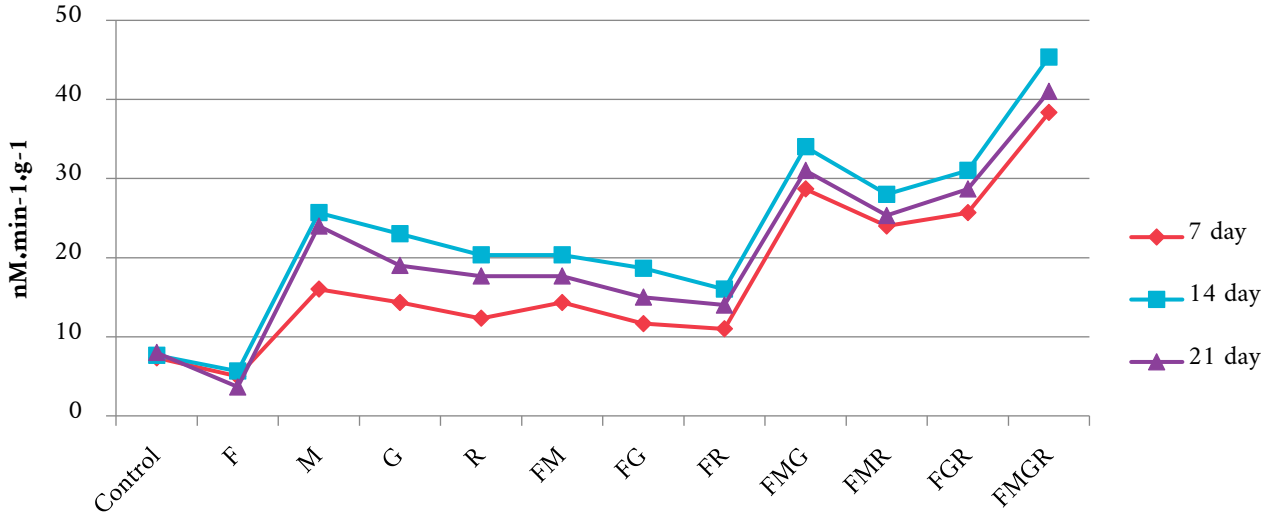


تم إجراء التقويم البيوكيميائي بقياس كميات المركبات الدفاعية المنتجة والمتراكمة في أوراق نبات الطماطة التي جمعت على فترات زمنية مختلفة بَعَد ٧ ، ١٤ و٢١ يومًا من اضافة المسبب المرضي

