تأثير غمر شتلات الفلفل المصابة بفايروس موزائيك الخيار بمعلق البكتريا

Trichoderma harzianum T-22 والفطر *Azospirillum brasilense*

على انزيمي البيروكسديز وبولي فينول اوكسديز

سيلدا محمد بكر نبيل عزيز قاسم بسام يحيى إبراهيم

وزارة الزراعة / مديرية زراعة كركوك قسم وقاية النبات / كلية الزراعة والغابات ــ جامعة الموصل

seldambc@gmail.com dr.nabel.aziz@uomosul.edu.iq bassamy1966@uomosul.edu.iq

- تاريخ استلام البحث 3/4/2022 وقبوله 28/4/2022
- البحث مستل من أطروحة الدكتوراه للباحث الأول.

الخلاصة

أظهرت نتائج التشخيص المصلي باستعمال اختبار الاليزا الثلاثية TAS-ELISA وجود فايروس موزائيك الخيار في العينات التي جلبت من الحقول المحيطة بمدينة الموصل المزروعة بـ نباتات الخيار . بينت نتائج معاملة بذور الفلفل بالفطر *Trichoderma harizanum T-22* و البكتريا *Azospirillum brasilense* زيادة فعالية إنزيمي البيروكسديز وانزيم الاوكسديز متعدد الفينول ومحتوى الفينولات في النباتات المصابة بفايروس موزائيك الخيار . حيث سجلت اعلى قيم للزيادة في فعالية إنزيم البيروكسديز في اليوم الثلاثين من المعاملة بالفطر T-22 *T. harizanum* بواقع ٤٧٤.٢١ (وحدة .دقيقة.غم وزن رطب$^{-١}$) بينما كانت فاعلية الانزيم منخفضه في نباتات المقارنة بواقع ١٦١.٤ (وحدة .دقيقة.غم وزن رطب$^{-١}$). وأظهرت معاملة خليط البكتريا *A.brasilense* والفطرT-22 *T.harizanum* اعلى مستوى لفعالية انزيم الاوكسديز متعدد الفينول بواقع ٣٤٥.٣٧ (وحدة .دقيقة.غم وزن رطب$^{-١}$) بعد ثلاثين يوما من المعاملة وفي نباتات المقارنة كانت فعالية الإنزيم ١٢٧.١ (وحدة .دقيقة.غم وزن رطب$^{-١}$) . وبينت نتائج التقدير الكمي للفينولات الكلية بعد ثلاثين يوما من المعاملة تفوق معاملة خليط البكتريا *A.brasilense* والفطرT-22 *T.harizanum* بواقع ١.٣٥ (ملغم.غم وزن رطب$^{-١}$) بينما كان ادنى مستوى للفينولات في معاملة المقارنة بواقع ٠.٨٥ (وحدة .دقيقة.غم وزن رطب$^{-١}$).

الكلمات المفتاحية : *Azospirillum brasilense* ، *Trichoderma harizanum T-22* ، انزيم البيروكسديز

Effect of immersion seedlings of capsicum annuum that infected with cucumber mosaic virus in suspension of bacteria Azospirillum brasilense and Trichoderma harzianum T-22 on the peroxidase and polyphenol oxidase.

Selda Mohammed Baker **Nabil Aziz Kassim** **Bassam Yahya Ibrahim**

Ministry of Agriculture **Department of Plant Protection**

Directorate of Agriculture of Kirkuk **College of Agriculture and Forestry, University of Mosul**

seldambc@gmail.com dr.nabel.aziz@uomosul.edu.iq bassamy1966@uomosul.edu.iq

- **Date of research received 3/4/2022 and accepted 28/4/2022.**
- **Part of PhD. dissertation for the first author.**

Abstract

The result of serological diagnosis using TAS-ELISA test showed presence of cucumber mosaic virus in samples of squash plant from the fields in Mosul city .pepper seeds treated with *Trichoderma harizanum* T-22 and *Azospirillum brasilense* caused an increase in peroxidase enzyme, polyphenol oxidase enzymes activity and phenol content in plants infected with cucumber mosaic

virus .Where the highest values of increasing activity were recorded. peroxidase on the thirtieth day after infection with the virus in T. *harizanum* T-22 treatment with 474.21 (unit. min.g wet weight^{-1}) while the activity of the enzyme was 161.4 (unit. .min.g wet weight^{-1}) in control treatment . mixture of *A.brasilense* and *T.harizanum* T-22 treatment showed the highest level of polyphenol oxidase activity with 345.37 (unit. min.g wet weight^{-1}) after thirty days of treatment. In control treatment plants, the enzyme activity was 127.1 (unit. min.g wet weight^{-1}) .

The highest amount of total phenols was recorded in mixture of *A.brasilense* and *T.harizanum* T-22 treatment with 1.35(mg.g wet weight^{-1}), while the lowest amount was 0.85 (mg.g wet weight^{-1}) in control treatment ..

