# توصيف عزلات محلية من بكتريا الريزوبيا المعزولة من نبات الحمص المزروع في محافظة السويداء وتقييم تأثيرها التضادي في نمو فطر الـ .Fusarium SPP

روان هيا الخطيب* محمود أبو غرة** محمد سعيد الشاطر***

(الإيداع: 10 حزيران 2020 ، القبول: 17 آب 2020)

**الملخص:**

هدف هذا البحث إلى عزل بكتريا الريزوبيا من نبات الحمص وتوصيفها بيوكيميائياً وتقييم فاعليتها التضادية تجاه فطر Fusarium oxysporum و Fusarium solani مخبرياً، نفذ البحث في مخبر أمراض النبات البكتيرية في كلية الزراعة بجامعة دمشق وفي البيت الزجاجي التابع للهيئة العامة للتقانة الحيوية ضمن أصص بلاستيكية للموسم الزراعي 2019 . 2020 م. جمعت عينات نباتية من نبات الحمص من مواقع مختلفة من محافظة السويداء بسورية، حيث عزل منها 15 عزلة بكتيرية. تبين نتيجة العدوى الاصطناعية أن 10 عزلات منها شكلت عقداً جذرية. وبنتيجة الاختبارات الكيميائية الحيوية تبين أنها تنتمي لـ Rhizobiaceae ، حيث كانت سالبة غرام. غير متبوغة. موجبة الكاتلاز. سالبة الاوكسيداز. قادرة على استخدام بعض السكريات كالزيلوز و المالتوز و الفركتوز و الغالاكتوز والسكروز والمانيتول كمصدر للكربون. كما أنها تستقلب الغلوكوز وغير قادرة على استقلاب اللاكتوز. بعض هذه العزلات تحلل النشاء والبعض الآخر تحلل الجيلاتين. كما أظهرت نتائج التضاد الحيوي بين الريزوبيا والفطريات المدروسة مخبرياً أن معدل التثبيط للفطريات المختبرة تباين باختلاف نوع الفطر وعزلة الريزوبيا حيث كان التأثير المثبط للعزلتين R1 و R2 أعلى ما يمكن على الوسط المغذي للفطر F. oxysporum إذ بلغت نسبة التثبيط 97.23% و 95.6% على التوالي، ومتوسطة على فطر F. solani (65.5%) و (62.35%)، بينما أعطت باقي عزلات الريزوبيا تاثيراً عالي إلى متوسط في تثبيط نمو الفطرين المختبرين في الوسط المغذي. كما أظهرت النتائج أنّ عزلات الريزوبيا لها تضادية عالية تجاه الفطر Fusarium oxysporum مقارنة بالفطر Fusarium solani .

**الكلمات مفتاحية:** حمص . رايزوبيا . اختبارات بيوكيميائية . *Fusarium*.

*طالبة دكتوراه . قسم علوم التربة، كلية الزراعة، جامعة دمشق

** أستاذ دكتور. قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة دمشق

***أستاذ دكتور. قسم علوم التربة، كلية الزراعة، جامعة دمشق

# Characterization of local strains of *Rhizobia* bacteria isolated from chickpea planted in AS- Swaida governorate and evaluation of their Antagonistic effect on growth of *Fusarium* SPP. fungi

**Rawan Haya Al Khateeb[*] Dr. Mahmoud Abu Gharraa[**] Dr. Mohammed Said Al-Shater[***]**

**(Received: 10 June 2020, Accepted: 17 August 2020)**

**Abstract:**

**The aim of this study was: Isolate the Rhizobia from the chickpea plant, determine its biochemical characters and evaluate its antagonistic effect against Fusarium solani and Fusarium oxysporum in laboratory. The research was carried out in the laboratory of bacterial plant diseases in the Faculty of Agriculture-Damascus and in the glass house of the National Commission of Biotechnology for the agricultural season 2019 - 2020. Plant samples were collected from different locations of AS-Swaida governorate, Syria, 15 bacterial strains were isolated, the result of artificial infection showed that 10 isolates formed root nodes. The biochemical tests showed that they belong to Rhizobiaceae, Where They was Gram negative, Do not form spores, catalase positive, oxidase negative, able to use some sugars such as xylose, maltose, fructose, galactose, sucrose and mannitol as the source of carbon. they also metabolizes glucose and they are unable to metabolize lactose. some isolates decompose starch and others dissolve gelatin. Results of antagonist between Rhizobia isolates and tested fungi showed that the inhibition rate of tested fungi displayed differences in accordance with different fungi species and rhizobial isolate. However, the inhibitory effect of Rhizobia isolate (R1) and (R2) occurred most on medium growth of F. oxysporum 97.8% and 95.6% respectively, and moderate on F. solani (66.3%) and (65.5%). While, the inhibitory effect of The rest of rhizobial, isolated occurred High to Medium growth of All fungi tested. The data suggest that the Rhizobia isolates which are highly antagonist on Fusarium oxysporum Compared to Fusarium solani.**

**Keywords: Chickpea plant ,*Rhizobia*, biochemical tests, *Fusarium***

---

*(PhD) student, Soil Sciences Dep., Damascus Univ.

