الكشف عن الانزيمات والسموم المنتجة من مسبب مرض ذبول الافرع واسوداد الساق في أشجار التفاح والبرتقال في بغداد

إيمان خليل عبد الكريم [1]
قسم وقاية النبات – كلية علوم الهندسة الزراعية – جامعة بغداد ،العراق
eman.khalil@coagri.uobaghdad.edu.iq

نيران سالم الجراح [2]
قسم وقاية النبات – كلية علوم الهندسة الزراعية – جامعة بغداد ،العراق
neran.aljarah@coagri.uobaghdad.edu.iq

مستخلص البحث:
اجريت الدراسة في كلية علوم الهندسة الزراعية في مختبرات قسم وقاية النبات 2019، بهدف تشخيص المسبب المرضي لمرض ذبول الافرع واسوداد الساق جزيئياً ودراسة قدرته على انتاج الانزيمات والسموم على أشجار التفاح والبرتقال في بعض مناطق بغداد .أظهرت نتائج التتابع النيوكلوتيدي للفطر *Neoscytalidium* انه يعود للنوع *N.hyalinum*وكانت نسبة تطابق عزلة التفاح 100% مع العزلات العالمية و98% لعزلة البرتقال . تم تسجيل التتابعاتالنيوكليوتيدية للفطر فيالمنظمة العالمية لبنك الجينات ويعد هذا التسجيل الاول للفطر على التفاح والبرتقال في العراق .اظهرت النتائج قدرة الفطر في انتاج انزيمي السيلوليزواللاكيز. أظهرت نتائج تحليل راشح عزلات الفطر بطريقة الـFTIR أن السم المنتج من قبل عزلاتالفطريتكون من مجاميع فعالة متمثلة بالكاربون – هيدروجين مدعمة بمجاميع المثلين (CH2) والمثيل (CH3) مع وجود المجموعة الفعالة كاربون – أوكسجين وتم تشخيصها لاولمرة بطريقةGC-Mass وأظهرت نسبة تطابق 88-91 مع مادة Peroxide dibutyl وهي مادة مؤكسدة قوية .

الكلمات المفتاحية :*Neoscytaldiumhyalinum*، التشخيص الجزيئي، السموم الفطرية ،مرض ذبول الافرع و اسوداد الساق.

المقدمة:

تعد أشجار الفاكهة ذات أهمية اقتصادية كبيرة في كثير من دول العالم ومنها العراق إذ بلغ إنتاج البرتقال لسنة 2018 في محافظات المنطقة الوسطى 72816 طن أما التفاح فبلغ 49644 طن(الجهازالمركزيللاحصاء، 2018).تصاب هذه الاشجار بالعديد من الامراض منها مسببات أمراض التقرحات الناتجة عن عدد من الفطريات من بينها أنواع الفطر *Neoscytalidium*.spp التي تكون الظروف غير المناسبة للعائل دوراً كبيراً في حدوث الإصابة (Begonde واخرون ، 2010).

ذكر Sutton و Dyko (1989) قدرة الفطرعلى إصابة النبات مسبباً الذبول وموت الاطراف والتقرحات والتصمغ ويوجد الفطر في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية وفي اوربا وافريقيا واسيا وامريكا الشمالية والجنوبية. للفطر مدى عائلي واسع فهو يصيب الفيكس و اليوكالبتوس و الاكاسيا و الاناناس و التفاح و البطاطا الحلوة و الخوخ و الحور والتوت (Polizzi واخرون ، 2009 ; Ray واخرون ، 2010 ; Phillips واخرون ، 2013). إن الانزيمات والسموم المفرزه من قبل المسببات المرضية من الأمور غير المعروفة او المدروسة لبعض الفطريات على الرغم من دورها المهم في

حدوث الإصابة وظهور الاعراض في العائل عن طريق تأثيرها في تحليل وتحطيم مكونات خلايا العائل والتأثير في البروتوبلاست والتداخل في نفاذية الاغشية (الخيرو ، 2009). أن الدراسات التي تناولت مرض ذبول الافرع واسوداد الساق في عوائل مختلفة أشارت بشكل عام الى إنتاج المسبب المرضي لمركبات تسبب الذبول وموت الافرع و نظراً لانتشار الإصابة بالمرض في البساتين و في الحدائق المنزلية فضلاً عن تطور تقانات تشخيص المسببات المرضية و نتاجاتها الايضية لذلك هدفت الدراسة الى عزل المسبب المرضي من اشجار التفاح و البرتقال و تشخيصه جزيئياً ومعرفة قدرته على إنتاج الانزيمات والسموم الفطرية .

المواد وطرائق العمل

عزل وتشخيص المسبب المرضي

تم جمع احدى عشرعينة من أفرع أشجارتظهر عليها أعراض ذبول الافرع واسوداد الساق من بساتين منطقة الطارمية و الجادرية في محافظة بغداد من اشجار التفاح والبرتقال في شهري تموز واب من سنة 2018. اذ تم قطع تقريباً 30 سم من الفرع المصاب مع جزء من المنطقة السليمة من الفرع نفسه. وضعت العينات في أكياس من البولي اثلين وكتب عليها أسم العائل ومنطقة وتاريخ الجمع وجلبت الى المختبر لعزل المسبب المرضي. حضر وسط مستخلص البطاطا دكستروزأكار (PDA) Potato Dextrose Agar وعقمت بالمؤصدة بدرجة حرارة 121°م وضغط 1.5 كغم/ سم^2 لمدة 15 دقيقة وترك ليبرد قليلاً في غرفة العزل (الهود). أضيف إليهاالمضاد الحيوي سلفات ستربتومايسين بمعدل 50 ملغم / لتر الى الوسط (الخيرو، 2009) وخلط جيداً لضمان تجانسه مع الوسط قبل عملية الصب في الاطباق ثم صبت في اطباق بتري قطر 8.5 سم. عزل المسبب المرضي من الافرع المصابة وذلك بأخذ قطع من المنطقة المصابة والمنطقة المجاورة للاصابة إذ قطعت الى أجزاء صغيرة طولها 5 ملم وعقمت سطحياً بمحلول هايبوكلورات الصوديوم بتركيز 1% لمدة ثلاث دقائق ثم غسلت بالماء المقطرالمعقم ثلاث مرات، جففت القطع باستخدام ورق النشاف المعقم. نقلت القطع الى الاطباق بواقع 3 قطع / طبق و3 أطباق / عينة (جزء الفرع) و حضنت الاطباق لمدة 4 أيام على درجة حرارة 25 ± 2°م. نقيت الفطريات المعزولة وتم تشخيصها مظهرياً من قبل الدكتوره نيران سالم الجراح اعتماداً على المفتاح التصنيفي لاجناس الفطريات الناقصة (Barnett و Hunter ، 1972)،تم تأكيد التشخيص بأجراء التشخيص الجزيئي.

