اختبار مدى مقاومة عزلات فطر *Venturia inaequalis* للمبيدات الفطرية المستعملة في لبنان

حنان دياب العرب ويوسف أبو جودة
كلية الزراعة والعلوم الغذائية، الجامعة الأميركية في بيروت، بيروت، لبنان.

الملخص

دياب العرب، حنان ويوسف أبو جودة. 1997. اختبار مدى مقاومة عزلات فطر *Venturia inaequalis* للمبيدات الفطرية في لبنان. مجلة وقاية النبات العربية. 15 (1): 3-9.

يعتبر مرض تبقع التفاح من أهم الأمراض التي تعتري التفاح في العالم. وفي لبنان، يسبب هذا المرض خسائر جمة في المناطق الجبلية وبخاصة في منطقة عكار. جمعت عينات من 23 بستاناً موزعين على المناطق اللبنانية وتمّ منها الحصول على 230 عزلة فطرية، أجريت عليها دراسات مخبرية لتحديد مدى مقاومتها للمبيدات الفطرية من مجموعة البنزيميدازول (Benzimidazoles) ومانعات البناء الحيوي للستيرول (SBI). وفي الدراسات المخبرية التي أجريت على نمو الهيفات والتبويغ، أظهرت جميع عزلات الفطر، باستثناء عزلة واحدة، مقاومة لمبيدي بينوميل و ثيوفانات الميثيل (Thiophanate methyl) بتركيز 1.0 جزء بالمليون ولم تتأثر معظم العزلات بتركيز 50 جزء بالمليون. كما أظهرت تلك الدراسات المخبرية أن جميع العزلات كانت حساسة لمبيد فيناريمول (fenarimol) الذي ثبط نموها عند تركيز 0.25 جزء بالمليون. واختلفت العزلات فيما بينها بالجرعة المؤثرة النصفية (ED_{50}) حيث تراوحت بالنسبة لمبيد فيناريمول ما بين 0.002 و 0.052 جزء بالمليون وللمبيد فلوزيلازول (fluzilazol) ما بين 0.001 و 0.018 جزء بالمليون. أما بالنسبة للمبيدين بروموكونازول (bromocunazol) وفنبوكونازول (fenbuconazol) اللذين ينتميان لمجموعة مانعات البناء الحيوي للستيرول (SBI) واللذين لم يكونا قد سوقا بعد في لبنان، فإن الجرعة الفعالة تراوحت ما بين 0.009 و 0.026 جزء بالمليون بالنسبة للمبيد الأول ومابين 0.008 و 0.039 بالنسبة للمبيد الثاني وبالتالي فانهما يتسمان بفعالية جيدة.

كلمات مفتاحية: تبقع التفاح، *Venturia inaequalis*، المقاومة للمبيدات الفطرية.

المقدمة

يعتبر مرض تبقع التفاح المتسبب عن الفطر *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. (anomorph: *Spilocaea pomi* Fr.) من أهم الأمراض التي تصيب التفاح في جميع مناطق زراعته في العالم (1). وفي لبنان، يسبب هذا المرض أضراراً كبيرة في المناطق الجبلية وبخاصة في جبال عكار؛ ولكنه غير مهم في سهل البقاع.

ونظراً لأن معظم الزراع يرشون المبيدات الزراعية وفق برنامج زمني محدد (رزنامة زراعية) فقد أدى ذلك إلى استعمال زائد للمبيدات دون الوصول إلى النتائج المرجوة. وظهر ذلك جلياً في منطقة عكار في موسم 1993 و1994، فعلى الرغم من أن بعض الزرّاع رشوا أشجارهم عشر رشات في الموسم الواحد إلاّ أن نسبة الإصابة بالمرض ظلت مرتفعة جداً، مما أدى إلى حدوث خسائر كبيرة. ويمكن عزو ذلك إلى واحد أو أكثر من الأسباب التالية: اختيار غيرموفق للمبيدات، وتوقيت غيرصحيح للرش، أو ظهور سلالات من الفطر مقاومة للمبيدات المستعملة. وأظهرت نتائج المسح المنفذ أن المبيدات المنتمية لمجموعة البنزيميدازول (Benzimidazoles) هي المبيدات الأكثر استعمالاً في لبنان لمكافحة هذا المرض.

وتشير تقارير علمية في أماكن أخرى من العالم إلى ظهور سلالات من الفطر مقاومة لمجموعة الـ Benzimidazoles كان أولها عام 1974 في أستراليا (11) ثم في الولايات المتحدة الأميركية (5) وكندا (8) وعديد من البلدان الأخرى.

نفذ هذا البحث لدراسة مدى حساسية أو مقاومة عزلات/سلالات من الفطر المسبب لمرض تبقّع التفاح للمبيدات الأكثر استعمالاً في لبنان، وكذلك لمقارنة النتائج المخبرية مع الفعالية الفعلية على النبات.

