دراسة مختبرية لفعالية بعض المطهرات ضد الفطر *Cladosporium herbarum* المرافق لمرض تبقع اوراق نخيل التمر.

لونا فحطان محسن
مركز ابحاث النخيل / جامعة البصرة

زينب جواد ماضي
كلية العلوم/جامعة البصرة

الخلاصه :

اجري عزل وتشخيص الفطر *Cladosporium herbarum* المرافق لمرض تبقع اوراق نخيل التمر في البصرة.

واظهرت نتائج اختبار القدرة الامراضيه للفطر *C. herbarum* قدرة الفطر على احداث الإصابه ووجدت اعراض مرض تبقع اوراق نخيل التمر على الاوراق المختبرة.

كما بينت الدراسه فعالية المطهرات الفينول واليود والـ Cetrimide والـ Hypochlorite ضد الفطر *C.herbarum*

اد اظهر الفينول فعاليه عاليه في تثبيط النمو الفطري عند التراكيز الثلاثه 1.25% و 2.5% و 5% في حين اظهر اليود قتل جميع العزلات عند التراكيز 2.5% و 5% اما عند تركيز 1.25% بقيت 6 خلايا حيه بعد مرور دقيقه واحدة.

واظهر الـ Hypochlorite قتل جميع العزلات عند التراكيز 2.5% و 5% اما عند التركيز 1.25% بقيت 10 خلايا حيه بعد مرور دقيقه واحدة و2 خليه حيه بعد مرور دقيقتان ونصف وخليه واحدة بعد مرور خمس دقائق ، واظهر الـ Cetrimide قتل جميع العزلات عند تركيز 2.5% و 5% اما عند تركيز 1.25% بقيت 20 خليه حيه بعد مرور دقيقه واحدة و7 خلايا حيه بعد مرور دقيقتان ونصف و 3 خلايا حيه بعد مرور خمس دقائق.

المقدمه

تعد نخله التمر *Phoenix dactylifera* L احد اهم اشجار الفاكهة في كثير من الدول العربيه ومنها العراق ، وتشتهر محافظه البصرة بتنوع وجودة اصناف النخيل فيها إلا إن اعداد النخيل انخفض في هده المحافظه من ١٠ مليون نخله الى اقل من ٣ مليون نخله لعدة عوامل من بينها الإهمال وانتشار الافات الحشريه والمرضيه (الجهاز المركزي للإحصاء ، ٢٠٠٠) .

يعد مرض تبقع اوراق النخيل من الامراض الشائعه في معظم مناطق زراعه النخيل الدي يتسبب عنه العديد من الفطريات (عبد القادر ومحمد ، ١٩٩٧) وينتشر مرض تبقع اوراق النخيل في البساتين المهمله وتظهر اعراض المرض على الاوراق(السعف) القديمه بالعمر بشكل اكبر من الاوراق الحديثه وقد تختلف هده الاعراض باختلاف الفطريات المسببة لها او باختلاف العوامل البيئيه المحيطه (Elarios,1989 والدجوري ،١٩٩٨).

ويعد الفطر *Cladosporium herbarum* من الفطريات المرافقه لمرض تبقع اوراق نخيل التمر وقد عزله (فياض ومانع ، ٢٠٠٨) من عينات عشوائيه من السعف المصاب من بساتين نخيل التمر في البصرة .

اد تضمنت دراسه عزل وتشخيص الفطريات المسببه لمرض تبقع اوراق النخيل ومعاملتها لبعض المبيدات الكيمياويه حقلياً.

تعد المطهرات من المواد الكيماويه التي لها القابليه على تثبيط نمو الكائنات المجهريه، تقومن المطهرات بالتعتيم الكيميائي Chemosterilant الدي هو مصطلح يستخدم لوصف المواد التي تحدث تاثير قاتل كلي لجميع الاحياء المجهريه كما هو الحال في في التعقيم الحراري، وقد اظهرت المطهرات فعاليتها تجاه العديد من الفطريات (1989,Russell, Hugo) .