التشخيص الجزيئي للفطر

استخلاص الحامض النووي

حضرت مزارع نقية من عزلتي المسبب المرضي بأعتماد طريقة البوغالمفرد (بطريقة التخطيط) وبعد 4 أيام جمع الغزل الفطري (الخيوط الفطرية) والسبورات في أنابيب بلاستيكية معقمة وحفظت في المجمدة لحين استخلاص DNA باستعمال عدة قياسية متخصصة من إنتاج شركة ZYMO الامريكية المؤلفة من المواد الموضحة في جدول1.

جدول (1). العدة القياسية لاستخلاص الحامض النووي .

المحتويات	الحجم / العدد
ZR BashingBead™ Lysis Tubes (0.1 & 0.5 mm)1	50
Lysis Solution	40 ml
Fungal/Bacterial DNA Binding Buffer2	100 ml
DNA Pre-Wash Buffer3	15 ml
Fungal DNA Wash Buffer	50 ml
DNA Elution Buffer	10 ml
Zymo-Spin™ IV Spin Filters (Orange Tops)	50
Zymo-Spin™ IIC Columns	50
Collection Tubes	150
Instruction Manual	1

واتبعت التوصيات الخاصة بالشركة المجهزة للعدة القياسية في استخلاص ال DNA لعزلتي الفطر.

تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR)

البادئ Primer

لاجراء تفاعل تضخيم السلسلة (PCR) أستعمل البادئ ITS1 و ITS4 المصنع من قبل شركة Integrated DNA technology كما موضح في الجدول 2.

جدول (2). تسلسل القواعد في البادئات المستعملة لتضخيم قطع من الحامض DNA للفطر

البادئ	تسلسل القواعد النيتروجينية	Tm (°C)	GC (%)	Product size
Forward	5′- TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3′	60.3	50 %	550 base pair
Reverse	5′TCCTCCGCTTATTGATATGC- 3′	57.8	41 %	

إذ أذيب البادئ المجفف في ماء قياسي (خال من الانزيم المحلل للدنا) وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة ليعطي تركيزاً نهائياً 100 بيكومول/مايكروليتر ويعد محلولاً خزنياً، أما محلول العمل اليومي فقد حضر بتخفيف المحلول الخزني الى 10 بيكومول/مايكروليتر.

تحضير خليط التفاعل Master Mix

حضر خليط التفاعل بحجم نهائي 25 مايكروليتر وذلك بمزج المكونات الموضحة في جدول 3.

جدول (3). خليط التفاعل المستعمل في تفاعل PCR

المكونات	التركيز
Taq PCR PreMix	5µl
Forward primer	10 picomols/µl (1 µl)
Reverse primer	10 picomols/µl (1 µl)
DNA	1.5µl
Distill water	16.5 µl
Final volume	25µl

وذلك وفق تعليمات الشركة المجهزة Intron Biotechnology الكورية ثم مزجت محتويات خليط التفاعل لعدة ثوان، ثم وضع الانبوب في جهاز التدوير الحراري Thermocycler وأجري تفاعل تضخيم سلسلة الدنا (DNA) للعينات وفق البرنامج الموضح في جدول 4.

جدول (4). برنامج البلمرة لتضاعف قطع ال DNA للفطر *Neoscytalidium*

التسلسل	الخطوات	درجة الحرارة	الوقت	عدد الدورات
1	Initial Denaturation	95°م	3 د	1 دورة
2	Denaturation -2	95°م	45 ثا	35 دورة
3	Annealing	52°م	1د	
4	Extension-1	72°م	1د	
5	Extension -2	72°م	7د	1 دورة

الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز للحامض النووي

تم إجراء الترحيل الكهربائي للكشف عن نتيجة تفاعل PCR أثناء وجود الحامض النووي القياسي لتميز حجم الحزمة. حضر هلام الاكاروز وفقاً ل Sambrook واخرون (1989) بإضافة 1.5 غم من الاكاروز في 100 مل محلول بفر TBE (Tris-Borate EDTA) (تركيزه 1.5%) وسخن لدرجة الغليان ثم ترك ليبرد لغاية الوصول الى درجة 45-50°م. صب الهلام في حوض تصلب الهلام بحذر لتجنب تكون فقاعات بعدها غمر المشط في الحوض لعمل حفر في الهلام وترك الهلام ليتصلب. رفع المشط بلطف وغمر الهلام بدارئ TBE بعد تصلبه في حوض جهاز الترحيل الكهربائي بالكامل. حقنت نواتج PCR في حفر لوح الهلام المغمور بواقع 5مايكروليتر لكل حفرة فضلاً عن وجود المحلول القياسي Ladder ورحلت كهربائياً (70فولت / ساعة) لمدة 1-2 ساعة. فحصت قطع DNA المصبغة بجهاز توثيق الهلام تحت أشعة U.V.

تحديد تعاقب القواعد النايتروجينية(DNA Sequencing)

لتحديد تعاقب القواعد النايتروجينية لقطع DNA المضاعفة في نواتج تفاعلات تضخيم DNA للعزلات، أرسلت نواتج التضخيم الى شركة Macrogen لغرض تحديد التعاقب النيوكليوتيدي الخاص DNA المضاعف للفطر.

دراسة مقدرة الفطر في إنتاج الانزيمات

الكشف النوعي عن قابلية الفطر *Neoscytalidium* sp.على إنتاج أنزيم السيلوليزCellulase.

استخدمت طريقة Hankinو Anagnostakis (1977) و المذكورة في محمد (2019) وذلك بتمية الفطر على وسط زرعي خاص وذلك بتحضير الوسط وتعقيمه بالمؤصدة بدرجة حرارة 121°م وضغط 1.5 كغم/ سم^2 لمدة 15 دقيقة وترك ليبرد ثم صب الوسط في أطباق بتري قطرها 8.5 سم، بعد تصلب الوسط الزرعي لقح مركز كل طبق بأقراص 5 ملم من حافة مستعمرة نقية للفطروبثلاثة مكررات. وضعت الاطباق في الحاضنة على درجة حرارة 25 ± 2°م. سجل وجود النمو أو عدم وجوده إذ أن نمو العزلة على هذا الوسط يشيرالى قابلية الفطر على إنتاج الانزيم.

