عزل وتشخيص الفطر *Alternaria alternata*، المسبب لمرض تبقع الاوراق من نماذج مصابة من بعض محاصيل الخضر ودراسة بعض خصائصه

أ.د.ساهي جواد ضاحي أ.م.د.ورقاء سعيد قاسم الطائي م.م.نجوى فواز كركجة الخزرجي
قسم علوم الحياة
كلية العلوم/جامعة الموصل

تاريخ تسليم البحث: ٢٠١٣/١٢/١١ ..... **تاريخ قبول النشر**: ٢٠١٤/٢/٢٠

ملخص البحث:

لقد تم عزل ٢٥ عزلة من فطر Alternaria alternata المسبب لمرض تبقع الاوراق من ثمانية من محاصيل الخضر في مدينة الموصل, وجرت تنقية كل عزلة بأستعمال تقنية الزرع على الشريحة وتنقيتها بطريقة السبور المنفرد ومن ثم استعملت هذه العزلات لدراسة بعض صفات الفطر, خاصةً تلك التي لها علاقة بأمراضيته كالنمو القطري للمستعمرة وكفاءتها في انتاج الكونيدات. وبالزرع على وسط PSA والتحضين لمدة ٥ ايام عند الدرجة الحرارية ٢٥±١ْم, تبين ان العزلة AA4 المعزولة من السلق قد اعطت اكبر نمو قطري, اذ بلغ قطر المستعمرة ٥٥,٥ملم بينما اعطت العزلة AA11 المعزولة من الفجل اقل نمو قطري فقد بلغ ٣٤,١ملم. وبعمل عوالق كونيدية من العزلات وبزرعها على موائل PSA والتحضين لمدة ٥ ايام وعند الدرجة الحرارية ٢٥±١ْم اعطت العزلة AA20 المعزولة من البامية اكثف عالق ($14x10^5$ كونيدة/مل) بينما اعطت العزلة AA24 اقل العوالق الكونيدية كثافة ($2.8x10^5$ كونيدة/مل) وهذا يشير الى وجود تباين بين عزلات هذا الممرض النباتي في هاتين الصفتين المهمتين لأحداث الامراضية وهي سرعة النمو وكمية السبورات المنتجة التي تسرع من انتشار الفطر.

مستل من رسالة الماجستير للباحث الثالث

Isolation and characterization of the fungus *Alternaria alternata* , the causative agent of leaf-spot disease, from some vegetable crops

Prof. Dr. S. J. Dhahi Asst. Prof. Dr. Warka S.K. Al-Taee Asst. Lect. Najwa F.K. Al-Khazraji
Department of Biology
College of Science /Mosul University

Abstract:

Twenty five isolates of the fungus *Alternaria alternata*, the causative agent of leaf-spot disease, were obtained from diseased specimens of eight vegetable plants collected from several sites within the city of Mosul, Iraq. The isolates were purified by the slide-culture technique and the single-spore isolation technique and used to compare their radial growth rate and efficiency in producing conidia, both features are essential for successful spread of the plant pathogen.After 5 days incubation on PSA at (25±1)?c isolate AA4 from *Beta vulgaris* gave the largest colony diameter (55mm) while isolate AA11 isolated from *Raphanus oleracea* gave the smallest (34.1mm).As regard the conidial suspension density, isolate AA20 from *Abelmoschus esculentus* gave the most dense suspension ($14x10^5$ conidia/ml) while isolate AA24 from *Beta vulgaris* gave the least dense suspension ($8.2x10^5$ conidia/ml) among all isolates. Both of these attributes are genetically controlled and very essential for successful spread of the pathogen.

المقدمة

يعد الفطر Alternaria alternata من الفطريات الناقصة الواسعة الانتشار اذ ينتشر في جميع الاماكن ويُعد من الفطريات الرمية، وتمتاز كونيدات هذا الفطر بأنها متعددة الخلايا Multicellular فضلاً عن كون عدد من الخلايا في الكونيدة الواحدة هي خلايا متعددة الانوية. (Huang وآخرون، ١٩٩٦)