Key words: ***Azospirillum brasilense* ,*Trichoderma harzianum* T-22 ,**

المقدمة

تسبب فايروسات النبات خسائر سنوية في المحاصيل الزراعية في جميع انحاء العالم تصل الى ٣٠ مليار دولار سنويا. اذ ليس من السهولة مكافحة الامراض الفايروسية داخل النبات بسبب طبيعة الفايروس وطريقة تطفله لذلك لا توجد اية مبيدات فايروسية يسهل استعمالها كما هو الحال مع المسببات المرضية الأخرى كالفطريات والديدان الثعبانية لذلك اتجهت الجهود نحو مكافحة الناقل للفايروس او إيجاد مواد تدعم وتزيد من المقاومة التي يظهرها النبات ضد الإصابة الفايروسية ومنها استخدام الاحياء المجهرية المعززة لنمو النبات كأحد الخيارات التي توفر للنبات وضعا صحيا جيدا تستطيع من خلال تحمل الإصابة الفايروسية فضلا عن كون هذه المركبات صديقة للبيئة وقليلة التلويث(Chauhan وآخرون ، ٢٠١٩ و Sastry واخرون ، ٢٠١٤).استعملت الفطريات التي تنتمي الى جنسس *Trichoderma* sp لمقاومة الامراض النباتية فضلا عن تأثيراتها المفيدة على النباتات من خلال تعزيز نمو النبات وتحسين كفاءة التمثيل الضوئي (Shoresh واخرون ، ٢٠١٠) وتحرض هذه الكائنات اليات مقاومة مشابهة الى الية تفاعل فرط الحساسية Hypersensitive reaction والمقاومة المستحثة الجهازية Systemic acquired resistance(SAR) والمقاومة الجهازية المكتسبة induced systemic resistance (ISR) في النباتات (Benítez واخرون ، ٢٠٠٤ Harman واخرون ٢٠٠٤) .

تعد السلالة T-22 من الفطر *Trichoderma harzianum* المكون النشط للمنتجات المسجلة والمستخدمة على نطاق واسع في مكافحة امراض النبات التي تسببها الفطريات والبكتريا والفايروسات (Luo واخرون ، ٢٠١٠) . وسجلت قدرة السلالة T-22 في مقاومة فايروس موزائيك الخيار (Vitti واخرون ، ٢٠١٦) كما استعملت ايضا البكتريا المعززة لنمو النبات Growth-Plant Promoting Rizobacteria(PGPR) في مقاومة الامراض النباتية (Compant واخرون ٢٠٠٥ أ) .

المواد وطرائق العمل

جمع العينات وتشخيص الفايروس

جمعت العينات النباتية التي ظهرت على اوراقها الاعراض الشديدة للموزائيك من حقول الخيار في محافظة نينوى ، اجري التشخيص المصلي لكافة العينات بتحضير عصير أوراق العينات بسحقها في هاون خزفي معقم مع ١٠ مل من محلول الاستخلاص المنظم ذو الدالة الحامضة pH7 ورشح العصير بطبقة من الموسلين ، واخذ الرائق واخضع لأختبار الاليزا الثلاثية باستعمال طقم الاليزا الثلاثية Triple Antibody Sandwich-ELISA (TAS-ELISA)

١. اضيف ١٠٠ مايكروليتر من محلول الاضداد اللاقطة (Capture Antibodies) لكل حفرة باستعمال الماصة الدقيقة
٢. اضيف ١٠٠ مايكروليتر من محلول الاضداد اللاقطة (Capture Antibodies) لكل حفرة باستعمال الماصة الدقيقة .
٣. غسلت حفر الطبق بالمحلول المنظم وكررت العملية بفاصلة خمس دقائق بين الغسلتين مع قلب الطبق على ورق تنشيف للتخلص من المحلول المنظم
٤. اضيف ١٠٠ مايكروليتر من العصير الفايروسي وبواقع حفرتين لكل عينة ، واضيف عصير نباتي سليم الى حفرة كمقارنة سالبة واضيف العصير الفايروسي المقارنة الموجبة المجهز من قبل الشركة المنتجة .

٥. وضعَ الطبق في صندوق رطب وحضن داخل الثلاجة على درجة ٤ مْ لمدة ٢٤ ساعة.

٦. غسل الطبق بالمحلول المنظم وكررت عملية الغسل سبع مرات.

٧. اضيف ١٠٠مايكروليتر من خليط مكون من ٥٠ مايكروليتر من المحلول اضداد الارنب Detection antibody مع ٥٠ مايكروليتر من اضدادا اضداد الارنب المحضر في الفأر conjugate(المترابط).

٨. وضع الطبق داخل صندوق رطب وترك على درجة حرارة الغرفه لمدة ٤ ساعات .

٩. غسل الطبق وكررت العملية ثماني مرات .

١٠. اضيف ١٠٠ ميكروليتر من محلول المادة الأساس P-Nitrophenol phosphate PNP لكل حفرة ووضع الطبق في صندوق رطب وحضن لمدة ساعة واحدة مع مراعاة عدم تعريض الطبق للضوء المباشر.

١١. اضيف ٥٠ ميكروليتر من محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH عيارية ٣ مولر الى كل الحفر المستعملة لايقاف التفاعل.

١٢. تم تقييم النتائج من خلال اجراء الفحص البصري لمشاهدة اللون الأصفر في حفر العينات التي تحتوي على العصير النباتي المصاب ، إضافة الى فحص حفر الطبق طيفيا بواسطة جهاز قارئ الاليزا ELISA Reader على الطول الموجي ٤٠٥ نانومتر.

وتم تثبيت عزلة الفايروس على نباتات الخيار وحضر العصير النباتي الخام الحاوي على الفايروس من الأوراق النباتية الحديثة النمو بسحق٣ غم من أوراق العينة ، في هاون خزفي مع ٤ مل من المنظم الفوسفاتي KH_2PO_4 ذي عيارية ٠.٠١ مولاري/ لتر ودالة حامضية ٧ pH ، ورشح المستخلص خلال قماش الموسلين تم تلقيح نباتات خيار بمرحلة نمو ٤-٦ أوراق بعد تعفيرها بمسحوق الكاربوراندم ٦٠٠ مش،غسلت الاوراق بماء لعدة ثواني وتركت في البيت البلاستيكي لمتابعة ظهور الاعراض وتم تجديد العزلة كل شهرين.

