حصر وتعريف مرض اللفحة النارية على التفاح والكمثري في منطقة الجبل الأخضر– ليبيا

نجاة إدريس عمر[1] عزالدين محمد العوامي[1] محمد على موسى أدم[1]

DOI: https://doi.org/10.54172/mjsc.v26i1.703

الملخص

أجريت هذه الدراسة في موسم نمو التفاح والكمثرى (2007) حيث تم حصر وتعريف مسبب مرض اللفحة النارية على التفاح والكمثرى في بعض المواقع بمنطقة الجبل الاخضر وقد تميزت الأعراض التشخيصية لهذا المرض بتغير لون أزهار الكمثرى والتفاح إلى اللون الأسود وتغير لون الأوراق في الكمثرى إلى اللون الأسود وإلى البني في التفاح ولوحظ النز أو الإفراز البكتيري على ثمارالكمثرى مع تجعدها وتحنطها مع تقدم الإصابة. جمعت عينات مصابة عزلت منها عدة عزلات للبكتيريا المسببة للمرض من مواقع مختلفة بمنطقة الجبل الأخضر (قرنادة – الفائدية – البيضاء – شحات – الوسيطة). وأوضحت نتائج الحصر تسجيل أعلى شدة إصابة بهذا المرض مع نهاية فترة الدراسة بمنطقة الفائدية على اشجار التفاح (44.25%) ثم يليها شحات والبيضاء والوسيطة ثم منطقة قرنادة (32.49%). وبدراسة الصفات العامة والشكلية والمزرعية وكذلك الخواص الفسيولوجية والبيوكيميائية لهذه العزلات أتضح إنها تتبع البكتيريا *Erwinia amylovora* وهذا ما دلت عليه أيضاً اختبارات القدرة الأمراضية على ثمار الكمثرى الكاملة غير التامة النضج وكذلك على شرائح ثمار التفاح والكمثرى غير تامة النضج . وأكد تفاعل تسلسل البلمرة (PCR) باستخدام البادئات المتخصصة تعريف هذه البكتيريا.

[1] قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة عمر المختار، البيضاء–ليبيا.

© للمؤلف (المؤلفون)، يخضع هذا المقال لسياسة الوصول المفتوح ويتم توزيعه بموجب شروط ترخيص إسناد المشاع الإبداعي CC BY-NC 4.0

المقدمة

يعد التفاح والكمثرى من أهم محاصيل الفاكهة في منطقة الجبل الأخضر فى ليبيا، ويعتبر مشروع الجبل الأخضر من أهم المشاريع الزراعية التي تنتج التفاح والكمثرى نظراً لملاءمة الظروف الجوية لنموه (أبو غنيه ، 1986) . حيث تم زراعة 15000 شجرة تفاح في عام 2003 و 70000 شجرة تفاح في عام 2004 (الهيئة الوطنية للمعلومات والتوثيق ، 2004) . تصاب أشجار التفاحيات بالعديد من الأمراض منها الأمراض الفطرية و الفيروسية والفيرودية (Agrios، 1997). كما تصاب أشجار التفاحيات بالأمراض البكتيرية مثل مرض التدرن التاجي الذي تسببه البكتيريا *Agrobacterium tumifaciens* و مرض اللفحة النارية الذي تسببه البكتيريا *Erwinia amylovora* ومرض تعصف الكمثرى بواسطة البكتيريا *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (عبدالرحيم ، 1996). ويعد مرض اللفحة النارية من أهم مسببات الأمراض البكتيرية الخطيرة على التفاحيات وعدد من النباتات التي تتبع العائلة الوردية ويعتبره البعض أخطر مرض يصيب التفاح والكمثرى (Vanderzweet *et al*., 1988) لهذا استهدف هذا البحث دراسة انتشار المرض في مواقع مختلفة بمنطقة الجبل الأخضر وعزل وتعريف المسبب المرضي على التفاح والكمثرى واثبات علاقته بالأعراض المصاحبة للحالة المرضية.

مواد وطرق البحث

حصر انتشار المرض :لدراسة انتشار المرض أثناء موسم 2007 حددت مواقع مختلفة بمنطقة الجبل الأخضر وهي قرنادة –الفائدية – البيضاء – شحات – الوسيطة التي تنتشر بها زراعة التفاح *Malus domestica* والكمثرى *Pyrus communis* والتي لوحظ فيها انتشار الأعراض المرضية (شكل 1) . اختيرت مزرعة فى كل موقع لجمع العينات وحددت فى كل منها 4 مكررات وكل مكرر أشتمل على 3 أشجار وكل شجرة عُلمت فيها 3 أفرع وتم متابعتها من شهر الطير (أبريل) حتى شهر هنيبال (أغسطس). سًجلت الملاحظات على الأوراق حيث أخذت قراءات للمرض على الأفرع المحددة حسب المقياس الذي يشتمل على 6 درجات ثم قدرت شدة الأصابة (%) وفق المعادلة التي اقترحها Horsfatl and Heuberger (1942)وسجلت درجات الحرارة والرطوبة خلال موسم الدراسة عن طريق محطة أرصاد البيضاء (البلنج) ومحطة أرصاد شحات التي تغطي مواقع هذه الدراسة (جدول 1).