الكشف النوعي عن قابلية الفطر*Neoscytalidium* sp. على إنتاج أنزيم اللاكيزLaccase.

اتبعت طريقة Kalra واخرون (2013) لاختبار قدرة الفطرعلى إنتاج أنزيم اللاكيز وذلك باستخدام وسط PDA المضاف إليه guaiacol % 0.04. حضرالوسطPDA وعقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121°م وضغط 1.5 كغم / سم^2 لمدة 15 دقيقة وترك ليبرد. بعدها تم إضافة guaiacol بحيث نحصل على تركيز 0.04% وخلط جيداً قبل عملية الصب في الاطباق قطرها 8.5 سم. بعد تصلب الوسط الزرعي لقحت مراكز الاطباق بأقراص 5 ملم من حافة مستعمرة نقية للفطر. حضنت الاطباق على درجة حرارة 25 ± 2°م لمدة ثلاثة أيام. تم متابعة الاطباق يومياً وسجل وقت ظهور التلون البني المحمر حول مستعمرة الفطر الذي يشير إلى ايجابية التفاعل وأن سرعة إنتاجه في الوسط و شدته حول مستعمرة الفطر يشير إلى كمية الانزيم المنتج من الفطر.

مقدرة الفطر*Neoscytalidium* في إنتاج السموم.

استخلاص راشح عزلات الفطر *Neoscytalidium*

تم استخلاص راشح عزلات الفطر تبعاً لطريقة Gardner واخرون (1985) والمعدلة من Kohmoto واخرون (1993) إذ نميت عزلات الفطر على الوسط الزرعي السائل جابكس دوكس CZD ذو pH 7. ثم فصل راشح العزلات عن النمو الفطري ورشحت المزارع الفطرية باستخدام اوراق الترشيح وأعيد ترشيحه بأستعمال الملي بور0.2 M و وتم حفظ راشح العزلات بصورة منفصلة في المجمدة لعمل التجارب اللاحقة .

تأثير راشح عزلتي الفطر *Neoscytalidium* sp.المعامل حرارياً في الافرع والاوراق النباتية

أجريت هذه التجربة لمعرفة طبيعة المادة السامة في راشح الفطرهل هي بروتينات أم غير ذلك. أختبر سمية الراشح الذي تم ذكره اعلاه على أفرع تحوي أوراق العائل النباتي حديثة القطع الخاصة بكل نوع غسلت الافرع بالماء للتخلص من الاتربة بعدهاغمرت نهاية الافرع في قناني حاوية على 50 مل من الراشح المعامل حرارياً بدرجة 120°م لمدة 20 دقيقة مع معاملة تحتوي الراشح غيرالمعامل ومعاملة الماء فقط وبالكمية نفسها. تم ملاحظة الاعراض التي تظهرعلى الافرع المغمورة نهايتها براشح العزلات مثل الذبول وتلون الافرع المحتوية الاوراق في أثناء 24-48 ساعة من المعاملة فضلاً عن معاملات الراشح غير المعامل حرارياً والماء فقط للمقارنة.

أستخلاص وتنقية السموم من عزلات الفطر بالمذيبات العضوية

تم أستخلاص وتنقية المواد السامة من الراشح الخام الذي تم الحصول عليه باتباع طريقة Wolpert و Dunkle (1980) لكل عزلة وذلك بخلط 25 مل منه مع حجم مساو له من الميثانول، وترك المزيج في درجة حرارة 4°م لمدة 24 ساعة، وأزيل الراسب المتكون بعد المعاملة بوساطة جهازالطرد المركزي بسرعة 4500 دورة / دقيقة لمدة نصف ساعة. عزل الطافي في أنبوبة جديدة و معقمة و تم تبخير الميثانول قدر الامكان في الفرن على درجة حرارة 45°م. مزج المتبقي 25 مل مع

50 مل من الكلوروفورم وتم الرج في قمع الفصل لمدة 15 دقيقة ثم ترك لفترة حتى انفصل الى طورين وجمع كل طور على انفراد الطور العضوي (الكلوروفورم) والطور المائي وكررت هذه العملية لثلاث مرات. أختبر سمية كل طور بأستعمال الاوراق النباتية الخاصة بكل نوع والتي سبق جمعها من الشتلات قبل إجراء التجربة مباشرة. إذ غسلت الاوراق بالماء الجاري للتخلص من الاتربة العالقة بها ثم وضعت في أطباق بتري 8.5 سم تحتوي على ورقة ترشيح مبللة. وضعت قطرة من كل طور (الكلوروفورم والمائي) لمعرفة أي الطورين يحمل المادة السامة والذي يستدل عليه من البقع البنية (موت أنسجة الورقة) المتكونة على الاوراق المعاملة عملت ثلاث أوراق / طور. أهمل الطور العضوي لعدم تكون بقع على الاوراق وحفظ الطورالمائي لأحداثه بقعاً واضحة على الاوراق بعد أقل من 24 ساعة من المعاملة وتم تجفيفه في درجة حرارة 45°م في جهازالتجفيف لتركيزه وزوال الكلوروفورم. أعيد استخلاص المواد السامة من الطور المائي مرة اخرى بمزجه مع 50 مل من البيوتانول المشبع بالماء المقطر في قمع الفصل ولثلاث مرات متتالية ومن ثم جمع الطور المائي في كل مرة وأعيد اختبار سميته على الاوراق كما وضح أعلاه وتبين انه خال من المواد السامة أما الطور العضوي فقد أحدث بقعاً واضحة على الاوراق، لذلك تم تركيزه في درجة حرارة 45°م في جهاز التجفيف وحفظ في درجة حرارة 4°م لحين الاستعمال .

تشخيص السموم من راشح العزلات الفطرية

إجراء فحص Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) لراشح عزلتي الفطر *Neoscytalidium* sp.

أجري الاختبار في كلية العلوم للبنات/ جامعة بغداد/الجادرية. إذ تم تجفيف الراشح الذي تم الحصول عليه بالفرن على درجة حرارة 45°م ثم سحقت جيداً بأستخدام هاون خزفي. مزجت مع بروميد البوتاسيوم وتم كبسها في أقراص خاصة تمهيداً لوضعها في الجهاز IRPrestige-21 للتعرف على طبيعة الاواصر التي يتكون منها راشح عزلات الفطر.