** Professor, Plant Protection Dep., Damascus Univ.

*** Professor, Soil Science Dep., Damascus Univ.

**1–مقدمة:**

توجد الريزوبيا (*Rhizobia*) بصورة تعايشية داخل العقد الجذرية لنباتات بقولية، حيث يمد النبات البقولي البكتريا العقدية بما تحتاجه من المواد العضوية وغير العضوية اللازمة لها. بينما تمد البكتريا النبات بالمواد الآزوتية وذلك بتثبيتها لآزوت الهواء الجوي في النبات(Peoples وزملاؤه، 1995؛ Sprent وزملاؤه، 2017؛ Andrews و Andrews ، 2017). تنتمي **الريزوبيا** تصنيفياً لعائلة Rhizobiaceae، و أهم الأجناس التي تضمها: (Azorhizobium – Rhizobium – Braydyrhizobium – Sinorhizobium – Nerorhizobium – Pararhizobium – Ensifer– Masson–؛ 1998 [a] وزملاؤه، De Lajudie ؛ 1997 وزملاؤه، Jarvis) (Mesorhizobium – Allorhizobium Biovinوزملاؤه، 2009 ؛ Young وزملاؤه، 2001؛ Mousavi وزملاؤه، 2014؛ Mousavi وزملاؤه، 2015). وتشارك جميعها في العايش مع النباتات البقولية بتثبيت الآزوت الجوي، كما أنها قادرة على استعمار جذور النباتات غير البقولية (Chabot وزملاؤه، 1996)، كما أنها وحيدة الخلية و حجم الخلية أقل من 2 ميكرون و متغيرة الشكل pleomorphic و متحركة بواسطة سياط قطبية أو محيطية و تراكم حبيبات poly–B– hydroxybutyrate (Triplett، 1990)، ومن صفاتها الفيزيولوجية ( متباينة التغذية الكيميائية، تستخدم منتجات التمثيل الضوئي من النبات البقولي كمصدر للكربون والآزوت الجوي كمصدر للآزوت، منها ما هو سريع النمو(*Rhizobium*) حيث يبلغ متوسط زمن نموها من 2 إلى 4 ساعات ومنها ماهو بطيء النمو (*Braydyrhizobium*) متوسط زمن نموها 6 إلى 12 ساعة، بيئة النمو : ( **YMA** yeast manitol agar) (Heichel و Henjum، 1991). تعد الفطريات التابعة للجنس .*Fusarium* spp من أهم مسببات الأمراض التي تسبب أعفان البذور وجذور النباتات بشكل عام ومنها النباتات البقولية (Agrios، 2005) ومن أهم الطرائق في مكافحة أمرض النبات استخدام المبيدات الفطرية، إلا أنّ أكثر المبيدات الفطرية لها سمية على الإنسان ولها تأثيرات سلبية على الكائنات غير المستهدفة والبيئة المحيطة (Maloy، 1993) دفع هذا الباحثون إلى إيجاد بدائل آمنة على البيئة وصحة الإنسان في مكافحة أمراض النبات . ومن هذه البدائل استخدام بكتريا الريزوبيا التي تنمو في العقد الجذرية للنباتات البقولية بشكل تكافلي فقد وجد العديد من الباحثين أن الريزوبيا في النباتات العائل تحفز النبات في مقاومته تجاه الفطريات (Ozgonen و Gulcu ، 2011؛ Akhter، 2014) وقد يعود آلية فعل الريزوبيا في قدرتها في مكافحة ممرضات النبات بثلاث طرائق إما المنافسة على المكان والغذاء (Essalmani و Lahlou ، 2002) أو إنتاج مضادات حيوية لها قدرة في تحليل مشيجة الفطريات عن طريق إنتاج أنزيمات محللة للجدر الخلوية للفطر(Arfaouie، 2006) وأخيراً قد تحفز النبات المضيف على إنتاج مواد تقاوم ممرضات النبات(Pieterse وزملاؤه، 2001) وذكر العديد من الباحثين فاعلية الريزوبيا في المكافحة الحيوية لممرضات النبات حيث أشار Ehteshamul–Haque و Ghaffar (2008) فاعلية بكتريا الريزوبيا في تثبيط الفطريات الساكنة للتربة مثل .*Fusarium* spp ، كما ذكر العديد من الباحثين فاعلية بكتريا الريزوبيا بشكل كبير في تثبيط نمو الفطريات *Fusarium solani* و*Fusarium oxysporum* (Shaban و El–Bramawy ، 2011: Matloob و Alkaif ، 2015) إذ سببت نسب تثبيط تراوحت من 50 . 100% في الوسط المغذي.

**2–أهداف البحث:**

1. عزل سلالات محلية من البكتريا التكافلية لنبات الحمص في مواقع عديدة من محافظة السويداء، ومعرفة السلالات القادرة على تشكيل عقد جذرية بنتيجة العدوى الاصطناعية.
2. توصيف العزلات البكتيرية بالاختبارات المجهرية والمزرعية والبيو كيميائية ( الكيمياحيوية ).
3. دراسة التضاد الحيوي بين عزلات بكتريا الريزوبيا وفطرال *Fusarium* المسبب لأعفان بذور وجذور النباتات.

