عزل وتشخيص مسببات مرض القدم السوداء في العنب بمحافظة نينوى – العراق

خالد حسن طه زهراء خليل إبراهيم سعيد

الملخص

هدفت الدراسة ولأول مرة عزل وتشخيص المسببات المرضية لمرض القدم السوداء في العنب بمحافظة نينوى/ العراق، وقد أظهرت نتائج العزل والتشخيص وجود الفطريات:

Ilyonectria وطوره الكامل ***Cylindrocarpon destructans* (Zinssmeister) Scholten *radicicola* (Gerlach and L. Nillsson) P. Chaverri and C. Salgado, comb. nov.;** ***Campylocarpon*** و ***Cylindrocarpon macrodidymum* Halleen, Schoers and Crous** ***Campylocarpon pseudofasciculare*** و ***fasciculare* Schroers, Halleen and Crous Halleen, Schroers and Crous**. وقد تفوقت نسب عزل الفطر ***C.destructans*** على بقية الفطريات، إذ تم عزله من جذور الشتلات بنسبة **16.17%** ومن سيقانها بنسبة **17.07%**. يعد تشخيص الفطريات ***C. macrodidymum*** و ***Campyl.fasciculare*** و ***Campyl. pseudofasciculare*** مسبباً لمرض القدم السوداء تسجيلاً أولاً في العراق فضلاً عن الطور الكامل للفطر ***C.destructans*** وأظهرت اختبارات القدرة الإمراضية أن جميعها تسببت في إحداث اسوادٍ للجذور واختزالٍ في المجموع الجذري وبشدة إصابة متباينة.

المقدمة

يعد مرض القدم السوداء في مقدمة الأمراض التي تلحق ضرراً اقتصادياً بالغاً على العقل المزروعة والشتلات الصغيرة وفي كرمات العنب في البلدان التي تشتهر بزراعة العنب منها فرنسا والولايات المتحدة الأمريكية وإسبانيا والصين وتركيا والأرجنتين وإيران وأستراليا وشيلي (**10**)، إذ لا تنخفض معدلات الإصابة أدنى من **40 %** وحتى في حقول العنب المستديمة تصل نسبة الخسائر في البلدان المتقدمة بهذا المرض إلى **50 %** أو أكثر في الكرمات التي بأعمار من **4–15** سنة (**18**). وفي جنوب أفريقيا تراوحت أدنى نسباً للإصابة بالمرض من **40–60%** (**16**)، وأشار **Halleen** وجماعته (**13**) أن من **22–52%** من الشتلات المصابة في مشاتل العنب سببها أنواع من ***Cylindrocarpon*** وفي سانتا بربارة في أمريكا أجري مسح لمرض القدم السوداء في مشاتل العنب منذ عام **2007** وكانت الإصابة أعلى من **74%** (**23**). تأتي خطورة المرض من خلال الضرر الشديد الذي يلحقه في شتلات و كرمات العنب، إذ تتنخر انسجة الجذور **Necrotic Tissues** ويختزل حجم المجموع الجذري الحي فضلاً عن اختزال الشعيرات الجذرية وتهرئ القلف وموت أنسجة الخشب في قاعدة العقلة مما يترتب عنه قصر السلاميات وإختزال المجموع الخضري وصغر حجم الأوراق كما تنخفض معدلات التركيب الضوئي إلى مستويات دنيا قد تنتهي بموت النبات (**16**). وينتشر المرض في المشتل بسرعة، إذ تصاب **92%** من الشتلات بعد **8** أسابيع من التلقيح ولايقتصر ظهور مرض القدم السوداء في المراحل المبكرة من عمر النبات في المشتل وإنما يتعدى ذلك الى مراحل عمرية متقدمة لكرمات العنب في الحقل، وقد تصل الى عمر **15** سنة (**18**، **19**). انحصرت الإصابة بمرض القدم السوداء بأنواع الجنسين ***Cylindrocarpon*** وأطوارها الكاملة و***Campylocarpon*** لاسيما تمثل أنواع الجنس ***Cylindrocarpon*** أعلى نسبة من الأنواع الأخرى (**5**، **13**)، تعد أنواع ***Cylindrocarpon*** من الفطـــــريات

جزء من رسالة الماجستير للباحث الثاني.

كلية الزراعة والغابات –جامعة الموصل– نينوى، العراق.

المستوطنة للتربة **Soil inhabitants** فأما تكون طفيليات شديدة الإمراضية أو ضعيفة الإمراضية ولها مدى واسع تهاجم به عوائل نباتية متعددة تزيد على **124** نوعاً نباتياً ومن أشهر أنواعه الممرضة للعنب ***C.destructans*** و ***C. obtusisporum*** و ***C. magnusianum*** و ***C. macrodidymum*** و ***C. liriodendri*** (**Koike** و**Wilen**، **2010**) وإن أول تسجيل كان للنوع ***C.destructans*** على العنب في فرنسا عام **1961** (**2**). ولأنواع ***Cylindrocarpon*** مدى عائلي واسع يقع ضمن ما يقارب **20** عائلة نباتية يمثل العديد من النباتات العشبية والخشبية (**1**، **3**، **9**، **20**). صنفت أنواع ***Neonectria sensu/Cylindrocarpon*** بالاعتماد على الاختبارات الوراثية (**ITS, LUS,rpb1, tef1, tub**) ووجد أن المجاميع الاربعة التي صنفها **Booth** (**3**) تنتمي لخمس مجاميع تضم المجموعة الأولى الطور الكامل ***N. coccinea*** والمجموعتان الأولى والرابعة من ***Cylindrocarpon*** تنتمي للنوع ***Neonectria / Cylindrocarpon sensu stricto*** وتضم المجموعة الثانية الطور الكامل(**Rugonectria** gen .nov.) -***N.rugulosa*** وتضم المجموعة الثالثة الطور الكامل ***N.mammoidea*** ***Cylindrocarpon*** (**Thelonectria** gen. nov.) والمجموعة الثانية من ***/N. veuillotiana*-groups** وتضم المجموعة الرابعة الطور الكامل ***N. radicicola*-group** والمجموعة الثالثة من ***Cylindrocarpon*** (***Ilyonectria*** gen. nov). أما المجموعة الخامسة فقد ضمت الجنس ***Campylocarpon*** (**6**). يحدث الفطر إمراضية في مدى واسع من العوامل البيئية المتباينة ولمدى عائلي واسع في مختلف أنحاء العالم فضلاً عن وجود العوامل البيئية غير الملائمة للنبات يشجع في حدوث الإصابة بمرض القدم السوداء كنقص العناصر الغذائية وارتفاع الرطوبة وانضغاط التربة وعدم تهيئة أرض المشتل أو عدم تهيئة حفر ملائمة لزراعة شتلات العنب (**11**، **22**). يتسبب الفطر في تلون الخشب بالأسود أو البني الداكن في الجزء القاعدي من العقل المجذرة بعد ستين يوماً من إجراء العدوى الصناعية . والأعراض تظهر واضحة على **92%** من الشتلات بعد ثمانية أسابيع من العدوى بهيئة شحوب واصفرار وموت الاوراق وتقزم الشتلات وبطء نموها واسوداد قاعدة العقلة والجذور وخلوها من الشعيرات الجذرية مع تلون خشب الجذور بالبني المستمر أو المتقطع (**16**). ونظراً لإنتشار الإصابة بمرض القدم السوداء في مشاتل العنب بمحافظة نينوى من خلال ظهور أعراض المرض على معظم الشتلات واختزال نموها وموت بعضها حتى يندر الحصول على شتلات سليمة منها فضلاً عن عدم وجود دراسات مسبقة عن المرض في المشتل فقد هدفت الدراسة إلى إجراء دراسة أولية لعزل وتشخيص المسببات الرئيسة للمرض واختبار إمراضيتها.