اختبار كفاءة البكتريا *A. brasilense* والفطر T-22 *T. harzianum* في استحثاث المقاومة الجهازية في نبات الفلفل ضد فايروس موزائيك الخيار

استعمل معلق الخلايا البكتريا *Azospirillum brasilense* بتركيز ١×١٠ ^٦ خلية . مل^-١ والمنتج من قبل شركة Bactogen. ومعلق ابواغ الفطر *Trichoderma harzianumT-22* بتركيز ٤×١٠ ^٦ بوغ . مل^-١ والمنتج من قبل شركة Bioglobal في معاملات استحثاث المقاومة الجهازية ضد فايروس موزائيك الخيار وذلك بإضافة ٥غم من كل مستحضر على حدة في نصف لتر ماء مقطر معقم وحسب تعليمات الشركتين المنتجتين واستعملت المستحضرات في معاملة بذور نباتات الفلفل .

معاملة البذور بمعلق ابواغ الفطر *Trichoderma harzianum* T- 22

وضعت البذور في قدح زجاجي معقم يحوي على معلق الفطر بتركيز ٤×١٠ ^٦ بوغ . مل^-١ لمدة ٣٠ دقيقة ، بعد انتهاء مدة النقع جففت البذور بوضعها بين ورقتي ترشيح معقمتين .

معاملة البذور بمعلق البكتريا *Azospirillum brasilense* :

وضعت البذور في قدح زجاجي معقم يحوي على معلق البكتريا بتركيز ١× ١٠ ^٦ . مل^-١ ولمدة ٣٠ دقيقة وبعد انتهاء مدة النقع جففت البذور بوضعها بين ورقتي ترشيح.

معاملة البذور بمعلق ابواغ الفطر *Trichoderma harzianum* T-22.:

وضعت البذور في قدح زجاجي معقم يحوي على معلق الفطر بتركيز ٤×١٠ ^٦ بوغ . مل^-١ لمدة ٣٠ دقيقة ، بعد انتهاء مدة النقع جففت البذور بوضعها بين ورقتي ترشيح معقمتين .

معاملة البذور بمعلق خليط ابواغ الفطر ومعلق البكتريا

نقعت البذور في قدح زجاجي معقم يحوي على كمية متساوية من مستحضر الفطر ومعلق البكتريا لمدة ٣٠ دقيقة وجففت بوضعها بين ورقتي الترشيح .

زرعت بذور المعاملات الثلاث في مستنبتات وبعد وصول النباتات الى مرحلة نمو ثلاث أوراق نقلت الى أصص تحوي تربة مزيجية معقمة بمركب OXY (٤% ethane peroxy acid و١٤% active oxygen) بواقع شتلة واحدة لكل اصيص ثم وزعت الاصص الى اربع معاملات بحيث ضمت كل معاملة ستة اصص وكمايلي:-

١- شتلات غير معاملة بذورها بعوامل الاستحثاث وملقحة بالفايروس بمرحلة نمو ٤-٦ أوراق (المقارنة).

٢- شتلات بذورها معاملة بمعلق ابواغ الفطر وملقحة بفايروس موزائيك الخيار بمرحلة نمو ٤-٦ أوراق .

٣- شتلات بذورها معاملة بمعلق البكتريا وملقحة بفايروس موزائيك الخيار بمرحلة نمو ٤-٦ أوراق.

٤- شتلات بذورها معاملة بخليط معلق ابواغ الفطر ومعلق البكتريا وملقحة بفايروس موزائيك الخيار بمرحلة نمو ٤-٦ أوراق.

اخذت عينات من اوراق جميع المعاملات بعد ٢٤ ساعة و٧ أيام و١٥ يوم و٣٠ يوم من التلقيح بالفايروس ، ووضعت في أكياس نايلون وحفظت العينات في المجمدة لحين تقديرفعالية إنزيمي البيروكسديز وانزيم الاوكسديز متعدد الفينول ومحتوى الفينولات .

نفذت التجربة باستخدام تصميم القطاعات العشوائية الكاملة (RCBD) وبواقع ستة قطاعات واحتوت كل وحدة تجريبية على نبات واحد

واختبرت المتوسطات باستخدام اختبار دنكن المتعدد المدى وفق نظام Duncan Multiple Range test SAS (الراوي وعبد العزيز ٢٠٠٠).

تحضير مستخلص الانزيم الخام

حضر مستخلص الانزيم الخام وفقا للطريقة الموصوفة من قبل Pitotti واخرون(١٩٩٤) حيث سحق نصف غرام من اوراق نباتات الفلفل مع ١٠ مل من دارئ فوسفات البوتاسيوم البارد Potassium Phosphate Buffer عيارية (٠.١ مولر) ذو أس هيدروجيني pH 7 في هاون خزفي معقم . رشح المستخلص من خلال ورق الترشيح نوع Whatman No.1 واخضع الراشح للانتباذ باستخدام جهاز انتباذ بسرعة ٤٠٠٠ دورة . دقيقة لمدة ١٠ دقائق أخذ الراشح وتم حفظه تحت ظروف التجميد لحين تقدير فعالية الإنزيمات .