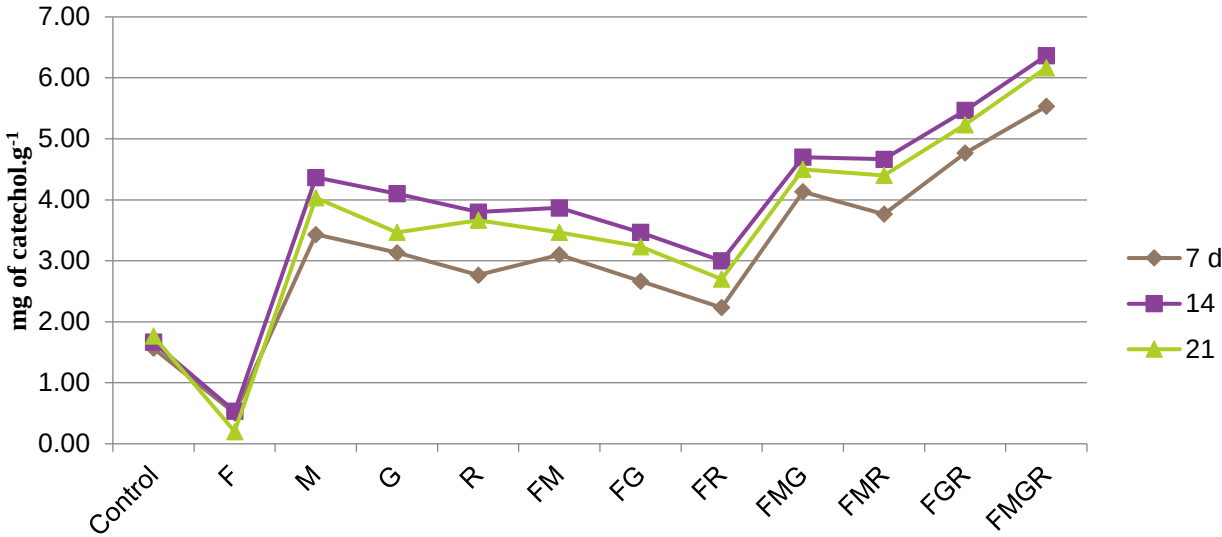
الانزيمات في تَجْرِبَة الاصص



الشكل 4-18. تركيز انزيم POX في الاصص LSD = 2.8 ، 2.5 و 2.3 على التتابع

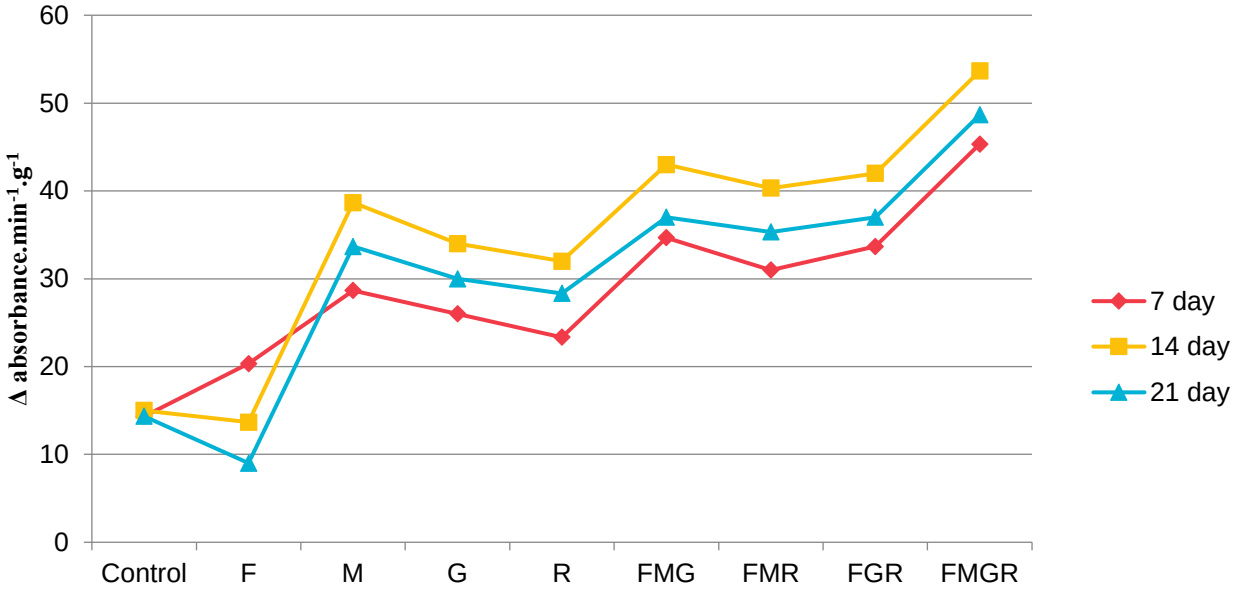


الشكل 4-19. تركيز انزيم PAL في الاصص LSD = 2.5 ، 2.4 و 2.1 على التتابع

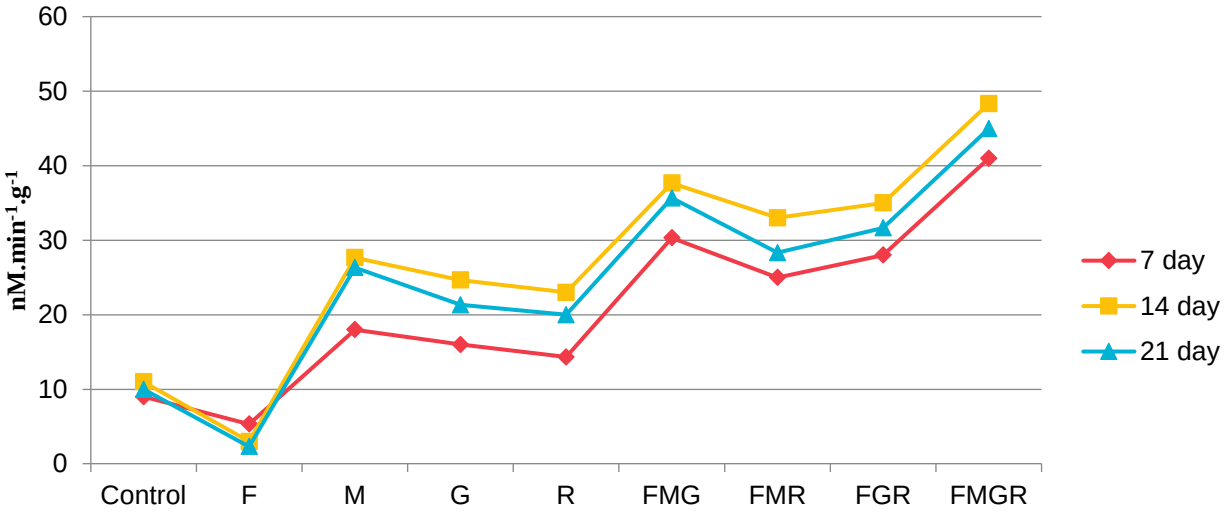


الشكل 4-20. تركيز الفينولات في الاصص، LSD = 0.36 ، 0.37 و 0.38 على التتابع

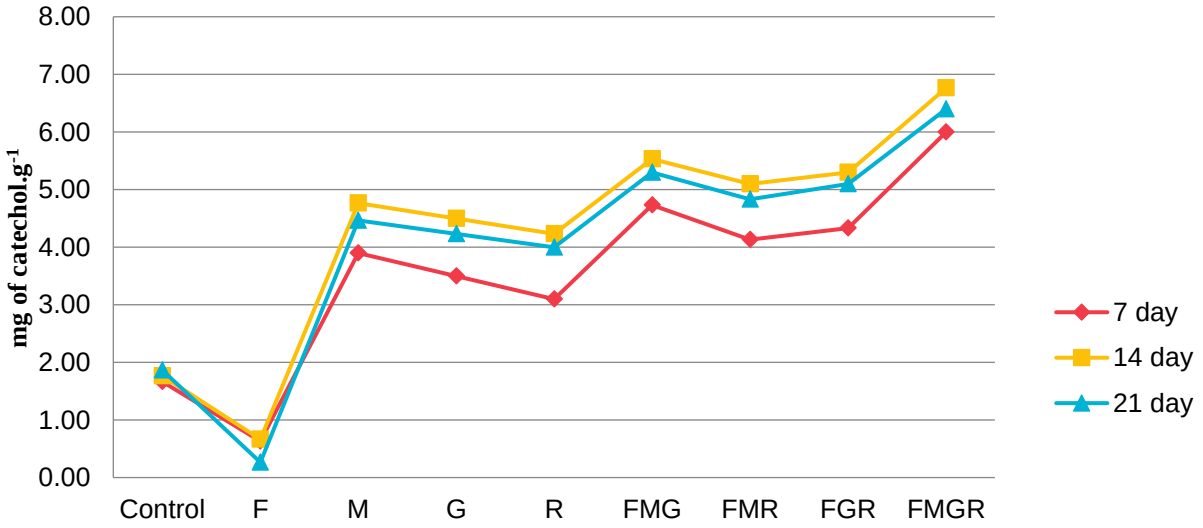
التَّجْرِبَة الحقلية (المعاملة بَعَد الاصابة - المكافحة)



الشكل 4-21. تركيز انزيم POX في البيت البلاستيكي بعد الاصابة، LSD = 2.8 ، 2.9 و 3 على التتابع

