موت أفرع العنب المتسبب عن الفطر Ellis *Curvularia lunata*

خالد حسن طه نضال يونس محمد بسام يحيى إبراهيم
قسم وقاية النبات / كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل / موصل /العراق

الخلاصة

في دراسة لمرض موت أفرع كرمات العنب في مزرعة نينوى والذي تسبب عن الفطرEllis *Curvularia lunata*. وطوره الكامل *Pleospora sp*.ومن الدراسة السمية للفطر تم الحصول على راشح مزرعة الفطر والذي تم فصل وتنقيته مكوناته باستخدام عمود فصل من هلام السليكا وتم تحديد مكوناته باستخدام كراماتوكرافي الصفائح الرقيقة TLCوجهاز المطياف وبحزمة موجية محصورة بين٢٦٠-٢٩٠ نانوميتر حيث تم الحصول على مركبين سميين للفطر. وقد تباين التأثير السمي للمركبين عند إجراء اختبار ذبول الأفرع والاختبار الحيوي لأوراق العنب واختبار تحلل الكلوروفيل .

المقدمة

يعد العنب من المحاصيل البستنية ذات الانتشار العالمي الواسع إضافة إلى الأعداد الكبيرة من أصناف العنب التي تزرع بصورة واسعة في الحدائق المنزلية(السعيدي,١٩٨٤) . كما يعد موت قصبات وأفرع العنب من الأمراض المحددة لزراعة كرمات العنب وإنتاجيتها ، وقد تم تسجيل العديد من المسببات الفطرية الممرضة لها والتي تعمل بشكل منفرد أو مركب مع أكثر من مسبب في أن واحد مؤدية إلى تدهور الكرمة وموتها (Odjakova و Hadjiivanova ،٢٠٠١ و Oliveira وآخرون ،٢٠٠٤) وفي مقدمتها النوع Ellis *Curvularia lunata* حيث أشير إلى أول تسجيل له على كرمات العنب في الولايات المتحدة الأمريكية فضلا عن النوعين *C. verruculosa* و *C .verruciformis* (Ellis ،١٩٦٦) . وتمت الإشارة إلى تسبب الفطر في إحداث تبقع للأوراق وموت نهايات القصبات فضلا عن تقرح اذرع وسيقان العنب في المواسم الرطبة والجافة (Uyovbisere وآخرون ،٢٠٠٧) .

وفي العراق تم تسجيله في منطقتي رشنكي وباري بهار التابعة لمحافظة دهوك على الصنف رشميو المربى بالطريقتين الراسية والشكل –T ،كما أن العدوى الصناعية به أحدثت تقرحا لقصبات أصناف العنب زرك ورشميو وطيفي وكمالي المزروعة بطرق التربية الراسية والسلكية وعلى شكل حرف T(Saido ،٢٠٠٧) . ونظراً لتفشي موت أفرع العنب وبوبائية عالية في مزرعة نينوى خلال عام ٢٠٠٤ لذا ارتأينا إجراء الدراسة التي تضمنت تشخيص المسبب ومعرفة مدى سميته للعنب.

مواد البحث وطرائقه

العزل: تم عزل الفطر من أفرع عنب مصابة على وسط مستخلص البطاطا والدكستروزوالاجار Potato PDA Dextrose Agar المدعم بالمضاد الحيوي كبريتات الستربتومايسيين بتركيز ٥٠ ملغم/ لتر حضنت الأطباق بدرجة ٢٥-٢٧سيليزية لمدة أربعة أيام فحصت النموات الفطرية النامية ومن ثم نقيت في أطباق بتري معقمة حاوية على الوسط الغذائي PDA ثم عرف الفطر باستخدام المفتاح التصنيفي المعد من قبل Barnett وHunter (٢٠٠٦)، والى مرتبة النوع باستخدام المفتاح التصنيفي لمرتبة النوع المعد من قبل Ellis (١٩٦٦).

اختبار القدرة الامراضية للفطر: اختبرت القدرة الامراضية للفطر المعزول وذلك باختيار أغصان سليمة بعمر سنة و بأقطار متجانسة لاتتجاوز ١.٥سم وتمت العدوى الصناعية بتنميةالفطر المعزول على الوسط الغذائيPDAالمدعم بالمضاد الحيوي كبريتات الستربتومايسيين بتركيز٥٠ملغم /لتر عند درجة حرارة ٢٥°-٢٧سيليزية لمدة سبعة أيام ، تم أحداث جرح بطول٢ سم ولقح بقرص قطره ٤ملم من مزرعة الفطر المعزول (Lewis و Vanarsdel ،١٩٧٨) تم تلقيح خمسة أغصان بواقع جرح واحد في كل غصن ثم غطيت الجروح بوسادة قطنية مبللة وربطت بشريط لاصق.