**3–مواد وطرائق البحث:**

تم تنفيذ البحث في مخبر أمراض النبات البكتيرية في جامعة دمشق، وفي البيت الزجاجي التابع للهيئة العامة للتقانة الحيوية للموسم الزراعي 2019 . 2020 م.

**3–1– جمع العينات النباتية:**

جمعت عينات عشوائية من نبات الحمص بعمر 6 – 8 أسابيع خلال شهر حزيران لعام 2019 م من عدة مواقع في محافظة السويداء المزروعة بالصنف **(العجيلاتي)**، بمعدل أربعة نباتات من كل حقل، ووضعت العينات في أكياس بلاستيكية مع بطاقة تحتوي على رقم العينة . منطقة الجمع . تاريخ أخذ العينة، وتم نقلها إلى مخبر أمراض النبات البكتيرية في كلية الزراعة بدمشق .

**3–2– عزل البكتريا:**

تم فصل الجذر عن المجموع الخضري، غسلت الجذور من التراب تحت الماء الجاري وتمت عملية تعقيم الجذر الحامل للعقد الجذرية بالكحول الإيتلي 70%، فصلت العقد الجذرية بمشرط معقم ووضعت في جفنة معقمة وأضيف اليها هيبو كلوريد الصوديوم 2% مدة دقيقتين ثم الغسل والنقع بالماء المقطر دقيقتين ثلاث مرات، وضعت العقد المعقمة في جفنة معقمة وأضيف اليها 2 مل ماء مقطر معقم وتم الطحن ثم تركت العقد المطحونة بماء الطحن 5 دقائق ، ثم أخذ 60 ميكرولتر من ماء الطحن ونشر على طبق يحوي وسط مستخلص الخميرة والمانيتول **yeast manitol agar (YMA)( مانيتول 1%، آغار 1.5%، خميرة 0.1% ، فسفات ثنائية البوتاسيوم 0.08%، كلور الصوديوم 0.01% ، كربونات الكلسيوم 0.1% ، ماءات المغنزيوم المائية 0.02%) (أبو غرة، 1997)**، حضنت الأطباق على درجة حرارة 28 مْ لمدة 48 ساعة. نقلت مستعمرات منفردة إلى أطباق جديدة وحضنت بنفس الشروط السابقة وأعطي لكل واحدة رمزاً يميزها ثم حفظت البكتريا في وسط LP ( ببتون: 7غ/ لتر، خميرة: 7غ/ لتر ) مع غليسرول ضمن أنابيب Oppendort 1.5 مل تحت درجة حرارة 20– درجة مئوية لإجراء الاختبارات عليها في وقت لاحق.

**3–3– تعريف البكتريا المعزولة باستخدام العدوى الاصطناعية والطرائق الكيميا حيوية:**

**3–3–1– العدوى الاصطناعية:**

تمت العدوى ضمن أصص بمعدل ثلاث مكررات للعزلة لتقييم كفاءة العزلات البكتيرية في تشكيل العقد الجذرية على جذور الحمص . عقم الخفان الزراعي في الأتوكلاف مرتين لمدة 20 دقيقة عند الحرارة 121 درجة مئوية، ووزع ضمن الأصص المعقمة . وضع 10 مل من بيئة سائلة LP ( ببتون:7 غ/لتر وخميرة : 7غ/ لتر ) ضمن أنابيب زجاجية وعقمت بالأتوكلاف لمدة 20 دقيقة على حرارة 121 مْ ، تركت لتبرد ثم لقحت ب 1 مل من معلقات بكتيرية محضرة من العزلات المراد اختبارها، وتم التحضين عند درجة حرارة 28 مع الرج 100 دورة/ دقيقة لمدة 48 ساعة بغرض نقع بذور الحمص المعقمة بها لمدة ساعة قبل زراعتها. قلعت النباتات بعد 8 أسابيع من الزراعة وسجل وجود أو غياب العقد على جذورها( Laranjo وزملاؤه، 2014). كما أخذ الوزن الجاف للنبات الكامل بعد تجفيفه على درجة حرارة 60 درجة مئوية حتى ثبات الوزن (FAO، 2007).

**3–3–2– تعريف البكتريا بالطرائق المجهرية والمزرعية والكيميائية الحيوية:**

أجريت الاختبارات التالية لتعريف البكتريا وهي: اختبار غرام بطريقة ( Suslow وزملاؤه، 1982)، اختبار الكاتالاز ( Goszczynska وزملاؤه، 2000) ، واستقلاب لاكتوز ( De oliveira وزملاؤه، 2007)، واختبار الأوكسيداز واختبار غلوكوز ببتون أغار وتحلل الجيلاتين بطريقة Frasier واختبار أكسدة السكريات والتبوغ وتحلل النشاء والتنفس (أبو غرة، 1997).