تقدر فعاليه المطهرات بوساطه اختبارات المعلق Suspension tests

وتتم هده الاختبارات بتحضير المعلق الفطري ومعاملته بالمطهر لفترة من الزمن تحت ظروف مسيطر عليها ، قدمت هده الاختبارات لاول مرة في سنه 1903 ولا زالت تستخدم لحد الان كاختبارات تحليليه ناجحه ضد العديد من الاحياء المجهريه كالفطريات (Hugo and Russell,1989)

لدا هدفت هده الدراسه الى عزل الفطر *Cl. herbarum* وتشخيصه واختبار القدرة الامراضيه له ومعاملته ببعض المطهرات الكيميائيه لمعرفه فعاليـة المطهرات على الفطر المذكور .

المواد وطرائق العمل

اولا : عزل وتشخيص الفطر *Cladosporium herbarum*

جمعت عينات عشوائيه من اوراق (سعف) نخيل مصاب بمرض تبقع اوراق النخيل ، قطع العرق الوسطي (الجريد) والورقات الى قطع صغيرة بطول 0.5 سم تقريبا تم يغسل السعف بماء جاري لازاله الاتربه تم يقطع ويعقم ثلاث دقائق بمحلول هايبوكلورات الصوديوم تركيز % 10 من المستحضر التجاري لمدة ثلاث دقائق . وبعد غسلها بالماء المقطر المعقم جففت القطع على ورق الترشيح . نقلت كل اربع قطع الى اطباق بتري حاويه على Potato dextrose agar (PDA) المعقم والمضاف له المضاد الحياتي Chloramphenicol (250 ملغم / لتر) وبعد 5 – 7 ايام من فترة الحضن على درجه حرارة 25- $^{+}2$ م نقيت العزلات الفطريه عن طريق زرع بوع مفرد Singlespore على وسط PDA وشخص الفطر بالاعتماد على المفاتيح التصنيفيه (Ellis (1976 و (1980) Domschet *et.al* .

ثانيا : اختبار القدره الامراضيه للفطر

استخدمت طريقه Elmeleigi *et.al* (1986) لاختبار امراضيه الفطر المعزول. اخذت وريقات (خوص) سليمه متساويه الطول قدر الإمكان من اوراق الدور الثالث لصنف نخيل الحلاوي. غسلت الوريقات بماء جاري ثم عقمت سطحيا بالكحول الاتيلي 70% غسلت بعدها بماء مقطر معقم، قسمت الوريقات الى مجموعتين جرحت المجموعه الاولى باستخدام إبرة معقمه وتركت المجموعه الاخرى بدون تجريح. وضعت كل ورقتين في انبوبه اختبار تحوي 20 مل ماء مقطر معقم وبواقع ثلاث مكررات للفطر المذكور ، رشت بعد ذلك الوريقات بمعلق ابواع الفطر C. herbarum وبتركيز 10^{-2} بوع/مل بوساطه رشاش يدوي(Atomizer) تم سدت فوهه كل انبوبه بورق المنيوم ووضعت في حامل داخل الحاضنه على درجه حرارة ٢٥+ ٢م ، وتمت مراقبه ظهور الاعراض كل يومين ولفترة ١٤ يوم من الرش، تضمنت معامله المقارنه رش وريقات مجروحه وغير مجروحه بماء مقطر معقم.

ثالثا: تقدير فعاليه المطهرات مختبريا

نشطت عزلات الفطر *C. herbarum* بإنمائها على وسط PDA لمدة يـوم – يومين تم نقل جزء من المستعمرة المنشطه الى 5 مل من الماء المقطر المعقم في انبوب اختبار ورج جيدا تم حسبت اعداد الخلايا الفطريه باستخدام شـريحه العـد Haemocytometer للحصول على تركيز 1 × 10^{10} خلية / مل .