المواد وطرائق البحث

العزل

جمعت شتلات أعناب مصابة من مشاتل مختلفة في محافظة نينوى بعمر أقل من سنة إلى سنتين للمدة من شهر آب إلى شهر تشرين ثاني من عام **2011**، ظهرت عليها أعراض الاصفرار والذبول والموت الموضعي والتقزم وتلون الجزء القاعدي للعقلة باللون الأسود. قلعت الشتلات وغسلت جيداً من الأتربة العالقة بها، ثم جلبت إلى المختبر بغية إجراء العزل منها وتم التأكد من إصابتها بمرض القدم السوداء عبر ملاحظة التقرحات الداكنة الموجودة على الجذور وأسفل العقلة. أخذ جزء بطول **6**سم من نهاية العقلة المجذرة، غسل بماءٍ جارٍ لفترة ثلاث ساعات ثم عقم سطحياً بواسطة **70%** إيثانول لفترة **30** ثانية ثم في محلول **3.5%**هايبوكلورات الصوديوم لفترة دقيقتين وكرر تعقيمها بالكحول لفترة **30** ثانية ثم جففت بين ورقتي ترشيح، وعمل فيها شق طولي وأخذ منها أجزاء صغيرة بأبعاد **1**× **2** ملم من قطع الخشب لجذور وساق الشتلات بعد استبعاد **3** سم من طرف قاعدة كل عقلة مجذرة (**8**). زرعت **5** قطع في أطباق بتري معقمة (قطر **9**سم) تحتوي على الوسط الغذائي مستخلص البطاطا والدكستروز والاكار **Potato**

PDA Dextrose Agar المضاف إليه المضاد الحيوي بنسلين بمعدل 100مغلم /لتر لتجنب التلوث البكتيري. حضنت الأطباق في حاضنة نوع بندر Binder في درجة حرارة 25°م (±2) تحت ظروف إضاءة وظلام متبادلة كل 12 ساعة لمدة 10 أيام. دونت النتائج بحساب نسب الفطريات المعزولة من الساق وجذور الشتلات المصابة .

تشخيص الفطريات المعزولة

شخصت الفطريات النامية بعد تنقيتها بتعريف بعض صفاتها المزرعية والمجهرية المتمثل بمظهر المستعمرة ولونها وطبيعة نموها على الوسط PDA بعد حضنها عليه لمدة 20 يوماً، وحددت الصفات المجهرية بوجود الأبواغ الكلاميدية أو غيابها والأبواغ الكونيدية الصغيرة والأجسام الثمرية الجنسية وقيس قطرها بحساب متوسط قياس 20 بوغاً كلاميدياً لكل نوع، وقيس الطول والعرض لكل من الأبواغ الكونيدية الصغيرة والكبيرة بأنواعها من حيث عدد الحواجز لكل نوع وذلك لما له علاقة بأنواع *Cylindrocarpon* ونوعي *Campylocarpon*، فضلاً عن صفات التراكيب الثمرية الجنسية والأكياس والأبواغ الكيسية، وذلك تبعاً لما ذكرهه Brayford وجماعته (4)، Halleen وجماعته (12)، Halleen (10)، Petit وGubler (21)، Chaverri وجماعته (6).

تم قياس أبعاد الأبواغ بأنواعها والحوامل البوغية والتراكيب الثمرية والأطوار الأخرى باستخدام مجهر نوع Motic بواسطة البرنامج Motic Image Plus 2.0ml الخاص بقياس الأبعاد. حفظت الفطريات المعزولة في درجة حرارة 4°م على الوسط الغذائي PDA المائل في أنابيب اختبار بغية استخدامها في التجارب اللاحقة. حسبت أعداد مستعمرات الفطريات النامية على الأجزاء النباتية في الوسط PDA ومنها تم حساب نسبة الفطريات المعزولة من الشتلات المصابة بمرض القدم السوداء.

اختبارات القدرة الإمراضية

نفذت التجربة بتاريخ 2012/2/14 في البيت البلاستيكي التابع لقسم وقاية النبات/كلية الزراعة والغابات/جامعة الموصل. هيئت تربة معقمة بالفورملين (يحتوي على 36% فورمالديهايد) بمعدل 2%من المادة التجارية. تم إحكام تغطيتها بالبولي اثيلين لمدة 14 يوماً ثم تهويتها لمدة 21 يوماً ثم وضعت في أصص بلاستيكية سعة 20 كغم تربة مزيجية بأبعاد 60×31سم.

هيئت عقل متجانسة بالقطر والطول مأخوذة من قصبات كرمات عنب يحتوي كل منها على خمس سلاميات لثلاثة أصناف إذ تم الحصول على الصنف كشمش محلي من محطة بستنة مديرية الزراعة في محافظة نينوى وعلى الصنف شدة سودة من منطقة الفاضلية وعلى الصنف حلواني من منطقة الحويجة/كركوك. أختير الصنف حلواني ممثلاً للأصناف القصبية والصنف كشمش محلي ممثلاً للأصناف الخالية من البذور Seedless والصنف شدة سودة ممثلاً للأصناف الدابرية، إذ تعد الأصناف الثلاثة الأكثر شيوعاً بزراعتها في المنطقة. وبغية الحصول على عقل خالية من المسببات المرضية لحدٍ ما ،عوملت العقل قبل الزراعة بالماء الحار (في درجة حرارة 50°م) فترة 30 دقيقة ثم نقلت مباشرة إلى ماء بارد لفترة 30 دقيقة (8). هيئت مستعمرات من الفطريات المعزولة تملأ أطباق بتري نامية على الوسط الغذائي PDA في درجة حرارة 25°م بعمر عشرة أيام للفطريات *C. destructans* و*C. macrodidymum* و*Campyl. fasciculare* و*Campyl.pseudofasciculare* قطع الغزل الفطري مع الوسط الغذائي بواسطة خلاط نوع كرستال لوثت التربة باللقاح الفطري على نحو متجانس بواقع ثلاثة أطباق لكل أصيص (22). ثم سقيت بالماء مباشرة .زرعت الأصص بالعقل بواقع ثلاثين عقلة/أصيص بعد دفن ثلاث سلاميات من العقلة في التربة واشتملت كل معاملة على ثلاثة مكررات وبواقع 30 عقلة لكل أصيص (مكرر). نفذت تجربة عاملية باستخدام تصميم القطاعات العشوائية الكاملة Randomized Complete Block Design (RCBD). قلعت الشتلات بعمر 5 أشهر إذ

تم بدء قلع الشتلات بتاريخ 2013/7/23 من الأصص وغسلت بالماء بغية إزالة التربة العالقة بها وأخذت النتائج بدراسة الصفات الآتية:

شدة إصابة المجموع الجذري بالقدم السوداء في المكرر استناداً إلى مقياس **Agusti- Brisach** وجماعته (1) المؤلف من 5 درجات إستناداً الى الاعراض الملاحظة على الجذور وهي (0) الجذور سليمة، (1) تغيرات طفيفة في لون الجذور مع اختزال من 0–25% من كتلة الجذور، (2) تغيرات في لون الجذور مع اختزال من 26–50% من كتلة الجذور، (3) تغييرات متوسطة في لون الجذر مع اختزال من 51–75 من كتلة الجذر، (4) تغييرات شديدة في لون الجذور مع اختزال من 76– فأكثر من كتلة الجذر، (5) النبات ميت. وحسب متوسط شدة الإصابة وفق المعادلة الآتية:

$$\text{شدة الإصابة} = \frac{\text{مجموع (عدد الشتلات المصابة} \times \text{فئة الإصابة)}}{\text{العدد الكلي للشتلات المختبرة} \times \text{أعلى فئة}}$$

حللت النتائج إحصائيا" باستخدام نظام **Statistical Analysis System (SAS)** واختبرت النتائج بطريقة دنكن عند مستوى احتمال **0,05** .