مواد البحث وطرائقه

موقع الدراسة وعزل سلالات الفطر

خلال عامي 1993 و 1994 تم بصورة عشوائية اختيار 23 بستان تفاح في المناطق التالية: عكار العتيقة، كفرذبيان والمناطق المجاورة، مجدل العاقورة ومنطقة جبل الباروك وجمعت منها عزلات من فطر *V. inaequalis*. وتم الحصول على 230 مستعمرة (عزلة) فطرية وحيدة البوغ (وحدة تكاثرية واحدة) أي بمعدل 10 مستعمرات لكل بستان.

تحديد التركيز الأدنى المانع لنموالهيفات

Minimum inhibitory concentration (MIC)

تم في المرحلة الأولى اختبار مدى حساسية عزلات الفطر (230 عزلة) لمجموعتين من المبيدات: مجموعة البنزيميدازول ممثلة بالمبيد بينوميل (benomyl) بتركيز 1.0 جزء بالمليون بحسب توصيات OEPP bulletin & FRAC (9) ومجموعة مانعات البناء الحيوي للستيرول (Sterol biosynthesis inhibitors) (SBI) ممثلة بالمبيد fenarimol بتركيز 0.05 كما اقترح Köller ومشاركوه (6) أو

بتركيز جزئين بالمليون حسبما اقترحه (2). وفي الاختبار الثاني، تمّ بصورة عشوائية، اختيار 60 عزلة فطرية واختبار مدى حساسيتها للبينوميل عند تركيز 5 و 50 جزء بالمليون.

نفذت التجارب المتعلقة بتأثير المبيدات في نمو هيفات الفطر في المختبر ضمن أطباق بتري تحتوي على مستنبت بطاطا ديكستروز - آغار (شاهد اول) أو المستنبت + 50 جزء بالمليون ريفاميسين (Rifamycin) أو ستريبتومايسين (Streptomycin) (كشاهد ثان)، والمستنبت + ريفاميسين + المبيد المراد دراسته بالتركيزات المناسبة. اقتطعت اقراص بقطر 3 سم من محيط مستعمرات الفطر الوحيدة البوغ ووضعت داخل أطباق بتري تحتوي المعاملات المختلفة. كررت جميع المعاملات ثلاث مرات. أضيف المبيد والمضاد الحيوي في المستنبت بعد التعقيم وعندما وصلت درجة حرارة المستنبت إلى 50° سلزيوس. وقد جرى التحضين لمدة شهر في الظلام عند درجة حرارة 18° سلزيوس، تم بعدها قياس قطر المستعمرات الفطرية. واعتبرت العزلة الفطرية حساسة للمبيد في حال عدم نموها؛ واعتبرت متحملة له إذا كان نموها خفيفاً ولم يزد قطر المستعمرة عن 10 مم؛ واعتبرت مقاومة للمبيد عندما زاد قطر المستعمرة عن 10 مم.

ولدراسة المقاومة المتبادلة (Cross Resistance) ما بين المبيدات التي تنتمي لمجموعة البنزيميدازول لمدى حساسيتها للمبيدين benomyl و Thiophanate methyl تم اختيار 12 عزلة (عزلتين من كل بستان بصورة عشوائية) و درست حساسيتها للمبيدين بالتركيزات التالية 0، 1، 5 و 50 جزء بالمليون (2).

تحديد الجرعة المؤثرة النصفية (ED_{50}) للمبيدات المانعة للبناء الحيوي للستيرول (SBI)

اختيرت بعض العزلات الفطرية بصورة عشوائية لتحديد الجرعة المؤثرة النصفية التي تؤدي إلى تخفيض معدل نمو هيفات الفطر إلى النصف (ED_{50}). واستعملت لهذه الغاية التركيزات التالية للمبيد fenarimol 0، 0.01، 0.02، 0.05، 0.1، 0.25، 0.5، 1 و 2، جزء بالمليون. أما بالنسبة للمبيدات fluzilazol، fenbuconazol و bromocunazol فاستعملت التركيزات التالية: 0، 0.001، 0.003، 0.01، 0.03، 0.1 و 0.3 جزء بالمليون من كل منهما وكررت كل معاملة ثلاث مرات. وبعد فترة الحضانة، جرى حساب النسبة المئوية لتخفيض معدل نمو الهيفات. كما تمّ حساب الجرعة المؤثرة النصفية (ED_{50}) ومعدلات F_1 وF_2 المقترحة من Köller ومشاركوه (6). وحللت النتائج إحصائياً باستعمال طريقة دانكن Duncan's multiple range test (DMRT).