تشخيص السموم في راشح عزلات الفطر *Neoscytalidium* spp. بواسطة Gas chromatography mass spectrometry

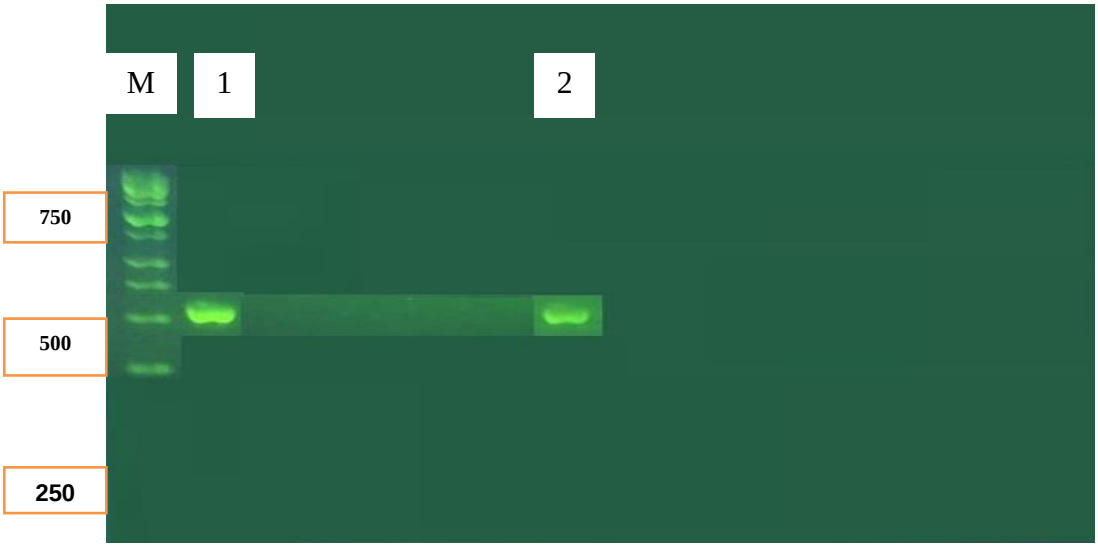
أجريت هذه التجربة لتشخيص المركبات السامة في مذيب البيوتانول المستخلص من راشح عزلتي الفطر قيد الدراسة في مختبر GC-Mass في وزارة العلوم والتكنولوجيا / دائرة البيئة والمياه/ الجادرية، اذ أخذت العينات التي تم استخلاصها وأجري لها عملية فلترة بواسطة Steril syringe filter لكل عزلة على إنفراد ثم وضعت في أنابيب خاصة وتم حقنها في جهاز QP2010 Plus - GCMS تحت فولتية قدرها 70 ev وعمود نوع Optima 5ms ذي أبعاد (0.25 mm - 30 m وسمك 0.25 Mm) ودرجة الحرارة المبرمجة بدقيقتين على درجة حرارة 60°م وبعدها تزداد الحرارة بمقدار 10°م/ دقيقة ثم خمس دقائق على حرارة 300°م وقيمة درجة الحاقن هي 280 °م، وتبدأ تسجيل النتائج بعد دقيقتين من بدء تشغيل الجهازوينتهي عمل الجهاز بعد 31 دقيقة ثم تحلل النتائج وفق البرنامج المعتمد في الجهاز لوزارة العلوم والتكنولوجيا / بغداد / العراق .

النتائج والمناقشة:

عزل وتشخيص المسبب المرضي

التشخيص الجزيئي بأستعمال تقانة تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR)

أظهرت نتيجة الترحيل الكهربائي للحامض النووي DNA المستخلصة من الفطر قيد الدراسة على هلام الأكاروز وجود حزمة واحدة ذات وزن جزيئي bp550 (الشكل 1) باستخدام بوادئ الفواصل الاستنساخية ITS1 و ITS4 وجاءت هذه النتيجة مؤكدة لقدرة هذه البوادئ في تضخيم الحامض النووي rDNA لأنواع الفطر إذ استخدمت في العديد من الدراسات (Xu واخرون ، 2018 ; Mirtalebi واخرون ، 2019) ويعد هذا التسجيل الاول لهذا الفطر على التفاح والبرتقال في العراق.



شكل 1 .الترحيل الكهربائي للمادة الوراثية لعزلتي الفطر *Neoscytalidium* sp.

دراسة التتابع النيوكليوتيدي

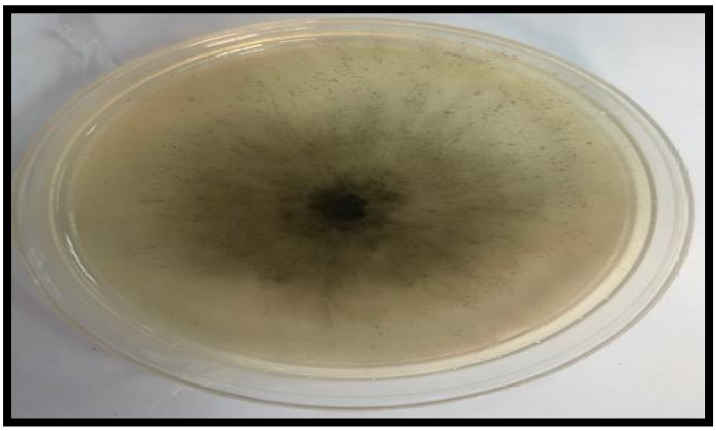
أظهرت نتائج التتابع النيوكلوتيدي للفطر انه النوع *N.hyalinum*، أظهرت عزلة التفاح نسبة تطابق 100% مع العزلات العالمية الموجودة في بنك الجينات العالمية NCBI، في حين تطابقت عزلة البرتقال بنسبة 98% ووجود أربعة مواقع للتغاير من النوع الانقلابي، تم تسجيل التتابعاتالنيوكليوتيديةللفطرفيالمنظمة العالمية لبنك الجينات وتم الحصول على رقم الانضمام MW011729.1 و MW011731.1 وأصبح مرجعًا للعراق والشرق الأوسط والعالم .