النتائج والمناقشة

العزل مسببات مرض القدم السوداء وتشخيصها

العزل

يظهر شكل (1) أعراض الإصابة بمرض القدم السوداء على شتلة عنب التي أجري العزل منها .كما يبين جدول (1) ظهور العديد من الفطريات بعد العزل من جذور شتلات العنب المصابة بالقدم السوداء في عام 2011 وكان أعلاها نسبة الفطر ***Cylindrocarpon destructans*** (16.17%) وتكررت سيادة نسبة عزله من ساق الشتلات بنسبة 17.07% تلاه النوع ***C. macrodidymum*** بنسبة عزل 13.95% وتكرر عزله من ساق الشتلات بنسبة عزل 15.44% ثم النوعين ***Campylocarpon fasciculare*** و ***Campyl. pseudofasciculare*** بنسبتي عزل من الجذور 13.96 و12.5% على التوالي وتكرر عزلهما من الساق بنسبتي عزل 13.82 و13% على التوالي. وتصدر الفطر ***C.destructans*** الفطريات المعزولة، وذلك يتفق مع تفوق عزله في العديد من البلدان الذي سجل فيها مرض القدم السوداء، فضلاً عن أنه أول المسببات المسجلة لهذا المرض . ومع ذلك فإن الأنواع الأربعة المذكورة آنفاً تعد من المسببات الرئيسة لمرض القدم السوداء في العنب رغم حداثة تسجيل نوعي ***Campylocarpon*** مقارنة بقدر معرفة واشتهار أنواع ***Cylindrocarpon*** مسبباً رئيسة للمرض (2، 5، 10، 11، 12، 13، 15، 21).

شكل 1: شتلة عنب مصابة طبيعياً بالقدم السوداء يلاحظ تلون الجزء المدفون في التربة باللون الأسود وخلو الجذور من الشعيرات الجذرية نتيجة موت مساحات كبيرة من القلف وانعكاس ذلك على المجموع الخضري بموت مساحات كبيرة من الأوراق وتلونها بالبني الداكن.

جدول 1: الفطريات المعزولة من جذور وسيقان شتلات عنب مصابة بمرض القدم السوداء تم الحصول عليها من مشاتل عدة في محافظة نينوى

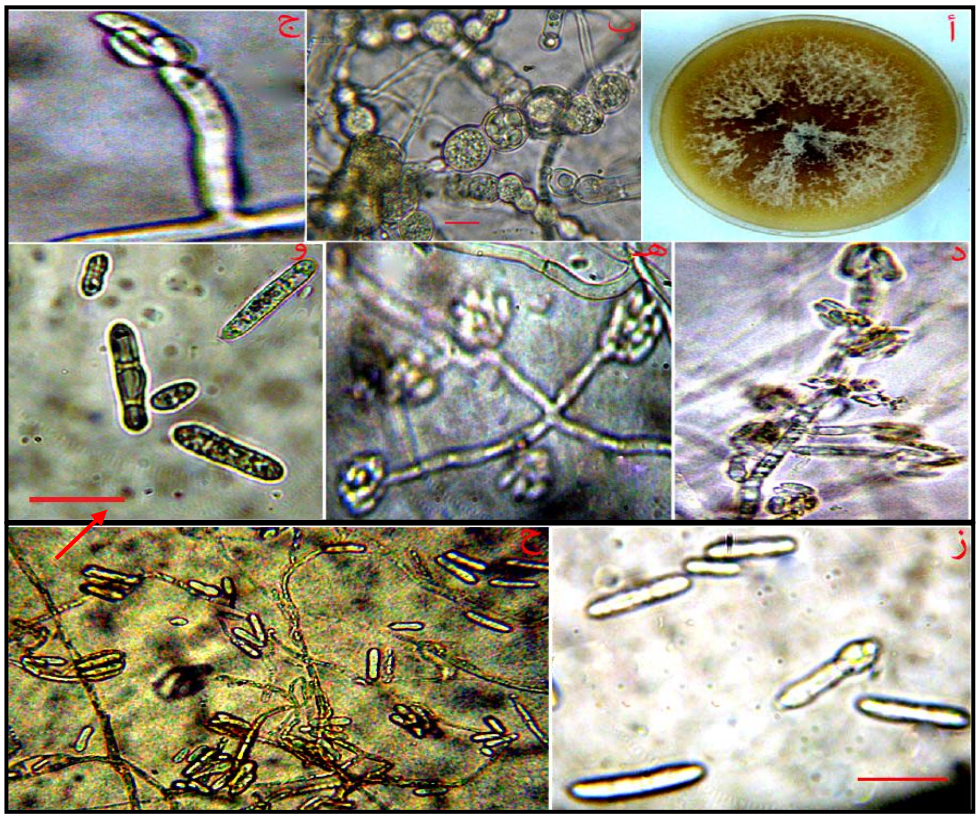
الفطريات المعزولة	*% للعزل من الجذور	*%للعزل من السيقان
Cylindrocarpon destructans	**16.17**	**17.07**
C. macrodidymum	**13.95**	**15.44**
Campylocarpon fasciculare	**13.96**	**13.82**
Campyl. pseudofasciculare	**12.5**	**13**
مجموع نسب العزل	**100**	**100**

* أن الفطريات المعزولة من الجذور والسيقان المكملة لنسبة العزل تمثل الفطريات الثانوية لمرض القدم السوداء (قيد النشر)