اختبار تأثير المبيد بينوميل benomyl في انبات الأبواغ

بما أن نمو فطر *V. inaequalis* بطيء على مستنبت بطاطا ديكستروز آغار (potato dextrose agar)، فقد استعمل هذا الاختبار كمقياس سريع لدراسة مقاومة الفطور للمبيد benomyl واستعملت لهذا الغرض عزلات أحضرت من الحقل مباشرة من مجدل العاقورة (MA) عكار(H_1, H_2) والباروك (B_1, B_2). جمعت 50 ورقة تفاح مصابة من كل بستان وتم تحضير معلق بوغي تركيزه 10^4 بوغة/مل ووضعت قطرتين (10 ميكروليتر) منه في أطباق بتري تحتوي على مستنبت بطاطا - ديكستروز - آغار المضاف إليه التركيزات المختلفة للمبيد. أضيف مبيد البينوميل قبل التعقيم بالتركيزات التالية 1، 5 و 50 جزء بالمليون. وكررت المعاملات ثلاث مرات، وكان معدل الأبواغ في كل مكرر 200 بوغ. وتم الفحص المجهري وتحديد النسبة المئوية لمنع إنبات الأبواغ بعد التحضين لفترة تراوحت ما بين 24 و48 ساعة. وحيث أن مبيدات البنزيميدازول لا تؤثر في عملية إنبات الأبواغ بحد ذاتها بل في طول أنبوبة الإنبات، فقد اعتبر، في هذه التجربة، أن نمو البوغ كان طبيعياً ولم يتأثر بوجود المبيد عندما يبلغ طول أنبوبة الإنبات أربع مرات طول البوغة.

مقارنة كفاءة المبيدات في الدراسات المخبرية (*in-vitro*) والكفاءة الفعلية على النبات(*in-vivo*).

لدراسة الكفاءة الفعلية للمبيدات على النبات في مكافحة عزلات الفطر الحساسة للمبيد مقارنة بالعزلات المقاومة له، تم اختيار عزلة حساسة لتركيز 1.0 جزء بالمليون من مبيد البينوميل وعزلة أخرى مقاومة لتركيز 50 جزء بالمليون منه (في الدراسات المخبرية). تمت زراعة عشرين غرسة تفاح (East Malling) بعمر سنة واحدة في أصص بلاستيكية بقطر 20 سم تحتوي على مزيج من تربة وبيتموس وبرلايت بنسبة 1:1:2. وتم إعداء 10 منها برشها بمعلق بوغي من أبواغ العزلة الحساسة بتركيز 1.5×10^5 بوغ/ مل. وبعد مرور 48 ساعة، تم رش خمس منها بمبيد البينوميل بتركيز 300 ملغ/مل (المعدل الموصى به تجارياً) وتركت الخمسة الاخرى كشاهد. كما تمّ إعداء 10 شتلات بالعزلة المقاومة للمبيد؛ رش خمس منها بالمبيد بينوميل وتركت خمسة شتلات كشاهد. وقد وضعت الغراس في دفيئة بلاستيكية ذات رطوبة 100% لمدة 48 ساعة نقلت بعدها إلى غرفة نمو (phytotron) تراوحت درجة الحرارة فيها ما بين 15 و 19° سلزيوس والرطوبة ما بين 95 و 100%. وبعد 23 يوماً، تم فحص الشتلات لتحديد درجة إصابتها وذلك باستخدام مقياس (scale) من

صفر إلى تسعة بحسب المساحة المصابة للورقة كما في (4) مع تعديل طفيف، وحللت النتائج إحصائياً باستعمال اختبار DMRT.

النتائج

حساسية عزلات الفطر لمبيدات البنزيميدازول

لم تلاحظ أية فروقات مظهرية/مورفولوجية ما بين نمو العزلات المزروعة على مستنبت بطاطا ديكستروز آغار بدون إضافة المضادات الحيوية أو مع إضافة Rifamycin أو Streptomycin. وأظهرت النتائج أن جميع العزلات المدروسة في الاختبار الأول كانت مقاومة لمبيد بينوميل باستثناء عزلة واحدة من كفرذبيان أظهرت حساسية لتركيز 1.0 جزء بالمليون منه ولم تعط أي نمو.

مشابهاً للشاهد. هذا وكان البينوميل

وليس قاتلا له (Fungicidal) لأن الفطر استعاد نموه عندما نقلت نمواته التي كانت نامية على مستنبت مسمم بالبينوميل بتركيز 1.0 جزء بالمليون إلى مستنبت غير مسمم.

وفي اختبار آخر، أظهرت 59 عزلة من أصل 60 تمّ اختيارها عشوائياً مقاومة مرتفعة للبينوميل حيث نمت بصورة طبيعية على مستنبت يحتوي 50 جزء بالمليون منه وهو أعلى تركيز تم اختباره في هذه التجربة.

وأظهرت نتائج المقاومة المتبادلة، المدرجة في الجدول رقم 1، أن حساسية عزلات الفطر للمبيدين: بينوميل وثيوفانات الميثيل أو مقاومتها لهما متطابقة. فالعزلة الحساسة للمبيد الأول كانت حساسة للمبيد الثاني والعزلات المقاومة للمبيد بينوميل كانت مقاومة أيضاً لمبيد ثيوفانات الميثيل بتركيز 50 جزء بالمليون.