استخدمت اربعه مطهرات وهي الفينول واليود و الـ Hypochlorite والـ Cetrimide بالتراكيز التاليه % 5 و % 2.5 و % 1.25 ودلك بإضافة 100 مل من الماء المقطر الى 5 غم من المطهر الحصول على تركيز 5 % تم سحب 10 مـل من هدا التركيز بوساطه ماصه معقمه واضيف الى 10 مل مـن المـاء المقطـر المعقم للحصول على تركيز 2.5% وكررت العمليه نفسـها مـع هـدا التركيـز للحصول على تركيز 1.25 % .

حدد عدد الخلايا المختزله حسب طريقه (Hugo and Russell,1989) حيـث اضيف 0.1 مل من المعلق الفطـري الى 0.9 مل من المطهـر ليصـبح التركيز 1 × 10^{9} خلية / مل ، وبعد مرور دقيقه واحدة ودقيقتان ونصف وخمـس دقـائق خفف العالق الفطري المضاف إليه المطهر بنسبه 1 / 100 لإزاله تاثير المطهـر ودلك باخد 0.1 ما من المعلق الفطري – المطهر وإضافته الى 9.9 مل من المـاء المقطر المعقم في انبوب اختبار معقم ، اخد 0.1 مل من كل وقت مـن الاوقـات السابقه ونشر على سطح طبق بتري معقم يحتوي علـى وسـط PDA بوسـاطه قضيب زجاجي على شكل حرف L ، تم حضنت الاطباق في الحاضـنه بدرجـه حرارة 25 م لمدة 5 – 7 ايام حتى يظهر النمو الفطري فـي طبـق السـيطرة ، وحسبت اعداد الخلايا الفطريه في كل طبق لكل وقت من الاوقات السابقه وقورنت مع طبق السيطرة لمعرفه الاختزال الدي حدث في اعداد المستعمرات . وحسـب المعادله التاليه

$$\text{نسبة القتل} = \frac{\text{عدد الخلايا التي قتلت بتركيز ووقت معين}}{\text{العدد الكلي للخلايا الحية}} \times 100$$

التحليل الإحصائي :

نفذت هذه التجربه حسب تصميم التام العشوائيه الكامله متعدد العوامل C. R. D عند مستوى احتماليه 0.01 وقورنت المتوسطات وفق طريقه اقل فرق معنوي معدل R. L. S. D (الراوي وخلف الله ، ١٩٨٠) .

النتائج والمناقشه

اظهرت النتائج من عزل الفطر *C.herbarum* لوحه (1) ولوحه (2) ونتائج اختبار الامراضيه ان الفطر *C. herbarum* له القدرة على احداث الاصابه على الوريقات المجرحه وغير المجرحه وبعد مرور اسبوع اعطى اعراض تلون بني على العرق الوسطي للورقه ، وبعد مرور اسبوعين ظهرت الاعراض على شكل تلون العرق الوسطي بلون بني غامق وظهور بقع على السطح السفلي للورقه وفي دراسه قام بها (فياض ومانع، ٢٠٠٨) حول الفطريات المعزوله من مرض تبقع اوراق نخيل التمر في البصرة، اظهر الفطر C. herbarum قدرته على احداث الإصابه على الوريقات المجرحه وغير المجرحه واعطى اعراض مشابهة للاعراض التي حصلنا عليها.

اظهرت النتائج في الجدول (1) إن الفينول قتل جميع الخلايا الفطريه عند التركيز الثلاثه بنسبه قتل 100% استخدم الفينول من قبل Lister في عام 1867 كمادة مانعة للتعفن antiseptic ، تقل فعالية الفينول بالتخفيف وبوجود المواد العضوية وهو فعال في الاس الهيدروجيني الحامضي (Hugo and Russell , 1989)

اما اليود فقد اظهر نسبه قتل 99.8% بعد مرور دقيقه واحدة و 100% بعد مرور دقيقتان ونصف وخمس دقائق ، يملك اليود نطاق واسع من الفعاليه ضد الاحياء المجهريه مثل البكتريا الهلاميه والفطريات والفايروسات وهو مادة قليله