تشخيص الفطريات المعزولة

شخص الفطر ***Cylindrocarpon destructans*** **(Zinssmeister) Scholten** الذي بلغ قطر مستعمرته النامية على الوسط **Malt Extract Agar (MEA) 2%** **78** ملم وعلى الوسط **Potato Dexstrose Agar (PDA) 80** ملم بعد **20** يوماً من النمو في درجة حرارة **25°** م. كان لون مستعمرته أبيض وتحول إلى اللون البرتقالي أو البني الداكن مع تقدم المستعمرة بالعمر. غالباً ما تكون المستعمرات حلقات متحددة المركز. الوسادة الفطرية **Sporodochia** غزيرة التكوين على سطح الوسط أو على الغزل الفطري الهوائي، الخلية المولدة للأبواغ تتكون قمياً على تفرعات غير منتظمة من مجاميع خلوية تنتج جانبياً ويبلغ متوسط طول الحامل الكونيدي **65** مايكروميتر. يكون الفطر أبواغاً كونيدية تنشأ من حوامل متفرعة أو بسيطة مفردة تتجمع بهيئة مجاميع في نهايتها والأبواغ الكونيدية الكبيرة شفافة أسطوانية ذات نهاية منتفخة مستقيمة وأحياناً قليلة الانحناء، وقد تحتوي على قاعدة مسطحة وتحتوي على ندبة انفصال في القاعدة وتحتوي الأبواغ الكبيرة على **1–5** حواجز (وغالباً) من **1–3** حواجز ويبلغ متوسط أبعاد البوغ الكونيدي الذي يحتوي على حاجز مفرد**11–18 ×3–5** مايكروميتر والتي تتكون من حاجزين أبعادها **18–26×4.5–5** مايكروميتر الذي يتكون من ثلاثة حواجز **22–31 ×4.5– 6** مايكروميتر، وتحتوي الأبواغ الكبيرة على أبواغ كلاميدية صفراء إلى بنية اللون كروية يبلغ قطرها من **8– 10** مايكروميتر، ويحتوي الفطر أيضاً على أبواغ كلاميدية تكون غزيرة التكوين يبلغ متوسط قطرها من **8– 25** مايكروميتر إما مفردة أو في سلاسل أو في تجمعات ذهبية إلى بنية اللون في المستعمرات القديمة على الغزل الفطري .ويكون الفطر أبواغاً كونيدية

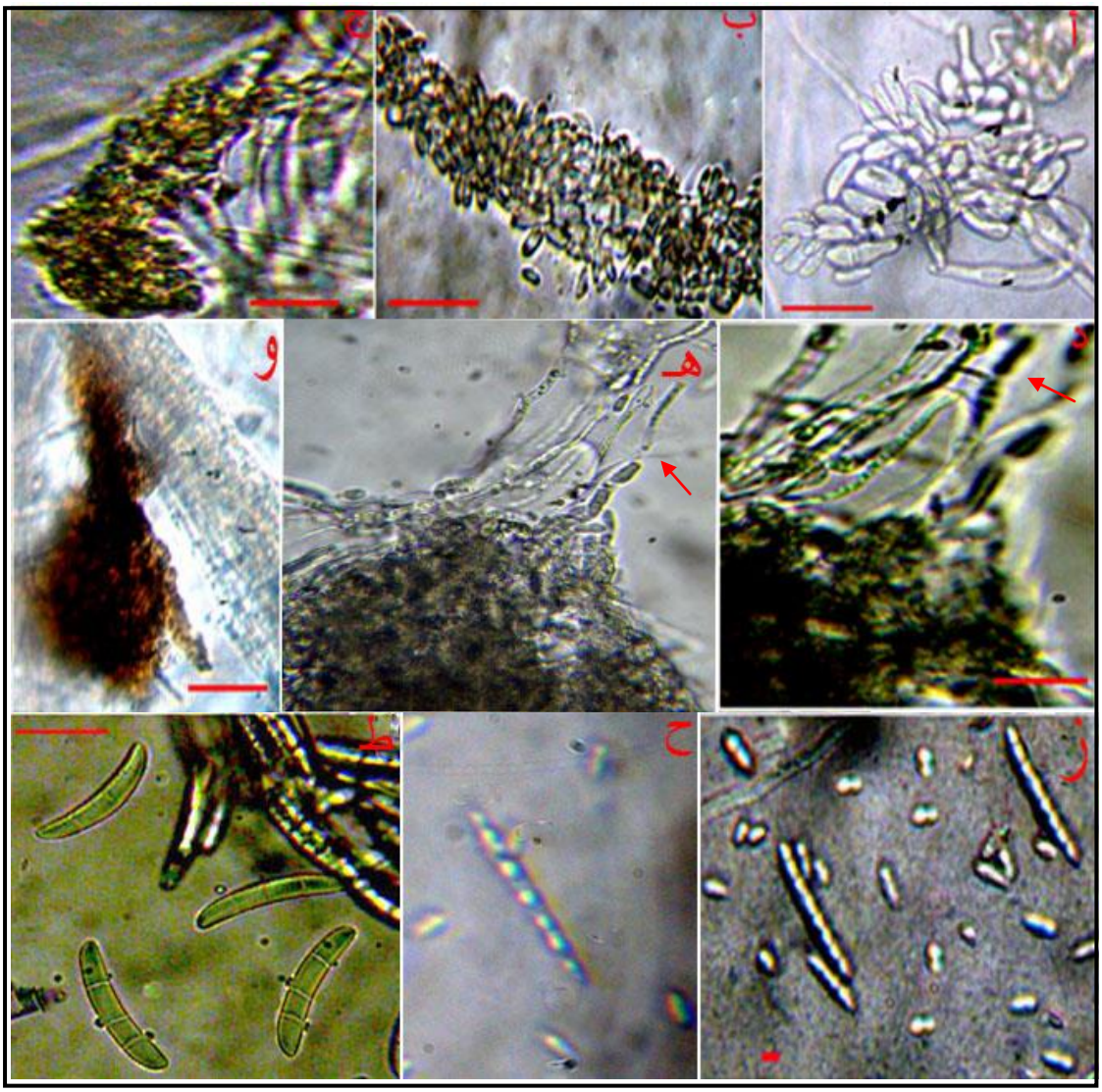
صغيرة **Microconidia** أسطوانية الشكل أو بيضوية شفافة تتكون من خلية واحدة تنشأ من حوامل متفرعة أبعادها **12–7 ×4.1–2.7** مايكروميتر (شكل **2**).



شكل **2**: الفطر ***Cylindrocarpon destructans***

أ– مستعمرة الفطر على الوسط **MEA** بعمر **10** أيام ب– الأبواغ الكلاميدية **Chlamydospores** في الغزل الفطري ج– حامل أبواغ بسيط غير متفرع **Unbranched simple conidiophore** د–حامل أبواغ بسيط متفرع **Branched simple conidiophore** هـ حامل أبواغ مركب**Compound conidiophore** و– الأبواغ الكونيدية الكبيرة **Macroconidia** والصغيرة **Microconidia** ز– تكون الأبواغ الكلاميدية **Chlamydospores** في بعض خلايا الأبواغ الكبيرة **Macroconidia**ح– الغزل الفطري الهوائي **Aerial mycelium** ب– = **10**مايكروميتر، و، ز– = **20** مايكروميتر .

لوحظ الطور الكامل للفطر ***C. destructans*** وهو ***Ilyonectria radicicola*** **Gerlach &L. (Nilsson) P.Chaverri & C.Salgado, comb. nov.;** المتمثل بجسمه الثمري **Perithecia** شبه كروي الشكل في بادئ الأمر يكون شفافاً ثم يتحول إلى اللون البني المحمر يحتوي على حلمة ، وتوجد زوائد أو قشور في الجدار يتراوح قطر الجسم الثمري من **200** إلى **400** مايكروميتر ، ويكون الفطر حصيرة من الغزل الفطري فوق جدار التركيب الثمري ويحتوي على فتحة لإطلاق الأبواغ . يحتوي الجسم الثمري على أكياس نحيفة شفافة تحتوي على أبواغ إهليجية الشكل كل بوغ يحتوي حاجزاً أملساً شفاف الجدار أبعاد البوغ تراوحت **16–8×2.2–4.4** مايكروميتر (شكل **3**).