حساسية عزلات الفطر لمبيد الفيناريمول (fenarimol)

بالنسبة لمبيد الفيناريمول، أظهرت التجارب التي أجريت على 230 عزلة أن تركيز 0.05 جزء بالمليون من هذا المبيد أدى إلى تأخير معدل نمو الهيفات بنسب تراوحت ما بين 40 و 80%. غير أن تركيز 2 جزء بالمليون منه أدى إلى منع نمو هيفات جميع العزلات الفطرية وهذا التركيز هو الذي اقترحه Gilpatrick (2) للتمييز ما بين العزلات المقاومة والعزلات الحساسة. هذا وقد أظهر المبيد فيناريمول بتركيز 2 جزء بالمليون فعالية مميتة (fungicidal) للفطرحيث أنه عندما تم نقل أقراص (discs) العزلات إلى مستنبت خال من المبيد لم ينم للفطر.

تحديد الجرعة المؤثرة النصفية ED_{50} لمانعات البناء الحيوي للستيرول SBI

يظهر الجدول رقم 2 الجرعة النصفية والمعيارين F_1 و F_2 للمبيد فيناريمول لـ 19 عزلة من الفطر اختيرت بصورة عشوائية. ويشير معيار F_1 إلى المعدل الوسطي للجرعة المؤثرة النصفية مقسوماً على أدنى جرعة موثرة نصفية؛ بينما يشير معيار F_2 إلى أعلى جرعة مؤثرة نصفية مقسومة على معدل الجرعة المؤثرة النصفية ويمكن اعتباره بالتالي معياراً لمستوى المقاومة. وهكذا فإن معيار F_2=3، يعتبر منخفضاً ويدل على أنه لا توجد نسبة مقاومة تذكر عند هذه العزلات. وتراوحت الجرعة المؤثرة النصفية للمبيد فيناريمول ما بين 0.002 و 0.052 جزء بالمليون. أما معدل الجرعة المؤثرة النصفية للمبيد فيناريمول والتي احتسبت كمعدل الجرعات للعزلات من رقم 2 إلى 16 (بعد استبعاد المقياسين الأعلى والأدنى للجرعات) فكانت 0.017 جزء بالمليون.

ر المقاومة المتبادلة لبعض عزلات فطر *V. inaequalis* ستنبت بطاطا ديكستروز-آغار مسمم بأحد المبيدين المنتميين لمجموعة البنزيميدازول.

Table 1. Cross Resistance tests for randomly selected *V. inaequalis* isolates cultured on PDA.amended with either of the two benzimidazole derivatives.

رقم العزلة الحقلية Field isolates #	المبيدات الفطرية وتركيزها (ميكروغرام/مل) Fungicides and the concentration (µg/ml)			
	بينوميل Benomyl		ثيوفانات ميثيل Thiophanate-methyl	
	5	50	5	50
K_6 . 2	R	R	R	R
K_6 . 3	R	R	R	R
K_5. 1	R	R	R	R
K_5. 3	R	R	R	R
F_3 . 1	S	S	S	S
F_3 . 4	R	R	R	R
F_7 . 1	R	R	R	R
F_7 . 4	R	R	R	R
A_8 . 1	R	R	R	R
A_8 . 3	R	R	R	R
A_9 . 1	R	R	R	R
A_9 . 3	R	R	R	R

R= مستعمرة مقاومة بقطر > 1 سم. R= Resistant colony ∅ > 1cm.

S= مستعمرة مقاومة بقطر < 4 سم. S= Sensitive colony ∅ < 0.4 cm

وتراوحت الجرعة المؤثرة النصفية للمبيد فلوزيلازول التي احتسبت لثماني عزلات اختيرت عشوائياً ما بين 0.018 و 0.001 جزء بالمليون أما معدل الجرعة المؤثرة النصفية فكان 0.008 جزء بالمليون. وكانت قيم معياري F_1 و F_2 هي 8 و 2، على التوالي (جدول 3).

وكذلك تراوحت الجرعة المؤثرة النصفية للمبيد fenbuconazol ما بين 0.031-0.009 جزء بالمليون وما بين 0.039-0.008 بالنسبة للمبيد bromocunazol (جدول 3) أما معدل الجرعة المؤثرة النصفية

للمبيد fenbuconazol فكانت 0.02 و 0.016 للمبيد bromocunazol. وكانت قيم معياري F1 و F2 متماثلة للمبيدين $F_1=F_2=2$.

اختبار إنبات الأبواغ

لم تظهر أية فروقات إحصائية معنوية ما بين نسبة إنبات الأبواغ الكونيدية على المستنبتات التي احتوت بينوميل بتركيز 1 أو 5 أو 50 جزء بالمليون (51–69%) مقارنة بالشاهد (58–71%) (جدول 4). وهكذا فقد أكدت نتائج هذا الاختبار النتائج التي تم الحصول عليها من نمو الهيفات وهو أن العزلات اللبنانية أصبحت شديدة المقاومة لهذا المبيد.