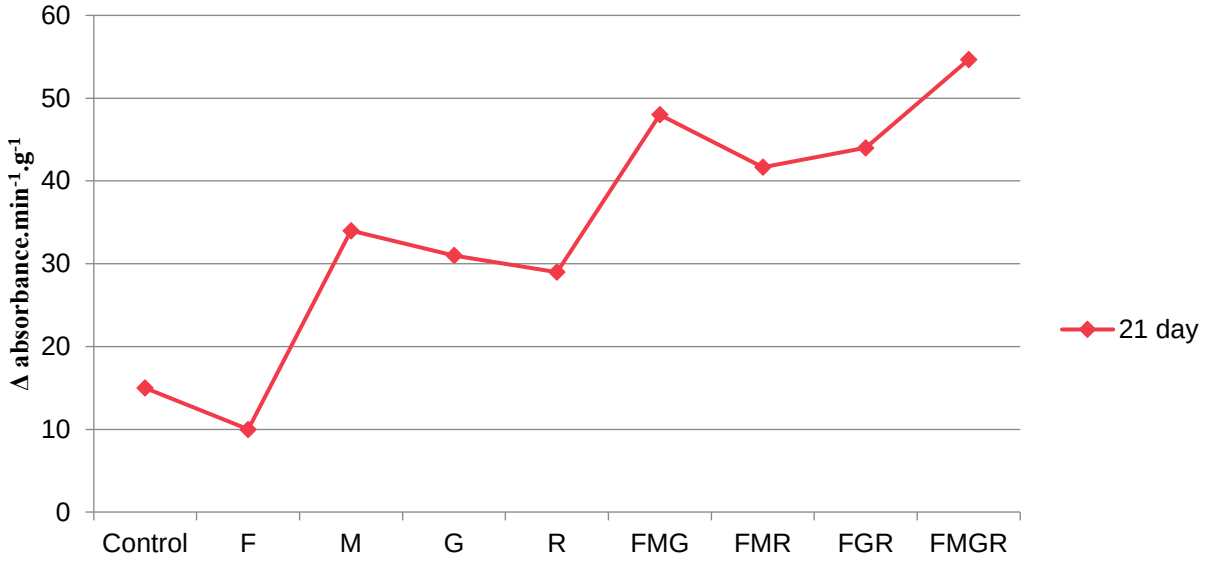


الشكل 4-22. تركيز انزيم PAL في البيت البلاستيكي بعد الاصابة، LSD = 1.8 ، 2.3 و 2.5 على التتابع

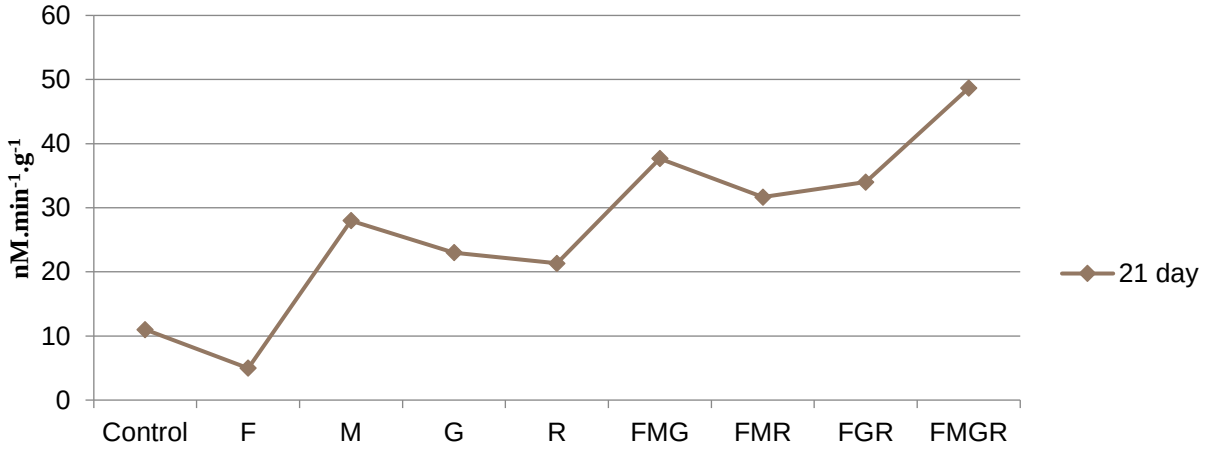


الشكل 4-23. تركيز الفينولات في البيت البلاستيكي بعد الاصابة، LSD = 0.20، 0.26 و 0.21 على التتابع

التَّجْرِبَة الحقلية
(المعاملةَ قبل الاصابة
- المقاومة)



الشكل 4-24. تركيز انزيم POX في البيت البلاستيكي قبل الاصابة
L.S.D. = 2.4



الشكل 4-25. تركيز انزيم PAL في البيت البلاستيكي قبل الاصابة
L.S.D. =1.9

الشكل 4-26. تركيز الفينولات في البيت البلاستيكي قبل الاصابة
L.S.D. = 0.3

معايير النمو الحيوية لنبات الطماطة

حسب محتوى الكلوروفيل من اوراق نبات الطماطة بَعَد ٣٠ يوماً في تجربة الاصص وبَعَد ٦٠ يومًا في تجربة البيت البلاستيكي

تم قياس وطول المجموع الخضري بَعَد ٤٠ يوماً مِنْ إضافة اللقاح الفِطْري في تجربة الاصص

وبَعَد ٩٠ يومًا تم قياس طول المجموع الخضري ووزن الثمرة عند اول جنية في البيت البلاستيكي

فضلًا الى الوزن الرطب والجاف فِي نهاية التجربة بالنسبة لتجربة الاصص تحت ظروف البيت البلاستيكي.