تركت الأشجار لمدة٦٠ يوما بعد التلقيح(Sharma وآخرون ،١٩٨٤).أخذت النتائج بحساب متوسط الزيادة في طول التقرح الحاصل في الغصن . كما تم إعادة عزل الفطر الممرض من الأفرع بعد ظهور الإصابة تأكيدا لفرضيات كوخ.

تاريخ تسلم البحث٢٠٠٩/٤/٢ وقبوله ٢٠٠٩/٦/٥

تكشف الطور الكامل للفطر : تم جمع عدة أفرع من نباتات العنب ظهرت عليها أعراض الذبول في نهاية موسم النمو واختير عدد من الأجسام الثمرية بالتقاطها بشكل مفرد بواسطة ابرة معقمة وتحت القوى

الصغرى(X5) من المجهر ثم زرعت هذه الأجسام الثمرية في أطباق بتري حاوية على الوسط PDA بعد تصلبه وحضنت هذه الاطباق في درجة حرارة ٢٥- ٢٧ سيليزية لمدة سبعة أيام.

اختبار سمية الفطر:

١-اختبار ذبول الأفرع: حضر الوسط الغذائي السائل تشابك دوكس Cazpek Dox Broth المعقم والمدعم بالمضاد الحيوي كبريتات الستربتومايسيين بتركيز٥٠ملغم/لتر، وزع الوسط الغذائي في دوارق سعة٥٠٠ سم^3 بواقع ٢٠٠ سم^3/ دورق ثم لقحت بقرص من الفطر بقطر ٤ ملم ، أخذ من حافة مزرعة بعمر خمسة أيام ثم حضنت في درجة ٢٥-٢٧ سيليزية لمدة ٢١يوم .وضعت الدوارق في هزاز كهربائي بسرعة ٤٠ حركة في الدقيقة ولمدة عشر دقائق، رشح الوسط بوساطة ورق ترشيح نوع Whatman رقم (٢) بوضعه في قمع بوخنر ومركب على دورق ايرلنماير ثم سحب الراشح بواسطة مخلخل ضغط ،اخذ جزء من الراشح الفطري ٥ مل وأضيف إليه ثلاث قطرات من١% صبغة الفوكسين القاعدية الحمراء ،ثم قسم في ٥ أنابيب اختبار معقمة حجم ٢٠سم^3 .أخذت أفرع عنب طرفية سليمة بأقطار وأطوال متجانسة تحمل كل منها ٥ أوراق قمية ووضعت في الأنابيب الحاوية على الراشح الفطري مع صبغة الفوكسين القاعدية ، أما معاملة المقارنة فقد وضعت الأفرع في أنابيب اختبار تحتوي ماء مقطر ومعقم أضيف إليه صبغة الفوكسين القاعدية،اشتملت المعاملة على خمسة مكررات.وضعت الأنابيب في درجة حرارة المختبر لمدة ٧٢ ساعة تحت ضوء الفلورسنت. أخذت النتائج بملاحظة أعراض الذبول بعد ٢٤ ساعة من المعاملة (Yoder،١٩٨١).

تنقية السم الفطري:تم تحضير ٢٥٠ سم^3 من راشح مزرعة الفطر وفقاً للطريقة سابقة الذكر ووضع في قمع فصل زجاجي سعة ٥٠٠ سم^3 ثم أضيف إليها ١٠٠ سم^3 من خلات الاثيل وبعد الرج لعدة دقائق يدوياً أخذت طبقة خلات الاثيل وتم ترشيحها من خلال طبقة من كبريتات الصوديوم اللامائية.

اعداد عمود هلام السليكا : تم استخدام عمود فصل زجاجي بطول ٧٥سم وقطر ٢.٥سم ،وضعت قطعة من الصوف الزجاجي في نهاية العمود جرى بعد ذلك تعبئة العمود بمادة هلام السليكا غسل العمود بالماء المقطر و حسب معدل التدفق Flow Rate بوساطة خلات الاثيل والذي ضبط عند ١٢ مل /ساعة .كرر الإجراء مرتين للتأكد من استقرارية معدل التدفق ثم ملئ العمود بخلات الاثيل أثناء فترة عدم الاستخدام .

