

عزل وتعريف مسبب مرض تبقع ولفحة أوراق اليوكالبتوس (*Harknessia eucalypti*) في ليبيا وتأثير درجة الحرارة في نموه مخبرياً

فرحات علي ابوزخار¹، اسلام بن فوزي اليانقي^{2,3} ومحمد الحبيب بن ادريس بن جامع²

(1) قسم حماية النبات، المعهد الوطني للعلوم الفلاحية بتونس، تونس، البريد الإلكتروني: farhatabouzkhara@gmail.com

(2) مخبر التصريف في الموارد الغابية وتثمينها، المعهد الوطني للبحوث في الهندسة الريفية والمياه والغابات بتونس، جامعة قرطاج، تونس؛

(3) مخبر النوبيوتكنولوجيا وتثمين الموارد النباتية الطبية، المعهد الوطني للعلوم التطبيقية والتكنولوجيا، جامعة قرطاج، تونس.

الملخص

ابوزخار، فرحات علي، اسلام بن فوزي اليانقي ومحمد الحبيب بن ادريس بن جامع. 2020. عزل وتعريف مسبب مرض تبقع ولفحة أوراق اليوكالبتوس (*Harknessia eucalypti*) في ليبيا وتأثير درجة الحرارة في نموه مخبرياً. مجلة وقاية النبات العربية، 38(4): 296-303.

أجريت الدراسة في مشتل القرصانية لإنتاج الغابات بمنطقة سرت، ليبيا لتحديد مسبب إصابة أشجار *Eucalyptus stricklandii* بأمراض تبقع ولفحات الأوراق خلال شهر آذار/مارس 2016، حيث أوضحت نتائج تقدير نسبة إصابة الأشجار إلى انتشار المرض بنسبة 100% في جميع الأشجار المختبرة وبشدة إصابة قدرها 10% على الأوراق العليا و 30% على الأوراق السفلى المختبرة. كما أوضحت نتائج العزل المجهرية إلى تكرار وجود فطر *Harknessia eucalypti* بنسبة 80% في جميع القطع النباتية المختبرة مرافقة للفطر *Alternaria sp.* بنسبة 20%. وبينت نتائج تأثير درجات الحرارة في نمو الفطر عند حرارة 20، 25 و 30 °س بأن الفطر قد أنتج نموات بيضاء قطرها 9، 9 و 1.3 سم، على التوالي، في مدة ستة أيام، بينما توقف نمو الفطر عند حرارة 35 و 40 °س. وعند اختبار القدرة الامراضية للفطور المعزولة على أوراق النبات *E. camaldulensis*، اوضحت النتائج إمرضيه الفطر وظهور أعراض الإصابة. ويعد هذا أول تسجيل للفطر *Harknessia eucalypti* على أشجار اليوكالبتوس في ليبيا.

كلمات مفتاحية: لفة الأوراق، أمراض فطرية، *Harknessia eucalypti*، *Eucalyptus stricklandii*.

المقدمة

وللأشجار المقدرة على التكيف في الظروف البيئية التي تختلف كثيراً عن موطنها الأصلي وبخاصة في البيئات الأكثر جفافاً باختلاف نوعيات التربة (Hanks et al., 1995). بلغت المساحة الإجمالية لزراعة أشجار اليوكالبتوس في ليبيا عام 1965 حوالي 26,000 هكتار وارتفعت عام 1972 إلى 75,000 هكتار في المشاريع الزراعية التابعة للدولة وضمت الأنواع التالية: *Eucalyptus bosistoana*، *E. amplifolia*، *E. leucoxydon*، *E. occidentalis*، *E. melliodora*، *E. platypus*، *E. sideroxydon*، *E. torquata*، *E. teretioris*، *E. gomphocephala*، *E. rudis*، *E. camaldulensis* (FAO, 1979).

تعرض أشجار اليوكالبتوس في العديد من دول العالم للعديد من الأمراض النباتية حيث سجل أكثر من 400 نوعاً لأمراض تبقع ولفحات الأوراق في العالم (Crous et al., 1993). كما تسهم الأمطار وزيادة نسبة الرطوبة في زيادة شدة الإصابة (Hardiyantom & Tridasa, 2000). وينتشر فطر *Harknessia sp.* على مدى واسع مرافقاً لأوراق وأفرع عدة عوائل نباتية (Sankaran et al., 1995) وقد سجل الفطر