جدول 2. الجرعة المؤثرة النصفية والمعيارين F_1 و F_2 للمبيد فيناريمول لـ 19 عزلة من الفطر *V. inaequalis*

Table 2. Mean ED_{50} values ($\mu.ml^{-1}$) derived from regression equations of several concentrations of fenarimol for mycelial growth inhibition of 19 *Venturia inaequalis* isolates

رقم العزلة الحقلية Field isolate #	الجرعة المؤثرة النصفية ED_{50}	
F_3 . 1	0.052	a
K_2 . 3	0.039	ab
K_2 . 2	0.034	abc
A_9 . 1	0.032	abc
F_7 . 4	0.030	abc
A_8 . 3	0.029	abc
K_7 . 1	0.022	abc
A_9 . 3	0.021	abc
K_7 . 6	0.014	bc
K_6 . 2	0.012	bc
F_3 . 4	0.011	bc
K_6 . 3	0.008	bc
F_2 . 3	0.005	bc
A_8 . 1	0.005	bc
F_2 . 2	0.004	bc
K_5 . 1	0.004	bc
K_6 . 2	0.003	bc
K_5 . 3	0.002	c
K_6 . 1	0.002	c
الخطأ القياسي		
±SD	0.02	
F_1	9	
F_2	3	
BLS	0.017	

المعدلات داخل الأعمدة نفسها والتي تحمل الأحرف نفسها لا تختلف إحصائيا على مستوى احتمالية 5% باستعمال اختبار دنكان

F_1= المعدل الوسطي للجرعة المؤثرة النصفية/ أدنى جرعة مؤثرة نصفية

F_2= أعلى جرعة مؤثرة نصفية/ معدل الجرعة المؤثرة النصفية

BLS= المعدل الوسطي للجرعة المؤثرة النصفية للعزلات (2-16) بالنسبة للفيناريمول

Means in the same column followed by different letters differ significantly ($P \leq 0.05$) according to DMRT.

F_1= Baseline ED_{50}/lowest ED_{50}

F_2= Highest ED_{50}/baseline ED_{50}

BLS= The mean baseline ED_{50} for isolates (2-16) for fenarimol.

جدول 3. الجرعة المؤثرة النصفية والمعيارين F_1 و F_2 للمبيدات فلوزيلازول، فنبوكونازول وبروموكونازول لثمانية عزلات من فطر *Venturia inaequalis*

Table 3. Mean ED_{50} values ($\mu g.ml^{-1}$) derived from regression equaltions of several concentrations of fluzilazol, fenbuconazol and bromocunazol for mycelial growth inhibition of eight *Venturia inaequalis* isolates.

رقم العزلة الحقلية Field isolate #	المبيد الفطري Fungicide		
	Bromocunazol ED_{50}	Fenbuconazol ED_{50}	Fluzilazol ED_{50}
K_6 .6	0.022 ab	0.024 ab	0.018 a
K_2 . 1	0.013 b	0.026 ab	0.013 ab
K_6 . 2	0.021 ab	0.018 ab	0.013 ab
K_1 . 2	0.039 a	0.031 a	0.012 ab
F_7 . 1	0.015 ab	0.024 ab	0.005 b
A_8 . 3	0.015 ab	0.016 ab	0.003 b
K_1 . 1	0.008 b	0.013 b	0.003 b
A_6 . 2	0.010 b	0.009 b	0.001 b
الخطأ القياسي			
± SD	0.01	0.01	0.01
F_1	2	2	8
F_2	2	2	2
BLS	0.016	0.020	0.008

المعدلات داخل الأعمدة نفسها والتي تحمل الأحرف نفسها لا تختلف إحصائيا على مستوى احتمالية 5% باستعمال اختبار دنكان

F_1= المعدل الوسطي للجرعة المؤثرة النصفية/ أدنى جرعة مؤثرة نصفية

F_2= أعلى جرعة مؤثرة نصفية/ معدل الجرعة المؤثرة النصفية

BLS= المعدل الوسطي للجرعة المؤثرة النصفية للعزلات (2-16).

Means in the same column followed by different letters differ significantly ($P \leq 0.05$) according to DMRT.

F_1= Baseline ED_{50}/lowest ED_{50}

F_2= Highest ED_{50}/baseline ED_{50}

BLS= Mean baseline ED_{50} for isolates (2-6).

المقارنة Correlation ما بين النتائج المخبرية والنتائج على النباتات الحية

أظهرت النتائج الأولية والمعروضة في الجدول 5 أن الرش بمبيد البينوميل بالتركيز الموصى به عالمياً أدى إلى مكافحة جيدة لعزلة الفطر الحساسة للمبيد، إذ أن معدل نسبة الإصابة على النبات المرشوش كانت أقل من قيمتها على الشاهد غير المرشوش وبفروقات معنوية ظاهرة. على أن الرش بالبينوميل لم يؤدِ إلى مكافحة العزلة المقاومة وكانت نسبة الإصابة على الأشجار غير المرشوشة موازية لمعدلها على الأشجار المرشوشة. وهذا يعني تطابقاً ما بين التقنيتين.