3-4-**الفطور المستخدمة بالدراسة:** تم الحصول على عزلات نقية ومعرفة لفطر *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* التي تسبب أعفان للبذور وجذور النباتات من مخبر أمراض النبات في قسم وقاية النبات . جامعة دمشق.

**3-4-1- إكثار الفطور:** تم إكثار الفطور بأخذ أقراص بقطر 5 مم من أطراف المستعمرات الفطرية بعمر 3 أيام ووضعت في مركز أطباق بتري تحتوي على بيئة بطاطا دكستروز آجار (PDA) وتم تحضينها على درجة حرارة 25 درجة مئوية لمدة 7أيام.

**3-4-2- اختبار القدرة التضادية لعزلات الريزوبيا (*Rhizobia*) ضد الفطريات المختبرة:**

تم تحضير الوسط YMA بشكل سائل في أنابيب اختبار بعدد عزلات البكتريا وتم تعقيمها بالأتوكلاف تم تلقيح الأنابيب بالعزلات البكتيرية وحضنت على درجة حرارة 28 درجة مئوية لمدة 48 – 72ساعة حتى ظهور العكارة.

تم تحضير وسط مغذ خليط من بيئة البطاطا دكستروز أجار ومستخلص الخميرة بمعدل(1:1) وعقمت بالاتوكلاف ثم صبت في أطباق بتري تم تلقيحها بالعزلات البكترية المحضرة مسبقا بمعدل 0.1 مل نشرت على كامل سطح الطبق تركت لمدة ساعة حتى يستقر اللقاح ثم بعد ذلك تم عدوى الأطباق بأقراص من المزارع الفطرية المدروسة، إذ أخذ من حافة كل مستعمرة فطرية أقراص بقطر 5 مم ومن ثم وضعت الأقراص في مركز الطبق الملقح سابقاً بالبكترياً وبمعدل ثلاثة مكررات لكل فطر وكل عزلة. وتمت عدوى أطباق بتري تحوي الوسط المغذي بالفطريات دون تلقيحه بالعزلات البكترية كمعاملة شاهد أيضاً بمعدل ثلاثة مكررات لكل فطر، ومن ثم حضنت الأطباق على درجة حرارة 25 درجة مئوية لمدة 7 أيام.

بعدها تم قياس قطر نمو الفطريات في أطباق المعاملة وقدُرت نسبة التثبيط وفقا للمعادلة:

تثبيط نمو المشيجة(%) = ((قطر المستعمرة في الشاهد – قطر المستعمرة بوجود الريزوبيا)/ قطر المستعمرة في الشاهد)*100 (Vincent، 1947).

**3-5- التحليل الإحصائي:** أجري التحليل الإحصائي بأخذ المتوسط الحسابي لثلاث مكررات تجريبية وتحليل البيانات باستخدام MSTAT-C واعتماداً على اختبار دونكان عند مستوى معنوية 0.05.

**4-النتائج والمناقشة:**

**4-1- تعريف البكتريا المعزولة باستخدام العدوى الاصطناعية والطرائق المجهرية والمزرعية والكيمياحيوية:**

**4-1-1-العدوى الاصطناعية :**

يعد نبات الحمص عالي التخصص في العلاقة التعايشية مع الرايزوبيا ، حيث تستعمر جذوره أنواع قليلة منها(Broughton و Petter، 1999؛ Laranjo وزملاؤه، 2008) ، تم عزل 15 عزلة بكتيرية من العقد الجذرية على نبات الحمص من مواقع مختلفة من محافظة السويداء. تبين بنتيجة العدوى الصناعية أن 10 عزلات بكتيرية قادرة على التعقد (شكلت عقد جذرية ) في حين أن باقي العزلات لم تشكل عقداً وهذا يتوافق مع( Pepol وزملاؤه، 2018) حيث أن سبب عدم تعقد بعض العزلات قد يكون عائداً إلى عدم انتماء البكتريا إلى الريزوبيا (تلوث) أو ربما ضعف كفاءة البكتريا أو عدم قدرتها على التأقلم مع الظروف البيئية. وقد تشكل العدد الأكبر من العقد الجذرية ( وردية اللون ) على طول الجذر الرئيسي قرب منطقة التاج الجذري وهذا يتوافق مع دراسة (Jakobsen، 1985 ؛ Andrews و Andrews ، 2017)

**الجدول رقم (1): التوزع الجغرافي للعزلات**

| اسم العزلة | منطقة الجمع |
|---|---|
| R3–R2 | سورية . السويداء . شهبا . شقا |
| R6 | سورية . السويداء . القريا |
| R5 | سورية . السويداء . نمرة القريا |
| R4 | سورية . السويداء . شهبا . المشنف |
| R7 | سورية . السويداء . شهبا . نمرة |
| R10 –R9 . R1 | سورية . السويداء . شهبا. العجيلات |
| R8 | سورية . السويداء . شهبا. طربا |