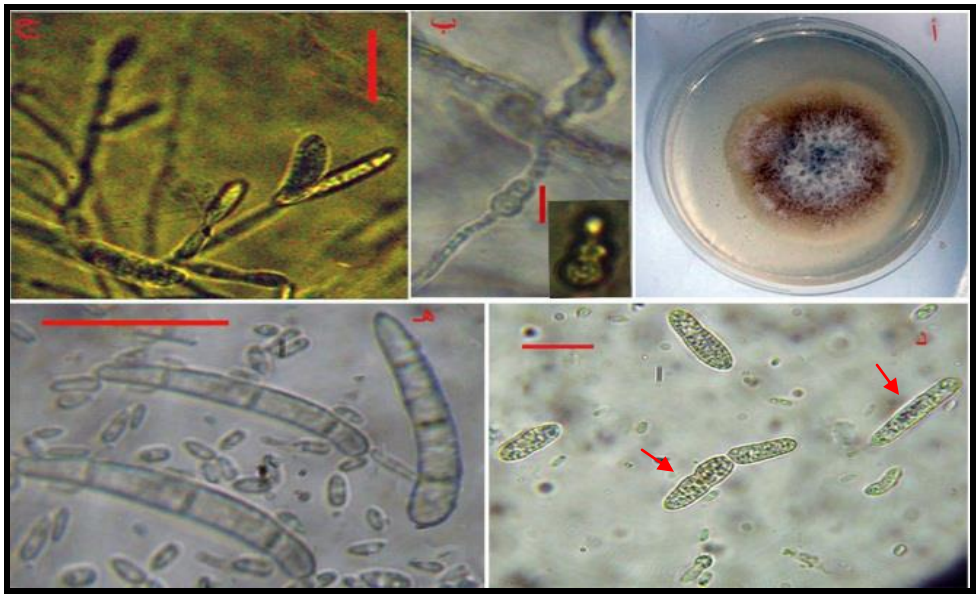
شكل 3: الفطر *Ilyonectria radicicola*

أ– بداية تشكل الجسم الثمري للفطر ب– قرب تكامل تشكل الجسم الثمري ج– جسم ثمري غير ناضج **Immature perithecium** د،هـ – فتحة خروج الأكياس**Osteiol** مع وجود الخيوط العقيمة **Paraphysis** و.– جسم ثمري ناضج **Mature perithecium** ز،ح– الأكياس **Ascus** والأبواغ الكيسية **Ascospores** ط– الأكياس مختلطة مع الأبواغ الكونيدية الكبيرة. أ– و. – = **100** مايكروميتر ، ز،ح– = **10** مايكروميتر ، ط – = **20** مايكروميتر.

تقاربت الصفات المذكورة آنفاً مع صفات *C. destructans* المذكورة من لدن **Brayford** وجماعته (4)، **Halleen** وجماعته (12)، **Halleen** (10)، **Petit** و**Gubler** (21)، **Chaverri** وجماعته (6). سجل *C. destructans* بطوره الناقص فقط في محافظة دهوك/ العراق مسبباً من بين مسببات تدهور كرمات العنب من لدن **Haleem** (2010)، إلاَّ إنه لم يسجل مسبباً لمرض القدم السوداء في مشاتل العنب وبذلك يعد الفطر في مقدمة الفطريات المسببة لمرض القدم السوداء في العراق.

شخص النوع ***Cylindrocarpon macrodidymum*** **Halleen, Schoers and Crous** الذي تميزت مستعمرته على الوسط **PDA** والوسط **MEA** باللون البرتقالي إلى البني الداكن وغزارة غزلها الفطري الهوائي. حوامل الأبواغ الكونيدية بسيطة أو معقدة مع وجود الوسادة الفطرية والأبواغ الكونيدية الصغيرة إهليجية أو شبه بيضوية الشكل شفافة تبلغ أبعادها **8–** 16× **3.2–5** مايكروميتر. والأبواغ الكونيدية الكبيرة إسطوانية الشكل تحتوي على

1–3 حواجز، مستقيمة عريضة في الجزء القمي، وقد تنحني الخلية القمية إلى الجانب، تبلغ أبعاد أبواغه الكونيدية الكبيرة التي تتكون من حاجز مفرد **14–27×4–6** مايكروميتر والأبواغ التي تحتوي على حاجزين تبلغ أبعادها **26–35×5–** 7.5 مايكروميتر والأبواغ التي تحتوي على ثلاثة حواجز أبعادها **31–41 ×6–8** مايكروميتر.ولا ينتج الفطردائماً أبواغاً كلاميدية وعندما تنشأ الأبواغ فإنها تكون في سلاسل قصيرة بينية (شكل **4**).



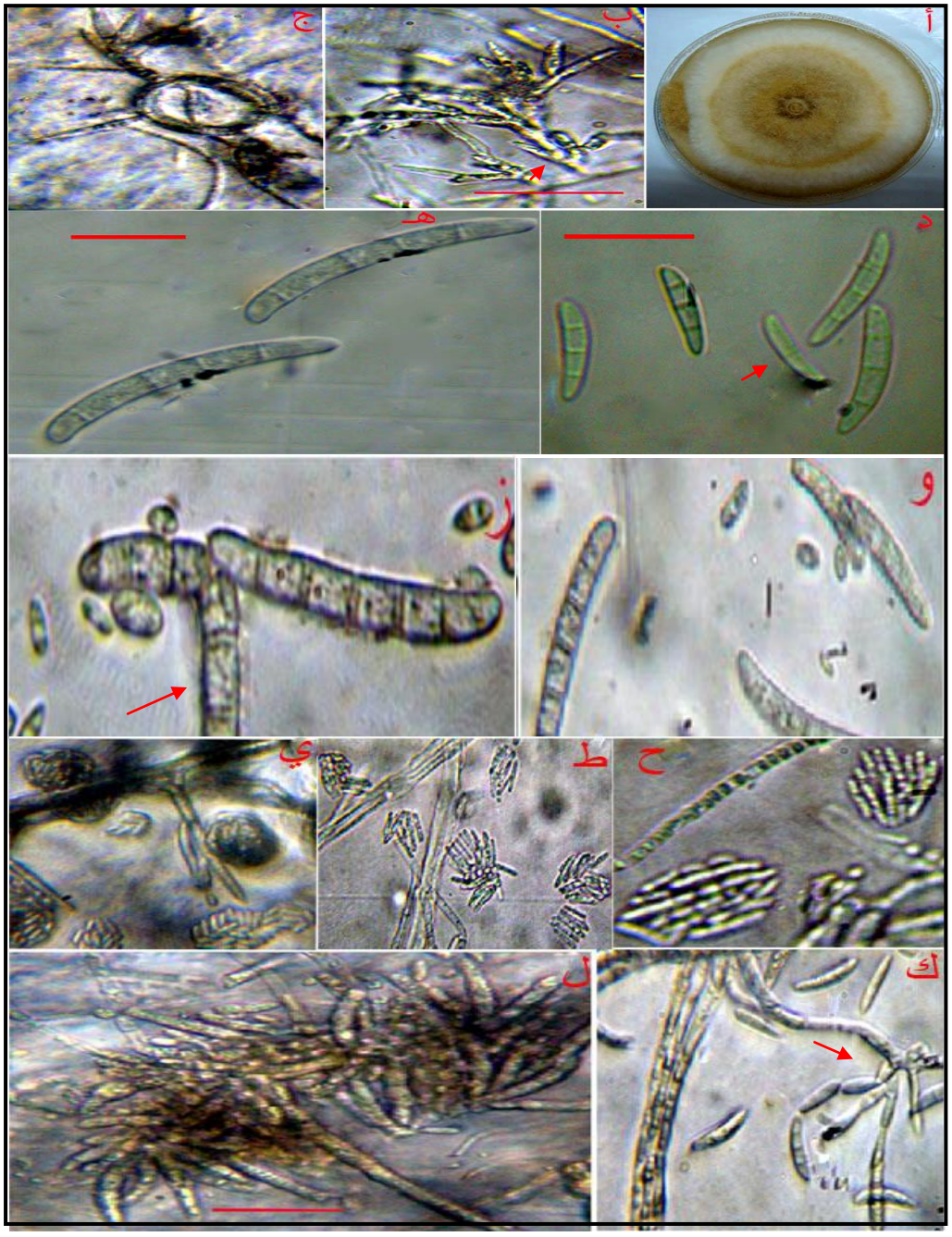
شكل **4**: الفطر***Cylindrocarpon macrodidymum***