تنقية راشح مزرعة الفطر بعمود هلام السليكا: تم إضافة ٥٠ سم^3 من مستخلص راشح مزرعة الفطر في خلات الاثيل بهدوء على الجدار الداخلي للعمود واستقبل الراشح في عشر قناني زجاجية معقمة بحجم ٢٠سم^3 . تم تبخير خلات الاثيل الى درجة الجفاف ومن ثم أذيبت البقايا في ٥سم^3 من الايثانول وحفظت في درجة ٥ سيليزية لحين استخدمها في الاختبارات اللاحقة.

اختبارات الكشف عن السم الفطري :

١-الاختبار الضوئي: تم قياس طيف الامتصاص لراشح القناني العشر ضمن حزمة الطول الموجي للاشعة فوق البنفسجية المحصورة بين ١٩٠ -٣٢٠ نانوميتر وبفاصلة ١٠ نانوميتر في جهاز المطياف لتحديد الطول الموجي الذي يقع فيه أعلى امتصاص وكذلك لتحديد عدد القمم لمنحنى طيف الامتصاص والتي تعطى إشارات أولية عن عدد المركبات الموجودة في أجزاء راشح مزرعة الفطر . استخدمت أجزاء الراشح التي أعطت أعلى قيم للامتصاص في حزمة الطول الموجي ٢٦٠-٢٩٠ نانوميتر للاختبارات اللاحقة .

٢-اختبار كروماتوكرافي الصفائح الرقيقة TLC Thin layer chromatography: استخدمت صفائح هلام السليكا بأبعاد ٢٠ x ٢٠ وسمك ٠.٢٥ سم استخدمت أجزاء الراشح المتوقع احتوائها على السموم الفطرية والتي تم الحصول عليها من عمود الفصل والمذابة في الايثانول في تنقيط ألواح TLC وذلك باستخدام ماصة دقيقة Micropipetteحجم ٥ مايكروليتر بعد أن تم تنشيط تلك ألواح حراريا في فرن كهربائي في درجة ٨٠ سيليزية لمدة ساعتين ثم طورت الصفيحة في حوض فصل يحتوي على مزيج الكلوروفورم والاسيتون وتولوين وخلات الاثيل بنسبة٩:١: ٦:٣ كمحلول جريان وبعد انتهاء طور الجريان رشت الألواح بمحلول ٢٠% حامض الكبريتيك ووضعت في فرن درجة حرارته ١١٠سيليزية لمدة ١٠دقائق وفحصت باستخدام مصباح للأشعة فوق البنفسجية عند الطول الموجي ٣٦٥ نانوميتر ثم حددت البقع التي أعطاها كل جزء من أجزاء الراشح .

الاختبار الحيوي لأوراق العنب بالسم الفطري:استخدمت أوراق عنب قمية وضعت على أوراق ترشيح في أوعية بلاستيكية وأضيف١.٠ سم^3 من السم المذاب في ١% ايثانول بثلاثة تراكيز (٢٥ و٥٠ و ٧٥ مايكروغرام/سم^3) إضافة إلى معاملة المقارنة،تمت الإضافة في أربعة مواقع في السطح العلوي والسفلي

للاوراق . حضنت الأوراق تحت الإضاءة ولمدة ٧٢ساعة .ثم حساب شدة الإصابة بتأثير السم وفقا لسلم من ثمانية درجات (Mesdah وآخرون ، ٢٠٠٠).

اختبار تحلل الكلوروفيل :استخدمت أقراص من أوراق عنب غضة بقطر ٠.٤ سم ووضعت في أطباق بتري بقطر ٩سم وبواقع عشرة أقراص لكل تركيز من تراكيز السم الفطرى وهي صفر و٢٥و٥٠ و٧٥ مايكروغرام / سم^{3} في ١% ايثانول حيث أضيف ١٠ سم^{3} من كل تركيز من التراكيز المذكورة إلى طبق المعاملة .حضنت الأطباق عند درجة حرارة ٢٧سيليزية ولمدة ٧٢ ساعة وبعد انتهاء فترة المعاملة تم استخلاص وحساب كلوروفيل A و B حسب طريقة Knudsen وآخرون (١٩٧٧) .