المناقشة

دلت هذه الدراسة، التي أجريت باستعمال تقنيات مخبرية (*in-Vitro*) وتقنيات على النبات الحي (*in-vivo*) أن جميع عزلات فطر *V. inaequalis* كانت مقاومة لمبيد بينوميل بتركيز 1.0 جزء بالمليون باستثناء عزلة واحدة (229 من أصل 230). وكان مستوى

المقاومة مرتفعاً حيث كانت حوالي 60 عزلة، اختيرت عشوائياً، مقاومة لتركيز 50 جزء بالمليون، علماً أن Shabi ومشـــاركوه (7) اقـــترحوا تسمية مقاومة عالية جداً (VHR) للعزلات التي تنمو بصورة طبيعية في مستنبت يحتوي على 50 جزء بالمليون بينوميل. وكانت هذه المقاومـــة متوقعة نظراً لكثرة استعمال المبيدات التـــي تنتمـــي لمجموعـــة الـــ benzimidazoles على التفاح في لبنان. وكذلك فقد تم التأكد من وجود مقاومة متبادلة (Cross Resistance) ما بين المبيد بينوميـــل والمبيـــد ثيوفانات الميثيل، كما ذكر في العديد من المصادر العلمية، وبذلك فانـــه لا ينصح في لبنان باستعمال مبيدات الـــ benzimidazoles بمفردهـــا لمكافحة مرض التبقع ضمن برنامج الرش.

جدول 4. النسبة المئوية لإنبات أبواغ *V. inaequalis* الكونيدية المختارة عشوائياً من البساتين على مستنبت PDA مسمم بالبينوميل بتركـــيز 1، 5 أو 50 جزء بالمليون.

Table 4. Percent germination* of *Venturia inaequalis* conidia from randomly selected orchards onmedia amended with benomyl (at 1, 5, or 50 $\mu g.ml^{-1}$).

Conidia germination** (%) النسبة المئوية لإنبات الأبواغ				
Benomyl ($\mu g.ml^{-1}$) تركيز البينوميل				
50	5	1	0	Orchards
57	60	61	63	H1
65	67	69	71	H2
62	62	65	67	MA
51	53	56	58	B

* حسبت النسبة المئوية للإنبات على 300 بوغ للتجربة الواحدة (100 بوغ بالمكرر كحدٍ ادنى.

** اعتبرت الكونيديا (الابواغ) مقاومة عندما وصل طول أنبوبة الإنبات، بعـــد 48 ساعة من التحضين على درجة حرارة 18° ســـلزيوس، إلـــى (4X) أربعة أضعاف طول البوغة.

* Percent germination was calculated on a minimum of 300 conidia per treatment (100 conidia per replicate).

** Conidia from these samples were considered resistant only when the germ tube reached a length equal to at least 4x the length of the conidium after incubation at 18°C for 48 hrs.

كما تم التأكد أيضاً من مقاومة عزلات الفطر للمبيد في لبنان عن طريق اختبار قدرة المبيد على منع إنبات الأبواغ، حيث فاقت الجرعـــة المؤثرة النصفية لأربع مجموعات من الأبواغ تركيز معدل الـــ 50 جزء بالمليون، بينما تدل الدراسات العالمية أن الجرعـــة المؤثـــرة النصفيـــة للعزلات الحساسة هي أقل من 0.1 جزء بالمليون في حين تنبت أبـــواغ العزلات المقاومة طبيعاً بتركـــيز 0.5 جـــزء بـــالمليون أو أكـــثر (2). وأوضح (5) أن عزلات الفطر المقاومة للمبيد تنبت بصـــورة طبيعيـــة بوجود مبيد البينوميل بتركيز 5 جزء بالمليون ولكنها لا تنبت بتركيز 50 جزء بالمليون، وهكذا فإن درجة مقاومة العزلات في لبنان تعتبر مرتفعة جداً.

جدول 5. معدل نسبة إصابة أوراق شجيرات التفـــاح بعـــزلات الفطـــر *V. inaequalis* المختارة، والمرشوشة وغير المرشوشة بمبيد البينومل بتركيز 300 جزء بالمليون.

Table 5. Severity index of apple scab on apple leaves inoculated with selected *Venturia inaequalis* isolates sprayed or unsprayed with benomyl at the recommended rate of 300 $\mu g.ml^{-1}$.

Treatment		SI*
Resistant isolate عزلة مقاومة بدون رش مبيد (شاهد)	+ no sprays	54.07 a**
Resistant isolate عزلة مقاومة + رش بالمبيد بنوميل	+ Benomyl spray	53.33 a
Susceptible isolate عزلة حساسة بدون رش أي مبيد (شاهد)	+ no sprays	40.74 a
Susceptible isolate عزلة حساسة + رش مبيد البنوميل	+ Benomyl spray	9.62 b

* Severity Index (SI) = $\frac{\text{Sum of } (S \times n_s)}{Z \times N} \times 100$

Where:

S= scale value ranges from 0 to 9 that represent 0 and 100% leaf area affected respectively

n_s = Number of leaves having s severity scale or category

Z= value of the highest scale (category) = 9,

N= Total Number of leaves

** Means in the same column followed by different letters are significantly different at $p \leq 0.05$ according to DMRT.