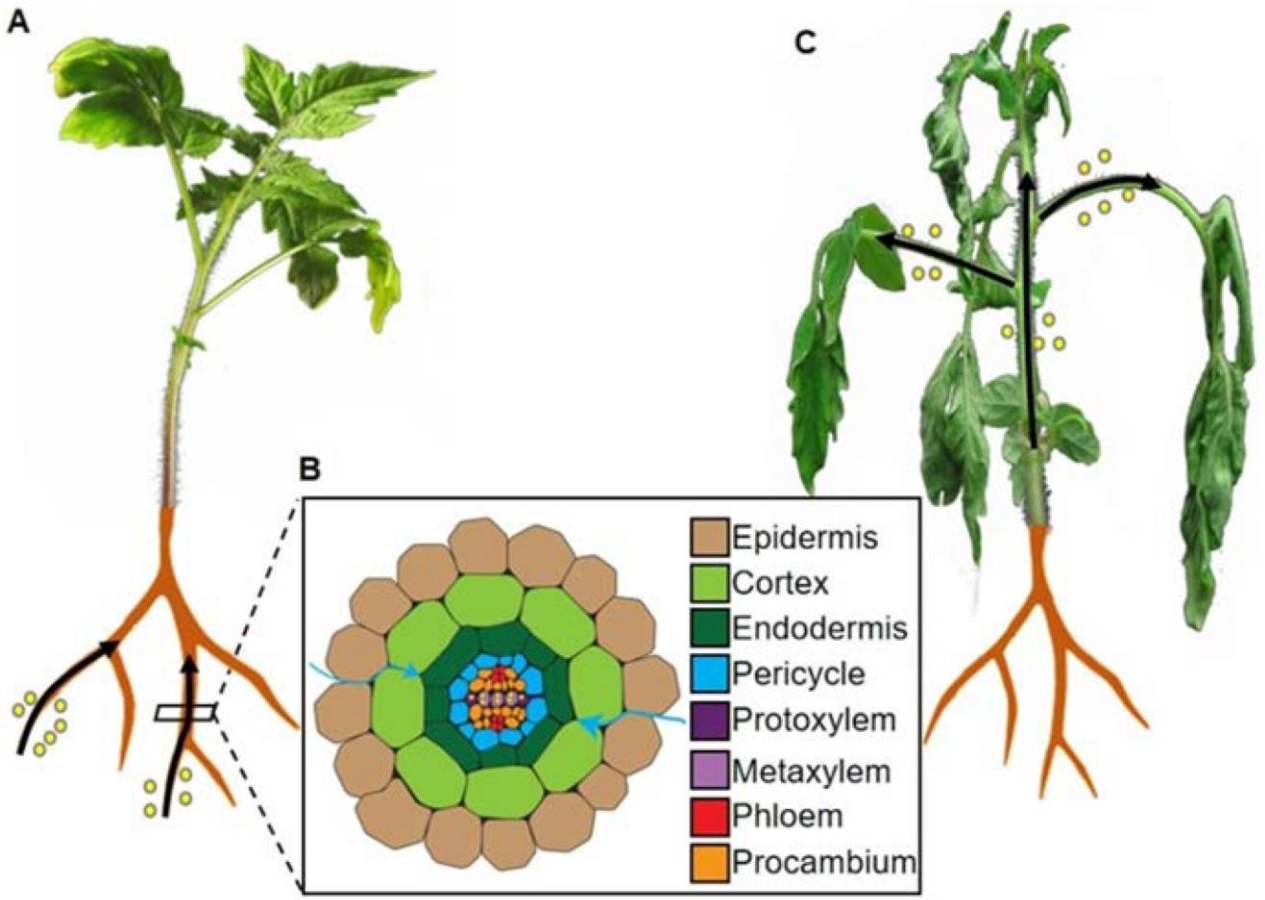
أجري تحليل محتوى عنصر النايتروجين (N) ومحتوى البروتين في تجربة البيت البلاستيكي في نبات الطماطة بَعَد ٩٠ يومًا

وبعد ذلك تم تقدير نسبة البروتين بضرب نسبة النايتروجين في ثابت K (= 6.25)

المُعاملات	طول المجموع الخضري (سم)	طول المجموع الجذري (سم)	الوزن الرطب (غم)	الوزن الجاف (غم)	محتوى الكلوروفيل
Control	60.2	7.4	53.8	10.5	51
F	21.2	4.5	16.5	4.3	27
M	80.7	14.4	70.8	18.3	93
G	76	12.3	65.5	15.3	88
R	73.5	10.8	61.3	12.5	82
FM	63.2	10.6	57.3	15	59
FG	56	9.5	55	11.5	55
FR	53.2	8.5	51.8	10.3	54
FMG	88.2	19.8	79.8	29.3	99
FMR	86.2	17.8	74.5	26	95
FGR	81.5	15.1	72.5	22	91
FMGR	101.5	24.5	53.8	38.5	118
L.S.D	٤,١	١,٨	٣,٧	٢,٢	٤,٤

المُعاملات	طول المجموع الخضري (سم)	نسبة عنصر N	محتوى البروتين	الوزن الثمرة	محتوى الكلوروفيل
Control	108.2	0.32	2	191.4	53
F	33.4	0.10	0.7	41.8	15
M	175.6	0.81	5.1	227.8	95
G	170.6	0.65	4.1	221.4	92
R	161.2	0.52	3.2	214	84
FMG	189.2	1.03	6.4	270.2	62
FMR	184	0.90	5.7	263.4	59
FGR	178.4	0.84	5.2	252.6	57
FMGR	203.6	1.38	8.7	302.2	101
L.S.D	٨,٧	٠,١٣	٠,٢٧	١٤,٥	8.٧

التَّشْرِيح المَرَضِيُّ للمقاطع النَّسِيجِيّة



تم جمع العينات النباتية فِي مرحلة التزهير لتحضير شرائح دائمية لمقاطع مستعرضة للسيقان والجذور