عزل البكتيريا واختبار القدرة الامراضية:جمعت الأزهار والأوراق المصابة من

الكمثرى والتفاح من عدة مزارع ووضعت في أكياس ورقية ثم نقلت إلى المعمل لأجراء عمليات العزل حيث نميت العزلات على بيئة D3 المتخصصة للبكتيريا *Erwinia* في أطباق بتري (Kado and, Hesket, 1970). و اجري اختبار فرط الحساسية على أوراق نبات التبغ صنف White Burly لتمييز البكتيريا الممرضة للنبات عن المترممة (Schaad *et al*., 2001). ثم اجري اختبار القدرة الأمراضية للعزلات التي أظهرت إيجابية لتفاعل فرط الحساسية وذلك على ثمار الكمثرى والتفاح غير كاملة النضج الخالية من أي أضرار حيث عقمت هذه الثمار سطحياً بغمرها بمحلول هيبو كلوريد الصوديوم (0.5%) لمدة دقيقتين ثم غسلت بالماء المقطر المعقم وعقمت مرة أخرى بالغمر في كحول إيثانول (95%) لمدة دقيقة وجففت هوائياً. وبعد ذلك اجري الاختبار على شرائح من هذه الثمار (أبو غرة ، 1997) وعلى الثمار الكاملة (Billing *et al*., 1960).

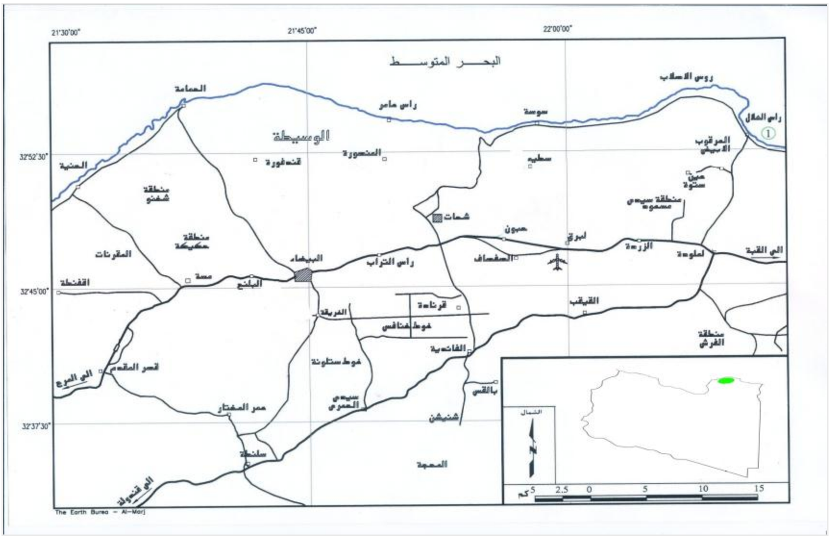
تعريف وتصنيف عزلات البكتيريا الممرضة:

اجريت تجارب لمعرفة الكائن الممرض وتصنيفه بحيث اشتملت تلك التجارب على دراسة شكل الخلايا واختبار صبغة جرام (Skerman, 1967) ، اختبار الحركة (Sands *et al*., 1970) ، ووجود الكبسولة (ابوغرة ،1997). كما تم دراسة نمو العزلات البكتيرية المتحصل عليها على عدة أنواع من البيئات منها البيئة التخصصية D3 (Kado and Heskelt, 1970) والبيئة MS(Miller and ,1972) و بيئة الاجار المغذي (Schroth *et* Kazempour *al*., 2006) وبيئة King B (King *et al*., 1954). من ناحية اخري، درست الخصائص الفسيولوجية والبيوكيميائية بحيث اشتمل ذلك اختبار مقدرة العزلات على انتاج انزيم الاوكسيديز (Kovacis, 1956)، وانزيم الكتاليز (Stanier *et al*., 1966)، وانتاج الليفان (kiraly *et al*., 1974). وامكن اجراء عدد من هذه الاختبارات باستخدام أشرطة Api20 (Biomerieux - France) وأشرطة Himedia (Himedia – India) تبعاً لما ذكره الباحثان Lelliott and Stead (1987) وقد إشتملت هذه الاختبارات الكشف على نشاط إنزيم بيتا جلاكتوسيديز وإنزيم ديكربوكسيليز وإنزيم اورنيثين ديكربوكسيليز وإنزيم اليوريز و إنزيم الجلاتينيز وإنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين والأندول واختزال النترات. كما اختبرت مقدرة العزلات البكتيرية على استخدام بعض السكريات والمواد الكربوهيدراتية كمصدر للكربون مثل الأرابينوز ، الأنيوسيتول ، الدكسترين ، الأدينيتول ، المانيتول ، التريهالوز ، الرابيوز ، المانوز ، السكروز والجلوكوز وكذلك اختبرت مقدرة العزلات البكتيرية على استخدام السترات وإنتاج الأسيتون .