أ– مستعمرة الفطر على الوسط **MEA** بعمر **6** أيام ب– الأبواغ الكلاميدية **Chlamydospores** المحددة للفطر ج–حوامل الأبواغ الكونيدية الكبيرة **Macroconidiophores** د،هـ الأبواغ الكونيدية الكبيرة**Macroconidia** والصغيرة **Microconidia** ب=–**10**. مايكروميتر، ج=– **30**مايكروميتر، د، هـ= –**20** مايكروميتر.

تقاربت الصفات المذكورة آنفاً مع صفات ***C. macrodidymum*** المشار إليها من لدن **Brayford** وجماعته (**4**)، **Halleen** وجماعته (**12**)، **Halleen** (**10**)، **Petit** و**Gubler** (**21**)، **Chaverri** وجماعته (**6**) .ويعد ذلك تسجيلاً أولاً للفطر ***C. macrodidymum*** الذي يعد مسبباً لتعفن القدم السوداء على العنب في العراق.

شخص الفطر ***Campylocarpon fasciculare*** **Schroers, Halleen and Crous** الذي تميزت مستعمرته على الوسط **MEA** باللون البني و بلغ قطرها **35** ملم بعد **7** أيام من التحضين في **30** ^{o} م. وحامل الأبواغ الكونيدية عادة بسيط يحتوي على فياليد **Phialide** مفرد أو تحمل الفياليدات على الحامل يتجاوز عددها الثلاثة. ينشأ الحامل على خلية تتكون جانبياً من الغزل الفطري الهوائي **Aerial mycellum** الذي يتجمع بهيئة ضفائر **Strands**، تحتوي الحزمة الواحدة على **12** خيطاً فطرياً تتفرع الفياليدات من الخلية الجانبية بغزارة، وتبدو جالسة على الضفيرة ولكنها محمولة على الخلية. فتبدو متقاربة في القاعدة ومنفتحة في الأعلى لتعطي الشكل القمعي. تحتوي الأبواغ الكونيدية الكبيرة عادة على **3–4** حواجز ولكنها قد تحتوي على **1–5** حواجز، أسطوانية الشكل متوسطة – قليلة الانحناء مستدقة إحدى النهايتين والأخرى غير مستدقة وليس للسرة أثر في نهايتها. وأبعاد الأبواغ الكبيرة التي تمتلك حاجزاً مفرداً **24–32×5–7** مايكروميتر التي تمتلك حاجزين **35–43.5×6.5–7.5** مايكروميتر وتمتلك **3** حواجز أبعادها **38–44.5× 6.5–8**، إذ تمتلك **4** حواجز أبعادها **47–51.5× 7.5–8.5** والتي تمتلك **5** حواجز أبعادها **44.5 –54× 7.5–9** مايكروميتر (الشكلين **4** و**5**). ولم يلاحظ أبواغاً صغيرة يكونها الفطر، كما لم يلاحظ أبواغاً كلاميدية يكونها الفطر وتقاربت الصفات المذكورة آنفاً مع مواصفات ***Campyl. fasciculare***

المشار إليها من لدن Brayford وجماعته (4)، Halleen وجماعته (12)، Halleen (10)، Petit وGubler (21)، Chaverri وجماعته (6). ويعد ذلك تسجيلاً أولاً للفطر *Campyl. fasciculare* الذي يعد مسبباً لتعفن القدم السوداء على العنب في العراق.