**4-1-2- إنتاجية المادة الجافة:**

أظهرت نتائج العدوى الصناعية تفوق النباتات المعاملة بالبكتيريا تفوقاً معنوياً في وزن المادة الجافة مقارنة بالشاهد غير المعامل بالبكتريا (0.8 غ. نبات$^{-1}$) الجدول (2). وكانت أعلى قيمة للوزن الجاف (2.61 غ.نبات$^{-1}$) في النباتات المعاملة بالعزلة (R1) أي بزيادة قدرها 226.25% على الشاهد. وكانت قيمة أقل فرق معنوي (LSD) مساويةً 0.16. وهذا يتوافق مع (Figueiredo وزملاؤه، 1998؛ Poole وآخرون، 2018) حيث تعتبر كمية الآزوت المثبت N2 أحد العوامل الهامة التي تؤثر بشكل مباشر في نمو الكتلة الحية للنبات، كما كانت العقد المتشكلة على الجذور وردية اللون ووفيرة العدد وكبيرة الحجم وذات لون أحمر في الداخل، وكان مظهر النباتات جيداً من حيث النمو واللون مقارنة مع نباتات الشاهد السلبي وهذا يدل على فعالية عالية للبكتيريا في كفاءة تثبيت الآزوت الجوي(Andrews وزملاؤه، 2013).

**الجدول رقم (2): متوسط الوزن الجاف لنباتات الحمص المعاملة بعزلات الريزوبيا (غ. نبات$^{-1}$).**

| اسم العزلة | متوسط وزن المادة الجافة (غ.نبات$^{-1}$) |
|---|---|
| R1 | 2.61 $^{a}$ |
| R2 | 2.41 $^{b}$ |
| R3 | 2.11 $^{de}$ |
| R4 | 2.15 $^{de}$ |
| R5 | 2.34 $^{bc}$ |
| R6 | 2.20 $^{cd}$ |
| R7 | 1.95 $^{fg}$ |
| R8 | 2.00 $^{ef}$ |
| R9 | 1.89 $^{f–h}$ |
| R10 | 1.80 $^{h}$ |
| شاهد سلبي | 0.8$^{i}$ |
| LSD | 0.16 |

عدم وجود أحرف مشتركة يعني وجود فرق معنوي على مستوى معنوية 0.05، الحرفان غير المتتاليان يعني المجال بين الحرف الأول والأخير (Duncan، 1995).

**4-1-3-تعريف البكتريا بالطرائق المجهرية والمزرعية والكيمياحيوية :**

تم اختبار ال 10 عزلات التي شكلت عقداً جذرية على جذور نبات الحمص بناءً على نتائج العدوى الاصطناعية حيث أظهرت نتائج العزل على الوسط الانتخابي YMA بعد 48 ساعة من التحضين مستعمرات كريمية اللون ، دائرية الشكل ، تامة الحواف، ومخاطية وهذا يتوافق مع الصفات الشكلية (المورفولوجية) للريزوبيا، كما أن كافة العزلات السابقة سالبة غرام (مجهرياً) ( Holt وزملاؤه، 1994).

بينت الاختبارات الكيمياحيوية (الجدول رقم (3)) أن كافة العزلات موجبة الكاتلاز. سالبة الاوكسيداز. قادرة على استخدام بعض السكريات كالزيلوز و المالتوز و الفركتوز ، الغالاكتوز والسكروز والمانيتول كمصدر الكربون تتوافق هذه النتائج مع صفات الرايزوبيا التي ذكرها Deora وزملاؤه (2010) و Erum و Bano (2008) و Kanika وزملاؤه (2010) و/ Teng وزملاؤه (2015). كما أنها تستقلب الغلوكوز وغير قادرة على استقلاب اللاكتوز وهذا يتوافق مع ما توصل إليه ( Oliveira وزملاؤه، 1997 )، جميع العزلات غير متبوغة وذات تأكسد هوائي وهذا يتوافق مع ( Rosenberg وزملاؤه، 2014). كما تميزت العزلات R1 و R7 بقدرتها على تحليل النشاء والعزلات R1 و R2 و R3 و R4 و R5 و R6 و R8 و R9 بتحليلها الجيلاتين.

**الجدول رقم (3): الخصائص الكيميائية الحيوية للعزلات المدروسة**

| اسم العزلة | غرام | كاتالاز | أوكسيداز | تحليل جيلاتين | تحليل نشاء | استقلاب لاكتوز | أكسدة مجموعة سكريات * | استقلاب غلكوز | التنفس |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| R1 | . | + | . | + | + | . | + | + | تأكسد هوائي |
| R2, R3, R4, R5, R6, R8, R9 | . | + | . | + | . | . | + | + | تأكسد هوائي |
| R10 | . | + | . | . | . | . | + | + | تأكسد هوائي |
| R7 | . | + | . | . | + | . | + | + | تأكسد هوائي |

*مجموعة السكريات هي (الزيلوز ، المالتوز ، الفركتوز ، الغالاكتوز ، السكروز ،المانيتول)

**4-2- التضاد الحيوي بين عزلات الريزوبيا والفطر *Fusarium oxysporum* و *Fusarium solani***

تظهر النتائج من الجدول رقم (4) أن فعالية التضاد لعزلات الريزوبيا المعزولة من العقد الجذرية لنبات الحمص تجاه الفطر المدروس تباينت وفقاً لنوع العزلة ونوع الفطر المدروس.