تعريف العزلات بواسطة تفاعل تسلسل البلمرة (PCR): نُميت العزلات البكتيرية المعزولة من منطقة الجبل الاخضر بالإضافة إلى عزلة تم

الحصول عليها من كلية الزراعة بجامعة الأسكندرية– مصر في أنابيب تحتوي بيئة مرق مغذي لمدة 24 ساعة ثم استخلص الحامض النووي لها تبعاً للخطوات الموجودة في الكتيب الخاص باستخلاص الحمض النووي DNA (Biospin Bacteria (Genomic DNA Extraction Kit (.Bioflux CHAIN). وحضر مخلوط تفاعل البوليميريز المتسلسل (PCR) في أنبوبة طرد مركزي سعتها 0.5 مل وذلك بإضافة 5 ميكرولتر من المحلول المنظم 10X و2.5 ميكرولتر من DNTPs و 2 ميكرولتر من الحمض النووي DNA المستخلص و1.5 ميكرولتر من كلوريد الماغنيسيوم ($MgCl_2$) و وحدتين من الإنزيم – Taq -DNA Polymerase (Promga, UK) و 1 ميكرولتر من البادئين التاليين :

البادي الأول Eamy A 5 -` CGGTTTTTAACGCTGGG-`3 والبادي الثاني Eamy B5-` GGG CAAATACTCGGATT -`3 (Schaad, 2001) بتركيز 10 ميكرولتر وبعد ذلك تم وضع مخلوط التفاعل في جهاز الPCR (SPCRIMKII, STUART SCIENTIFIC) وتم تشغيل الجهاز 35 دورة بحيث كانت الدورة الأولية (Denaturation) لمدة دقيقتين على درجة حرارة 95 مْ ثم تمت الدورات الاخرى على درجة حرارة 95 مْ لمدة دقيقة و50 مْ لمدة دقيقة و72 مْ لمدة دقيقة ،بعد ذلك دورة أخيرة (Final extension) على درجة حرارة 95 مْ لمدة دقيقة عقب ذلك أجريت عملية الترحيل الكهربائي على جل الأجاروز 1% (Sambrook *et al*., 1989).



شكل (1). مواقع دراسة مرض اللفحة النارية على التفاح والكمثرى بمنطقة الجبل الأخضر

جدول(1). المتوسط الشهري لدرجات الحرارة والرطوبة النسبية خلال فترة الدراسة من شهر الطير(أبرايل) حتى شهر هنيبال (أغسطس) (2007).

الشهور	محطة الأرصاد الجوي شحات		محطة الأرصاد الجوي البلنج	
	درجة الحرارة (مْ)	الرطوبة النسبية (%)	درجة الحرارة (مْ)	الرطوبة النسبية (%)
1	9.5	82	11.7	77
2	8.6	84	11.3	75
3	11.5	72	14.8	61
4	13.9	67	17.8	52
5	17.8	66	22	46.5
6	23.0	49	26.5	41
7	23.2	63	26	54
8	23.3	71	25.1	60
9	20.5	72	22.8	61
10	19.0	67	21.2	60
11	14.9	68	17.0	61
12	14.9	84	11.8	72

النتائج و المناقشة

حصر انتشار المرض في بعض المواقع بمنطقة الجبل الأخضر: تميزت أعراض المرض بتغير لون الأزهار في الكمثرى (شكل 2.أ) والتفاح (شكل 2.ب)إلى اللون الأسود، وتغير لون الأوراق في الكمثرى إلى اللون الأسود (شكل 3.ب) وفي التفاح إلى اللون البني(شكل 3.أ)، كما لوحظ نز بكتيري على ثمار الكمثرى ومع مرور الوقت تجعدت الثمار والأوراق وأخذت الثمار شكل المومياء (شكل 4). كما تبين من خلال تقدير شدة الإصابة بهذه الأعراض في مواقع الدراسة بمنطقة الجبل الأخضر (جدول 2) زيادة شدة المرض مع مرور الوقت من بداية ظهوره إذ لم تتعدى شدة الإصابة في شهر الطير 19.27 % في منطقة الفائدية التي سجلت بها أعلى إصابة وبعد ذلك ارتفعت شدة الإصابة تدريجياً في جميع المواقع حتى شهر هنبيال وقد سجلت أعلى شدة إصابة في منطقة الفائدية (44.25 %) يليها شحات والبيضاء والوسيطة التي تراوحت شدة الإصابة فيها بين 35.5 – 36.48 % بينما سجلت أقل شدة إصابة في منطقة قرنادة حيث وصلت إلى(32.49 %) . ويتضح بالتالي زيادة شدة الإصابة بزيادة درجة الحرارة والرطوبة النسبية (جدول 1) حيث كان