يعد اليوكالبتوس/الكينا *Eucalyptus spp.* من الأشجار دائمة الخضرة تنتمي للعائلة الأسيية Myrtaceae (Brooker, 2000)، ويضم هذا الجنس أكثر من 600 نوع، وتعد استراليا الموطن الأصلي له (بدر، 2003). يستخرج من هذه الأشجار زيت أثيري طيار يمكن استخدامه طبياً، كذلك تستطيع هذه الشجرة تدمير بيئات تكاثر بعوض الملاريا الرطبة والمستنقعات بتجفيفها وقد نفذت في أستراليا لهذا الغرض. كما يمكن استعمال خشبها في مجالات عديدة كتخصير العجينة الورقية وصناعة السيليلوز والخشب المعاكس والفحم وغيرها (السويدي وآخرون، 2020). أدخلت أنواع عديدة من هذه الشجرة إلى ليبيا في سنة 1900، إلا أن بعضها لم ينجح، وأفضل أنواع اليوكالبتوس التي ثبت نجاحها وتكيفها مع الظروف البيئية المحلية من مناخ وتربة هما نوعي *E. camaldulensis* و *E. gomphocephala* (الشقلاف، 2009). وبسبب سرعة نموه وملاءمته لمختلف الأجواء والتربة فقد انتشرت زراعة اليوكالبتوس في العديد من أقطار العالم (Gessesse & Teklu, 2011).

مواد البحث وطرائقه

موقع الدراسة

أجريت عمليات العزل من الأشجار التي ظهرت عليها أعراض الإصابة في مشتل القرضابية الإنتاجي التابع لوزارة الزراعة الليبية في مدينة سرت والتي تعد ضمن المناطق الجافة وشبه الجافة، حيث تمتد من دائرة العرض 30.23 إلى 31.15 شمالاً وتبلغ مساحة المشتل 70 هكتاراً، بينما أجريت الدراسة المخبرية في مختبر قسم النبات بكلية العلوم في جامعة الزنتان، ومختبر قسم النبات بكلية التربية في جامعة سرت.

تقصي انتشار مرض تبقع و لفحة الأوراق (المسح الحقلي)

تم تقصي مرض لفحة الأوراق على أشجار اليوكالبتوس *E. stricklandii* التي جلبت بذورها من أستراليا عام 2001 وزرعت مباشرة داخل المشتل حيث لوحظ ظهور أعراض الإصابة خلال شهر كانون الأول/ديسمبر 2016 وقدرت نسبة إصابة النباتات حسب طريقة (Sharma & Mohanan, 2007).

العزل والتشخيص

جلبت العينات التي ظهرت عليها أعراض الإصابة من أعلى وأسفل الأشجار من الجهة الشمالية والشرقية للأشجار وذلك بواقع ثلاثة أعصان من كل اتجاه بمعدل عشرة أشجار عشوائياً، ونقلت إلى مختبر الأحياء، كلية التربية، جامعة سرت، وجرى العزل حسب ما نشر سابقاً (حسون، 2009؛ الاسدي والسعدون، 2011) على المستتبت الغذائي أجاروز دكستروز البطاطا (PDA). شخّصت الفطور النامية على سطح شريحة زجاجية مضافاً إليها قطرة من صبغة أزرق اللاكتوفينول وبوساطة المجهر الضوئي وتم الاستعانة بعدة مراجع (البونوي، 1990؛ Barnett and Hunter, 1972؛ Crous et al., 1989a, 2019) لتعريف الأجناس الفطرية، واستخدم في الدراسة الشريحة الميكرومترية لقياس أبعاد الأبواغ وأطوال الزوائد ثم نقل الفطر الأكثر تكراراً إلى بيئة غذائية نقية (PDA) لزيادة دراسة صفات الكائن الممرض كما حسبت نسبة تردد الأجناس الفطرية وفقاً لمعادلة (Akhtar et al., 2007) كما يلي:

$$\text{نسبة تردد الجنس} = \frac{\text{عدد مستعمرات الجنس}}{\text{عدد المستعمرات الكلي}} \times 100$$

وقدرت نسبة إصابة النباتات (Sharma & Mohanan, 2007) كما يلي:

$$\text{النسبة المئوية للمصابين} = \frac{nd}{N} \times 100$$

حيث nd = عدد الأشجار المصابة، N = العدد الكلي للأشجار المختبرة.

Harknessia victoria المسبب لمرض لفحة الأوراق على أشجار النوع *E. pulverulenta* في أستراليا (Barber et al., 2003). كما سجل فطر *Harknessia hawaiiensis* على النوعين *E. grandis* و *E. robusta*، والفطر *H. eucalypti* على النوع *E. pilulans*، وفطر *H. fumaginea* على الأنواع *E. nitens*، *E. grandis*، *E. globulus*، والفطر *H. insueta* على الأنواع *E. odoraatus*، *E. globulus*، والفطر *E. viminalis*، *E. scarbo*، وفطر *H. globosa* على نوع *E. grandis* داخل مشاتل إنتاج الغابات وعلى النباتات الصغيرة في العديد من دول العالم، والفطر *Harknessia molokainesis* في جنوب أفريقيا (Crous et al., 1989b؛ Crous & Rogers, 2001).