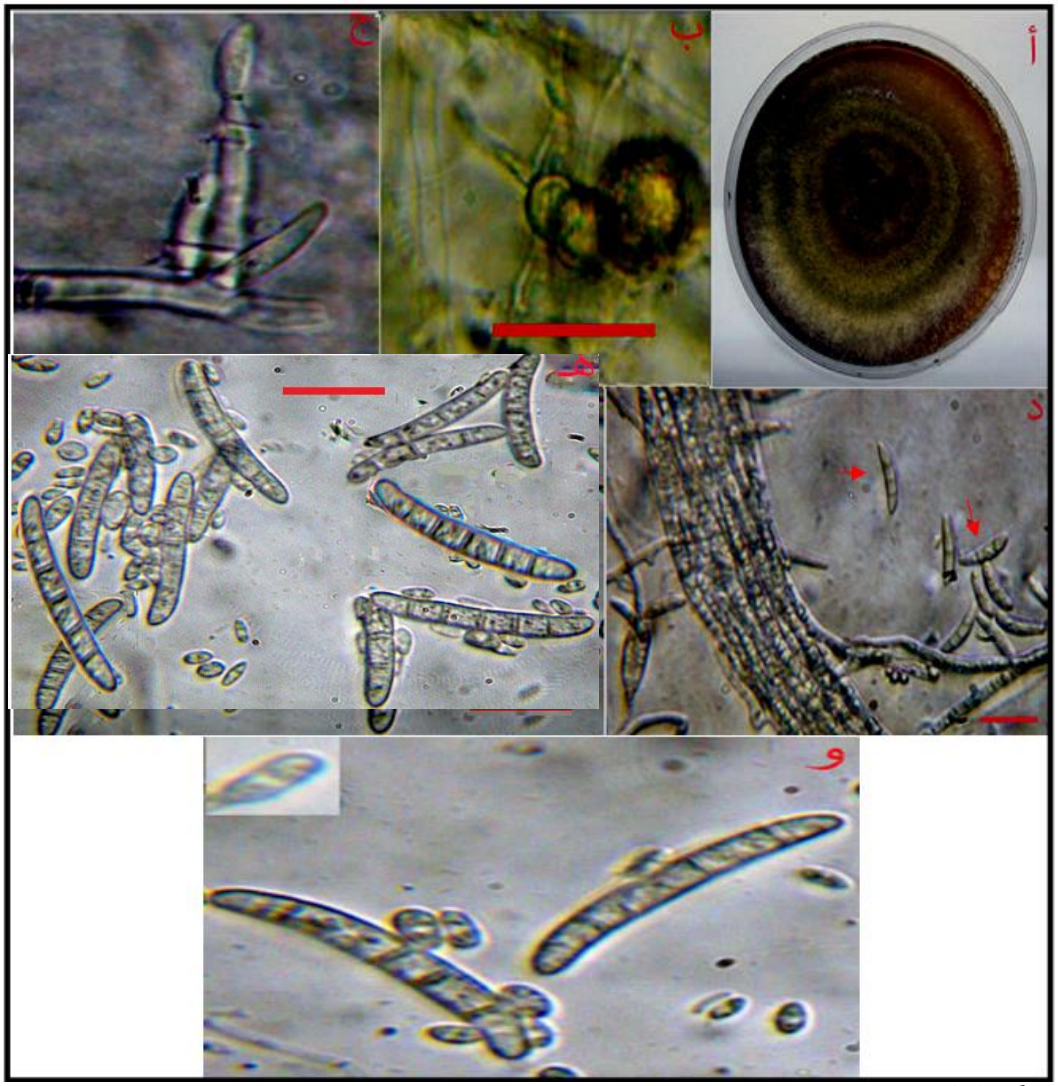


شكل 5: الفطر *Campylocarpon fasciculare*

أ– مستعمرة الفطر النامية على الوسط MEA بعمر 10 أيام ب– الخلية القاعدية Basal cell التي ينشأ عليها الحامل المتفرع ج–الحوامل الدائرية التي يكونها الفطر هـ،و،ز– الأبواغ الكونيدية الكبيرة Macroconidia ح،ط– الشكل القمعي Fascicle الذي يظهر به حوامل الأبواغ الكونيدية الكبيرة ي،ك– نشوء حوامل الأبواغ الكونيدية الكبيرة جانبياً على ضفائر يكونها الفطر أو على خيط فطري ل–غزارة تفرع حوامل الأبواغ الكبيرة وتكوين وسادة للأبواغ الكبيرة Sporodochium. ب=20 مايكروميتر، د، هـ،و،ز=30 مايكروميتر، ل=50 مايكروميتر .

شخص النوع ***Campylocarpon pseudofasciculare*** **Halleen, Schroers and Crous** الذي تميزت مستعمرته على الوسط MEA باللون البني وبلغ قطرها 45 ملم في 7 أيام في 30° م. وتشابهت

مواصفات غزله الفطري بسابقة، إلاَّ إن عدد الحواجز في البوغ الكبير (غالباً) مايكون عددها من **3–5** وقد يتراوح أحياناً من **2–6**، وبلغت أبعاد الأبواغ الحاوية على حاجزين **24–36 ×6–7** مايكروميتر التي تحتوي على **3** حواجز تراوحت أبعادها **37.5–48.5 × 6.5-7.5** مايكروميتر التي تحتوي على **4** حواجز تراوحت أبعادها **46.5–53.5×7–8.5** مايكروميتر التي تحتوي على **5** حواجز تراوحت أبعادها **51–59 ×7.5–8.9** مايكروميتر وتحتوي **6** حواجز بلغت أبعادها **59.8–61.5×8.5–9** مايكروميتر .الأبواغ الكلاميدية متباينة التكوين (وغالباً) ماتكون في مجاميع من **3–5** أبواغ تتكون بينياً أو على تفرعات جانبية قصيرة كروية أو مضلعة الشكل تتراوح أبعادها **8–11×7–8.5** مايكروميتر (الشكل،**4–6**). وتقاربت الصفات المذكورة آنفاً مع صفات ***Campyl. pseudofasciculare*** المشار إليها من لدن **Brayford** وجماعته (**4**)، **Halleen** وجماعته (**12**) و**Halleen** (**10**) و**Petit** و**Gubler** (**21**) و**Chaverri** وجماعته (**6**). ويعد ذلك تسجيلاً أولاً للفطر ***Campyl. pseudofasciculare*** الذي يعد مسبباً لتعفن القدم السوداء على العنب في العراق.



شكل 6: الفطر ***Campylocarpon pseudofasciculare***

أ– مستعمرة الفطر النامية على الوسط **MEA** بعمر**10** أيام ب– الأبواغ الكلاميدية **Chlamydospores** ج– حامل كونيدي بسيط مقسم **Simple septate conidiophore** يحتوي على ياقة **Collerate** د– تكون الضفائر **Strands** في الغزل الفطري الهوائي **Aerial mycelium** هـ،و– الأبواغ الكونيدية الكبيرة **Macroconidia** والصغيرة **Microconidia**. –ب **=10** مايكروميتر ج– **= 30** مايكروميتر، د،هـ **= 20** مايكروميتر .

اختبارات القدرة الإمراضية للفطريات المعزولة

يتبين من جدول (2) أن الفطر *C. destructans* كان من أشد الفطريات إمراضية للمجموع الجذري في الصنف حلواني (شكل 7)، إذ بلغت شدة إصابته بمرض القدم السوداء **0.893** يليه أيضاً إمراضيته الشديدة للصنفين كشمش محلي وشدة سودة، إذ بلغت شدة إصابة كل منهما **0.830** وإمراضية الفطريات ***Campyl. pseudofasciculare*** (**0.843**) و***C.macrodidymum*** (**0.836**) و***Campyl.fasciculare*** (**0.826**) في شدة إصابتهم للصنف حلواني.

شكل 7: أعراض إصابة عقل الصنف حلواني بعد إجراء العدوى الصناعية بالفطر ***C. destructans***

أ ،ب– شدة الإصابة العالية بالقدم السوداء وغياب الجذور وتقرح القلف ج– قطاع عرضي في عقلتين متباينتين في شدة إصابتهما (مقدار تلون الخشب بالبني والاسود) د، هـ– موت النموات الجديدة في العقل بعد نموها .

من تأثير تداخل الفطريات نجد أن الفطر***C. destructans*** كان أشدها تأثيراً في الأصناف فقد بلغ متوسط شدة إصابتها به **0.851** يليه الفطر ***C. macrodidymum*** (**0.800**) ثم الفطرين ***Campyl. fasciculare*** (**0.776**) و ***Camply. pseudofasciculare*** (**0.765**). من تداخل تأثير الأصناف نجد أن جذور الصنف حلواني أشدها تضرراً من بقية الأصناف، إذ بلغ متوسط إصابته **0.692** يليها جذور الصنف كشمش محلي الذي بلغت **0.640** ثم جذور الصنف شدة سودة (**0.621**). إن الإمراضية العالية للفطر ***C. destructans*** تتفق مع ما ذكرته الدراسات في إون هذا الفطر يأتي في مقدمة الفطريات المسببة لمرض القدم السوداء في مشاتل العنب، كذلك تأتي أهمية الأنواع ***C. macrodidymum*** و ***Campyl. fasciculare*** و ***Campyl. pseudofasciculare*** مسببات رئيسة لمرض القدم السوداء (**9**، **15**).