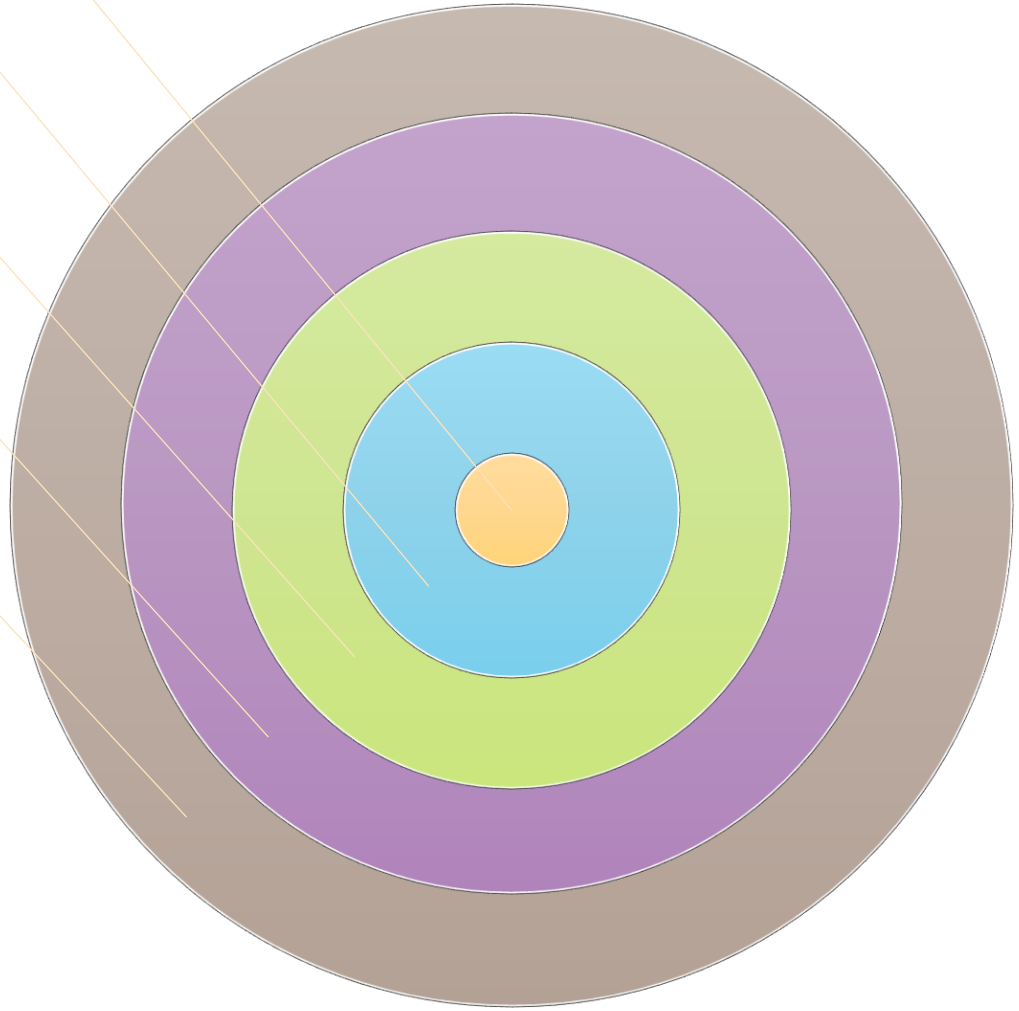
القتل والتثبيت:

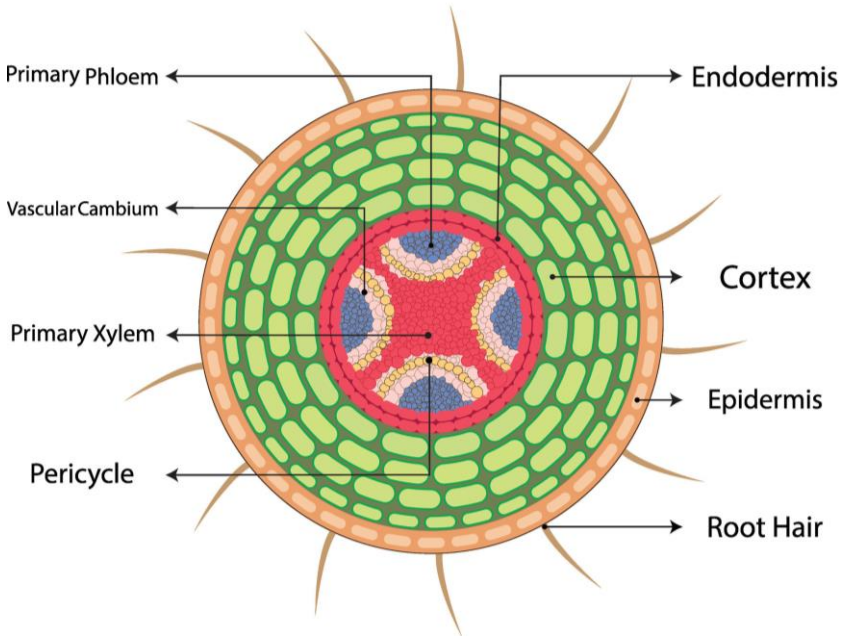
الغسل والانكاز:

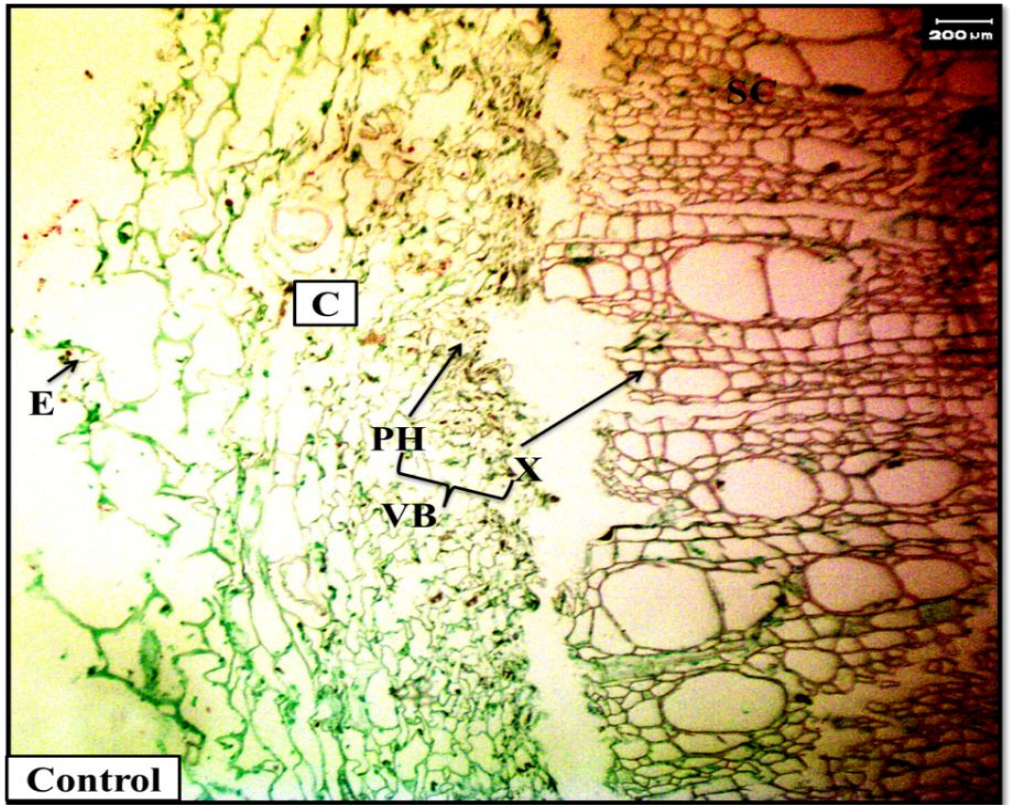
الترويق والتشريب:

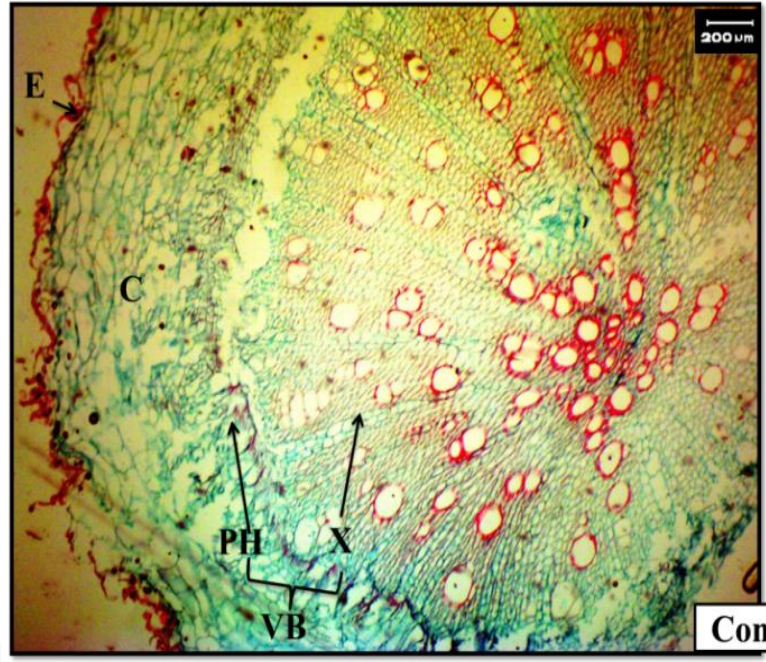
الطمر والتحميل:

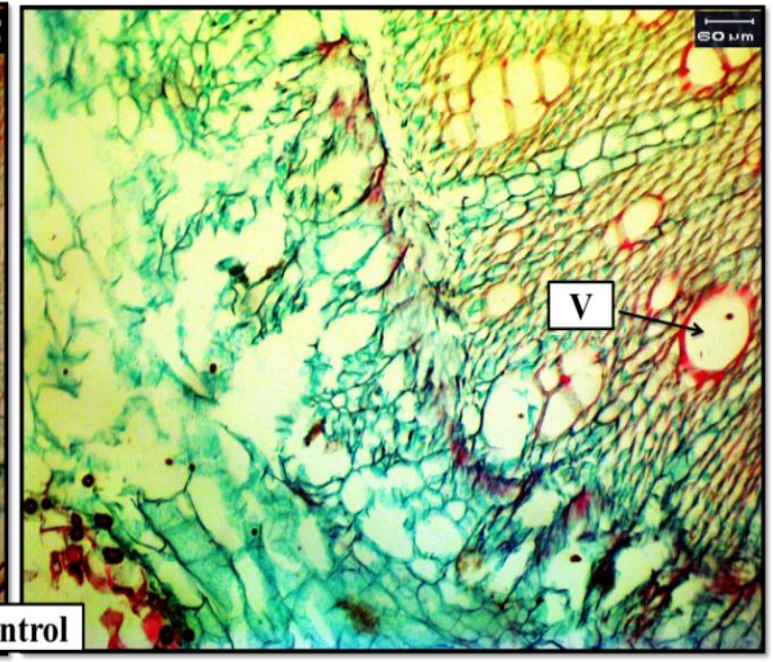
ازالة الشمع والتصبيغ

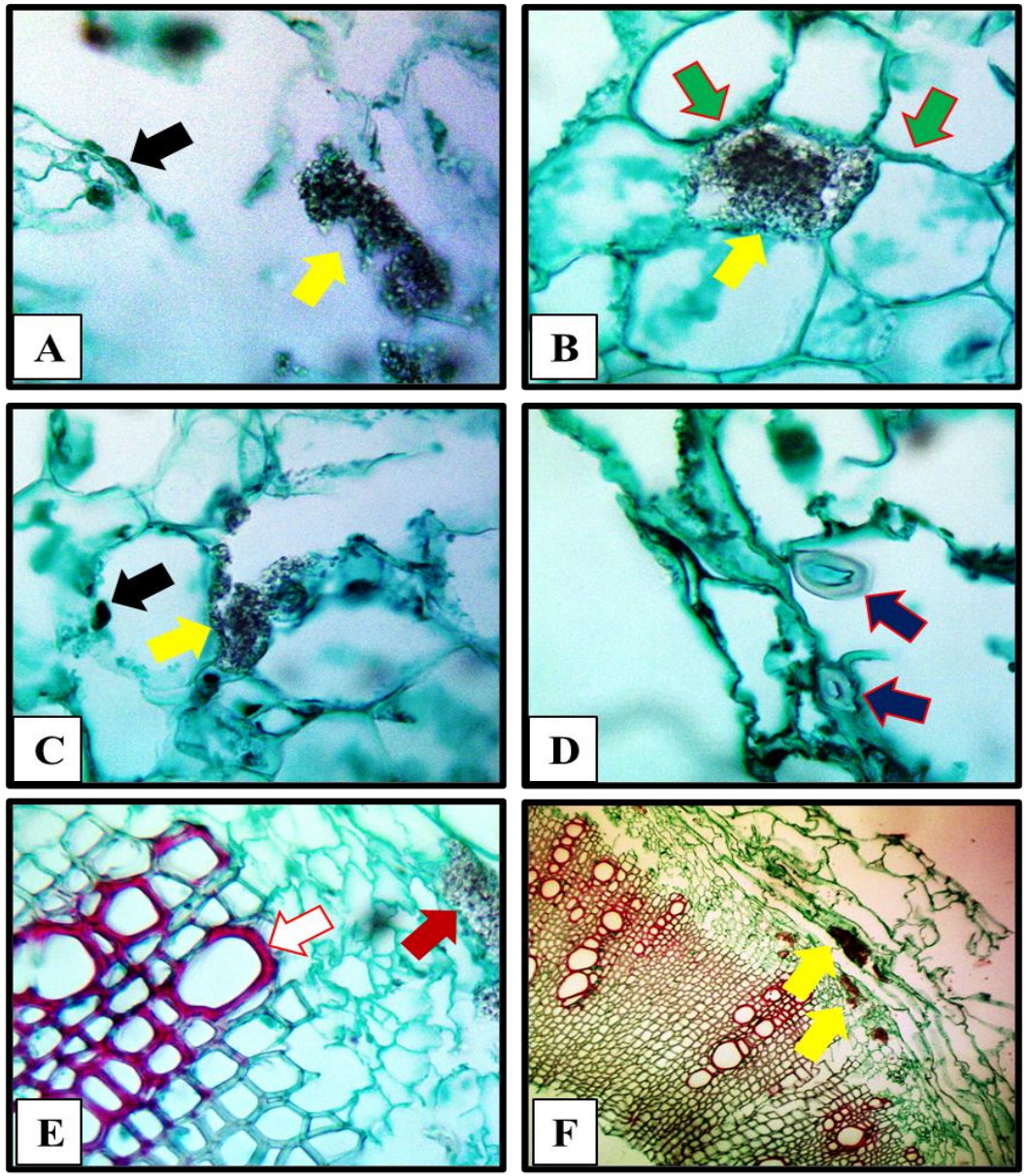





200 µm
SC
C
E
PH
X
VB
Control


200 µm
E
C
PH
X
VB


80 µm
V
Control



مقطع مستعرض في جذر الطماطة لمعاملة التوليفة

:A

السهم الاصفر: اصابة الخلايا البرنكيمية في منطقة القشرة،

السهم الاسود: يشير الى تشكيل حليمة داخل الخلايا البرنكيمية في منطقة القشرة،

:B

السهم الاصفر: يشير الى وجود الاصابة داخل الخلايا البرنكيمية في منطقة القشرة،

السهم الاخضر بحدود حمراء: يشير الى حدوث تسمك في جدران الخلايا البرنكيمية

:C

السهم الاصفر: يشير الى وجود الاصابة داخل الخلايا البرنكيمية في منطقة القشرة،

السهم الاسود: يشير الى تشكيل حليمة داخل الخلايا البرنكيمية في منطقة القشرة، الصورة

:D

السهم الاخضر: يشير الى تكون السكلريدات وهي عبارة عن انسجة سكلرنكيمية وظيفتها وقائية ودفاعية في الخلايا،