ووجد الفطر *Harknessia fumaginea*، *H. hawaiiensis* مرافقاً لبذور *E. pellita* في أستراليا وسبب مرض لفحة الأوراق على البادرات الصغيرة (Ciesla et al., 2010). وتسهم مسببات الأمراض النباتية بدورٍ مهماً في تشكيل النظم البيئية الطبيعية ومع انتشار أشجار الغابات عالمياً انتقلت معها مسببات الأمراض المرتبطة بها وبالتالي فهي تعاني بشكل متزايد من تأثيراتها وقد تكون غير مهمة في موطنها الأصلي (Treena & Michael, 2016). كما بينت دراسات أخرى (Crous et al., 2012b) إصابة أنواع من اليوكالبتوس بمرض تبقع الأوراق سببها أنواع مختلفة من الفطر منها *Harknessia fusiformis*، *H. globispora*، *H. rhabdosphaera*، *H. hawaiiensis* و *H. eucalyptorum* وتسبب أنواعه أمراض تبقع الأوراق على أشجار اليوكالبتوس أو تظهر على شكل مترمات داخلية وخارجية على أوراق وأعصان العديد من العوائل التابعة لكاسيات البذور angiosperma (Crous et al., 2012c). وينتمي الفطر إلى عائلة Harknessiaceae التابعة للفطور الاسكية، رتبة Diaporthales، ويتميز الطور الجنسي للفطر بتكوين Pycnidial بنية اللون وأبواغ اسكية بنية اللون تحمل زوائد شفافة لها قاعدة متطاولة سريعة الانفصال عند نهاية قمته (Crous et al., 2012a). تظهر المسببات المرضية على مستوى الجنس أو النوع أو العزلة اختلافات في صفاتها المورفولوجية والحيوية والمناعية بالإضافة إلى قدرتها الإمراضية ومقاومتها للظروف البيئية الضارة تحت تأثير اختلاف الوسط المغذي ودرجات الحرارة والرطوبة والضوء وتركيز أيون الهيدروجين (الجالبي، 2010؛ Amrita & Richa, 2014؛ Zape et al., 2013). كما تُعد الحرارة والرطوبة النسبية من أهم العوامل المؤثرة في نمو الفطور وانبات أبواغها والتي تعتبر ضرورية للتكاثر النوعي وللتطفل على العائل (Verhoeff, 1980).

هدفت هذه الدراسة إلى عزل المسبب المرضي لمرض تبقع ولفحة أوراق أشجار اليوكالبتوس الذي يصيب النوع *Eucalyptus stricklandii* ودراسة تأثير درجات الحرارة في نمو الفطر مخبرياً.

و 15 غ آجار من انتاج شركة T-Baker Lab Chemicals, INDIA و 20 غ سكرور و 1000 مل ماء مقطر. تم تعقيم المستبتين الغذائيين أولاً في جهاز التعقيم عند حرارة 121 °س وضغط جوي 1.5 ولمدة 20 دقيقة وترك للتبريد الهوائي حتى درجة 40 °س وأضيف إليهما 500 مغ من المضاد الحيوي Amoxicillin لمنع نمو البكتيريا، ثم سكبت في أطباق بتري معقمة قطرها 9 سم، ولقح مركز كل طبق بقرص قطره 0.5 سم من مستعمرة الفطر بعمر خمسة أيام مأخوذة من طرف المستعمرة. غلفت الأطباق بشريط من البارافيلم وحضنت في الحاضنة عند درجات حرارية مختلفة (20، 25، 30، 35 و 40 °س) ولمدة ستة أيام وبخمس مكررات. وبعد انتهاء فترة التحضين تم قياس النمو الفطري (سم) باستخدام مسطرة بلاستيكية مرقمة في اتجاهين متعامدين وفي جميع الأطباق وحساب متوسط النمو العام (الاسدي والسعدون، 2011). كما حسبت نسبة نمو الفطر وفقاً للمعادلة التالية (Ababutain, 2013):

$$\text{نسبة النمو} = \frac{\text{متوسط قطر مزرعة الفطر}}{\text{قطر الطبق المستخدم}} \times 100$$

النتائج والمناقشة

عزل الفطر المسبب لمرض تبقع الأوراق على اليوكالبتوس

بينت نتائج العزل وجود فطر *Harknessia eucalypti* في جميع القطع المختبرة وذلك اعتماداً على الخصائص المورفولوجية للفطر وبنسبة تردد وصلت إلى 80%. بعد أسبوع من عملية العزل وجد فطر مرافقاً له وهو *Alternaria sp.* بنسبة 20%، وسرعان ما غطى هذا الفطر جميع القطع. ويعد هذا أول تسجيل للفطر *Harknessia eucalypti* على أشجار اليوكالبتوس في ليبيا.