النتائج والمناقشة

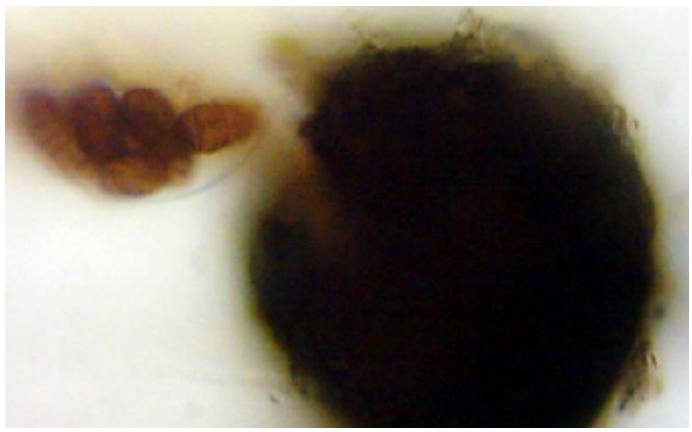
عزل الفطر المسبب وتشخيصه:أظهرت نتائج العزل من أفرع العنب المصابة عن ظهور الفطر *Curvularia lunata* Ellis وتميزت مستعمرة الفطر على وسط مستخلص البطاطا والدكستروز والاجار PDA بنموها القطني الأبيض إلى الرمادي في بداية النمو وتحولها إلى اللون الزيتوني ثم الأسود الداكن عند بلوغ قطر المستعمرة ٩ سم بعد٥ أيام من التحضين في درجة حرارة ٢٥°- ٢٧سيليزية وعند إجراء الفحص المجهري تبين أن الفطر يكون هايفات مقسمة بنية اللون وتتسع الحوامل الكونيدية في المنطقة التي تنشا منها الكونيدات وهي متعددة الحواجز وتقسم هذه الحواجز الكونيدة الى عدة خلايا وتتميز الكونيدات بوجود خلية مركزية داكنة اللون واكبر حجما من بقية الخلايا وهذا يودي إلى أنحاء وتقوس الكونيدة أحيانا من الجزء الوسطي كما في الشكل (١) .

كما ظهر الطور الكامل للفطر في نهاية شهر ايلول بهيئة وسادة فطرية Stroma تحت القلف الميت لأفرع العنب وانتج الفطر أجسام ثمرية من نوع Pesudothecia بأبعاد١٦٠-١٧٧ um تحتوي هذه الأجسام على عدة اكياس بابعاد ١٤٠-١٤٥ x ١٦-١٨ um يحتوي كل منها على ٨ أبواغ كيسية صفراء براقة مفصصة بابعاد ١٥-٢٣x ١٦-٢٢ um (الشكل ٢ و٣) وهذ المواصفات تتفق مع مواصفات الجنس *Pleospora sp* .وقد تم تسجيل هذا الجنس عل العنب في كل من الولايات المتحدة الأمريكية استراليا وتشلي والعراق بطوره الناقص(Ellis ، ١٩٦٦ و Smith وآخرون ، ١٩٨٨و Saido ،٢٠٠٧) وقد أوضحت نتائج تنمية معلق الأجسام الثمرية على PDA عن ظهور الفطر *C. lunata* بشكل نقي . ولم تسبق الإشارة إلى تسجيل الفطر *Pleospora sp* كطور كامل للفطر *C. lunata* إنما ذكر الفطر *Cochliobolus lunata* كطور كامل له (Wheeler ،٢٠٠٣) ، علما بان الفطر *Pleospora sp* يعد الطور الكامل للعديد من أنواع *Phoma* و *Stemphylium* و *Alternaria* و *Helminthosporium* (Wilhelmusو Jones ،٢٠٠١)