دراسة مقدرة الفطر في إنتاج الانزيمات

الكشف النوعي عن قابلية الفطر *Neoscytalidium* على إنتاج أنزيم السيلوليز Cellulase

أظهرت نتائج هذه التجربة قدرة عزلتي الفطر sp.*Neoscytalidium* على إنتاج أنزيم السيلوليز، إذ تمكن الفطرمنالنموعلى الوسط الزرعي الجابكس المدعم بالسليلوز بعد 24 ساعة من تلقيح الفطر، ولوحظ اكتمال نمو الفطر في الطبق قطره 8.5 سم بعد 5 أيام من التلقيح وحضانة الفطر في درجة حرارة 25 ± 2°م. أوضحت الكثير من الدراسات أهمية أنزيم السيلوليز الذي يعمل على تحليل السليلوز المكون الاساس لجدران الخلايا النباتية ومن ثم زيادة أمراضية المسببات المرضية وتسهيل مقدرتها على اختراق الخلايا وغزو الانسجة (Saleem واخرون، b 2012 ; محمد ، 2019) وتتفق

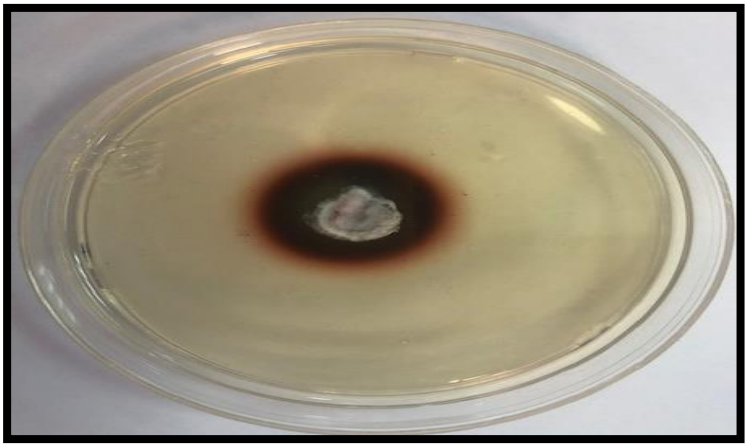
هذه النتائج مع ماتوصلت اليه الكعبي (2019) من قدرة أنواع الفطر .*Neoscytalidium*spp على إنتاج أنزيم السيلوليزاذ تراوحت الفعالية الانزيمية بين 0.015 الى 0.201 وحدة / ملغم.



شكل 2. نموالفطر*Neoscytalidium* على وسط الجابكس المدعم بالسليلوز

الكشف النوعي عن قابلية الفطر *Neoscytalidium*على إنتاج أنزيم اللاكيزLaccase

اوضحت النتائج قابلية الفطر*Neoscytalidium* على إنتاج أنزيم اللاكيز إذ لوحظ التلون البني المحمر حول مستعمرة عزلات الفطر على الوسط الزرعي PDA المدعم بالكوايكول كل على انفراد مع اختلاف وقت ظهور التلون وشدته ظهر التلون البني المحمرالغامق لعزلة التفاح1 بعد أقل من 24 ساعة من التلقيح وظهر التلون بشكل بني محمرغامق لعزلة البرتقال بعد 72 ساعة لوحظ أنه بعد 96 ساعة ازدادت درجة التلون في الوسط الزرعي إن ظهور هذا التلون في الوسط الزرعي دليل على قابلية العزلات على إنتاج أنزيم اللاكيز الذي يعمل على أكسدة مادة الكوايكول في الوسط الزرعي (Mansur واخرون ، 1997). ذكرImran واخرون (2012) قدرة أنزيم اللاكيز على تحليل المركبات الفينولية وغير الفينولية، كما يؤدي هذا الانزيم دوراً في هلاك النبات (Devi و اخرون ، 2012 ; Sunitha واخرون ، 2013 ، Janusz واخرون ، 2020).



شكل 3.

قدرة الفطر *Neoscytalidium* على إنتاج أنزيم اللاكيزفي الوسط الزرعي PDA المضاف اليه guaiacol

مقدرة عزلات الفطر *Neoscytalidium* spp. في إنتاج السموم

تأثير راشح عزلات الفطر *Neoscytalidium* المعاملحرارياً في الأفرع النباتية

بينت نتائج الأفرع النباتية المغمورة نهاياتها في راشح العزلات الفطرية المعاملة بالحرارة حصول ذبول و تلون بني على أوراق نباتات التفاح فضلاً عن تلون الفرع بلون بني بينما تغيرلون الاوراق الى اللون الاصفر وذبلت على الافرع النباتية للبرتقال ولوحظت هذه الاعراض بعد 24 ساعة من وضع الافرع في راشح العزلات كل حسب عائله إن حدوث هذه التغيرات تدل على انتقال المواد السامة الموجودة في راشح العزلات خلال الساق الى الجزء العلوي من الفرع أو قد تكون المواد التي ينتجها الفطر تعمل على أنسداد الاوعية الناقلة أو تدميرها ومن ثم تمنع أو تقلل من انتقال الماء والمواد المغذية لاجزاء النبات محدثة الذبول أو وجود المواد المؤكسدة التي تعمل على تغير لونها وحصول الذبول او ربما لتوافق كل العوامل المذكوره اعلاه مع بعضها مما تسبب في ظهورهذه الاعراض، كما تشيرالى ان العوامل المؤثره على الافرع النباتيهلاتقتصرعلى الانزيمات التي تثبط بالحراره بل وجود مواد اخرى ثابته حرارياً كانت هذه النتائج مشابه للاعراض التي ظهرت عند استخدام الراشح غير المعامل حرارياً مما يدل على أحتواء راشح العزلاتالمعامله حرارياً على مواد ذات طبيعة غير بروتينية لعدم تأثرها بالحرارة وكانت هذه النتائج مؤكدة للنتائج التي ذكرت في دراسات سابقة والتي أكدت مقدرة الفطرعلى إنتاج السموم (الساعدي ، 1999; Fullerton واخرون ، 2018) في حين لم تلاحظ أي تغيرات على الاوراق والافرع عند استخدام الماء فقط (معاملات المقارنة).

أستخلاص وتنقية السموم من عزلات الفطر بالمذيبات العضوية

أظهرت نتائج الاختبارالحيويبأستعمال الورقة المنفصلة فعالية راشح العزلات الفطرية المستخلص بالميثانول وظهورالبقع البنية على الورقة النباتية على شتلات التفاح والبرتقال بعد 24 ساعة. مما يؤكد على أن المادة السامة في الراشح هي ليست مادة بروتينية إذ تشيرالمصادر الى أن الميثانول يعمل على ترسيب البروتينات (Wolpert و Dunkle ، 1980). إن هذه النتيجة مؤكدة للنتائج التي تم التوصل اليها في معاملة راشح عزلات الفطر بالحرارة والتي سببت ظهور تغييرات على الافرع بعد وضعها في الراشح . لوحظت السمية في الطور المائي عند استخلاص الراشح بالكلوروفورم إذ لوحظ تكون بقع بنية في منطقة وضع قطرة الراشح المذاب في الطور المائي مما يشيرالى قابلية هذه المواد السامة على الذوبان في الماء دون الكلوروفورم ، وعلى العكس من ذلك لوحظت فعالية الراشح في طور البيوتانول ولم يلاحظ تكون أي بقع على الاوراق المعاملة بالطور المائي مما يؤكد قابلية المواد السامة على الذوبان في البيوتانول فظهرت البقع على الاوراق بعد 8 ساعات من المعاملة واختلف حجم البقعة باختلاف النباتات على الرغم من استخدام حجم واحد ووضعها في مكان واحد وسط الورقة من دون عمل جرح مما يشير الى قابلية المادة السامة على اختراق أنسجة الورقة والتأثير المباشرعليها. تتفق هذه النتائج مع العديد من الدراسات التي أكدت مقدرة الفطر على إنتاج المواد السامة وتأثيرها في عوائل مختلفة دون التوصل الى طبيعية هذه المواد السامة (القصاب ،1986 ; كريم واخرون ، 1987 ، محمد ، 2005 ; Fullerton واخرون ، 2018).