ولقد سُجلت اصابات مرضية عديدة منها تبقع الاوراق الذي يسببه الفطر والذي تم تشخيصه في العراق ودول متعددة من العالم كمسبب مرضي لها، تبدأ الاعراض المرضية على الاوراق بشكل بقع ذات لون بني فاتح, والتي لا تلبث ان تتسع وتتحول بتقدم الاصابة الى نسيج نباتي ميت ذي لون بني غامقٍ, ويمكن انتقال الاصابة من الهواء او التربة محدثة الاصابة الاولية للمرض. (Kwon و Park، ٢٠٠٠)

ان التبقع الالترناري يظهر بهيئة تبقعات بنية مستديرة غالباً او غير منتظمة الشكل وقد تتحد البقع مع بعضها لتشمل جزءاً كبيراً من نصل الورقة, وبتقدم الاصابة تتحول البقع الى اللون البني الغامق نتيجة لموت الانسجة. (الخيرو، ٢٠١١).

يهدف البحث الحالي الى عزل الفطر A. alternata المسبب لمرض تبقع الاوراق من بعض محاصيل الخضر الصيفية والشتوية ودراسة بعض خواصها ذات العلاقة بإنتشار المرض, مثل سرعة النمو القطري للعزلات على الوسط PSA وكفاءة التبويغ, وبالتالي كثافة عوالق الابواغ المنتجة.

مواد العمل وطرائقهُ:

جمع العينات

تم جمع عينات اوراق محاصيل الخضر المصابة بمرض تبقع الاوراق من المناطق الزراعية لمدينة الموصل لعام ٢٠١٢-٢٠١٣ وذلك من مناطق: الرشيدية، الكَبة، الدندان و منطقة حي العربي. انتخبت الاوراق المصابة للمحصول الصيفي والشتوي, وذلك من منتصف شهر ايار وإلى شهر كانون الاول ٢٠١٢ للمحاصيل الصيفية التي شملت: القرع، الباذنجان، اللوبيا، والبامية. اما المحاصيل الشتوية فشملت السلق، الشلغم، الشوندر و الفجل.

الوسط الزرعي وظروف النمو

استخدم وسط مستخلص البطاطا والدكستروز والاكار Potato sucrose agar (PSA) بصورة روتينية لتنمية السلالات او لأدامتها في الاطباق او على موائل Slants ويحضّر الوسط من مستخلص ٢٠٠غم بطاطا مضافاً اليه ٢٠غم سكروز و ١٥ غم آكار, ويكمل الحجم الى اللتر من الماء المقطر وضبط الاس الهيدروجيني للوسط عند ٦,٠ ، وعُقِم بالموصدة.

وأديمت العزلات بالحفظ في الثلاجة عند ٤ْم، وجرى التحضين بصورة منتظمة عند الدرجة الحرارية ٢٥±١ْم ولمدة ٥ ايام عند زرعها على الوسط PSA (Pitt و Hocking، ١٩٩٧).

وبعد تنقيتها بطريقة البوغ المنفرد Single- spore technique وتشخيصها بطريقة الزرع على الشريحة Slide- culture technique، تم الحصول على ٢٥ عزلة فطرية عائدة للنوع A. alternata .

دراسة خصائص الفطر:

أ)اختبار معدل النمو القطري

جرت متابعة النمو القطري (Radial growth) لعزلات الفطر المختلفة للتعرّف على مدى الاختلاف في هذه الصفة، حيث لقحت اطباق حاوية على وسط PSA بأقراص بقطر ٥ملم, وضعت

في وسط الطبق, مأخوذة من مستعمرات فتية نقية لعزلات الفطر بعمر ٥ أيام وبواقع ثلاث مكررات تحت المتابعة اليومية, بحساب متوسط قياس قطرين متعامدين لكل مستعمرة من العزلات الفطرية. (الطائي، ٢٠٠٧)

ب)حساب كثافة العالق البوغي لمستعمرات الفطر

حضر العالق البوغي لمستعمرات الفطر, وذلك بأخذ قرصين بقطر ٥ ملم من مستعمرات الفطر النامية بعمر ٥ أيام, ووضعت في داخل انابيب اختبار سعتها ١٠ مل حاوية على ٥ مل من الماء المقطر المعقم وبداخلها ٥ خرزات زجاجية صغيرة ورجت القنينة بواسطة جهاز الرج vortex, مما ادى الى تفتيت قرص الاكار وتكسير السلاسل البوغية، أُخذت قطرات منه ووضعت على شريحة عد الخلايا (Haemocytometer) لحساب عدد الابواغ التي انتجتها كل مستعمرة من مستعمرات الفطر في المليلتر الواحد من العالق.