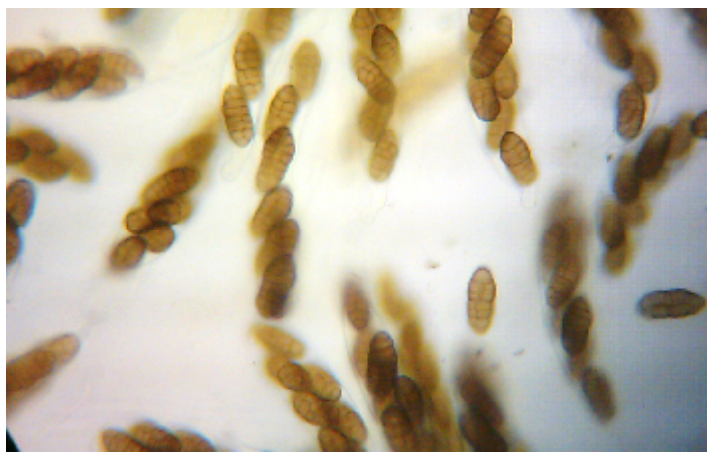
اختبار القدرة الامراضية للفطر:أظهرت أفرع العنب السليمة بعد ٦ أسابيع من العدوى الصناعية أعراض الذبول والموت التراجعي مع تشقق للقلف وذبول وموت للأوراق الموجودة على هذه الأفرع أما الأعراض بعد ٤ أشهر من العدوى الصناعية فكانت بشكل تقرحات داكنة اللون Cankers بعد موت وتنخر أنسجة الجزء المصاب Necrotic Lesions للنسيج المصاب مما يشير إلى إحداثه موتاً للأنسجة وجفاف قشرة الساق ثم موت وتقشر طبقة القلف وبلغ متوسط طول التقرح ٣.١ سم. تم إعادة عزل الفطر من مواقع الإصابة وبصورة نقية بعد زراعتها على الوسط الغذائي PDA .

اختبار ذبول الأفرع:ظهرت أعراض الذبول على الأفرع الموضوعة في راشح مزرعة الفطر حيث بدأت الأفرع بالذبول بعد اليوم الأول وانتهت إلى الجفاف بعد اليوم الثالث من المعاملة، أما الأفرع الموضوعة في الماء فقط فلم تظهر أعراضاً للذبول وعند فحص المقاطع النسيجية للأفرع لوحظ انتشار صبغة الفوكسين في أنسجة الخشب وهذا يدل على أن الراشح قد انتقل خلال الأوعية الخشبية الناقلة للماء إلى جميع أجزاء الأفرع والأوراق وان الذبول الحاصل فيها كان نتيجة للتسمم الحاصل في الأنسجة الناقلة براشح مزرعة الفطر ومن ثم انعكس ذلك على امتصاص الماء وعلى انتقاله في الأفرع وذلك ماأشار إليه Rajeev وآخرون (١٩٩٧) في التحري المبدئي عن السم الفطري .

الشكل (١): الحامل الكونيدي و كونيدات الفطر *Curvularia lunata* (40x)



الشكل (٢): الجسم الثمري Pesudoperithecia للفطر *Pleospora sp* وكيس Asci خارج منه(40X).



الشكل (٣):الأكياس والابواغ الكيسية للفطر *Pleospora sp* الطورالكامل للفطر *C. lunata* (40X).

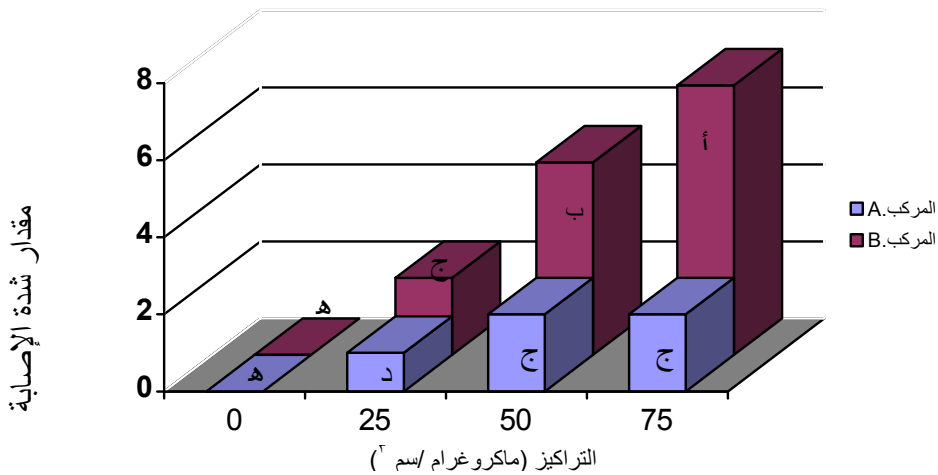
تنقية السم الفطري:

١-الاختبار الضوئي :أظهرت نتائج مسح الطيف الضوئي عند الطول الموجي ٢٠٦-٢٠٩ نانوميتر عن وجود ست قمم ضمن هذا المدى وتم إعطائها حروف تسلسلية للدلالة عليها وتشير هذه النتائج إلى طبيعة التركيب الحلقي الفينولي لهذه المركبات ضمن الطول الموجي المذكور أنفاً .