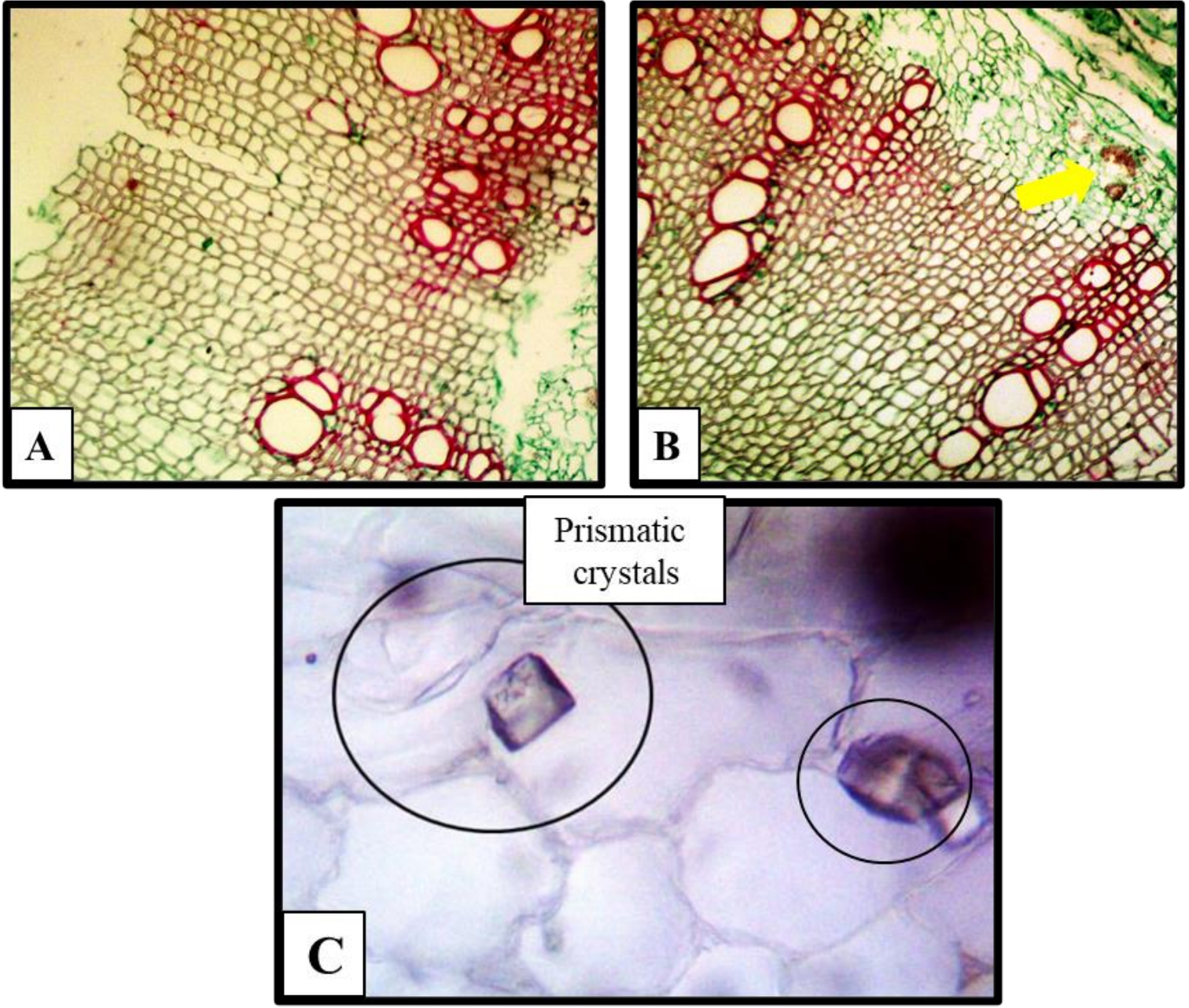
:E

السهم البني: يشير الى نمو خيوط الفطر داخل الخلايا البرنكيمية في منطقة القشرة،

السهم الابيض بحدود حمراء: يشير الى حدوث تسمك في جدران الخلايا البرنكيمية إنتاج المواد الهلامية

:F

السهم الاصفر: يشير الى وجود الاصابة داخل الخلايا البرنكيمية في منطقة القشرة ومنطقة الحزمة الوعائية سليمة وشكل الخلايا طبيعي.



مقطع مستعرض في ساق الطماطة لمعاملة التوليفة

A: الحزمة الوعائية في الساق وعدم وجود اصابة بالفطر والاوعية طبيعية،

B: السهم الاصفر: يشير الى وجود الاصابة داخل الخلايا البرنكيمية في منطقة القشرة، وهي إصابة بسيطة،

C: الدوائر السوداء تمثل وجود البلورات الموشورية في الخلايا البرنكيمية.

الاستنتاجات

وجود عدة عزلات متباينة في الصفات المظهرية وفي مؤشر المرض وأكثر عزلة أظهرت اشد امراضية شخصت جزيئيًا

وجود عدة عزلات من بكتيريا PGPR واقوى عزلة بكتيرية تثبيطا للفطر الممرض وشخصت جزيئيًا

استعمال البكتيريا الـ PGPR كمصنع حيوي لتصنيع MgO NPs واختبار فعاليتها في اختزال معدل النمو الشعاعي الفِطْري

إمكانية استخلاص افرازات جذور الثوم واختبار فعاليتها التثبيطية في الحد من النمو الشعاعي للفِطْر الممرض

الزراعة البينية للثوم اظهرت فعالية عالية في زيادة اعداد بكتيريا الـ PGPR في منطقة حول الجذور

جسيمات MgO NPsوالزراعة البينية لنبات الثوم أو استعمال افرازات جذورها في الحد من المرض.

جسيمات MgO NPsوالزراعة البينية لنبات الثوم أو افرازات جذورها ينتج عنه استحثاث للجينات المتعلقة بالدفاع مثل POX و PAL ومحتوى الفينول في أوراق الطماطة.

كفاءة المعاملات المستعملة في تحسين معايير النمو في نبات الطماطة

التوصيات

الاهتمام باستعمال الجسيمات النانوية المصنعة حيويًا ضد مسببات الأمراض النباتية لتعزيز الزراعة إذ يبدو أن المصير النهائي لاستعمالها كبديل لمبيدات الفطريات واعد للغاية.

من الضروري إجراء مزيد من الاستقصاء لاستكشاف التأثير السام للنبات للجسيمات النانوية وتناولها من النباتات كمغذيات دقيقة وتأثيرات طويلة المدى للجسيمات النانوية في مستوى سلامة النبات وصحة الانسان.

يجب أن تستهدف الأبحاث المستقبلية العمل على فهم التفاعل بين الأشكال المختلفة للجسيمات النانوية والنبات ومُسببات الأمراض النباتية التي تهاجمها.

يجب أن تركز الجهود على تطوير نهج إدارة مستدام وفعال وآمن وطويل الأمد وصديق للبيئة ضد الأمراض النباتية.

تفتح الدراسة بابًا جديدًا لصناعات الأسمدة لإنتاج السماد الحيوي لـ MgOلتغذية النبات إذ يمكن للصناعات الاعتماد على هذا المنتج في المستقبل القريب جدًا.

إقامة ندوات وورش عمل تثقيفية لتوعية الفلاحين والمزارعين بأهمية الزراعة المستدامة وأهمية الزراعة البينية، فضلًا عن الأسمدة النانوية والتصنيع الحيوي للمواد النانوية.

الاهتمام بالمختبرات وتزويدها بأحدث الأجهزة والمواد المهمة لإنجاز بحوث طلبة الدراسات العليا.

شكـراً لكـم

على الحضور وحسن الاستماع