تقدير شدة الإصابة ونسبة الإصابة بمرض تبقع الأوراق

سجلت نتائج الكشف بإصابة الأوراق الكبيرة في السن المختبرة بشدة إصابة قدرها 10% على الأوراق العلوية وما نسبته 30% على الأوراق السفلية. بينما سجلت نسبة إصابة الأشجار المختبرة بنسبة 100%. ويعزى ارتفاع نسبة الإصابة إلى قرب المشتل من البحر وبالتالي زيادة نسبة الرطوبة الجوية مما يؤثر في كمية الأبواغ المحمولة في الهواء وفقاً لما نشر سابقاً (Sellal et al., 2017) بأن ارتفاع الإصابة في المناطق المنخفضة وانخفاضها في المناطق المرتفعة يعود إلى كمية اللقاح الفطري الذي يقل كلما زاد الارتفاع ويزيد كثافة كلما اقترب من مستوى سطح البحر. كما تسهم العوامل البيئية مثل درجات الحرارة ونسبة الرطوبة بدور مهم في تغريق أبواغ الفطر في الهواء لمسافات قصيرة أو طويلة وتؤثر في إنباتها (Bennett, 2010؛ Goncalves et al., 2010).

وقدرت شدة إصابة الأوراق حسب الدليل المرضي الآتي: 0 = الأوراق سليمة ولا توجد إصابة، 1 = الإصابة أثلتت 1-25% من أنسجة الأوراق، 2 = الإصابة أثلتت 26-50% من أنسجة الأوراق، 3 = الإصابة أثلتت 51-75% من أنسجة الأوراق، 4 = الإصابة أثلتت 76-100% من أنسجة الأوراق. وحسبت شدة الإصابة (Disease Severity) وفقاً للمعادلة التالية (Townsend & Heuberger, 1943).

$$\text{النسبة المئوية لشدة الإصابة} = \frac{\text{عدد أوراق النباتات في الدرجة } 0 \times 0 + \dots + \text{عدد أوراق النباتات في الدرجة } 4 \times 4}{\text{مجموع أوراق النباتات المصابة} \times \text{أعلى دليل مرضي}} \times 100$$

اختبار القدرة الإراضية للفطر *Harknessia eucalypti* مخبرياً

حضرت مزارع نقية للفطر المعزول على المستبت الغذائي PDA وبعمر أسبوع بالإضافة لثمانية أوراق سليمة لم تظهر عليها أعراض الإصابة من أشجار اليوكالبتوس *E. camaldulensis* عمرها عشرة سنوات بتاريخ 2016/2/28 بعد غسلها جيداً بالماء لإزالة الأتربة والغبار عليها، ومن ثم جففت بورق الترشيح ثم طهرت سطحياً بالكحول الإيثيلي تركيز 70% لمدة ثلاثة دقائق ومن ثم إعادة غسلها بالماء المعقم لإزالة آثار الكحول وتجفيفها بورق الترشيح المعقم. عمل خدش سطحي على سطح الأوراق، وأوراق أخرى لم تخدش للمقارنة. لوثت أسطح الأوراق بوضع قرصين بقطر 5 مم من طرف المستعمرة الفطرية PDA نامي عليها الفطر عمره أسبوع أخذت بوساطة ثاقب من الفلين المعقم (Cork borer) للورقة الواحدة. ولضمان الإصابة غطيت القطع بقطعة قطنية مبللة بالماء المعقم لتوفير الرطوبة وتم لفها بورق السيلوفان اللاصق الشفاف وذلك لمنع التبخر لكلا المعاملتين. أما معاملة الشاهد فقد لوثت بقرص بالفطر نفسه من المستبت الغذائي فقط مع تغطيتها بالقطن المبلل والملفوفة بورق السيلوفان، ومن ثم وضعت الأوراق داخل أطباق بتري قطرها 12 سم تحتوي على ورقة ترشيح مبللة بالماء وتركت لمدة أربعة أيام عند حرارة الغرفة (20-25 °س) ثم أزيلت أوراق السيلوفان اللاصق وتركت الأوراق داخل الأطباق وتم ملاحظة تطور البقع كل يومين للتأكد من حدوث الإصابة وذلك حسب ما نشر سابقاً (شاكور، 2008؛ El-Meleigi et al., 1986) مع بعض التعديلات بما تلائم ظروف التجربة.