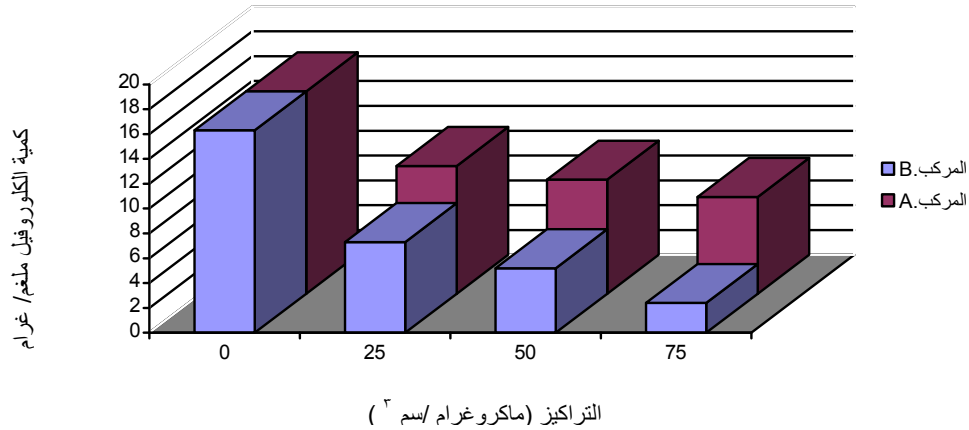
٢--اختبار كروماتوكرافي الصفائح الرقيقة : كانت محصلة الفصل باستخدام **TLC** في الحصول على ستة بقع تمثل ستة مركبات بواقع بقعتين للجزئين الثالث والخامس من الراشح وبقعة واحدة لكل من الجزء السادس والثامن من الراشح في حين لم تحدد آية بقعة لبقية أجزاء الراشح باستخدام حامض الكبريتيك والفحص باستخدام مصباح الأشعة فوق البنفسجية عند الطول الموجي ٣٦٥ نانوميتير .

الاختبار الحيوي لأوراق العنب بالسم الفطري:أظهرت نتائج هذا الاختبار أن جزئين فقط من أجزاء الراشح وهما الثالث والخامس قد اظهرا أعراضا سمية على أوراق العنب حيث بدا نسيج أوراق العنب الانتفاخ ثم ما لبث أن تحول إلى اللون البني ثم اللون الأسود ومن ثم حدوث موت موضعي في موقع المعاملة بالسم الفطري وقد تم تسميتهما في هذه المرحلة بالمركبان A وB وقد تباين المركبين في تأثيرهما السمي وكذلك ظهرت اختلافات معنوية التراكيز المستخدمة كما يتضح من الشكل (٤)حيث ازداد التأثير السمي مع زيادة التركيز ، وأشار Kim وآخرون(٢٠٠٠) أن بعض أنواع الفطر *Curvularia* تنتج مجموعة من السموم الفطرية والتي لها عدة تأثيرات على الأنسجة النباتية والتي تودي في المحصلة إلى ظهور أعراض اللفحة .

اختبار تحلل الكلوروفيل :يتضح من الشكل (٥) وجود اختلافات معنوية بين المركبين السميين A وB في تأثيرهما على محتوى الأوراق من الكلوروفيل وأدت المعاملة بالمركب B إلى حصول أعلى مقدار للخفض في الكلوروفيل في جميع التراكيز المستخدمة وكان أعلى مقدار للخفض في المحتوى من الكلوروفيل عند التركيز ٧٥ مايكروغرام /سم^{3} مقارنة بتراكيز المركب A . وتملك العديد من السموم الفطرية تأثيرا على المحتوى من الكلوروفيل وهناك عدة سبل لهذا التأثير السام منها تراكم المركبات الوسطية في مسار تخليق الكلوروفيل أو من خلال تحطيم البلاستيدات او حدوث عملية قصر لصبغة الكلوروفيل أو زيادة نشاط إنزيم Chlorophlase عل حساب إنزيم Chlorophyll synthetase (Abbas وآخرون ،١٩٩٣)



الشكل (٤): تأثير المعاملة بالمركبين السميين للفطر *C. lunata* على شدة الإصابة في أوراق العنب .