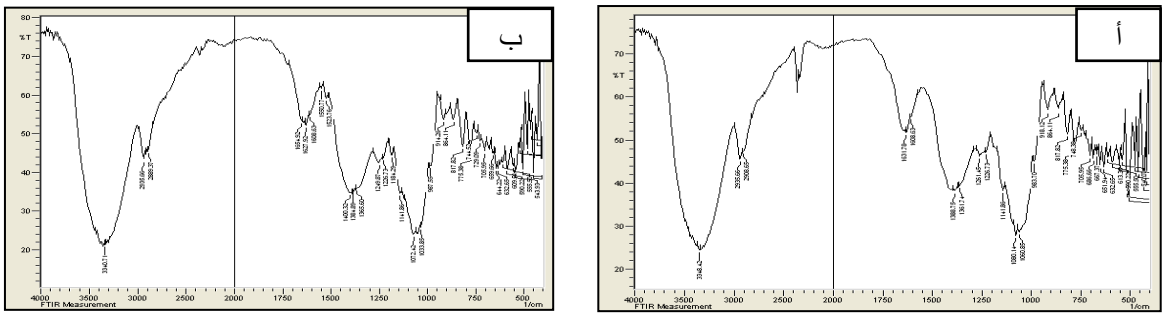
أ- التفاح ب - البرتقال

شكل 4. تأثيرالطورالمائي لراشح عزلتي الفطر *Neoscytalidium*sp المنماة في وسط الجابكس والمعامل بالكلورفورم في أوراق الشتلات.

تشخيص السموم من راشح العزلات الفطرية

إجراء فحص(FTIR)Fourier Transform Infrared Spectroscopy لراشح عزلات الفطر *Neoscytalidium*

أوضحت نتائج هذا الفحص طبيعة الاواصرالتي يتكون منها راشح العزلاتالفطرية اذ بين ان المادة هي مركب عضوي اليفاتيلايحتوي أواصر مزدوجة إذ أظهرت النتائج وجود المجاميع الفعالة المتمثلة ب كاربون – هيدروجين مدعمة بالمجاميع الميثيلين CH2 والمثيل CH3 ووجود المجموعة الفعالة كاربون – أوكسجين .



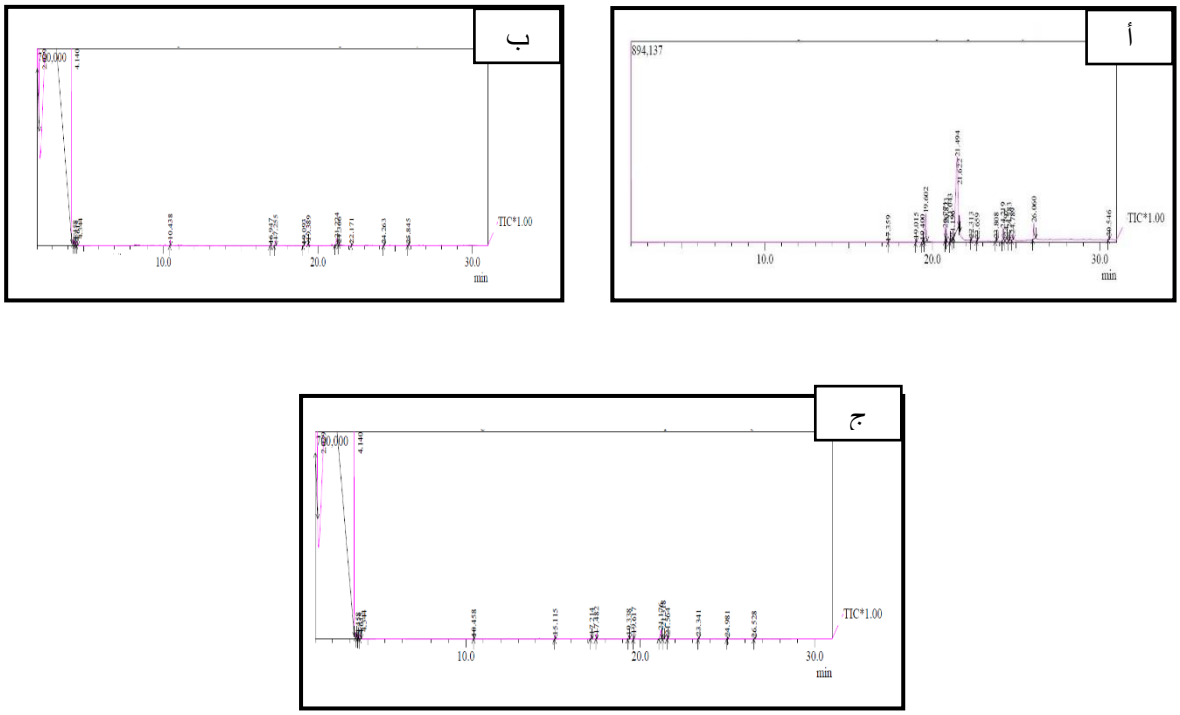
شكل 5.المجاميع الفعالة لعزلتي الفطر .*Neoscytalidium* sp

أ- عينة راشح عزلة التفاحب- عينة راشح عزلة البرتقال

تشخيص السموم في راشح عزلات الفطر *Neoscytalidium* بواسطة Gas chromatography-mass spectrometry

أظهرت نتائج تشخيص السموم لراشح العزلات الفطرية تشابه المادة التي ظهرت في كل رسومات الجهاز/ العينات مع مادة Peroxide dibutyl بنسبة تطابق تراوحت بين 88 – 91 عند وقت الاحتجاز 4.140 دقيقة و Base Peak 56.0 ووزن جزيئي 146. إن Peroxide dibutyl يعرف بكونه مركباً عضوياً خطياً يتكون من المجاميع الفعالة كاربون – هيدروجين وكاربون – أوكسجين