دراسة تأثير درجات الحرارة المختلفة في النمو الشعاعي للفطر *Harknessia eucalypti* على المستبتات الغذائية

للحرارة تأثير كبير في نمو وتكاثر الفطور حيث تؤثر مباشرة في التفاعلات الإنزيمية لعمليات الأيض (البوني، 1990). جهز المستبت الغذائي PDA ووسط آجار مستخلص الشعير (Malt extract agar) والذي يتكون من 30 غ خلاصة بذور الشعير المحلي صنف صفيت

أعراض الإصابة

مستعمرات لونها ابيض كريمي في غضون أسبوعين وبشكل كثيف وميسليوم هوائي له رائحة حلوة تشبه الفاكهة على المستنبت الغذائي PDA. حيث كان معدل نمو الميسليوم الفطري سريعاً إلا انه بطيء التبوغ على سطح المستنبت الغذائي PDA ونما بصورة متساوية في جميع الاتجاهات ومن النقطة المركزية على شكل دوائر بسبب الإنتحاء السلبي للخيوط الفطرية التي تمتاز بها الفطور ويكونها سالبة الإنتحاء الكيماوي. وزاد نمو الفطر كلما ابتعد عن التركيز العالي للمواد المتركمة، وكون الفطر أجسام ثمرية مغمورة كروية الشكل (شكل D-2) كتلة من الأبواغ الأسكية لونها بني يميل إلى اللون الأسود لها جدر ناعمة (شكل B-2)، منتخخة الجوانب (ventricose) تحمل زوائد شفافة طويلة عند قممها، حدث لها إنبات وكونت هيفات مقسمة متفرعة (شكل C-2) وباستخدام الشريحة الميكرومترية (Ocular micrometer) تراوحت أطوالها في حدود 4-10-20 × 2.5-4 ميكرومتر، بينما قدرت أبعاد الأبواغ في حدود 18-20-22 × 12-13-15 ميكرومتر بمتوسط قدره 12×19 ميكرومتر وهذا يتفق مع ما ذكره Lee et al. (2004) عند وصفه لفطر *Harknessia eucalypti*. وفي بحث آخر (Crous et al., 1989a) عند دراسة الفطور المسببة لتبقع ولفحة أوراق اليوكالبتوس للنوعين *E. nitens* و *E. globulus* والمتسبب عن الفطر *H. eucalypti* حيث سجل حجم أبواغ الفطر 16-22 × 8-14 ميكرومتر بمتوسط قدره 12×19 ميكرومتر، ومتوسط أطوال الزوائد 8.5 ميكرومتر واقترح بأنها للنوع *H. eucalypti*. ومع الدراسة التي قام بها Crous et al. (1993) أشاروا إلى وجود فطر *H. eucalypti* على أشجار اليوكالبتوس في جنوب أفريقيا وكان متوسط حجم أبواغه 12×22 ميكرومتر وأكدوا بأنها متشابهة ومماثلة للفطر *H. eucalypti*، إلا أن أحجام الأبواغ وأطوال الزوائد للفطر *Harknessia sp.* وبخاصة عند الفطر *H. eucalyptorum* قد تباينت بين الأنواع المختلفة لأشجار اليوكالبتوس المصابة (Crous et al., 1993). وتم حتى الان وصف أكثر من 40 نوعاً من *Harknessia sp.* عزلت من أوراق وسوق أشجار كاسيات البذور التي تميزت باختلاف أشكالها ومميزاتها وتشابهت أبواغها بأنها بنية اللون تحتوي قاعدتها على زوائد طولية (Crous et al., 2012c). ويجري دراسة الفطر بواسطة اختبار التفاعل المتسلسل للبوليمراز (PCR) بإحدى المراكز المتخصصة في تونس.

اختبار القدرة الامراضية لفطر *Harknessia eucalypti* مختبرياً

القابلية للإصابة - ظهرت أعراض العدوى الصناعية على الأوراق مشابهة لتلك التي شوهدت على الأشجار المصابة على هيئة بقع على الأوراق في معاملة التلوين بعد ثمانية أيام من العدوى على شكل نموات بيضاء اللون على السطح العلوي للأوراق التي تم خدشها وحققها بالفطر (شكل B-3 و C)، وعدم ظهور الفطر على الأوراق في معاملة المقارنة