التحليل الاحصائي:

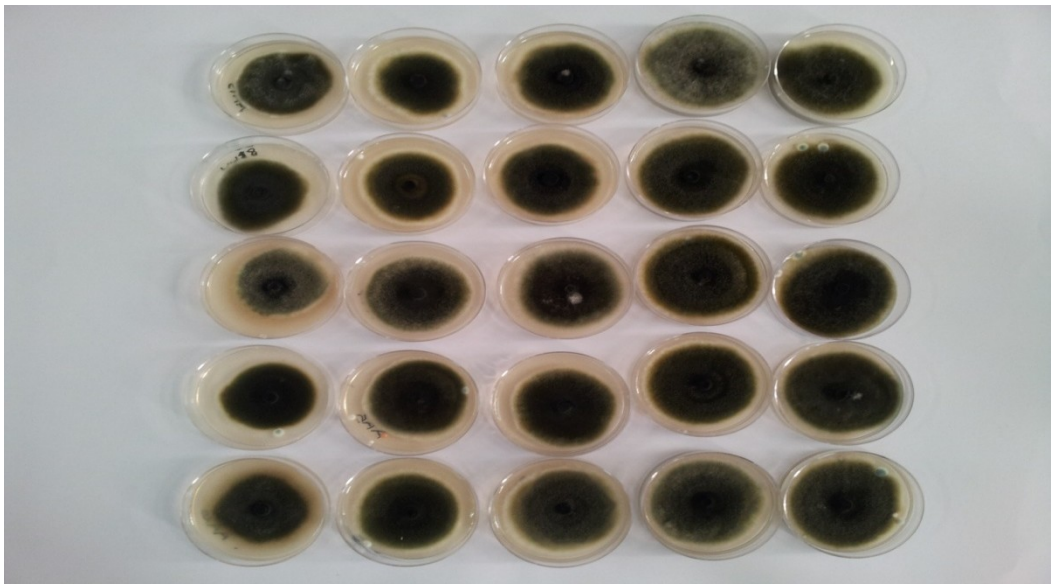
استخدم التصميم العشوائي الكامل, لأجراء تجربة التنمية وحساب اقطار المستعمرات, وكذلك لحساب كثافة العوالق الكزنيدية من العزلات المختلفة, حيث اجري تحليل التباين لكل حالة, وفي حال وجود فروق معنوية بين الاقطار او الكثافات المختلفة, فقد استخدم اختبار دنكن متعدد المدى لأيجاد العزلات ذات المتوسط الاعلى (Steel و Torrie، ١٩٦٠).

النتائج:

يظهر (الجدول –١) توزيع العزلات على عوائلها اذ تراوح عدد العزلات بين ٩ من السلق, وعزلة واحدة من كل من نباتي اللوبيا والقرع، بينما يظهر (الشكل –١) الاختلاف في اقطار العزلات النامية على وسط PSA.

الجدول (١): عزلات الفطر *A. alternata* المستحصل عليها خلال البحث الحالي حسب عوائلها.

العائل	رمز العزلة	عدد العزلات
السلق (Beta valgaris)	AA2- AA10	
الفجل (Raphanus oleracea)	AA11- AA14	٩
الباذنجان (Solnum melongera)	AA15- AA18	٤
الباميا (Abesmoschas esculentus)	AA19- AA20	٤
الشوندر (B. vulgaris)	AA21- AA22	٢
الشلغم (Prassica repa)	AA23- AA24	٢
اللوبيا (Vigna sinensis)	AA25	٢
القرع (Cucurbita pepo)	AA26	١
		١



شكل ـ١ـ التباين في اقطار مستعمرات عزلات الفطر A. alternata **المنماة على الوسط** PSA **لمدة ٥ أم ±ايام وبدرجة حرارة ٢٥**

كما يظهر (الجدول –٢) تحليل التباين لأقطار المستعمرات, حيث يبدو واضحاً ان هذا الاختلاف في النمو القطري يرجع الى الاختلاف بين العزلات, وكذلك الى الاختلاف في المكررات, اذ في كلا المصدرين من مصادر التباين كانت قيمة F اكبر من الجدولية, وهذا الاختلاف كان معنوياً عند مستوى احتمال ٥%.