لوحه رقم (1) الخيوط الفطريه لفطر *Cladosporium herbarum*

لوحه رقم (2) المستعمرة الفطريه للفطر على وسط Cladosporium herbarum PDA

الدوبان في الماء لذلك تحتاج الى تزويدها بمحلول مائي لكي تذوب، فعاليه اليود ضد الاحياء المجهريه اقل اعتمادا من الكلور على درجه الحرارة والاس الهيدروجيني ويجب تجنب الاس الهيدروجيني القاعدي عند استخدام اليود كمادة مطهرة، كما ان فعاليه اليود المضادة للجراثيم اقل تاثرا بالمواد العضويه (Hugo and Russell , 1989).

واظهر الـ Cetrimide نسبة قتل 99.4% بعد مرور دقيقه واحدة و 99.7% بعد مرور دقيقتان ونصف 99.9% بعد مرور خمس دقائق .

كما اظهر الـ Hypochorite نسبة قتل 99.7% بعد مرور دقيقه واحدة و 99.9% بعد مرور دقيقتان ونصف وخمس دقائق، يعتبر الـ Hypochlorite من اقدم وافضل المطهرات، فهو يظهر قتل سريع تجاه عدد كبير من الاحياء المجهريه بضمنها الفايروسات والفطريات.

كما اظهرت النتائج ان الفينول اكثر المطهرات فعاليه اد قتل جميع العزلات الفطريه عند التراكيز التلاته 1.25% و 2.5% و 5% وفي الاوقات التلاته دقيقه ودقيقتان ونصف وخمس دقائق.

وجاء في المرتبه التانيه اليود اد قتل جميع العزلات عند التراكيز 2.5% و 5% وبعد مرور دقيقه واحدة ودقيقتان ونصف وخمس دقائق، وقتل جميع العزلات عند تركيز 1.25% بعد مرور دقيقتان ونصف وخمس دقائق ، وبقيت 6 خلايا حيه عند تركيز 1.25% وبعد مرور دقيقه واحدة.

وفي المرتبه التالته جاء الـ Hypochlorite إد قتل جميع العزلات عند تركيز 5 % و 2.5 % وبعد مرور دقيقه واحدة ودقيقتان ونصف وخمس دقائق، اما عند تركيز 1.25 % فقد بقيت 10 خلايا حيه بعد مرور دقيقه واحدة و2 خليه حيه بعد مرور دقيقتان ونصف وخليه واحدة حيه بعد مرور خمس دقائق.

وفي المرتبه الرابعه ظهر الـ Cetrimide إد قتل جميع العزلات عند تركيز 5 % و 2.5 % وبعد مرور دقيقه واحدة ودقيقتان ونصف وخمس دقائق، اما عند تركيز 1.25 % فقد بقيت 20 خليه حيه بعد مرور دقيقه واحدة و 7 خلايا حيه بعد مرور دقيقتان ونصف و 3 خلايا حيه بعد مرور خمس دقائق .

المطهر	التركيز	عدد الخلايا في وقت القتل/دقيقة		
		1	2.5	5
الفينول	0	3401	3401	3401
	1.25	0	0	0
	2.5	0	0	0
	5	0	0	0
	نسبه القتل %	100	100	100
اليود	0	3401	3401	3401
	1.25	6	0	0
	2.5	0	0	0
	5	0	0	0
	نسبه القتل %	99.8	100	100
Cetrimide	0	3401	3401	3401
	1.25	20	7	3
	2.5	0	0	0
	5	0	0	0
	نسبه القتل %	99.4	99.7	99.9
Hypochlorite	0	3401	3401	3401
	1.25	10	2	1
	2.5	0	0	0
	5	0	0	0
	نسبه القتل %	99.7	99.9	99.9