ظهرت أعراض الإصابة حقلياً على الأوراق الكبيرة في السن على شكل بقع بنية غير منتظمة الشكل على السطح العلوي للأوراق تراوحت أبعادها في حدود 3.52-6.8 مم، ثم زادت اتساعاً وتحولت إلى لفحات مع اصفرار للأوراق وتحول أنسجة الأوراق إلى اللون البني، وفي نهاية الإصابة تساقطت الأوراق على سطح التربة (شكل 1)، وهذا يتفق مع أعراض الإصابة وموت أنسجة الأوراق التي وجدها Crous et al. (1993) في إصابة أنواع اليوكالبتوس *E. nitens*، *E. globulus*، *E. maidentii* بفطر *Harknessia eucalypti* في كثير من دول العالم. ويتفق أيضاً مع دراسات أخرى (Crous et al., 1989b؛ Wingfield et al., 1995) بإصابة أشجار اليوكالبتوس بفطر *H. globosa* في تشيلي وجنوب أفريقيا التي أشارت بأن الفطر سبب أعراض مميزة على شكل موت أنسجة لونها بني فاتح على سطح الأوراق لأنواع الأشجار *E. nitens*، *E. maidentii*، *E. globulus* وأن الفطر يخترق أوراق النباتات عبر الصفيحة الوسطى للخلاية النباتية.



شكل 1. أعراض مرض تبقع ولفحة أوراق *Harknessia eucalypti* على أوراق نباتات اليوكالبتوس *Eucalyptus stricklandii* في ليبيا. **Figure 1.** Leaf spots and blight disease symptoms associated with *Harknessia eucalypti* on *Eucalyptus stricklandii* in Libya.

وصف الفطر الممرض

هيفات الفطر مقسمة ومتفرعة ولونها بني باهت ونمو الميسليوم داخلي. تميزت المستعمرة الفطرية على سطح مستنبت PDA بلون أبيض شفاف رقيق (شكل A-2). ينمو الفطر بسرعة حيث وصل قطر المستعمرة بعد أسبوع من التلقيح إلى 9 سم، وأصبح ناعماً ومخاطي/غروي (Slimy) ثم تغير لونه من اللون الأبيض الكريمي إلى اللون الأخضر الزيتوني بعد تقدمه في العمر وأصبحت له رائحة مميزة بعد 16 يوماً. وهذا يتفق مع ما وجدته Crous et al. (1993) عند وصفه لفطر *Harknessia sp.* وكذلك أشار Crous et al. (2007) بأن الفطر *H. gibbosa* كون

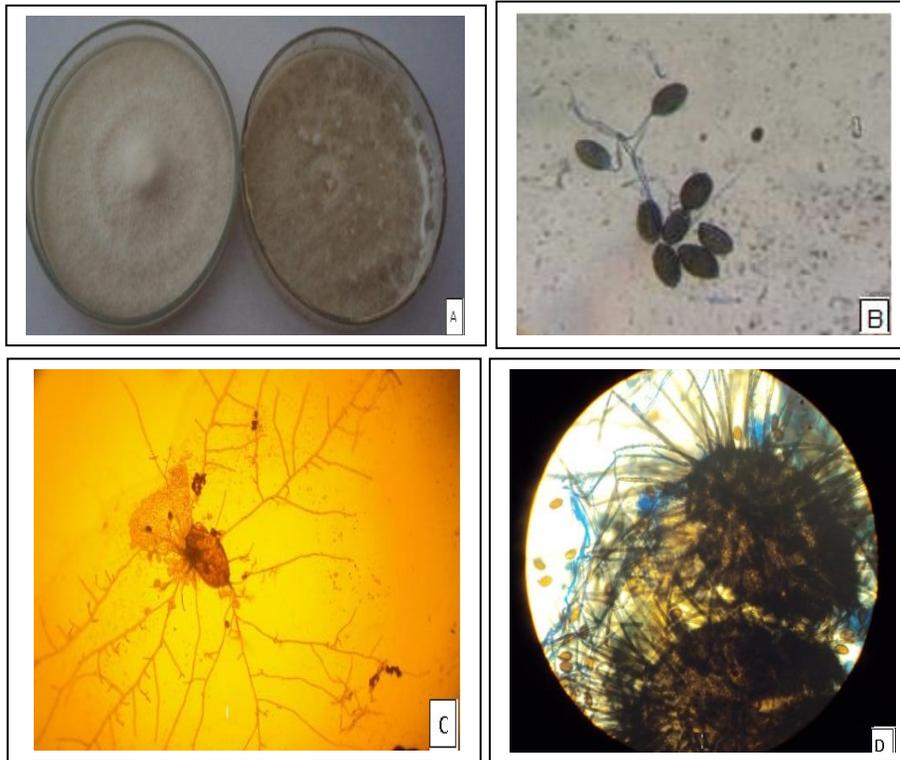
في تفريق وانتشار أبواغ الفطر في الهواء لمسافات قصيرة أو طويلة. عندما تسقط هذه الأبواغ على سطح صلب أو سائل بشرط توافر الغذاء والرطوبة اللازمين فإنها تنمو أو تثبت على الفور. كما تؤثر درجات الحرارة في نمو الفطور وإنتاج التراكيب التكاثرية وزيادة كمية اللقاح التي ينتجها (Ayyasamy & Baskaran, 2005؛ El-Gali, 2017). إن سبب زيادة النمو الفطري في المدى الحراري 20-35 °س ترجع إلى فعاليته الحيوية في النمو والتي تصل إلى قمة نشاطها عند الدرجة الحرارية المثلى ومن ثم يسهل لها استغلال المصادر الغذائية في الوسط الغذائي وبناء الجزيئات الكبيرة في بناء كتلة الفطر، وهذا يتفق مع ما نشر سابقاً (الاسدي والسعدون، 2011) بأن الفطر قد نما بمعدل 9 سم عند حرارة 25 °س، وإن حرارة 30 °س قد سببت ضعفاً في نمو الفطر على المستنبت الغذائي PDA حيث بلغ متوسط قطر نموه 1.3 سم بينما توقف نمو الفطر عند درجات الحرارة 35-40 °س، بينما لم ينمو الفطر في المستنبت الغذائي MEA عند درجات الحرارة المختبرة، وربما يرجع إلى تأثير الفطر بالرقم الهيدروجيني لمستخلص الشعير المحلي صنف صفيت مما أثر ذلك في الحالة الأيونية لمكونات الوسط وعدم جاهزية الأحماض الأمينية والمغذيات الأخرى في الوسط لاستغلالها من قبل الفطر (Danew & Klossek, 1989).