جدول (٢): تحليل التباين لمتوسطات الاقطار (بالملم) الناتج من العزلات المختلفة بعد التنمية على وسط PSA ولمدة ٥ ايام وبدرجة حرارة ٢٥+أم

مصادر التباين	درجات الحرية	متوسطات مربعات الانحرافات قطر المستعمرة (ملم)
العزلات	24	38796.47*
المكررات	2	85698.07*
الخطأ التجريبي	48	19520.77
المجموع	74	

*) معنوي عند مستوى احتمال ٥%

ويبين (الجدول –٣) نتائج اختبار دنكن متعدد المدى على اقطار العزلات, حيث يظهر ان العزلات AA4,AA5,AA15 لها اعلى الاقطار بينما العزلة AA11 لها اصغر الاقطار.

جدول (٣): اختبار دنكن متعدد المدى لمتوسطات اقطار العزلات(بالملم) بعد التنمية لمدة (٥) ايام على الوسط PSA وعند الدرجة الحرارية ٢٥ ±١م ورتبت العزلات من اعلى قطر لأوطأ قطر

العزلات	متوسطات الاقطار
AA4	55.500 أ
AA5	54.500 أ
AA15	54.167 أ
AA7	53.300 أب
AA10	52.167 أب ج
AA6	51.833 أب ج
AA16	51.667 أب ج
AA17	51.667 أب ج
AA14	51.5000 أب ج
AA9	51.167 أب ج
AA22	51.167 أب ج
AA19	50.833 أب ج
AA8	50.500 أب ج
AA23	50.500 أب ج
AA26	50.167 أب ج
AA25	50.162 أب ج
AA21	49.667 أب ج
AA20	49.500 أب ج
AA3	49.000 أ ب ج
AA18	46.500 ب ج د
AA24	45.833 ب ج د
AA13	44.667 ج د
AA12	44.667 ج د
AA2	40.667 د
AA11	34.167 هـ

الاحرف المختلفة ضمن العمود الواحد يعني وجود فروق معنوية عند مستوى احتمال ٥% في اختبار دنكن المتعدد المدى.

ويظهر (الجدول –٤) نتائج تحليل التباين للإختلافات في كثافة العوالق الكونيدية بين العزلات المختلفة, حيث هناك فروق معنوية بين العزلات وكذلك بين المكررات كما يبدو من قيم F.

الجدول (٤): تحليل التباين لمتوسط كثافة العالق الكونيدي (كونيدة/مل) الناتج من العزلات المختلفة بعد التنمية على وسط PSA ولمدة ٥ ايام وبدرجة حرارة ٢٥ ±١م

مصادر التباين	درجات الحرية	متوسطات مربعات الانحرافات عدد الابواغ (بوغ/ملم)
العزلات	24	171.50*
المكررات	2	2120.06*
الخطأ التجريبي	48	60.683
المجموع	74	

*) معنوي عند مستوى احتمال ٥%

ويبين (الجدول –٥) نتائج اختبار دنكن على متوسطات كثافة العوالق الكونيدية من العزلات المختلفة, ويظهر من الجدول ان العزلة AA20 لها اعلى كثافة بينما العزلة AA24 لها اقل كثافة عالق كونيدي.

الجدول (5): اختبار دنكن متعدد المدى لمتوسط كثافة العالق البوغي ($x10^4$ بوغ/مل) للعزلات المختلفة بعد التنمية لمدة ٥ ايام على الوسط PSA عند الدرجة الحرارية (٢٥±١م)