متوسط درجة الحرارة في شهر الطير حسب سجلات محطة الأرصاد بالبلنج هي 17.8% والرطوبة النسبية 52% بينما كانت شدة الإصابة أثناء هذه الفترة في البيضاء 12.97% وفي الوسيطة 15.7% وفي شهر هانيبال زادت شدة الإصابة حيث وصلت في البيضاء إلى 35.52 % وفي الوسيطة 36.84% في الوقت الذي زادت فيه درجة الحرارة حيث وصلت إلى 25.1% والرطوبة النسبية إلى 60%. والبيانات المسجلة بمحطة الأرصاد في شحات (جدول 1) توضح أن متوسط درجة الحرارة في شهر الطير كانت 13.9مْ والرطوبة النسبية 67% وأثناء هذه الفترة كانت شدة الإصابة في الفائدية 19.27% وقرنادة 19.145% وشحات 9.75% ثم حدثت زيادة في شدة الإصابة تدريجياً حتى وصلت في شهر هانيبال بمنطقة الفائدية 44.25% و 32.49% في منطقة قرنادة و 35.50% في شحات هذه الزيادة في شدة الإصابة قد ترجع إلى الارتفاع التدريجي لدرجات الحرارة والرطوبة النسبية حيث وصلت درجة الحرارة إلى 23.3 مْ والرطوبة النسبية إلى 71% .

جدول (2) شدة الإصابة (%) بمرض اللفحة النارية على التفاح في مواقع مختلفة من منطقة الجبل الأخضر في الفترة الممتدة من شهر الطير إلى شهر هانيبال 2007 ف.

المواقع	الطير (أبريل)	الماء (مايو)	الصيف (يونيو)	ناصر (يوليو)	هنيبال (أغسطس)
قرنادة (تفاح)	9.14	12.20	20.92	27.60	32.49
الفائدية (تفاح)	19.27	29.58	30.16	37.87	44.25
شحات (تفاح)	9.75	15.57	22.48	29.12	35.50
البيضاء (كمثرى)	12.97	17.50	24.11	30.47	35.52
الوسيطة(تفاح)	15.70	20.25	27.33	33.30	36.84

أقل فرق معنوي (LSD) بين الأشهر=3.35، بين المواقع= 3.35 ، للتداخل = 7.505 .

عزل البكتيريا واختبار القدرة الامراضية:أوضحت عمليات العزل على البيئة D3 التخصصية أن البكتيريا نمت وكونت مستعمرات قببية حمراء اللون ذات حواف ناعمة مع تغير لون البيئة من اللون الأخضر المميز لها إلى اللون الأحمر، هذه الصفات المزرعية على البيئة التخصصية تتفق مع ما ذكره Kado and Heskett (1970) فيما يختص بنمو البكتيريا التي تتبع الجنس *Erwinia* على هذه البيئة. حيث تم اختيار عدد (5) عزلات بمعدل عزله من كل موقع من مواقع الدراسة وأعطيت أسماء لتميزها عن بعضها. عندما أجرى اختبار فرط الحساسية على أوراق نبات التبغ لهذه العزلات البكتيرية تبين مقدرتها على أحداث الموت الموضعي للأنسجة وذلك تحت ظروف المعمل بعد 48 ساعة وهذا يدل على أن البكتيريا المختبرة ممرضة للنبات فقد ذكر Al-Kazempour و Dhmashi and Klaif (2004) *et al.*,(2006) أن هذا الاختبار يستخدم لتمييز البكتريا الممرضة للنبات عن البكتيريا غير الممرضة أو المترممة. وبعد

اختبار القدرة المرضية للعزلات البكتيرية الموجبة لاختبار فرط الحساسية الذي اجري بطريقتين أما بحقن ثمار الكمثرى الكاملة أو بحقن شرائح ثمار الكمثرى أو التفاح غير تامة النضج اتضح قدرة العزلات على إحداث المرض حيث تمثلت الأعراض المرضية في ظهور اللون البني المسود حول مواضع الحقن على ثمار الكمثرى الكاملة (شكل 5.أ) في حين ظهرت على شرائح ثمار التفاح (شكل 5.ب) والكمثرى غير تامة النضج (شكل 5.ج) أعراض التشبع بالماء مع وجود النز البكتيري حول حدود غلاف البذور وعلى سطح شرائح الثمار .