(شكل 3-A). كون الفطر أجسام بيضاء كروية عديدة بارزة على سطح الأوراق بعد 33 يوماً من العدوى وهي عبارة عن أجسام ثمرية للفطر (شكل 3-F) ويمكن اعتبار الأجسام الثمرية الأسكية التي أنتجها الفطر تراكيب يحافظ بها على حيويته تحت الظروف السيئة للبيئة الجافة كما نتجت من هذه الأجسام لقاحاً إضافياً من الأبواغ الأسكية (أحمد، 1998). وعزل المسبب المرضي من المعاملات الملوثة مرة ثانية وشخص الفطر على أنه *Harknessia eucalypti* نفسه الذي تم التلوين به، كما ظهرت نقط سوداء كروية الشكل عند مركز النموات الفطرية وهي عبارة عن الأجسام الثمرية بعد 15 يوماً من العدوى.

دراسة تأثير درجات الحرارة المختلفة في النمو الشعاعي للفطر

Harknessia eucalypti

أشارت النتائج (جدول 1) أن نمو الفطر قد تغير بتغيرات درجات الحرارة المختلفة حيث أنتج نموات بيضاء عند حرارة 20، 25 و 30 °س وبمعدلات نمو قدرها 9، 9، 1.3 سم، على التوالي، في مدة ستة أيام على المستنبت الغذائي PDA وكانت درجات الحرارة المثلى لنمو الفطر 20 و 25 °س على المستنبت الغذائي، حيث ذكرت دراسة سابقة (Bennett, 2010) أن العوامل البيئية كدرجات الحرارة تسهم بدورٍ مهم



شكل 2. الصفات المظهرية لفطر *Harknessia eucalypti*. (A) نمو الفطر على المستنبت الغذائي PDA، (B) الأبواغ الاسكية للفطر، (C) إنبات الأبواغ الاسكية للفطر (لاحظ هيفات الفطر)، (D) الأجسام الثمرية للفطر.

Figure 2. Morphological characteristics of *Harknessia eucalypti*. (A) growth of the fungus on PDA, (B) mature spores, (C) germinated ascospores (notice the mycelial growth), (D) globose pycnidial body of the fungus .