تقدير فعالية إنزيم البروكسيديز(وحدة.دقيقة$^{-1}$.غرام وزن طري$^{-1}$)

تم تقدير فعالية إنزيم البروكسيديز وفقاً للطريقة الموصوفة من قبل Müftügil (1985) حيث اضيف ٢ مل من مزيج التفاعل المكون من ١ مل من H_2O_2 بتركيز ١.٠ % (يحضر انيا) و ١ مل من الكوايكول (اذابة ١.٣٦ مل من الكوايكول في دورق حجمي سعة ٢٥٠ مل ثم اكمل الحجم باستخدام الماء المقطر) في خلية المطياف الضوئي spectrophotometer ثم أضيف ٠.١ مل من العينة وتمت متابعة التغير في إمتصاص الضوء كل ٣٠ ثانية ولمدة ٣ دقائق عند طول موجي 420 نانوميتر. ثم حسبت عدد وحدات الانزيم . مل$^{-1}$ وفق المعادلة التالية .

$$\text{(عدد وحدات الإنزيم / مل)} = \frac{\Delta\text{أ قراءة الجهاز} \times ٣}{\Delta\text{ن} \times ٠.٠٠١}$$

Δ أ: التغيير في امتصاص الضوء .

Δ ن: المدة الزمنية المستغرقة للتغيير في الامتصاص.

الوحدة الواحدة من الإنزيم (كمية الإنزيم التي تسبب زيادة في إمتصاص الضوء مقدارها ٠.٠١ وحدة في الدقيقة الواحدة عند طول موجي مقداره ٤٢٠ نانوميتر).

تقدير فعالية الاوكسديز متعدد الفينول (وحدة.دقيقة.غرام وزن طري$^{-١}$)

تم تقدير فعالية الأنزيم اوكسيديز متعدد الفينول وفقاً للطريقة الموصوفة من قبل حمزة (٢٠٠٧). قيست فعالية انزيم الاوكسديز متعدد الفينول باضافة (١ مل من محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ ٠.٢ مولر واس هيدروجيني pH٧ و ١ مل من محلول كاتيكول (اذابة ٠.٢٤٨ غم من الكاتيكول في كمية من محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ واكمل الحجم الى ١٠٠ مل) و ١ مل من مستخلص النبات الخام) في خلية المطياف الضوئي spectrophotometer وتمت متابعة التغير في إمتصاص الضوء كل ٣٠ ثانية ولمدة ٣ دقائق عند طول موجي 420 نانوميتر. وأخذت النتائج بتسجيل القراءات لثلاثة مكررات من كل معاملة. وتم حساب فعالية الإنزيم من المعادلة الآتية:

$$\text{(عدد وحدات الإنزيم / مل)} = \frac{\Delta\text{أ قراءة الجهاز} \times ٣}{\Delta\text{ن} \times ٠,٠٠١}$$

Δ أ: التغيير في امتصاص الضوء .

Δ ن: المدة الزمنية المستغرقة للتغيير في الامتصاص.

الوحدة الواحدة من الإنزيم (كمية الإنزيم التي تسبب زيادة في امتصاص الضوء مقدارها ٠,٠١ وحدة في الدقيقة الواحدة عند طول موجي مقداره ٤٢٠ نانوميتر).

التقدير الكمي للفينولات الكلية (ملغرام .غرام وزن طري$^{-١}$)

استخدمت طريقة الاستخلاص بالميثانول: ماء ٨٠:٢٠ وفق ما ذكره Aberoumand و Deokule (٢٠٠٨) و Chandra وآخرون (٢٠١٤). تم سحق ٠.٥ غم من اوراق نباتات الفلفل مع ١٠ مل من دارئ فوسفات البوتاسيوم البارد Potassium Phosphate Buffer ٠.١ مولر ذو أس هيدروجيني pH 7 في هاون خزفي معقم . رشح من خلال ورق الترشيح ثم اخضع الراشح لعملية الانتباذ بسرعة ٤٠٠٠ دورة . دقيقة لمدة ١٠ دقائق أخذ الراشح وتم حفظه تحت ظروف التجميد لحين تقدير فعالية الفينولات .

قدرت الفينولات الكلية بطريقة Singleton and Rossir والمستخدم فيها Folin- Ciocalteu Phenol Reagent وكما يلي :

١-أخذ٠.٢ مل من المستخلص الفينولي- الكحولي في أنبوبة اختبار

٢- اضيف له ٠.٦ مل ماء مقطر

٣- اضاف له ٠.١ مل من الدليل Folin-Ciocalteu Reagent

٤-تترك لمدة خمس دقائق في جو المختبر ثم يضاف للخليط ١ مل من٨% كاربونات الصوديوم وتخلط جيدا بالتحريك وتترك في جو مظلم لمدة نصف ساعة

٥- اكمل الحجم الى ٣ مل بالماء المقطر

٦- تقرأ الامتصاصية على طول موجي ٧٥٠ نانوميتر.

قدرت الفينولات الكلية بالاسقاط على منحنى ألـ Gallic Acid والمحضر بنفس الطريقة بكميات من ٥٠ - ٢٥٠ ميكروغرام مل$^{-١}$ في المستخلص الكحولي للميثانول. وحسبت بعدها كمية الفينولات (ملغ .غم وزن طري$^{-١}$).

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج التشخيص المصلي باستعمال اختبار الاليزا ذو الاحتواء الثلاثي TAS-ELISA لكافة العينات الحقلية التي جمعت على وجود فايروس موزائيك الخيار نتيجة ظهور اللون الأصفر في حفر العينات الموجبة . أشار قاسم (٢٠١٥) الى حساسية هذا الاختبار في الكشف عن الفايروسات وكذلك عن تراكيز منخفضة لها في العصير النباتي تصل بين ١-١٠ نانوغرام / مل عصير نباتي كما تستعمل نوعي الاضداد متعدد النسيلة ووحيدة النسيلة كما انه يستعمل بشكل واسع للكشف عن السلالات الأنواع الفايروسية. واستخدم اختبار الاليزا الثلاثية من قبل Yu واخرون (٢٠٠٥) حيث تم اختبار ١٩٧ عينة جمعت من ست مقاطعات في الصين وعثر على ١٣٠ عينة مصابة بفايروس موزائيك الخيار من بينها ٩٣.١ % من سلالات المجموعة الأولى و ٦.٩% من سلالات المجموعة الثانية . وتمكن Shang واخرون (٢٠١١) من الكشف عن فايروس موزائيك التبرقش الأخضر للخيار باستعمال الاختبار المذكور وأيضا لتقدير تركيز الفايروس حيث كانت بقيمة ٠.٠٤ نانوغرام / مل العصير النباتي.