* شدة الاصابة

S= سلم شدة الاصابة يتراوح من صفر الى 9 حيث تعني 9 ان الاصابـــة تغطـــي كامل سطح الورقة

n_s= عدد الاوراق التي تنتمي الى درجة معينة من سلم الاصابة

Z= أعلى درجة لشدة الاصابة = 9

N= مجموع عدد الاوراق

** المتوسطات المتبوعة بحروف غير متماثلة يوجد بينها فروقـــات احصائيـــة علـــى مستوى 5% حسب طريقة دنكن.

وقد تم التأكد من هذه النتائج في اختبار آخر حيث أن رش شتلات التفاح بالمبيد بينوميل لم يحمها من الاصابة بمرض التبقع عندما أعديت الأشجار بعزلات مقاومة للمبيد ولكنه أعطى مكافحة جيدة عندمـــا تـــم الإعداء بعزلة حساسة.

ومن جهة أخرى تبين انه يمكن اعتبار جميع العـــزلات حساســـة للمبيد فيناريمول. حيث أن التركيز الأدنى الذي يمنع نمو هيفات الفطر كان دون 0.25 جزء بالمليون وهو اقل من التركيز الذي اعتمـــده (10) أي 0.4 جزء بالمليون لتمييز العزلات الحساسة. و على الرغم من ذلك فان هناك تبايناً واضحاً في مستوى حساسية العزلات المختلفة للـــمبيد فيناريمول. هذا وقد وجد أن معـــدل الجرعـــة المؤثـــرة النصفيـــة ED_{50} لمانعـــات البنـــاء الحيـــوي للســـتيرول (baseline sensitivity) المستعملة في هذا الدراســـة كـــانت 0.015 و 0.008 و 0.020 و 0.016

جزء بالمليون لمبيدات فيناريمول، فلوزيلازول، فنبوكونازول وبروموكونازول، على التوالي.

وهكذا يكون معدل الجرعة المؤثرة النصفية لمبيد الفيناريمول لعزلات الفطر في لبنان أقل بقليل مما ذكر في التقارير السابقة (أي 0.04 جزء بالمليون) (5) بينما كان معدل الجرعة المؤثرة النصفية للمبيد فلوزيلازول مشابهة لما ذكره (6) وبذلك تكون فعالية هذه المبيدات في الظروف المخبرية متقاربة من بعضها البعض.

وحيث أنه لم تكتشف أي عزلة مقاومة لمبيد الفيناريمول الذي يعتبر من أوائل المبيدات التابعة لمجموعة مانعات البناء الحيوي للستيرول التي أدخلت واستعملت في لبنان فإن مقاومة *V. inaequalis* لمبيدات SBI بما فيها الـ fluzilazol لا تشكل لغاية الآن مشكلة في لبنان.

اما المبيدان الفطريان الحديثان نسبياً bromocunazol و fenbuconazol فقد أظهرا فعالية جيدة في الاختبارات المخبرية، ويحبذ إجراء تجارب أخرى لدراسة فعاليتها في الظروف الحقلية.

وبناءً على هذه النتائج، يمكن عزو إخفاق المكافحة الكيميائية لمرض تبقع التفاح في عكار وغيره من المناطق اللبنانية إلى الانتشار الواسع لعزلات الفطر المقاومة لمجموعة مبيدات الـbenzimidazoles الشائعة الاستعمال منذ أمد بعيد في لبنان. لذا لا ينصح باستعمال هذه المجموعة من المبيدات لمكافحة مرض التبقع في لبنان. ومن جهة أخرى لا تزال مجموعة مبيدات الـ SBI تتسم بفعالية عالية في مكافحة مرض التبقع. فعلى نقيض مركبات الـ benzimidazoles ، لا توجد سوى تقارير قليلة نسبياً عن ظهور سلالات من فطر التبقع مقاومة لمبيدات الـ SBIs. وعادة لا تظهر هذه السلالات المقاومة إلا بعد بضع سنوات من الاستعمال المتكرر. وبناء على ما تقدم، ومنعاً أو تفادياً لظهور سلالات مقاومة لمبيد الـ SBIs، فإنه ينصح عادة برش رشتين فقط من هذه المبيدات في الموسم كما ينصح بعدم رش هذه المبيدات أكثر من أربع مرات في الموسم الواحد مهما كانت الظروف. كما ينبغي استعمال هذه المبيدات بالتناوب مع أو ممزوجة مع مبيدات اخرى كالمبيدات التي تعمل عن طريق الملامسة Thiram, mancozeb و captan أو بالتناوب باستعمال مبيدات تنتمي لمجموعات كيميائية جديدة أخرى مثل aniline-pyrimidines و β-methoxyacrylates ذات طرق تأثير بيوكيميائية مختلفة على الفطر (3).