تعريف وتصنيف عزلات البكتيريا الممرضة:أوضحت النتائج فيما يختص بالصفات العامة والشكلية أن خلايا هذه العزلات عصوية الشكل متحركة وحركتها سريعة إلى متوسطة السرعة سالبة لصبغة جرام وتكون المحفظة وهذا يتفق مع ماذكره Kazempour *et al.*, (2006) في وصفه للجنس البكتيري *Erwinia*. وعند تنمية البكتيريا على بيئة الأجار المغذي كونت مستعمرات شكلها مقبب بيضاء اللون ، في حين تنميتها على الاجار المغذي المضاف إليه 5% سكروز نمت مستعمرات لامعه بيضاء مقببة وبعد 48 ساعة أندمجت المستعمرات واصبح مظهرها لزج أو مخاطي أما عند تنميتها على بيئة King B تكونت مستعمرات لونها أبيض إلى كريمي مرتفعة قليلاً على سطح البيئة كما إنها لم تنتج صبغات متوهجة تعد هذه الصفات المزرعية مميزة للبكتيريا *E . amylovora* (King *et al.*, 1954 ؛ Bradbury, 1986)،وعلى البيئة Ms الأنتقائية تميزت بتكوين مستعمرات لونها برتقالي محمر لزجة وهي صفات تتميز بها البكتيريا *Erwinia amylovora*عند نموها على هذه البيئة (Miller and Schroth 1972) .أوضحت نتائج دراسة الخواص الفسيولوجية والبيوكميائية (جدول 3) أن جميع العزلات البكتيرية سالبة لاختبار أنزيم الاكسديز ولأنزيم ليسين دي كربوكسليز ولأنزيم اورثنين ديكربوكسليز ولأنزيم اليوريز وسالبة لأختزال النترات إلى نيتريت ولاتنتج غاز كبريتد الهيدروجين بينما كانت جميع العزلات البكتيرية موجبة لأنزيم الكتاليز . وعند دراسة مقدرة العزلات المختلفة على استخدام بعض المركبات العضوية والسكريات كمصدر للكربون (جدول 4) تبين أن جميع العزلات ماعدا عزلة البيضاء تستخدم الأربينوز، كما وجد أن عزلة الفائدية وعزلة شحات تستخدما المانوز في حين باقي العزلات كانت سالبة لاستخدامه أما عن استخدام السكروز والجلوكوز فإن بعض العزلات كانت ضعيفة في حين وجد أن جميع العزلات سالبة لاستخدام الأدينيتول والمانيتول و الرايبوز والدكسترين والانيسيتول والتريهالوز ماعدا عزلة قرنادة التي كانت موجبة لاستخدام التريهالوز هذه النتائج تتفق مع ما ذكره(1994) ,.Holt *et al* و AL-Dahmash and Klaif (2004) ؛ Kazempour *et al.*, (2006) عن الخصائص الفسيولوجية والبيوكيميائية للبكتيريا *E. amylovora* على الرغم من الاختلاف بعض العزلات في قدرتها على استخدام عدد من السكريات والمركبات الكربونية الأخرى فقد ذكر كل من (1963) Klement و (1980) Skerman *et al* و Mohan and Schaad (1987) و وأبو بكر (2005) إمكانية وجود اختلاف بين السلالات البكتيرية التي تتبع نفس النوع في قدرتها على استخدام بعض المركبات كمصدر للكربون . بناءً على ذلك فإن نتائج دراسة الصفات العامة والشكلية والمزرعية والفسيولوجية والبيوكيميائية تشير جميعها على أن العزلات التي تم عزلها من أشجار التفاح والكمثرى المصابة بمنطقة الجبل الأخضر تتبع البكتيريا *E. amylovora* ، وقد أكدت على ذلك نتائج دراسة القدرة الأمراضية للعزلات المذكورة حيث تطورت أعراض مرضية على ثمار الكمثرى وشرائح الكمثرى والتفاح مطابقة لتلك التي ذكرها الباحثين أبو غرة (1997) ؛ Sholberg *et al.*, (2001) ؛ AL-Dahmash and Klaif (2004) .

تعريف العزلات بواسطة تفاعل تسلسل البلمرة (PCR):تم في هذه الدراسة استخلاص الحامض النووي

DNA من 5 عزلات للبكتيريا *E. amylovora* معزولة من منطقة الجبل الأخضر بالإضافة إلى عزله معرفة مسبقاً تم الحصول عليها من جامعة الأسكندرية بمصر وأظهرت عملية الترحيل الكهربائي على جل الأجاروز ذلك من خلال ظهور حزم واضحة بالفحص تحت الأشعة فوق البنفسجية حيث أعطت كل عزلة ثلاث حزم أحداهما كبيرة في الأعلى على الجل وأخرى صغيرة في الأسفل (شكل 6). وقد تكون الحزمة الكبيرة خاصة بالحمض النووي الجينومي بينما الصغيرة تختص ببلازميدات هذه البكتيريا ، و لقد أوضح Fakenstein *et al.*, (1988) أمكانية التعرف على البكتيريا المسببة للفحة النارية من خلال الكشف عن وجود بلازميد محدد (Kb 29) . وعليه عند استخدام تقنية تفاعل تسلسل البلمرة (PCR) في تعريف البكتيريا المسببة لمرض اللفحة النارية بمنطقة الجبل الأخضر في وجود اثنين من البادئات الخاصة بهذه البكتيريا أتضح من عملية الترحيل الكهربائي على جل الأجاروز ظهور الحزمة الخاصة بالبكتيريا *E.amylovora* والتي حجمها 900 bp (شكل 7) إلا أن هذه الحزمة كانت ضعيفة، وهي حزمة يتم الكشف عليها عند تعريف هذه البكتيريا(Falkeenstein *el at*., 1988 ؛ Bereswill *et al.*, 1995). كما لوحظ وجود حزمتين يتراوح حجمها بين1300-1500 bp وقد يرجع وجود هذه الحزم الى اتحاد البادئات في مواقع اخري مشابهة لها في متوالية الحمض النوويDNA غير الموقع المستهدف وذلك يعتمد على نوع جهاز PCR المستخدم. وقد نجح البحاث Kazempour *et al.*, (2006) في تأكيد تعريف البكتيريا المسببة للفحة النارية على الكمثرى في إيران بواسطة تقنية تفاعل البوليميريز المتسلسل (PCR) في وجود بادئات خاصة بهذه البكتيريا، حيث أن التعريف المبدئي اعتمد على الاختبارات الشكلية والبيوكيميائية والفسيولوجية . ويعد هذا اول تعريف لهذه البكتيريا في منطقة الجبل الاخضر فى ليبيا.