فقد تفوقت العزلة R1 معنوياً على باقي العزلات في تثبيط نمو فطر ***Fusarium* ssp.** إذ بلغت نسبة التثبيط 97.8 و 66.3 % لكل من الفطرين ***Fusarium oxysporum*** و ***Fusarium solani*** على الترتيب. تلتها العزلة R2 بنسبة تثبيط لنمو الفطرين ***Fusarium oxysporum*** و ***Fusarium solani*** بلغت 95.6 و 65.5 % على الترتيب، بينما أعطت باقي عزلات الريزوبيا تاثيراً عالي إلى متوسط في تثبيط نمو الفطر ***F. oxysporum*** وتأثيراً متوسطاً في تثبيط نمو الفطر ***F. solani***، كما سجلت العزلة R10 أدنى قيمة في تثبيط نمو كلا الفطرين المختبرين على الوسط المغذي. وقد يعود تأثير الريزوبيا في تثبيط الفطريات الممرضة للنبات كونها تغير في تركيبة المواد الغذائية (Arora وزملاؤه ، 2001 ) أو لقدرتها على مقاومة المضادات الحيوية لاحتوائها على أنزيمات البيتا لاكتاماز، أو إنتاجها لبعض المركبات المضادة لنمو الفطريات، أو إفرازها أنزيمات تحلل المشيجة الفطرية (Deshwal وزملاؤه، 2003) تتوافق هذه النتائج كذلك مع (Ozkoc و Deliveli ، 2001؛ Arfaoui وزملاؤه، 2006 ؛ Hmissi وزملاؤه، 2011 ؛ Matloob و Alkaif ، 2015). ومن جهة أخرى أعطت عزلات الريزوبيا المختبرة تفوقاً معنوياً في التضاد( تضادية عالية) تجاه الفطر *Fusarium oxysporum* مقارنة بالفطر *Fusarium solani* تتوافق هذه النتائج مع (Kanouni وزملاؤه ، 2018) الذي أكد أن عزلات الريزوبيا المعزولة من الحمص تباينت في تثبيط الفطريات الممرضة حسب العزلة ونوع الفطر الممرض.

**الجدول رقم (4): النسبة المئوية لتثبيط عزلات الريزوبيوم المعزولة من العقد الجذرية لجذور الحمص على نمو Fusarium oxysporum و Fusarium solani الممرضة للنباتات في الوسط المغذى (PDA–YAM) بعد التحضين لمدة 7 أيام.**

| اسم العزلة | فطر Fusarium ssp. | |
|---|---|---|
| | **Fusarium oxysporum** | **Fusarium solani** |
| | النسبة المئوية لتثبيط النمو (%) | |
| R1 | 97.8A | 66.3A |
| R2 | 95.6B | 65.5A |
| R3 | 72.7F | 57.23D |
| R4 | 78.6E | 57.8D |
| R5 | 88C | 62.3B |
| R6 | 81.2D | 60.1C |
| R7 | 70.60H | 53.4EF |
| R8 | 71.83G | 54.1E |
| R9 | 70.29HI | 51.31FG |
| R10 | 70.08I | 49.3G |
| LSD | 0.402 | 2.122 |

**عدم وجود أحرف مشتركة يعني وجود فرق معنوي على مستوى معنوية 0.05 (Duncan، 1995)**

**5-الاستنتاجات والتوصيات:**

**5-1-الاستنتاجات:**

1. تم الحصول على عزلات نقية، تتبع عائلة الرايزوبيا بناءً على صفاتها الكيميائية الحيوية والمجهرية والمزرعية، متعايشة مع جذور نبات الحمص و قادرة على تشكيل عقد جذرية .

2. أعطت عزلات الريزوبيا المعزولة من العقد الجذرية لنبات الحمص تضاداً حيوياً عالياً تجاه الفطر ***Fusarium oxysporum*** ومتوسط تجاه الفطر ***Fusarium solani*** .

**5-2-التوصيات:**

1. إجراء تجارب التضاد تحت الظروف الحقلية ومعرفة الشروط البيئية المثلى لنجاحها.

2. إجراء دراسات مماثلة على عزلات من مختلف المناطق في سورية.

**6-المراجع:**

1. أبو غرة، محمود . (1997). أمراض النبات البكتيرية (النظري والعملي). دمشق: منشورات جامعة دمشق، ص: 350-359.

1-Agrios, M., (2005). A Plant Pathology, Academic Press, New York. pp. 948.

2-Akhter, S. H., (2014). Interactions between Rhizobium, antagonistic bacteria and fungal pathogens in fababean. Master's Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Department of Forest Mycology and Plant Pathology. Swedish.

3- Andrews, M., and Andrews, M. E., (2017) Specificity in legume-rhizobia symbioses. Int. J. Mol. Sci., 18: 705.