كما يجب التنويه بأهمية التوقيت الصحيح للرش بحيث يتم تنفيذه عند اللزوم فقط معتمدين في ذلك على نظم مراقبة وتنبوء الأمراض (Disease forecasting systems).

شكر وتقدير

يتقدم المؤلفان بشكرهما وتقديرهما للأستاذ الدكتور أديب سعد (كلية العلوم الزراعية والغذائية، الجامعة الأميركية في بيروت) والدكتور بسام بياعة (كلية الزراعة، جامعة حلب) لمراجعتهما العلمية للبحث الحالي والملاحظات القيمة التي أبدياها إزاءه.

Abstract

Diab El-Arab, H. And Y. Abou-Jawdah. 1997. Evaluation of the sensitivity of *Venturia inaequalis* isolates to fungicides used in Lebanon. Arab J. Pl. Prot. 15(1): 3-9.

Apple scab, caused by *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. Is one of the major apple diseases worldwide. The disease cause severe losses in apple orchards in Lebanon in the mountaineous areas particularly so in Akkar. A total of 230 isolates of *V. inaequalis* were collected from 23 orchards and single-spore colonies were prepared. In vitro tests were conducted to evaluate the level of resistance to benzimidazoles and sterol biosynthesis inhibitors (SBI). All isolates tested except one were resistant to benomyl and thiophanate-methyl at 1µg.ml-1. The majority of isolates were not inhibited at concentrations as high as 50µg.ml^{-1} in mycelial growth. Similarly, the majority of the isolates were not inhibited by benomyl at 1, 5, and 50 µg.ml^{-1} in spore germination tests. Preliminary in vivo tests with benomyl concerning resistance to benzimidazoles correlated well with the in vitro results. All isolates were inhibited by fenarimol at 0.25 µg.ml^{-1} indicating that all isolates can be considered sensitive to this fungicide. However, the sensitivity levels varied among the various isolates with the ED_{50} for fenarimol ranging between 0.002 and 0.052 µg.ml^{-1} and for fluzilazol between 0.001 and 0.018 µg.ml^{-1}. The ED_{50} of two new SBIs, that were not yet commercialized in Lebanon at the time the test was performed ranged from 0.009 to 0.025µg.ml^{-1} for bromocunazol and from 0.008 to 0.039µg.ml^{-1} for fenbuconazol, both indicating a good level of in vitro activity. These results indicate that resistance to benzimidazoles is widespread in Lebanon while resistance to SBIs was not detected.

Key words: Apple scab, fungicide resistance, *Venturia inaequalis*.

المراجع

2. **Gilpatrick, J.D.** 1982. Method for the detection of fungicide resistance in *Venturia* spp. of apple and pear. FAO Plant Protection Bulletin 30:51-54.
3. **Gouot J.M.** 1996. Comité d'action concernant la résistance aux fongicides (FRAC): Reunion annuelle (1995) du groupe de travail << inhibiteurs de la

References

1. **Biggs, A.R.** 1990. Diseases caused by Fungi. Foliar and fruit diseases. In: Compendium of Apple and Pear Diseases. A.L. Jones and H.S. Aldwincle (eds.). The American Phytopathological Society (page 7-12). APS Press. USA. 100 pp.

biosynthèse des sterols (IBS)>>. Phytoma - La defense des vegetaux 486:15-18.

4. **Horsfall, J.G. and R.W. Baratt.** 1945. An improved grading system for measuring plant disease. Abstracted in Phytopathology 35:655.
5. **Jones, A.L. and R.J. Walken.** 1976. Tolerance of *Venturia inaequalis* to dodine and benzimidazole fungicides in Michigan. Plant Dis. Rep. 60:40-44.
6. **Köller, W., D.M. Parker and K.L. Reynolds.** 1991. Baseline sensitivities of *Venturia inaequalis* to sterol demethylation inhibitors. Plant Disease 75:726-728.
7. **Shabi, E., K. Talma, and K. Merton.** 1983. Inheritance of resistance to benomyl in isolates *of Venturia inaequalis* from Israel. Plant Pathology 32:207-211.
8. **Sholberg, P.L., J.M. Youstaon, and D. Warnock.** 1989. Resistance of Venturia inaequalis to benomyl and dodine in British Columbia, Canada. Plant Disease 73:667-669.
9. **Smiths, C.M., A.E. Trivellas, L.E.B. Johnson and M.M. Joshi.** 1991. FRAC methods for monitoring the sensitivity range of fungal pathogens to benzimidazole fungicides. Bulleting OEPP/EPPO. 21:291-354.
10. **Stanis, V.F. and A.L. Jones.** 1985. Reduced sensitivity to Sterol-inhibiting fungicides in field isolates of Venturia inaequalis. Phytopathology 75:1098-1101.
11. **Wicks, T.** 1974. Tolerance of the apple scab fungus to benzimidazole fungicides. Plant Disease Rep. 58:886-889.