جدول (3) الصفات الفسيولوجية والبيوكميائية للعزلات المختلفة .

الاختبارات	عزلات المواقع				
	قرنادة	الفائدية	البيضاء	شحات	الوسيطة
اختبار الأوكسيديز Oxdase	–	–	–	–	–
اختبار الكتاليز Catalase	+	+	+	+	+
تكوين الليفان Levan	+	+	+	+	+
انتاج انزيم بيتا جالاكتوسيديز ß- galactosidase	–	–	–	–	–
انتاج انزيم لوسين ديكربوكسيليزLysine decarboxylase	–	–	–	–	–
انتاج انزيم اورنيثين ديكربوكسليز Ornithine decarboxylase	–	–	–	–	–
انتاج انزيم الجيلاتينيزGelatinase	–	–	–	–	–
انتاج كبريتيد الهيدروجين H_2S	–	–	–	–	–
انتاج الاندولIndole	–	–	–	–	–
انتاج انزيم اليوريز Urease	–	–	–	–	–
انتاج الاستوين Acetoin	+	+	+	+	+
استخدام السترات Citrate	+	+	+	+	+

(+) إيجابية الاختبار. (–) سالبة الاختبار.

جـــدول (**4**) اســتخدام الســكريات وبعــض المركبــات الكربونيــة الأخــرى كمصــدر للكربــون وإنتــاج الحمضFermentation بواسطة العزلات المختلفة .

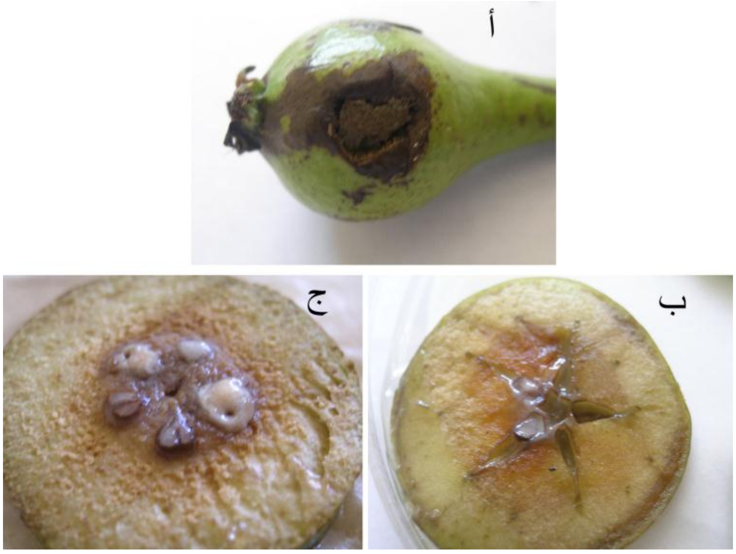
الاختبارات	العزلات للمواقع الخمسة				
	قرنادة	الفائدية	البيضاء	شحات	الوسيطة
الأربينوز Arabinose	+	+	−	+	+
الا ينوسيتول Inositol	−	−	−	−	−
الدكستربن Dextrin	−	−	−	−	−
الادونيتول Adonitol	−	−	−	−	−
المانيتول Mannitol	−	−	−	−	−
التريهالوزTrihelose	+	−	−	−	−
الرايبوز Ribose	−	−	−	−	−
المانوز Mannose	−	+	−	+	−
الجلوكوز Glucose	+	+	+	±	±
السكروز Sucrose	+	±	±	±	+

(+) إيجابية، (−) سالبة، (±) متوسطة.

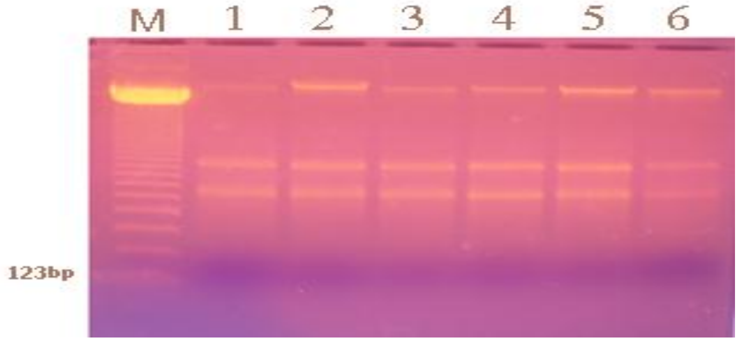
شكل (2). تغير لون أزهار وتحولها إلى اللون الأسودالكمثرى (أ) والتفاح (ب).