تاثير معاملة بذور الفلفل قبل الزراعة بالفطر *T.harzianum T-22* والبكتريا *A. brasilense* وخليطهما في مستوى فاعلية انزيم البيروكسديز

يلخص الجدول (١) تاثير مواعيد المعاملات في نباتات الفلفل المعاملة بذورها بعوامل الاستحثاث الفطر *T. harzianum* T-22 والبكتريا *A. brasilense* وخليطهما على فاعلية انزيم البيروكسديز حيث بينت النتائج تفوق معاملة النباتات المصابة بفايروس موزائيك الخيار والمعاملة بالفطر *T. harzianum* T- 22 على بقية المعاملات بعد ٣٠ يوم من المعاملة بعامل الاستحثاث حيث بلغت ٤٧٤.٢١ (وحدة .دقيقة.غم وزن رطب-١) بينما سجلت ادنى مستوى لفاعلية الانزيم في معاملة المقارنة وبلغت ١٦١.٤ (وحدة .دقيقة.غم وزن رطب-١) وبفرق معنوي عن بقية المعاملات .

اما بالنسبة التاثير العام لموعد تقييم فاعلية الانزيم حيث بلغت اعلى فاعلية بعد ٣٠ يوما من معاملة النباتات بالفايروس اذ بلغت ٣١٧.٦٥ (وحدة .دقيقة.غم وزن رطب-١) وبفرق معنوي عن بقية المواعيد حيث سجلت ادنى قيمة للانزيم بعد ٢٤ ساعة من معاملة النباتات بالفايروس اذ بلغت ١٨٠.٤١ (وحدة .دقيقة.غم وزن رطب-١) . كما واظهر الجدول التاثير العام لعوامل الاستحثاث في النباتات الفلفل حيث تفوق معاملة الفطر *T. harzianum* T- 22 حيث بلغت قيمة فاعلية الانزيم ٢٩٣.٥٦ (وحدة .دقيقة.غم وزن رطب-١) وبفرق معنوي عن بقية المعاملات ، كما وسجلت ادنى قيمة للانزيم في معاملة المقارنة بلغت ١٥٨.٦٦ (وحدة .دقيقة.غم وزن رطب-١) . أظهرت النتائج ان فاعلية الانزيم تتزايد تدريجيا بدءا من موعد إصابة النبات بالفايروس ولغاية ثلاثين يوما من الإصابة ويفسر ذلك بتصاعد حالة استحثاث المقاومة الجهازية ضد للفايروس في نباتات الفلفل متمثلا ذلك بتصاعد قيم فاعلية الانزيم

الجدول رقم (١) تاثير المواعيد والمعاملات بالعوامل الاحيائية على مستوى فاعلية انزيم البيروكسديز (وحدة .دقيقة.غم وزن رطب-١)

مواعيد تقييم فاعلية الانزيم	المعاملات	فاعلية الانزيم	التاثير العام لموعد تقييم فاعلية الانزيم
٢٤ ساعة	المقارنة	١٣٦.٦٧ ك	١٨٠.٤١ د
	CMV + *T. harzianum*	١٨٥ ح ط	
	CMV + *A. brasilense*	١٩٠ ح	
	CMV + *T. harzianum* + *A. brasilense*	٢١٠ ز	
٧ أيام	المقارنة	١٨٠ ط ي	٢١٧.٩١ ج
	CMV + *T. harzianum*	٢٤٨.٣٣ د	
	CMV + *A. brasilense*	٢١٣.٣٣ و ز	
	CMV + *T. harzianum* + *A. brasilense*	٢٣٠ هـ ز	
١٥ يوم	المقارنة	155.4ي ك	٢٢٢.٦٠ ب

	T. harzianum + CMV	٢٦٦.٦٧ ج د	
	A. brasilense + CMV	٢٣٥ هـ و	
	A. brasilense + *T. harzianum* + CMV	٢٣٣.٣٣ هـ و	
٣٠ يوم	المقارنة	١٦١.٤ ط ك	٣١٧.٦٥ أ
	T. harzianum + CMV	٤٧٤.٢١ أ	
	A. brasilense + CMV	٣٥١ ب	
	A. brasilense + *T. harzianum* + CMV	٢٨٤.٠٠ ج	
التاثير العام لعوامل الاستحثاث	المقارنة	١٥٨.٦٦ د	
	T. harzianum + CMV	٢٩٣.٥٦ أ	
	A. brasilense + CMV	٢٤٧.٣٤ ب	
	A. brasilense + *T. harzianum* + CMV	٢٣٩.٣٤ ج	

* المتوسطات ذات الأحرف المتشابهة لكل عمود لا تختلف معنوياً حسب اختبار دنكن متعدد الحدود تحت مستوى احتمال ٥%.