الشكل(٥):تأثير المعاملة بالمركبين السميين للفطر *C. lunata* على كمية الكلوروفيل في أوراق العنب .

GRAPEVINE BRANCHES DECLINE CAUSED BY *Curvularia lunata* Ellis

Khalid Hassan Taha Nidhal Younis Almurad Bassam Yahya Ibraheem
Dept. of Plant Protection, College of Agric. and Forestry. University of Mosul .Iraq

ABSTRACT

This study was conducted on grapevine showed decline symptoms and it was carried out in Ninava grapevine on (Shadda –Sudai) cv. The study indicated that the grapevine decline was caused by *Curvularia lunata* Ellis and its Telomorph stage *Pleospora sp. C. lunata* culture filtrate was purified by gel filtration ,TLC and calorimetric analysis by using spectrophotometer showed that *C. lunata* secreted two types of toxin whose wave length were 260-290 nm the two toxins showed different toxic effect to the grapevine

المصادر

ألسعيدي ،إبراهيم حسن(١٩٨٤).الأعناب ،دار الكتب للطباعة والنشر ،جامعة الموصل ٦٠٣ص.

Rajeev ,K.; R. K. Upad and I.K.G. Muker (1997).Toxins in Plant Diseases Development and Evolving Biotechnology. Science publishers, Inc USA 236pp.

Abbas, H. K.; W. C. A. Gelderblom; M. E. Cawood and W. T. Shier (1983). Biological activity of fumonisins mycotoxins from *Fusarium monloforme* in jimsonweed (*Datura stramonium* L.) and mammalian cell cultures. Toxicon. 31: 345-353.

Barnett, H.L and B.B. Hunter(2006). Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Burgess publishing company 241 pp.

Ellis,M.B.((1966). Dimataceous Hyphomycetes *Curvularia,Brachsporium* ,Etc. Issued 14December 1966Mucological papers ,No106:57pp

Kim,J.C.;G.J.Choi and H.T.Kim(2000).Pathogincity and pyrenocine production of *Curvularia inaequalis* isolated from zoysia grass. Plant Dis.84:684-688.

Knudsen,L.L.:T.W.Tibbitts and G.E.Edwards(1977).Measurement of Ozone injury by determination of chlorophyll concentration ,Plant physiology .60:606-608

Lewis, R.J. and E.P. Vanarsdel (1978).Development of Botryodiplodia cankers in Sycamore at controlled temperatures .Plant Dis.Reptr 62:125-126.

Mesdah , L.A.; G.M. Vander Weerden ; H.J.J. Nijkamp and J. Hille (2000).Sensitivity among species of solanaceae to AAL toxin produced by Alternaria alternate f.sp.lycopersici. Plant Pathology 49:737-741.

Odjakova,M. and C.Hadjiivanova.(2001).the complexity of pathogen defense in plant .Bulg.J.plant Physiol.27:101-109.

Oliveira, H.; M.E. Rego and T. Nascimento (2004).Decline of young grapevines caused by fungi .Acte Horticulturae 52:295-304.

Saido ,K.A.(2007) .Fungal decline of grapevines in Duhok Province .Msc. Thesis ,Plant Protection ,College of Agriculture ,Duhok University ,Iraq.

Sharma, J.K.,C. Mohanan & E.J. Maria (1984).Anew stem canker by Botryodiplodia theobromae in India .Mycol.Soc.83:162-193.

Smith ,I. M.; J. Dunez ; R .A.Elliot ; D.H. Philps and S.A. Archer(1988).European Hand Book of Plant Diseases .black well scientific publaction.365pp.

Uyovbisere ,E.; O. Aladi ; A.D. Akpa and P.S. Chindo(2007).Seasonality of the mycoflora of crown diseases complex of the vegetative organs of the grapevine Vitis vinifera cvar Anap-e- shahe .African J.Biotech.6(5):544-552.

Wheeler, M.H.(2003).Melanin biosynthesis in fungus Curvularia lunata (telomorph: Cocholiobolus lunata) Canadian Journal of Microbiology 49 :110-119.

Wilhelmus , K. R. and D. B. Jones (2001). Curvularia keratitis. Tr. Am. ophth. Soc. 99:111-130.

Yoder, O.C.(1981) "Assay" In: R.D. Durbin "Toxin in Plant Diseases" Academic press. New York. P.45-71.