شكل (3). تغير لون الأوراق في التفاح إلى اللون البني(أ) وفي الكمثرى إلى اللون الأسود (ب).

شكل (4) .تجعد الثمار والأوراق وأعراض المومياء.

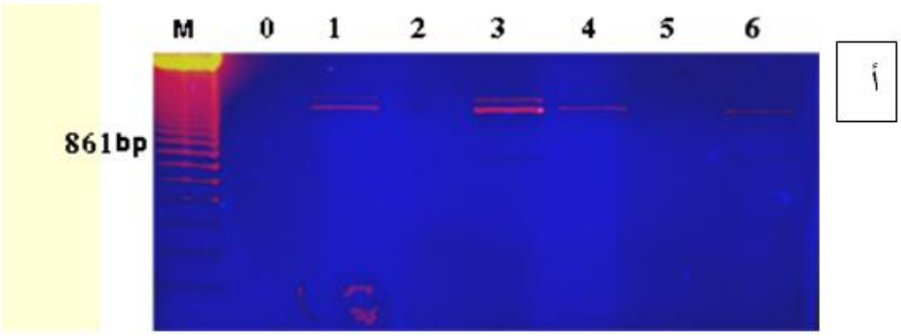


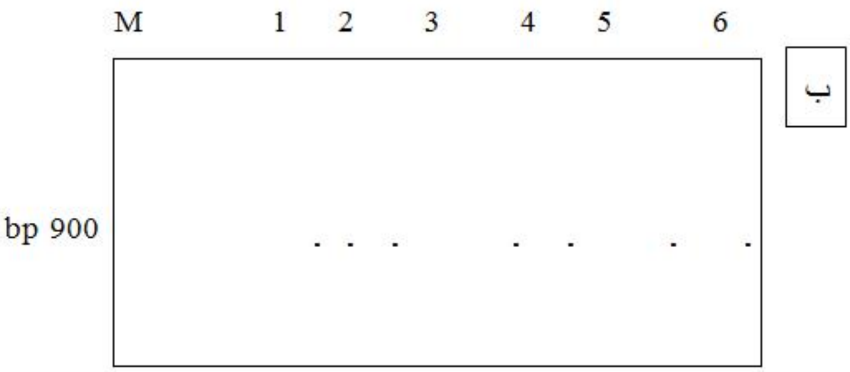
شكل (5) . إيجابية اختبار القدرة الإمرضية على ثمار كاملة للكمثرى غير تامة النضج(أ) وعلى شرائح ثمار التفاح (ب) و الكمثرى (ج) .



شكل(6)الحمض النووي الجينومي المستخلص من عزلات مختلفة للبكتريا *E. amylovora*

M. = المعلم (Marker) ، 1= عزلة الفائدية ، 2= عزلة قرنادة ، 3= عزلة البيضاء ، 4= عزلة شحات ، 5= عزلة الوسيطة، 6= عزلة مصر





شكل (7) استخدام تقنية (PCR) في تعريف العزلات البكتيرية

M = المعلم (Marker) ، 1= عزلة الفائدية، 2= عزلة قرنادة، 3= عزلة البيضاء، 4= عزلة شحات، 5= عزلة الوسيطة، 6= عزلة مصر. (أ) صورة ضوئية في الجل. (ب) شكل توضيحي للحزم المنتجة للDNA.

Identification And Survey Of Fire Blight Disease On Apple And Pear Trees In Jabel El-Akhdar Area, Libya

Ngaat I. Omar[1] Azzeddin M.Y. Alawami[1] Mohammed A.M. Adam[1]

Abstract

This study was carried out during the growth season of apple and pear of the year 2007, to survey and identify the causal agent of fire blight disease in different regions (ELfaidia, Shahat, Elbieda, Elwesita and Gernada) of El-Jabel El-akhdar area. The diagnostic symptoms of this disease included the change of the color of pear and apple flowers to black, pear leaves to black and apple leaves to brown .The ooze was observed on curly pear fruits and finally the fruit was mummified. Results of the survey revealed that the high severity disease was recorded at the study period in ELfaidia region (44.25%) followed by Shahat, Elbieda, Elwesita and Gernada (32.49%). The samples were collected for isolation purposes and the morphological, cultural, biochemical and physiological characters indicated that the causal agent of this disease was the bacterium *Erwinia amylovora*. Pathgenicity test on premature pear fruits and slices of premature pear and apple fruites confirmed this conclusion. The specific PCR amplification by using specific *E. amylovora* primers confirmed the identification of these isolates.

[1]plant protection Department-Faculty of Agricultural - Omar El-Mokhtar University – Al-Beida – Libya.