تاثير معاملة بذور الفلفل قبل الزراعة بالفطر *T.harzianum T-22* والبكتريا *A. brasilense* وخليطهما في مستوى فاعلية انزيم الاوكسديز متعدد الفينول

ويبين الجدول (٢) تأثير مواعيد المعاملات بعوامل الاستحثاث الفطر *T. harzianum* T-22 والبكتريا *A. brasilense* وخليطهما على فاعلية انزيم الاوكسديز متعدد الفينول في نباتات الفلفل، حيث تفوق المعاملة بخليط عاملي الاستحثاث على معاملة المقارنة بعد ٣٠ يوم من المعاملة بالفايروس حيث بلغت فاعلية الانزيم ٣٤٥.٣٧ (وحدة .دقيقة.غم وزن رطب$^{-1}$) وبدون فارق معنوي عن معاملة البكتريا *A. brasilense* في المواعيد ٢٤ ساعة و ٧ أيام و١٥ يوم اذا بلغت٣٢٨.٧ و ٣٢٨.٩٧ و ٣٢٩.٣٣ (وحدة .دقيقة.غم وزن رطب$^{-1}$).

وبالنسبة لتأثير العام لموعد تقييم فاعلية الانزيم حيث بلغت اعلى فاعلية للانزيم بعد ٣٠ يوما من معاملة النباتات بالفايروس اذا بلغت ٢٨٣.٥٤ (وحدة .دقيقة.غم وزن رطب$^{-1}$) وبفرق معنوي عن بقية المواعيد حيث سجلت ادنى مستوى لفاعلية الانزيم بعد ٢٤ ساعة من معاملة النباتات بالفايروس حيث بلغت ٢٥٣.٧٤ (وحدة .دقيقة.غم وزن رطب$^{-1}$). اما بالنسبة لتاثير العام لعوامل الاستحثاث حيث تفوق معاملة البكتريا *A. brasilense* حيث بلغت قيمة فاعلية الانزيم ٣٢٩.٨ (وحدة.دقيقة.غم وزن رطب$^{-1}$) وبفرق معنوي عن بقية المعاملات ، وسجلت ادنى قيمه للانزيم في معاملة المقارنة اذ بلغت ١١٤.٢٩ (وحدة .دقيقة.غم وزن رطب$^{-1}$) .

الجدول رقم (٢) تاثير المواعيد والمعاملات بالعوامل الاحيائية على مستوى فاعلية انزيم الاوكسيديز متعدد الفينول (وحدة .دقيقة-١.غم وزن رطب-١)

مواعيد تقييم فاعلية الانزيم	المعاملات	فاعلية الانزيم	التاثير العام لموعد تقييم فاعلية الانزيم
٢٤ ساعة	المقارنة	٩٤ ز	٢٥٣.٧٤ د
	CMV + *T. harzianum*	٣٠٩.٥٢ د	
	CMV + *A. brasilense*	٣٢٨.٧ ا ج	
	CMV + *T. harzianum* + *A. brasilense*	٢٨٢.١١ هـ	
٧ أيام	المقارنة	١١٣.٣٦ و	٢٦٨.٧٩ ج
	CMV + *T. harzianum*	٣١٥.٢٨ ج ـد	
	CMV + *A. brasilense*	٣٢٨.٩٧ ا ج	
	CMV + *T. harzianum* + *A. brasilense*	٣١٢.١١ ج د	
١٥ يوم	المقارنة	١٢٢.٧٣ و	٢٧٥.٨٤ ب
	CMV + *T. harzianum*	٣٢٢.٨٨ ب ج	
	CMV + *A. brasilense*	٣٢٩.٣٣ ا ج	
	CMV + *T. harzianum* + *A. brasilense*	٣٢٤.١١ ب ج	
٣٠ يوم	المقارنة	١٢٧.١ و	٢٨٣.٥٤ أ
	CMV + *T. harzianum*	٣٢٥.٥٩ ب ج	
	CMV + *A. brasilense*	٣٣٢.٢ ا ب	
	CMV + *T. harzianum* + *A. brasilense*	٣٤٥.٣٧ أ	
التاثير العام لعوامل الاستحثاث	المقارنة	114.29 ج	
	CMV + *T. harzianum*	٣١٨.٣١ ب	
	CMV + *A. brasilense*	٣٢٩.٨ أ	
	CMV + *T. harzianum* + *A. brasilense*	٣١٥.٩٢ ب	

*المتوسطات ذات الأحرف المتشابهة لكل عمود لاتختلف معنوياً حسب اختبار دنكن متعدد الحدود تحت مستوى احتمال ٥%.

تاثير معاملة بذور الفلفل قبل الزراعة بالفطر *T.harzianum T-22* والبكتريا *A. brasilense* وخليطهما في محتوى الفينولات الكلي (ملغم-١.غم وزن رطب-١)

تبين النتائج في جدول(٣) تأثير موعد تقدير محتوى الفينولات الكلي (ملغم.غم وزن رطب-١) عند معاملة بذور الفلفل قبل الزراعة بعوامل الاستحثاث بكل من الفطر *Ttrichoderma harzianum* T- 22 والبكتريا *Azospirillum brasilense* . حيث تبين تفوق النباتات المعاملة بخليط عاملي الاستحثاث اذ بلغت ١.٧٣ (ملغم.غم وزن رطب-١) وبدون فرق معنوي عن معاملة البكتريا *A. brasilense* بعد ٣٠ يوم من تلقيح النبات بالفايروس ولم يختلف عن معاملة الخليط بعد ١٥ يوما من تلقيح النبات بالفايروس اذ بلغت ١.٦٢ و ١.٦٩ (ملغم.غم وزن رطب-١) على التوالي وبفارق معنوي عن معاملة المقارنة اذا بلغت ٠.٩١ (ملغم.غم وزن رطب-١). وبالنسبة للتاثير العام لموعد تقييم الفينولات حيث بلغت اعلى فاعلية لها بعد ٣٠ يوما من معاملة النباتات بالفايروس اذ بلغت ١.٤٢ (ملغم.غم وزن رطب-١) وبفرق معنوي عن بقية المواعيد حيث سجلت ادنى مستوى للفينولات الكلي بعد ٢٤ ساعة و ٧ أيام من معاملة النباتات بالفايروس حيث بلغت ٠.٩٠ و ٠.٩٩ (ملغم.غم وزن رطب-١) . اما بالنسبة للتاثير العام لعوامل الاستحثاث حيث تفوق معاملة الخليط حيث بلغت قيمة مستوى الفينول الكلي ١.٣٥ (ملغم.غم وزن رطب-١) وبفرق معنوي عن بقية المعاملات وسجلت ادنى مستوى للفينولات في معاملة المقارنة اذ بلغت ٠.٨٥ (وحدة.دقيقة.غم وزن رطب-١) .