العزلات	عدد الكونيدات
AA20	14.000 أ
AA26	١٢,٣٣٣ أ ب
AA13	١١,٦٦٧ أ ب ج
AA9	١١,٠٠٠ أ ب ج
AA18	١٠,٦٦٧ أ ب ج
AA23	١٠,٦٦٧ أ ب ج
AA15	١٠,٦٦٧ أ ب ج
AA17	١٠,٦٦٧ أ ب ج
AA2	١٠,٣٣٣ أ ب ج
AA16	١٠,٠٠٠ أ ب ج
AA22	١٠,٠٠٠ أ ب ج
AA3	١٠,٠٠٠ أ ب ج
AA14	١٠,٠٠٠ أ ب ج
AA5	١٠,٠٠٠ أ ب ج
AA25	٩,٦٦٧ أ ب ج
AA12	٩,٣٣٣ ب ج
AA4	٩,٣٣٣ ب ج
AA6	٩,٣٣٣ ب ج
AA19	٩,٠٠٠ ب ج
AA11	٨,٦٦٧ ب ج
AA10	٨,٦٦٧ ب ج
AA7	٨,٦٦٧ ب ج
AA8	٨,٣٣٣ ب ج
AA24	٨,٢٣٣ ب ج

المناقشة

تم في هذه الدراسة عزل وتشخيص ٢٥ عزلة تعود للجنس A. alternata من اوراق بعض نباتات الخضر, وكما هو موضح في (الجدول – ١) وتبين ان نبات السلق كان من اكثر المحاصيل الحاوية على الفطر في جميع العينات المستخدمة في الدراسة، حيث حقق اعلى عدد للعزلات و بلغت ٩ عزلات، وهذا يتفق مع ما جاءت به الطائي (٢٠٠٧) من ان الفطر A. alternata قد تم عزله من اوراق نباتات العائلة الرمرامية, وقد حقق اعلى نسبة تردد في نبات السلق و بلغت ٥٠% مقارنة بالمحاصيل الاخرى.

وكما يظهر من (الجدول – ١) فأن هناك تبايناً في تواجد هذا الفطر على العوائل المختلفة, اذ كانت اقل نسبة تردد له تمثلت على نبات اللوبيا والقرع, وهذا يفسر التخصص الفسيولوجي للفطر على بعض العوائل, وهذا يتفق مع ماجاء به حسن (١٩٩٨) من ان الـ A. alternata تمتلك خصوصية للعوائل التي تصيبها, ودرجة السمية تختلف بأختلاف النباتات المعيلة, وهذا يظهر مدى قابليتها على انتاج السموم الخاصة بالعائل، كما تم من خلال هذه الدراسة معرفة الصفات المجهرية والمزرعية للفطر A. alternata وهي ان المستعمرة تتصف بكونها زيتونية الى سوداء زيتونية او بنية زيتونية والابواغ تظهر بشكل سلاسل مترتبة طويلة نامية من الاسفل الى الاعلى وتظهر الابواغ بشكل بيضوي او مخروطي او مخروطي يستدق من طرفه مشكلاً تركيباً شبيهاً بالمنقار, والحوامل البوغية تظهر بلون بني شاحب او بني زيتوني, وان الكونيدات تكون مفردة او تتجمع في سلاسل قصيرة او طويلة بسيطة او متفرعة تحتوي ٢–٧ كونيدات متباينة الاشكال من البيضاوية او الاهليليجية الى الصولجانية المقلوبة او الكمثرية المقلوبة .

ولم تختلف العزلات في معدلات تواجدها على العوائل المختلفة فقط (الجدول – ١) وانما في معدلات نموها القطري على الاوساط الزرعية (الشكل – ١) وتأكدت معنوية الاختلافات في النمو القطري بإجراء تحليل التباين بين متوسطات اقطار العزلات المختلفة (الجدول – ٢) وعند إجراء اختبار دنكن متعدد المدى على متوسطات الاقطار المتباينة, أشارت النتائج في (الجدول – ٣) الى وجود فروقات معنوية بين مستويات اقطار مستعمرات العزلات، إذ اعطت العزلة AA4 اكبر نمو قطري, وهي عائدة لنبات السلق Beta vulgaris وكان مقداره (٥٥,٥٠٠ ملم) في حين اعطت العزلة AA11 اقل نمو قطري, وهي عائدة لنبات الفجل Raphanus oleracea وبلغ (٣٤,١٦٧ ملم) وقد اعتمدت الزيادة في قطر المستعمرة على فترة التحضين, اذ تزداد الاقطار بزيادة فترة التحضين عند الدرجة الحرارية الملائمة لنمو الفطر وهي ٢٥ْم على الوسط PSA, حيث ان هذا الوسط هو الوسط الملائم لنمو هذا النوع من الفطر, وهذا يتفق مع ما جاءت به تيموز (٢٠١٢) من ان فطر الـ A. alternata له القابلية على النمو على وسط PSA بالدرجة الاولى.