وتشابهت هذه النتائج مع نتائج تحليل ال FTIR التي بينت أن راشح الفطر يحتوي على مركب عضوي خطي يحوي هذه المجاميع الفعالة. إن هذه النتائج التي أكدت تقارب المادة السامة في راشح العزلات مع مادة Peroxide dibutyl وهي مادة مؤكسدة قوية تعمل على إنتاج الجذورالحرة ، وتعمل على أكسدة الخلايا وجفافها وموت الخلية في النهاية (Dinis واخرون ، 2016) وهذا يفسر تكوين البقع البنية على أوراق العوائل النباتية عند معاملتها براشح العزلات الفطرية المعاملة بالبيوتانول مع تباين التأثيرعند معامله اوراق البرتقال براشح عزله الفطرالمعزوله من البرتقال التي تسببت في ظهور تلون واصفرار خفيف مقارنه براشح عزلة التفاح على اوراقه وتأثيرها في الصبغة الخضراء وحصول بقع بنية واضحة على الاوراق، ذكرت العديد من الدراسات دور السموم الفطرية في خفض نسبة الكلوروفيل عن طريق تكوين بعض المركبات الوسطية المؤثرة في مسار تخليق الكلوروفيل أو تعمل على تحطيم البلاستيدات (Witkowiski و Halling 1988 ; عبد الله ، 1998). هذه النتيجة لا تطابق ما توصل اليه الخيرو (2009) إذ ذكر أن السم هو حامض الكلوكورينيك عند تشخيصه اعتماداً على تقانة التحليل بصفائح كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) ربما يعود السبب الى دقة تقانة GC-Mass او ان الفطر له القدره على انتاج اكثر من مادة سامة.



شكل 6. المركبات في عينات راشح عزلتي الفطر *Neoscytalidium*sp. بطريقة GC-Mass
أ- المقارنة ب- عينة راشح عزلة التفاح ج- عينة راشح عزلة البرتقال .

استنتاجات:

استعمال البادئ ITS1 – ITS4 ساعدت في تشخيص أنواع الفطر *Neoscytalidium*جزيئياً ،ويعد هذا التسجيل الأول لهذا النوع على العوائل المعزولة منها .للفطر قابلية لانتاج المادة السامة غير بروتينية وأثبت تحليل ال GC-Mass أنها متطابقة بنسبة 88- 91 مع dibytal Peroxide التي تعرف بكونها مادة مؤكسدة قوية .اختلفتعزلات الفطر في إنتاج كميات مختلفة من أنزيمي السليليزواللاكيزوأسرعها كانت عزلة التفاح.

التوصيات:

اجراء دراسات وفحوصات موسعة أكثر عن الية عمل سموم الفطر وتأثيرها في الانسجة النباتية واختلاف حساسيتها للإصابة.فضلا عن اختبار حساسية أنواع أخرى من النباتات للإصابة بالفطر الممرض .

شكر وتقدير:

نقدم شكرنا لمختبر وهج الدنا لتسهيل عمل التشخيص الجزيئي لعزلات المسبب المرضي المستخدمة في هذه الدراسة.

المصادر

- الجهاز المركزي للإحصاء وتكنولوجيا المعلومات. وزارة التخطيط والتعاون الإنمائي. تقرير أنتاج أشجار الفواكه الصيفية لسنة 2018. بغداد. العراق.
- الخيرو ، أنور نوري محمد . 2009 . تشخيص بعض سموم الفطرين *Phomaexigua*و*Nattrassiaemangiferae* والدفاعات المستحثة بها في اليوكالبتوس والجنار . أطروحة دكتوراه . كلية الزراعة والغابات . جامعة الموصل /العراق . 179ص .
- الساعدي ، باسم محمد عجيل . 1999 . دراسة حيوية ومقاومة الفطر *Hendersonulatoruloidea* المسبب لمرض ذبول الافرع على أشجار الفاكهة . رسالة ماجستير . كلية الزراعة . جامعة بغداد . 41 ص.
- القصاب ، عبد المطلب رضا حيدر . 1986 . تنقية وتشخيص السموم التي يفرزها الفطر *HendersonulatoruloideaNattrass*في الوسط الغذائي. رسالة ماجستير . جامعة صلاح الدين .49 ص.
- الكعبي ، حوراء نعمة حسين . 2019 . التوصيف المظهري والجزيئي لعزلات الفطر*Neoscytalidium* المعزولة من نبات التين وامكانية مقاومتها احيائيا في محافظة بابل . اطروحة دكتوراه . كلية الزراعة . جامعة الكوفة . 120 ص.
- عبدالله ، عفيف محمد راجح . 1998 . مرض لفحة الينكي دنيا (البشملة) ومكافحته كيميائيا . أطروحة ماجستير . كلية الزراعة والغابات . جامعة الموصل /العراق .
- كريم ، خالد احمد ; احسان شفيق دميرداغ وفياض محمد شريف . 1987 . ذبول افرع اليوكالبتوس وسمية راشح مزرعة الفطر المسبب للمرض *HendersonulatoruloideaNattrass*. زانكو. 5: 81- 92.
- محمد، نضال يونس.2005 . تسجيل أول لمرض ذبول الافرع الهندرسنيولي على اشجار الجنار في العراق . مجلة زراعة الرافدين 33(4) : 106 – 113 .