الجدول رقم (٣) تاثير المواعيد والمعاملات بعوامل استحثاث على موعد تقدير محتوى الفينولات الكلي (ملغم-١.غم وزن رطب-١)

مواعيد تقييم فاعلية الأنزيم	المعاملات	فاعلية الأنزيم	التأثير العام لموعد تقييم فاعلية الأنزيم
٢٤ ساعة	المقارنة	٠.٨ ز	٠.٩٠ ج
	Trichoderma + CMV	٠.٩٩ هـ و	
	Azospirillum + CMV	٠.٩١ و ز	
	Azospirillum + Trichoderma + CMV	٠.٩٢ د ز	
٧ أيام	المقارنة	٠.٨٤ ز	٠.٩٩ ج
	Trichoderma + CMV	١.٠٢ د و	
	Azospirillum + CMV	١.٢١ ج د	
	Azospirillum + Trichoderma + CMV	١.٠٧ د هـ	
١٥ يوماً	المقارنة	٠.٨٨ و ز	١.١٦ ب
	Trichoderma + CMV	١.٢٦ ج د	
	Azospirillum + CMV	١.٤٤ ب د	
	Azospirillum + Trichoderma + CMV	١.٦٩ أ ب	
٣٠ يوماً	المقارنة	٠.٩١ و ز	١.٤٢ أ
	Trichoderma + CMV	١.٤٩ ب ج	
	Azospirillum + CMV	١.٦٢ أ ب	
	Azospirillum + Trichoderma + CMV	١.٧٣ أ	
التأثير العام لعوامل الاستحثاث	المقارنة	٠.٨٥ د	
	Trichoderma + CMV	١.١٩ ب ج	

1.29 ب	**Azospirillum + CMV**	
١.٣٥ أ	**Azospirillum + Trichoderma + CMV**	

* المتوسطات ذات الأحرف المتشابهة لكل عمود لاتختلف معنوياً حسب اختبار دنكن متعدد الحدود تحت مستوى احتمال ٥%.

وفي نتائجنا الحالية زادت فاعلية كل من انزيم البيروكسديز وانزيم اوكسيديز متعدد الفينول والفينولات الكلية في نباتات الفلفل المصابة بفايروس موزائيك الخيار والمعاملة بالفطر T-22 *T. harizanum* و بالبكتريا *A. brasilense* ، وتعد هذه الانزيمات احد عناصر نظام الدفاع المستحث عند تعرض النبات للإصابة بالمسببات المرضية وتلعب دورا في الدفاعات النباتية وفي عملية البناء.

يزداد مستوى فاعلية انزيم البيروكسديز بعد الإصابة بالمسبب المرضي ولها عدة مسارات محتملة وهي اكسدة المواد المانحة للهيدروجين وبوجود بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 لانتاج جذور حرة تكون سامة للممرضات، وزيادة تكوين اللكنين المحفز في الخلايا مما يحد من عبور المسببات المرضية من مكان اختراقها للخلية ، كما انه يقوم باكسدة الفينولات الى مواد اكثر سمية تعرف بالكينونات فضلا عن استحثاث انتاج الفيتوالكسينات والتي تسهم بتثبيط الفايروس عن طريق تحطيم البروتينات التي يحتاجها الفايروس في عملية التضاعف او انها تؤثر على بروتين الفايروس مباشرة عن طريق انتاج بروتينات مرتبطة بالامراضية (Almagro واخرون ،٢٠٠٩ و Papaiah و Narasimh،٢٠١٤ و Bahar واخرون ٢٠٢٠).

وكذلك تتفق هذه النتائج مع ماتوصل اليه Rajininmala واخرون (٢٠٠٣) عند استخدام البكتيريا *p.fluorescens* و *P chlororaphis*. في استحثاث المقاومة في نباتات القرع المر Bitter gourd ضد فايروس الموزائيك الاصفر حيث اشارت النتائج الى تحسين نمو النباتات وخفض نسبة الاصابة في النباتات المعاملة ، زيادة فعالية الأنزيمات بيروكسديز والاوكسديزمتعدد الفينول ومحتوى المركبات الفينولية واتفقت هذه النتائج مع ما أشار Abdel-Shafi واخرون (٢٠١٣) الى ان ارتفاع نشاط بعض الإنزيمات المشاركة في أيض أنواع الأكسجين التفاعلي مثل البيروكسيديز ألاوكسيديز متعدد الفينول يمكن ان يوضح سبب انخفاض شدة الإصابة بفايروس الموزاييك الأصفر الزوكيني وتعزيز النمو والتمثيل الغذائي عند معاملة نباتات القرع براشح مزرعة الفطر *Trichoderma* sp. نتيجة الى تنشيط أنظمة الدفاع والتي تساعد على منع انتشار العوامل الممرضة وبالتالي زيادة نمو النباتات المعاملة براشح مزرعة الفطر والملقحة بفايروس الموزاييك الاصفر الزوكيني مقارنة مع النباتات غير المعاملة براشح مزرعة الفطر *Trichoderma* sp. .