4- Andrews, M., Raven, J. A., and Lea, P. J. (2013). Do plants need nitrate? The mechanisms by which nitrogen form affects plants. Ann. Appl. Biol., 163: 174–199.

5-Arfaoui, A. B., Sifi, B. A., Boudabous, A. M., El-Hadrami,I., and Cherif M. A., (2006). Identification of Rhizobium isolates possessing antagonistic activity against Fusarium oxysporum f.sp. ciceris, The causal agent of Fusarium wilt of Chickpea. J Plant Patho., 88: 67-75.

6-Arora, N. K., Kang, S.C., and Maheshwari, D. K., (2001). Isolation of siderophore producing strains of Rhizobium meliloti and their biocontrol potential against Macrophomina phaseolina that causes charcoal rot of groundnut. Curr Sci., 81: 673-677.

7-Broughton, W. J., and Perret, X., (1999). Genealogy of legume- Rhizobium symbioses. Current Opinion in Plant Biology, 2: 305-311.

8-Chabot, R., Antoun, H., and Cescas, M.P., (1996). Growth promotion of maize and lettuce by phosphate –solubilizing Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli. plant and soil, 184: 311-321.

9-De Lajudie, P., Laurent-Fulele, E., Willems, A., Torck, U., Coopman, R., Collins, M. et al., (1998[a]). Allorhizobium undicola gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently

nodulate Neptunia natans in Senegal. International Journal of Systematic Bacteriology, 48 (4): 1277-1290.

10-De Oliveira, A. N., De Oliveira, L. A., Andrade, J. S., and Chagas, J. A. F., (2007). Rhizobia amylase production using various starchy substances as carbon substrates .Brazilian Journal of Microbiology, 38: 208-216.

11-Deora, G.S., and Singhal, K., (2010). Isolation, biochemical characterization and preparation of bio fertilizers using Rhizobium strains for commercial use. Bioscience Biotechnology research Communications, 3 (2): 132-136.

12-Deshwal, V. K., Pandey, P., Kang, S. K., and Maheshwari, D. K., (2003). Rhizobia as biological control agent against soil borne plant pathogenic fungi. Indian J Exp Biol.,41: 1160-1164.

13-Duncan, D. B., (1995). Multiple rang and multiple F test. . Biometrics, 11: 1-53.

14-Ehteshamul-Haque, S. and Ghaffar, A., (2008). Use of Rhizobia in the Control of Root Rot Diseases of Sunflower, Okra, Soybean and Mungbean. J. Phytol., 138: 157-163.

15-Erum, Sh., and Bano, A., (2008). Variation in phytohormone production in Rhizobium Strains at Different Altitudes of Northern Areas of Pakistan. International journal of agriculture and biology Pakistan, 10(5): 536-540.

16-Essalmani, H, and Lahlou, H., (2002). In vitro antagonistic activity of some microorganisms towards Fusarium oxysporum f.sp.lentis. Cryptogamie-Mycol, 23: 221-234.

17-FAO. (2007). Methods of analysis for soils of arid and semi arid regions. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy.

18-Figueiredo, M. V. B., Burity, H. A., and De France, F. P., (1998). Water Deficit Stress on N2 Fixation in Cowpea Inoculated with Different *Bradyrhizobium* Strains. Can. J. Plant Sci., 78: 577-582

19-Goszczynska, T., Serfontein, J. J., and Serfontein, S., (2000). Introduction to practical phytobacteriology (A manual for phytobacteriology), first edition. Safrient- loop of bionet-international c/o ARC – plant protection research institute. Pretoria, p: 83.

20-Heichel, G. H., and Henjum, K. I., (1991). Dinitrogen fixation , nitrogen transfer and productivity of forage legume grass communities. Crop Sci., 31: 202- 208.

21-Hmissi, I., Gargouri, S., and Sifi, B., (2011). Attempt of wheat protection against Fusarium culmorum using Rhizobium isolates. Tunis J Plant Prot., 6: 75-86.

22-Holt, J. G., Kreig, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., and Williams. S. T., (1994). Berge's Manual of Determinative Bacteriology. 9th. ed., Williams and Wilknis, Baltimore, U.S.A, p: 40-169.

23-Jakobsen. I., (1985). The role of phosphorus in nitrogen fixation by young pea plans (Pisum sativum). Physiol. Plant, 64: 190-196.

24-Jarvis, B., Berkum, V.P., Chen, W., Nour, S., Fernandez, M., Cleyet-Marel, J., and Gills, M., (1997). Transfer of Rhizobium loti, Rhizobium huakuii, Rhizobium ciceri, Rhizobium mediterraneum, and Rhizobium tianshanense to Mesorhizobium gen. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 47(3): 895-898.

25-Kanika, M., Dogra, T., and Nain, L., (2010). Biochemical and Molecular Characterization of Mesorhizobium ciceri Containing acdS Gene. J. Plant Biochemistry & Biotechnology India, 19 (1): 107-110.