- محمد ، نجلاء حميد . 2019 . دراسة تباين وبائية مرض العفن الرمادي المتسبب عن الفطر *Botrytis cinerea* على نباتات الباذنجان والطماطة في الزراعة المحمية . رسالة ماجستير . كلية علوم الهندسة الزراعية . جامعة بغداد .114ص.
- Barnett,H.L. and B.B. Hunter. 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi . 3rd.edition BurgessPublishingCompany.Minneapolis,Minnesota.pp 241.
- Begoude, B. A. D. ; B. Slippers; M. J. Wingfield ; J.Roux . 2010. Botryosphaeriaceae associated with Terminalia catappa in Cameroon, South Africa and Madagascar. Mycological Progress . 9:101–123.
- Campbell, C. K. and J. L. Mulder .1977 . Skin and nail infection by *Scytalidiumhyalinum*sp.nov. Sabouraudia 15:161–166.
- Devi, N. N; J. J. Prabakaran and F. Wahab .2012 . Phytochemical analysis and enzyme analysis of endophytic fungi from *Centella asiatica*. Journal Tropical Biomedicine . 2:1280- 1284.
- Dinis L. T. ; S. Bernardo ; A. Conde ; D. Pimentel ; H. Ferreira ; L. Félix ; H. Gerós ; C. M. Correia and J. Moutinho-Pereira .2016 . Kaolin exogenous application boosts antioxidant capacity and phenolic content in berries and leaves of grapevine under summer stress. Journal of Plant Physiology .191 : 45–53 .
- Fullerton ,R. A. ; P. A. Sutherlan ; R. S. Rebstock ; N. T. Hieu ; N. N. A. Thu ; D. T. Linh ; N. T. K. Thanh and N. V. Hoa . 2018 . The life cycle of dragon fruit canker caused by *Neoscytalidiumdimidiatum*and Implications for control dragon fruit regional NetworkInitiationWorkshop.www.fftc.org.tw>files>actiwities.
- Gardner , J.M.;H.Tatum; Y.Suzuk and S.Takeuchi.1985. Plant pathotoxins from Alternaria citri : The major toxin specific for rough lemon plant .Phytochemistry .42:2861-2867.
- Imran ,M. ; M. J. Asad ; S. H. Hadri and S. Mehmood . 2012 . Production and industrial applications of laccase enzyme . Journal of Cell and Molecular Biology .10: 1-11.
- Janusz , G. ; A, Pawlik ; U, Swiderska- Burek ; J. Polak ; J.Sulej ; A. Jarosz-Wilkolazka and A. Paszcynski . 2020. Laccase properties , physiological functions and evolution . International Journal of Molecular Sciences .1-25.
- Kalra, K .; R. Chauhan ; M. Shaver and S. Sachdeva . 2013. Isolation of laccase producing *Trichoderma* spp. And effect of pH temperature on its activity. International Journal Chemistry of Environmental Technology . 5:2229-2235.

- Kohmoto, K. ; Y. Iton ; N. Shimomura ; Y. Kondoh ; H. Otani ;M. Kodama ; S. Nishimura and S. Nakatsuka . 1993 . Isolation and biological activities of two host specific toxin from the tangerine pathotype of *Alternaria alternate.*Phytopathology . 83: 495-502.
- Mansur, M .; T. Suarez ; J. B. Fernández-Larrea ; M.A. Brizuela and A.E. González . 1997. Identification of a laccase gene family in the new lignin-degrading basidiomycete CECT 20197. Applied and Environmental Microbiology . 63: 2637–2646.
- Mirtalebi ,M. ; F. Sabahi and Z. Banihashemi . 2019 . Fruit rot caused by *Neoscytalidiumhyalinum* on melon in Iran. Australasian Plant Disease Notes . 14: 2-4 .
- Saleem, A .; A. H. Moharram ; A.H.M. El-Said and A. Hamid . 2012b . Cellulose decomposing fungi and cellulose activity as affected by amistar and moncut fungicides. African Journal ofMicrobiology Research . 6: 4457-4470.
- Sambrook , J. ; E. F. Fritsch and T. Maniatis . 1989 . Molecular a cloning : laboratory manual (2 th end) Gold Spring Harbor . New York.USA.
- Sunitha, V. H.; D. Nirmala and C. Srinivas .2013 . Extracellular Enzymatic Activity of endophtic fungi strains isolated from medicinal plants. World Journal Agricultural Science . 9: 1-9.
- Sutton , B. C. and B. J. Dyko . 1989 . Revision of *Hendersonula*. Mycology Research. 93:466-488.
- Polizzi, G. ; D. Aiello and A. Vitale . 2009 . First report of shoot blight, canker, and gummosis caused by *Neoscytalidiumdimidiatum* on citrus in Italy. Plant Disease .93:1215.doi:10.1094/PDIS-93-11-1215A.
- Phillips , A . J .L . ; A. Alves ; J. Abdollahzadeh ; B. Slippers ; M. J. Wingfield J.Z. Groenewald and P.W. Crous . 2013 . The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. Studies in Mycology. 76:51-167.
- Ray, J. D. ; T. Burgess and V. M. Lanoiselet . 2010.First record of *Neoscytalidiumdimidiatum* and *N. novaehollandiae* on Mangifera indica and N. *dimidiatum* on Ficus carica in Australia.Australasian Plant Disease Notes. 5: 48–50.
- Wolpert, T.J.and L. D. Dunkle . 1980 .Purfication and partial characterization of host – specific toxins produced by Periconiacircinata .Phytopathology . 9:872-875.

- Witkowski , D.A. and P. B. Halling . 1988. Accumulation of hotodynamictetrapyrnles induced by ciluroter- methyl.Plant Physiology. 86:632-637.
- Xu , M. ; Y. Peng ; Z. Qi, ; Z. Yan ; L. Yang ; Meng - Die He ; Q. Li ; C. Liu ; Y. Ze Ruan ; S. Wei ; J. Xie ; Y. Xia.and H. Tang . 2018 .Identification of *Neoscytalidiumdimidiatum* causing canker disease of pitaya in Hainan, China. Australasian Plant Pathology.47: 547-553.

Detection of enzymes and toxins produced from the pathogen branches wilt and blackening of the stem in apple and orange treesin Baghdad.

Eman K. Abdul-Karim **Neran S. Aljarah**
Plant Protection Department , Collage of Agricultural Engineering Sciences , University of Baghdad , Iraq .

Abstract

This study was conducted in the College of Agricultural Engineering Sciences2019 / in the laboratories of the Plant Protection Department. The aim of the study is to identify the pathogenic fungi at the molecular level of the branch wilt and sooty stem disease,investigated the ability of isolated fungi to produce enzymes, and its ability to produce toxic substanceson apple and orange trees in some areas of Baghdad. The results of the nucleotide sequencing of the isolates *Neoscytalidium*Shows the isolates of apple a match of 100%, while the isolates of oranges was identical,98% The nucleotide sequencing for the *N. hyalinum* is registered in the World Gene bank Organization This is the first record of these species in Iraq on the orange and apple tree in this study. The results confirmed that the fungal isolates were able to produce cellulase and laccase enzymes with the various quantities and efficiency of enzyme production. The analysis of FFS using FTIR method showed that the toxin produced by the fungal isolates was composed of carbon-hydrogen supported by the groups of methylene (CH2) and methyl (CH3) with the presence of the active group of carbon-oxygen which was detected for the first time by GC-Mass method. These active groups showed an 88-91% matching rate with Peroxide dibutyl which is a strong oxidizer.