وبينت نتائج دراستنا زيادة في كميات الفينولات الكلية حيث اقترنت تلك الزيادة مع زيادة مستوى فعالية انزيمي بيروكسديز وبولي فينول اوكسديز نتيجة للمعاملة بعاملي الاستحثاث البكتريا *A.brasilense* و الفطر *T.harizanum* ان ميكانيكية التأثير للمركبات الفينولية على الفايروسات غير معروفة بشكل دقيق إذ يعتقد انها تؤثر في بروتين الفايروس إما بصورة مباشرة عن طريق ارتباطها باواصر هيدروجينية وتمنع تحرر الحامض النووي او تتاكسد الى كينونات Polyphenol بالانزيمات ولاسيما انزيم Quinones oxidaseوتصبح اكثر فعالية من الفينولات التي تكونت منها . وعملية تثبيط البروتينات بوساطة الكينونات بذاتها غير معروفة بالضبط وان بعض المركبات الفينولية تكون معقدات مع الحامض النووي الفايروسي وتثبط فعاليته (Bahar واخرون ،٢٠٢٠). كما ويتفق هذا مع ما ذكره Kingkampang في(٢٠٢٠) زيادة في محتوى نباتات الفلفل من المركبات الفينولية الكلي في الأسبوع الثاني بعد تلقيح النباتات بفايروس تجعد واصفرار اوراق الفلفل.

المصادر

- **حمزة، سروه رمضان (٢٠٠٧) دراسة خصائص البولي فينول اوكسديز المعزول من بعض الفواكه والخضار ودراسة تاثير بعض العمليات التصنيعية عل استقراره** . رسالة ماجستير – كلية الزراعة والغابات – جامعة الموصل .

- **Chauhan, P., Singla, K., Rajbhar, M., Singh, A., Das, N., & Kumar, K. (2019).** A systematic review of conventional and advanced approaches for the control of plant viruses. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 7(4) :8-8.
- **Sastry, K. S., & Zitter, T. A. (2014**). Management of virus and viroid diseases of crops in the tropics. In *Plant virus and viroid diseases in the tropics* (pp. 149-480). Springer, Dordrecht.
- **Shoresh, M., & Harman, G. E. (2010**). Differential expression of maize chitinases in the presence or absence of *Trichoderma harzianum* strain T22 and indications of a novel exo-endo-heterodimeric chitinase activity. *BMC plant biology*, 10(1): 1-11.
- **Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., & Codon, A. C. (2004).** Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains. *International microbiology*, 7(4) :249-260.
- **Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004**). Trichoderma species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology*, 2(1) :43-56.
- **Luo, Y., Zhang, D. D., Dong, X. W., Zhao, P. B., Chen, L. L., Song, X. Y., & Zhang, Y. Z. (2010).** Antimicrobial peptaibols induce defense responses and systemic resistance in tobacco against tobacco mosaic virus. *FEMS microbiology letters*, 313(2) :120-126.
- **Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clément, C., & Ait Barka, E. (2005a).** Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium Burkholderia sp. strain PsJN. *Applied and environmental microbiology*, 71(4):1685-1693.
- **Pitotti, A., Elizalde, B. E., & Anese, M. (1994).** Effect of caramelization and Maillard reaction products on peroxidase activity. *Journal of Food Biochemistry*, 18(6): 445-457.
- **Müftügil, N. (1985).** The peroxidase enzyme activity of some vegetables and its resistance to heat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36(9):877-880.
- **Chandra, S., Khan, S., Avula, B., Lata, H., Yang, M. H., ElSohly, M. A., & Khan, I. A. (2014**). Assessment of total phenolic and flavonoid content, antioxidant properties, and yield of aeroponically and conventionally grown leafy vegetables and fruit crops: a comparative study. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2014
- **Aberoumand, A., & Deokule, S. S. (2008**). Comparison of phenolic compounds of some edible plants of Iran and India. *Pakistan Journal of Nutrition*, 7(4):582-585.
- **Almagro, L., Gómez Ros, L. V., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros Barceló, A., & Pedreño, M. A. (2009).** Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of experimental botany*, 60(2), 377-390.
- **Papaiah, S., & Narasimha, G. (2014).** Peroxidase and polyphenol oxidase activities in healthy and viral infected sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves. *Biotechnol. An Indian J*, 9, 1-5.
- **Bahar, T., Qureshi, A. M., Qurashi, F., Abid, M., Zahra, M. B., & Haider, M. S. (2021).** Changes in phyto-chemical status upon viral infections in plant: A critical review. *Phyton*, 90(1) :75.

- **Rajininmala, P., R. Rabindran., M. Ramaiah., P. Nagarajan., & S. Varanavasiappan. (2003).** PGPR mediated disease resistance in bitter gourd against bitter gourd yellow mosaic virus. 6thint.PGPR workshop, 5-10 October, Calicut, India.
- **Abdel-Shafi, S., Abdel-Gawd, S., & Sleem, E. (2013**). Induction of Systemic resistance and enhanced enzyme activity by Trichoderma sp. Shmosa Tri (FJ 937359) in Squash against Zucchini Yellow Mosaic Virus (ZYMV). *Egyptian Journal of Botany, 3rd International Con*, 539-558
- **Kingkampang, H., Teerarak, M., Kramchote, S., Techawongstien, S., & Suwor, P. Phenols and peroxidase activity in Pepper yellow leaf curl Thailand virus (PepYLCThV) resistant and susceptible chili (Capsicum annuum L.) genotypes.** ***International Journal of Agricultural Technology*** . 16(4):845-854.