جدول(١) فعالية اربعه مطهرات تجاه الفطر *C. herbarum*

نوع المطهر	معدل تاثير التداخل بين نوع المطهر والوقت			معدل تاثير نوع المطهر
	الوقت			
	1	2.5	5	
الفينول	75.00	75.00	75.00	75.00
اليود	74.66	75.00	75.00	74.88
Cetrimide	74.85	74.00	74.98	74.61
Hypochlorite	74.80	74.00	74.99	74.92
R.L.S.D. $_{o.o1}$	لنوع المطهر=0.112		للتداخل بين نوع المطهر والوقت=0.195	

جدول (2) التداخل بين نوع المطهر والوقت

التركيز	معدل تاثير التداخل بين التركيز والوقت			معدل تاثير التركيز
	الوقت			
	1	2.5	5	
0	0.00	0.00	0.00	0.00
1.25	99.32	99.79	99.97	99.69
2.5	100.00	100.00	10.00	100.00
5	100.00	100.00	100.00.	100.00
R.L.S.D. $_{o.o1}$	للتركيز=0.112		للتداخل بين التركيز والوقت=0.195	

جدول (3) التداخل بين التركيز والوقت

كما اظهرت النتائج في جدول (2) ان اعلى معدل للتداخل بين المطهر والوقت هو 75 للفينول عند الاوقات الثلاثه ، واقل معدل للتداخل هو 74.61 للـ Cetrimide واظهرت النتائج في الجدول (3) ان اعلى معدل للتداخل بين التركيز والوقت هو 100 عند التركيز 5.25 واقل معدل للتداخل 99.69 عند التركيز 1.25 .

من هدا نستنتج ان افضل تركيز للقتل هو 5% وافضل وقت للقتل هو خمس دقائق وافضل مطهر هو الفينول.

وتكمن اهميه الفطريات المسببه لمرض تبقع اوراق نخيل التمر لكونها تستهدف تصنيع الغذاء الضروري للنمو متمثلا بعمليه التمثيل الضوئي التي تتم في الورقه (الزيات وجماعته ، 2002)

وفي دراسه قام بها Scott *et. al* (1986) حول بعض المطهرات تجاه 3 انواع من الفطريات هي *Candida albicans* و *Trichophyton mentagrophytes* و *Asperyillus niger* ظهر إن الفينول بتركيز % 0.36 قتل اكثر من % 99.99 من ابواع الانواع الثلاثه بوقت زمني مقداره اقل من دقيقتين وقتل اليود بتركيز 1% اكثر من 99.99 % من ابواع الانواع الثلاثه بوقت زمني مقداره اقل من دقيقتين ، اما الـ Hypochloriteبتركيز (0.2%) فقد قتل ابواع الفطر *A. niger* بوقت زمني مقداره 10 دقائق ، وابواع الفطر *T.mentagrophytes* بوقت زمني مقداره اقل من دقيقتين، وقتل ابواع الفطر *C. albicans* بوقت زمني مقداره خمس دقائق. وقتل الـ Cetrimide بتركيز (1%) ابواع الفطر *A. niger* بوقت زمني مقداره اقل من دقيقتين ن وقتل ابواع الفطر *T. mentagrophytes* بوقت زمني مقداره 20دقيقه ، وقتل ابواع الفطر *C. albicans* بوقت زمني مقداره اقل مد دقيقتين.

كما درس (عبد العزيز، 2000) فعاليه اليود تجاه 16 عزله فطريه من الفطريات *Alternaria alternate* و *Alternaria Chlamydospora* و *Aspergillus candidus* و *Aspergillus flavus* و *Aspergillus fumigillus* و *Aspergillus niger* و *Candida albicans* و *Candida cifferrii* و *Candida Chrysosporium keratinophilu* و *Candida tropicum* و *Sporothix schenckii* ، وقد اظهر اليود تثبيط عالي بنسبه 100 % عند التركيز 1.56 مايكرو غرام / مل .

المصادر

الجهاز المركزي للإحصاء ، (٢٠٠٠) . المجموعه الإحصائيه السنويه . بغداد . جمهوريه العراق .