جدول 2: تأثير العدوى الصناعية بالفطريات المعزولة من شتلات عنب مصابة بمرض القدم السوداء في شدة إصابة المجموع الجذري بالمرض للأصناف كشمش محلي وحلواني وشدة سودة في البيت البلاستيكي

الفطريات	* الأصناف شدة الاصابة بالقدم السوداء			متوسط تأثير الفطر
	كشمش محلي	حلواني	شدة سودة	
المقارنة	0.046f	0.060f	0.080f	0.062d
C. destructans	0.830b	0.893a	0.830b	0.851a
C.macrodidymum	0.793c	0.836b	0.770c	0.800b
Campyl. fasciculare	0.733d	0.826b	0.770c	0.776c
Campyl. pseudofasciculare	0.763cd	0.843b	0.960e	0.765c
متوسط تأثير الصنف	0.640b	0.692a	0.621c	

* الأرقام المتبوعة بأحرف مختلفة تدل على وجود فروق معنوية بينها عند مستوى احتمال 0,05

المصادر

1- Agusti-Brisach, C.; D. Gramaje; M. Leon; J. Garcia-Jimenez and J. Armengol (2011). Evaluation of vineyard weeds as potential hosts of black-foot and petri disease pathogens. Plant Disease 95:803-810.

2- Alaniz, S.; M. Leon; A. Vicent; J. Garcia-Jimenez; P. Abad-Campos and J. Armengol (2007). Characterization of *Cylindrocarpon* species associated with black foot disease of grapevine in Spain. Plant Disease 91: 1187-1193.

3- Booth, C. (1966). The genus *Cylindrocarpon*. Mycological Papers No.(104), 56pp.

4- Brayford, D.; B.M. Honda; F.R. Mantiri and G.J. Samuels (2004). *Neonectria* and *Cylindrocarpon*: the *Nectria* mammoidea group and species lacking microconidia. Mycologia 96: 572-597.

5- Cabral, A.; C. Rego; T. Nascimento; O. Helena; Z. J. Groenewald and P.W. Crous (2012). Multi-gene analysis and morphology reveal novel *Ilyonectria* species associated with black foot disease of grapevines. Fungal Biology 1 1 6: 6 2 - 80.

6- Chaverri, P.; C. Salgado; Y. Hirooka; A.Y. Rossman and G.J. Samuels (2011). Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. Studies in Mycology 68: 57–78.

7- Fourie, P. and F. Halleen (2004a). Occurrence of grapevine trunk disease pathogens in rootstock mother plants in South Africa. Australasian Plant Pathology 33: 313– 315.

8- Fourie, P.H. and F. Halleen (2004b). Proactive control of petri disease of grapevine through treatment of propagation material. Plant Disease 88:1241-1245.

9- Haleem, R.A. (2010). Molecular and Morphological Identification of Fungi Associated With Grapevine Decline Duhok Province. Ph.D. Thesis Plant Production, College of Agricultural, University Duhok, Iraq, p:145.

10- Halleen, F. (2005). Characterisation of *Cylindrocarpon* spp. Associated with Black Foot Disease of Grapevine. Ph.D. Thesis, College of Agriculture at the University of Stellenbosch, p: 248.

11- Halleen, F.; P.W. Crous and J.Z. Groenewald (2004a). ITβ-tubulin phylogeny of *Cylindrocarpon* spp. Associated with black foot disease of grapevine. Phytopathologia Mediterranea 43:146-147.

12- Halleen, F.; H.J. Schroers; J.Z. Groenewald and P.W. Crous (2004b). Novel species of *Cylindrocarpon* (*Neonectria*) and *Campylocarpon* gen. nov. Associated with black foot disease of grapevines (*Vitis* spp.). Studies Mycology 50:431-455.

13- Halleen, F.; P. Fourie and P. Crous (2005). Black foot disease of grapevine: Summary of research in South Africa. Wynboer- Pests & Diseases December 2005. http://www.wynboer.co.za/recen-tarticles/200512blackfoot.php3

14- Halleen, F.; P.H. Fourie and P.W. Crous (2007). Control of black foot disease in grapevine nurseries. Plant Pathology, 56: 637-645.

15- Halleen, F.; P. H. Fourie and, P. W. Crous (2006). A review of black foot disease of grapevine. Phytopathologia Mediterranea, 45: 55-67.

16- Halleen, F.; P.W. Crous and O. Petrini (2003). Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines. Australasian Plant Pathology 32: 47-52.

17- Koike, S.T. and C.A. Wilen (2010). Management of soilborne pathogens. In: UC IPM Pest Management Guidelines: Floriculture and Ornamental Nurseries. UC ANR Publication 3392. University of California, Davis, CA.http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/r28-0190211.html.

18- Ozben, S.; F. Demirci; K. Degirmenci and S. Uzunok (2012).first report of *Cylindrocarpon macrodidymum* associated with black foot diseases of grapevine in Turkey .Plant Disease 96:762.(Abst.).

19- O'Gorman, D.T.; P. Haag and P.L. Sholberg (2008). New Diseases Causing Decline of Wine Grapes in the Okanagan Valley. Canadian Plant Disease Survey, in Press.http://www.agf.gov.bc.-ca/cropprot/grapeipm/cylindrocarpon.htm

20- Marek, S. M.; S. Oklahoma; A.Y. Mohammad and R.M. Bostock (2013). *Fusarium* spp., *Cylindrocarpon* spp., and Environmental stress in the etiology of canker disease of cold – stored fruit and nut tree seedlings in California. Plant Disease 97:259-270.

21- Petit, E. and W.D. Gubler (2005). Characterization of *Cylindrocarpon* species, the cause of black foot disease of grapevine in California. Plant Disease89:1051 -1059.

22- Saydam, C.; M. Copen and E. Sezgin (1973). Studies on inculation techniques of cotton wilt caused by *Verticillum dahliae* kleb: 1 - Investigation on the laboratory inoculation techniques. Journal of Tirkish Phytopathology 2:69-75.

23- Scheck, H. (2012). Cylindrocarpon Black Foot Disease. PowerPoint Presentation. Santa Barbara County Agricultural Commissioner's Office. Santa Barbara, CA.

Iraqi J. Agric. Res. (Special Issue) Vol.19 No.2 2014

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF GRAPEVINE BLACK FOOT DISEASE CAUSAL AGENTS IN NINEVEH PROVINCE - IRAQ

K. H. Taha **Z. K. I. Saeed**

ABSTRACT

This study was aimed, for the first time isolation and identification of the most important black foot disease causal agents in Nineveh grapevine nurseries. The isolation from diseased grape young plants showed that there were the fungi: *Cylindrocarpon destructans* (Zinssmeister) Scholten, and it's telomorph *Ilyonectria radicicola* (Gerlach and L. Nillsson) P. Chverri and C.Salgado, comb. nov.; *C. macrodidymum* Halleen, Schoers and Crous, *Campylocarpon fasciculare* Schroers, Halleen and Crous, *Campyl. pseudofasciculare* Halleen, Schroers and Crous, as the main causal agent of disease . Isolation for *C. destructans* fungus gave the highest percentage from diseased grape young plant root (16.17%) and stem (17.07%). The fungi *C.macrodidymum*, *Campyl.fasciculare*, *Campyl. pseudofasciculare*, and *I. radicicola* (Telomorph for *C. destructans*) were recorded for the first time in Iraq. The Pathogenicity test proved to be that all fungi were pathogenic to grapevine cutting (cvs. Shadasoda, local seedless and hallawanii) causing black foot in nursery while the highest disease severity caused by *C. destructans* on three cultivars.

Part of M.Sc. thesis of Second author.
College of Agric. Frost. - Mosul Univ.- Nineveh, Iraq.