26-Kanouni, L., Larous, L., and Mezaache-Aichour, S., (2018). Inhibitory Effect of Rhizobia Isolated from Several Leguminous against Phytopathogenic Fungi. Annual Research & Review in Biology, 22(6): 1-16.

27- Laranjo, M., Alexandre, A., and Oliveira, S., (2014). Legume growth-promoting rhizobia: an overview on the Mesorhizobium genus. Microbiol Res., 169 (1): 2-17.

28- Laranjo, M., Alexandre, A., Velazques, E., Young, J. P. W., and Oliveire, S., (2008). Chickpea rhizobia symbiosis genes are highly conserved across multiple Mesorhizobium species. FEMS Microbiology Ecology Oxford, 66 (1): 391-400.

29-Maloy, O., (1993). Plant disease control, principles and practice, fungicide characteristics. John Wiley, New York.

30-Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., and Batut, J., (2009). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes?. Trends in microbiology, 17 (10): 458-466.

31-Matloob, A. H., and Alkaif, M., (2015). Molecular identification of some Fungi caused Broad bean root and crown disease controlled by using Rhizobium leguminosarum biovar viciae bacteria and Bioagents Trichoderma viride in the province of Babylon. Journal Al furat for the Agricultural Sciences, 7 (4) : 386-370

32-Mousavi, S.A., Österman, J., Wahlberg, N., Nesme, X., Lavire, C., Vial, L., Paulin, L., De Lajudie, P., and Lindstrom, K., (2014). Phylogeny of the Rhizobium–Allorhizobium–Agrobacterium clade supports the delineation of Neorhizobium gen. nov. Systematic and applied microbiology, 37 (3): 208-215.

33-Mousavi, S.A., Willems, A., Nesme, X., De Lajudie, P. and Lindstrom, K., (2015). Revised phylogeny of Rhizobiaceae: proposal of the delineation of Pararhizobium gen. nov., and 13 new species combinations. Systematic and applied microbiology, 38 (2): 84-90.

34-Oliveira, A., Ferreira, E. M., and Pampulha, M. E., (1997). Nitrogen Fixation , nodulation and yield of clover plants co-inoculated with root –colonizing bacteria. Symbioses, 23: 35-46.

35-Ozgonen, H., and Gulcu, M., 2011. Determination of mycoflora of pea (Pisum sativum) seeds and the effects of Rhizobium leguminosorum on fungal pathogens of peas. Afr J Biotechnol., 10: 6235-6240.

36-Ozkoc, I, M., and Deliveli, H., (2001). In vitro inhibition of the mycelial growth of some root rot fungi by Rhizobium leguminosarum biovar. phaseoli isolates. Turk. J. Biol., 25: 435-445.

37-Peoples, M. B., Herridge, D. F., and Ladha, J. K., (1995). Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production?. Plant and soil, 174 (1-2): 3-28.

38-Pieterse, C., Van Pelt, J. A., Van Wees, S. C. M., Ton, J., Léon-Kloosterziel, K. M., Keurentjes, J. J. B., Verhagen, B. W. M., Knoester, M., Van der Sluis, I., Bakker, B. A., and Van Loon, L. C., (2001). Rhizobacteriamediatedinduced resistance: Triggering, signaling and expression. Eur. J. Plant Pathol., 107: 51-61.

39-Poole, P., Ramachandran, V., and Terpolilli, J., (2018). Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts. Nat. Rev. Microbiol, 16: 291–303.

40-Rosenberg, E., Delong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., and Thompson, F., (2014). The Prokaryotes. 4th ed., Springer-Verlag, Berlin.

41-Shaban, W. I., and El-Bramawy, M. A. (2011). Impact of dual inoculation with Rhizobium and Trichoderma on damping off, root rot diseases and plant growth parameters of some legumes field crop under greenhouse conditions. International Res. J. of Agri. Sci. and Soil Sci., 3: 098-108.

42-Sprent, J. I., Ardley, J., and James, E. K., (2017). Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. New Phytol, 215: 40–56.

43-Suslow, T.V., Schroth, M. N., and Isaka, M., (1982). Application of a Rapid Method for Gram Differentiation of Plant Pathogenic and Saprophytic Bacteria without Staining, Phytopathology Magazine. U.S.A., 72 (3): 917-918.

44-Teng, Y., Wang, X., Li, L., Li, Z., and Luo, Y., (2015). Rhizobia and their bio-partners as novel drivers for functional remediation in contaminated soils. Frontiers in plant science. 6(32).

45-Triplett, E. W., (1990). Construction of a symbiotically effective strain of Rhizobium and Bradyrhizobium bv. trifolii with increased nodulation competitiveness. Applied and Environmental Microbiology, 56: 98-103.

46-Vincent, J. M., (1947). Distortion of fungal hyphae in presence of certain inhibitors. Nature, PP: 850-853.

47-Young, J. M, Kuykendall, L.D., Martinez-Romero, E., Kerr, A., and Sawada, H., (2001). Rhizobium radiobacter, R. rhizogenes, R. rubi, R. undicola and R. Vitis. International journal of systematic and Evaluationary Microbiology, 51: 89-103.