الراوي ، خاشع محمود وخلف الله ، محمد عبد العزيز (١٩٨٠) . تصميم وتحليل التجارب الزراعيه . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . مؤسسه دار الكتب للطباعه والنشر ، جامعه الموصل . ٤٨٨ صفحة .

الزيات، محمد محمود. صالح ابراهيم الفصيط، حسين عصام الدين متولي نعمه، هاني عبد الرحمن ظفران، خالد سعد ال عبد السلام، (٢٠٠٢). اهم افات وامراض نخيل التمر بالمملكه العربيه السعوديه وطرق مكافحتها المتكامله. وزارة الزراعه والمياه، منظمه الاغديه والزراعه للامم المتحدة، الرياض، السعوديه، ٤٨ ٩٥.

الدجوي، علي (١٩٩٨). الدليل التطبيقي لمكافحه افات وامراض النخيل ، مكتبه مدبولي، جمهوريه مصر العربيه، ٢٩٢ صفحة.

عبد العزيز ، جمال مهدي (٢٠٠٠) . دراسه حول الإصابات الفطريه في الابقار والفطريات العالقه بشعر الابقار والجاموس والخيول والإبل في محافظه البصرة وتاثير خمسه انواع من المضادات الفطريه على بعض العزلات . رساله ماجستير ، كليه العلوم ، جامعه البصرة .

عبد القادر ، هشام وهاشم ، صلاح الدين الحسين (١٩٩٧) . امراض النخيل (المشاكل ، تشخيص الامراض ، الوقايه والعلاج) . دار المريخ للنشر ، الرياض ، المملكه العربيه السعوديه ، ١٣٠ صفحة .

فياض ، محمد عامر ، علاء عودة (٢٠٠٨) . عزل وتشخيص الفطريات المسببه لمرض تبقع اوراق نخيل التمر في البصرة ومكافحته كيميائيا . مجلة البصرة لابحات نخله التمر ، المجلد ٧ ، العدد ٢ ، ١٣٧ صفحة .

Elarios, H. (1989). Studies on plant disease effecting date palm trees at the directorate of research program, king Abdulaziz city for science and technology, Riyadh, K.S.A. no. (23) : 132pp.

Hugo W.B & Russell A.D. (1989). Pharmaceutical Microbiology. Black well scientific publications 4th , ed , London. P511.

Scott , E.M. ; Gorman S.P. & Mc Garth, S.J. (1986). An assessment of antimicrobial agents used for hard-surface and skin difinfection. Journal of Clinical and Hospital Pharmacy, P205.

A study of the activity of some disinfectants against the fungi *Cladosporium herbarum* that associated with the date palm leaf spot disease in Basrah.

Luna Qahtan Muhsin **Zainab Jawad Madi**

Date Palm Research Center **College of Science**

Basrah University **Basrah University**

Summary:

Isolation and Identification of the fungi *Cladosporium herbarum* associated with the date palm leaf spot disease in Basrah was carried out. And the results of the pathegenicity test showed the ability of the fangi *C. herbarum* to cause the infection and gave symptoms of the leaf spot disease on the tested leaves. And the study showed the activity of the disinfectants phenole, iodine, cetrimide and Hypochlorite against the fungi *C. herbarum* phenole showed high activity in the inhibition of the fungi growth at the concentrations 1.25% , 2.5% and 5% while iodine showed killing of all isolates at the concentrations 2.5% and 5% , however at the concentration 1.25% six cells staied alive after passing one minte And Hypochlorite showed killing at all isolates at the concentrations 2.5% and 5% and however at the concentration 1.25% ten cells staied alive after passing one minute And two cells staied alive after passing two and half minute and one cell alive after passing five minute. And cetrimide showed killing of all isolates at the concentration 2.5% and 5% , however at the concentration twenty cells staied alive after passing one minute and seven cells staied alive after passing two and half minute and three cells staied alive after passing five minute.