المراجع

أبو غرة ، م .(1997). أمراض النبات البكتيرية ،.منشورات جامعة دمشق . دمشق . 432 صفحة.

أبو غنية ، ع. (1986) . أمراض المحاصيل البستانية . منشورات جامعة الفاتح . طرابلس . 272 صفحة.

أبوبكر ،ع .م . (2005) .دراسات على مرض التبقع البكتيري على نبات الشماري . رسالة ماجستير ، أكاديمية الدراسات العليا . بنغازي .84 صفحة

الهيئة الوطنية للمعلومات و التوثيق. (2004) . مشروع الدراسة المسحية لإعداد خريطة تنموية بشعبية الجبل الأخضر ، الهيئة الوطنية للمعلومات ، البيضاء .46 صفحة

عبد الرحيم ، ع . م . (1996). البكتيريا وأمراض النبات . منشورات جامعة عمر المختار – البيضاء 539. . صفحة

Agrios, G. N.(1997). Plant pathology .4th ed . Academic press , New York, 635 pp.

Al- Dahmashi, M. S. and Khlaif, H.(2004). Fire blight of Pom Fruits in Jordan : disease development and response of different fruit cultivars to the disease Journal of Horticulture Science 10, 81-93.

Bereswill, S., Bugert, P., Bruchmuller, I. and Geider, K.(1995) .Identification of Erwinia amylovora by PCR with chromosomal DNA. App. Enviromental Microbiology 61, 263 – 2642.

Billing, E., Crosse, J. E. and Garrett, C. M. E .(1960). Laboratory diagnosis of Fire blight and bacterial blossom blight of pear. Plant Pathology 9, 19.25.

Bradbury, J. F. (1986). Guid to plant pathogenic bacteria CAB international Mycological institute , Ferrylon , Kew surrey . England, 332 pp.

Falkenstein, H., Bellemann, P., Walter, S., Zeller, W. L. and Geider, K. (1988). Identification of Erwinia amylovora , the Fire blight pathogen , by colony hybridization with DNA from plasmid pEA29. Appl. Environomental Microbiology 54, 2798-2802.

Holt, J. G., Krueg, N. R ., Sneath, P. H., Staley, T. and Williams, S . T. (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th ed . Williams and Wilkins – Blatimore U.S.A., 787 pp.

Horsfall, J. G. and Heuberger, J. W. (1942). Measuring of a defoliation disease of tomatoes. Phytopathology 32, 226-232.

Kado, C. I. and Heskelt, M. G. (1970). Selective media for isolation of Agrobacterium, Corynebacterium, Erwinia, Pseudomonas, and Xanthomonas. Phytopalthology 60, 969-976.

Kazempour, M., Kamran, E. and Ali, B.(2006). Erwinia amylovora causing fireblight of pear in the Guilan Province of Iran. Journal of Plant Pathology 88 (1), 113-116 .

King, E. O., Word, M. K. and Raney, D. E. (1954). Two simple media for The demonstration of pyocyanin and fluorescein . Journal of Laboratory and Clinial Medicine 44, 301.307.

Kiraly, Z., Klement, Z., Solymosy, F. and Voros, J. (1974). Methods in plant pathology. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, London, New York, 509 pp.

Klement, Z. (1963). Rapid detection of the pathogenicity of pathogenic Pseudomonas. Nature 199, 299-300.

Kovacs, N. (1956). Identification of Pseudonmonas pyocyanea by The oxidase reation. Nature. London. 178, 703 .

Lelliott, R. A. and Stead, D. E. (1987). Methods for the diagnosis of plant pathogenic bacteria. Black well, scientific publication, London, 216 pp.

Miller, T. D. and Schroth, M. N. (1972). Monitoring The epiphyt population of Erwinia amylovora on pear with a selective medium. Phytopathology 66, 367-370.

Mohan, S. K. and Schaad, N. W. (1987). Semiselective agar medium for isolating Pseudomonas syringae pv. syringae and pv. Phaseolicola from bean seed. Phytopathology 77, 1390-1395.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA, 1659 pp.

Sands, D. C., Schroth, M. N. and Hildebrand, D. C. (1970). Taxonomy of phytopathogenic Pseudomonas. Journal of Bacteria 101, 9-23.

Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W.(2001). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria .APS Press, 373 pp.

Sholberg, P. L., Bedferd, K. E., Haag, P. and Randall, P. (2001). Survey of Erwinia amylovora isolates from British Columbia for resistance to bactericides and virulence on Apple in Canada. Journal of Plant Pathology 23, 60-67.

Skerman, V. B. D. (1967). A Guide to the Identification of the Genera of Bacteria, 2nd edition, Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins, 303pp.

Stanier, R. Y., Palleroni, N. J. and Doudoroff, M. (1966). The aerobic Pseudomonads : a taxonomic study. Journal of General Microbiology 43, 159-271.

Vanderzweet, T., Zoller, B. G. and Thomson, S. V. (1988). Controlling Fireblight of pear and apple by accurate prediction of the blossom blight. Plant Disease 72, 464-472.