وعند تقدير كثافة العالق البوغي لعزلات الفطر المختلفة اظهرت نتائج تحليل التباين (الجدول – ٤) وجود فروقات معنوية بين العزلات في متوسط ما تنتجه من الكونيدات، كما بيّن اختبار دنكن متعدد المدى لمتوسطات كثافة العالق بينت النتائج في (الجدول – ٥) وجود فروقات معنوية ايضاً بين الاعداد الحية المقدرة للأبواغ في عزلات الفطر، وذلك بعد تحضير العالق الكونيدي لكل منها, أعطت العزلة AA20 العائدة لنبات البامية اكثف عالق كونيدي وهو (١٤x١٠^{٤} بوغ/مل) من بين جميع العزلات, بينما أعطت العزلة AA24 العائدة لنبات الشلغم أقل العوالق الكونيدية كثافة وهي (٨,٢x١٠^{٤} بوغ/مل)، ولمّا كانت القياسات التي أجريت على العزلات بشأن كلتا الصفتين، النمو القطري وكثافة العالق الكونيدي، قد جرت تحت ظروف مختبرية قياسية موحدة، فلا بد ان يرجع الاختلاف في هاتين الصفتين الى اسس وراثية مختلفة بين العزلات، والعمل جارٍ لبيان الاختلافات الوراثية بإستعمال معايير اختبارية اخرى. ان كلاً من هاتين الصفتين تعد عاملاً مهماً في انتشار الفطر وغزوه لعوائل جديدة، فالنمو السريع للغزل والانتاج الوفير للكونيدات تمكّن الفطر من الانتشار السريع والتنافس الجيد في الطبيعة مع بقية الفطريات في غزو العوائل (Agrios، ٢٠٠٥).

المصادر:

الخيرو، انور نوري (٢٠١١).التشخيص الكروموتوغرافي لبعض سموم الفطر Alternaria conjuneta simmons المسببة لتبقع اوراق الزيتون النامية في العراق.مجلة التقني، ٢٤(٥):٢٠٦-٢١٦ .

الطائي، ورقاء سعيد قاسم. (٢٠٠٧). دراسة تصنيفية لأنواع جنس Alternaria المسبب لمرض تبقع الاوراق وتهيئة موديل للسيطرة البايولوجية في مدينة الموصل، اطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة الموصل، ١٥٣ صفحة.

تيموز، سولاف حامد. (٢٠١٢). تأثير بعض المواد الكيمياوية والعوامل الفيزياوية والكيمياوية على عزلتي فطر .Alternaria spp المسببة لتلف بعض انواع الحبوب المخزونة والاغذية المحلية والمعلبة. مجلة القادسية للعلوم الزراعية،٢(١):١١٦-١٢٨.

حسن، احد عبد المنعم.(١٩٩٨). الطماطم الامراض والافات ومكافحتها. الدار العربية للنشر والتوزيع-القاهرة، صفحة:٤٦.

Agrios,G.N.(2005).Plant pathology. 3rd. U.K.edition published by Acadimic press(London).

Hankin,L. and Anagnostakis, S.L.(1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi.*Mycologia.67*:597-607.

Huang, S.L.; Kohmoto,K.; Otani,H.; Kodama,M.(1991). Nuclear behavior during the formation of apressoria by *A. alternata. Myco. Sci.,37*:41-47.

Kown, J.H. and Park, C.S.(2002). Leaf spot of broad bean (*vicia faba*) caused by *Alternaria tenuissima.Res.Plant Disease.8*:pp.117-119.

Pitt,J.I.; Hocking, A.D.(1997).*Fungi and Food Spoilage.* Gaithersburg, Maryland, pp.593.

Steel,R.G.D.; Torrie,J.H.(1960).*Principle and Procedures of Statistics* .Mc Graw-Hill,pp.169-173,481p.

Thomma, Borrt P.H.(2003). *Alternaria* spp. From general saprophyte to specific parasitle. *Mol. Pl. Pathol*. pp.225-236.

Yeoh, H.H.; Khew, E. and Lin, G. (1985). Asimple method for screening cellulytic fungi. *Mycologia,77*:161-162.

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.