Harknessia sp. على الوسط الغذائي المحضر صناعياً MEA في جنوب أفريقيا عند درجة حرارة 25 °س إلى نمو الفطر وتكوينه نموات بيضاء باهتة مصفرة ثم تحولت إلى اللون الأخضر الزيتوني وأن جراثيم الفطر قد تشابهت في الشكل وفي تكوين الزوائد الطويلة. وأشارت النتائج أن النمو الخيطي الفطري تغير بتغير درجات الحرارة المختلفة وسجلت البيانات المدونة في جدول 1، أن النمو كان بطيئاً عند درجة الحرارة 30 °س وازداد عند درجات الحرارة المثلى (20-25 °س) وبنسبة نمو قدرها 100%. واتفقت هذه الدراسة مع دراسة أخرى (محمد وآخرون، 2018) بأن أفضل درجة حرارة لنمو فطر *Fusarium oxysporum* كانت 25 °س، وقد عزى عدم نمو الفطر عند درجات الحرارة العالية إلى تأثيرها على الانزيمات المسؤولة عن النمو والفعاليات الحيوية الأخرى وفقدان الغشاء الخلوي لوظيفته الحيوية أو تحطيم المكونات السيتوبلازمية وتحلل الخلايا (de Marañón et al., 1999).

جدول 1. تأثير درجة الحرارة في النمو القطري ونسبة النمو الخضري للفطر على المستنبت الغذائي PDA.

Table 1. Effect of temperature on growth diameter and mycelial growth rate on the PDA growth media.

الحرارة (°س) Temperature °C	قطر النمو (سم) Growth diameter (cm)	نسبة النمو % Growth rate (%)
20	9.0	100
25	9.0	100
30	1.3	16.7
35	0.0	0.0
40	0.0	0.0



شكل 3. اثبات القدرة الإراضية للفطر *Harknessia eucalypti*. (A) معاملة الشاهد، (B, C, D, E, F) تطور أعراض الإصابة وانتاج الفطر للأجسام التمرية على سطح الأوراق.

Figure 3. Pathogenicity test of *Harknessia. Eucalypti*. (A) control treatment, (B, C, D, E, F) development of infection symptoms and production of pycnidia on the upper leaf surface.

وأوضحت العديد من الدراسات (العتيبي، 2008) بأن نمو بعض الفطور يقف عند الحموضة والقلوية المرتفعة بسبب تأثيرها في النشاط الإنزيمي وفي عمليات الأيض. وهذا يتعارض مع الدراسة التي قام بها Crous & Rogers (2001) عند دراستهما لتأثير نمو الفطر

Abstract

Abouzkar, F.A., I. Yangui and M.H. Ben Jamâa. 2020. Isolation and identification of the pathogen causing blight and spots on *Eucalyptus* spp. and the effect of temperature on the fungal pathogen in vitro growth. Arab Journal of Plant Protection, 38(4): 296-303.

The study was conducted at Al-Qardabiya nursery for forest production in the Sirte region in Libya to determine the causal agents of *Eucalyptus stricklandii* trees infected with leaf blight and leaf spot diseases during March 2016, where the disease incidence reached 100% in all trees. Diseases severity observed was 10% on the upper and 30% on the lower leaves of the tested trees. Results of the microscopic isolation showed that *Harknessia eucalypti* pathogenic fungus was present in 80% of all the tested plant pieces, and was associated with *Alternaria* sp. in 20% of the tested samples. The results of the effect of temperature on the pathogen growth at three temperatures (20, 25, 30 °C) where the fungus has produced a white mycelium with diameter growth of 9, 9 and 1.3 cm, respectively, in a six days period, and the fungal growth stopped completely at 35-40°C. The fungus pathogenicity was reproduced on the leaves of *E. camaldulesis*. This is the first report on the occurrence of *Harknessia eucalypti* pathogenic fungus in Libya.

Keywords: Fungal diseases, leaf blight, *Eucalyptus stricklandii*, *Harknessia eucalypti*.

Corresponding author: Farhat Ali Abouzkar, Plant Protection Department, INRAT, Tunis, Email: farhatabouzkar@gmail.com

References

الاسدي، رامت مهدي صالح وعبد الله حمود السعدون. 2011. دراسة للفطر *Alternaria alternata* كمسبب لمرض خياص ضلع نخيل التمر. مجلة البصرة لأبحاث نخلة التمر (العراق)، 10: 1-9.

احمد، محمد علي. 1998. عالم الفطريات. الدار العربية للنشر والتوزيع، القاهرة. 280 صفحة.

- Brooker, M.I.H.** 2000. A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Hér. (Myrataceae). Australian Systematic Botany, 13: 79-148. <https://doi.org/10.1071/SB98008>
- Ciesla, W.M., M. Diekmann and C.A.J. Putter.** 2010. *Eucalyptus* spp. FAO/IPGRI Technical Guidelines for the safe movement of Germplasm, 17: 49.
- Crous, P.W. and J.D. Rogers.** 2001. *Wuestneia molokaiensis* and its *Harkensia anamorp* sp. nov. from *Eucalyptus*. Sydowia, 53: 74-80.
- Crous, P.W., P.S. Knox-Davies and M.J. Wingfield.** 1989a. A summary of Fungal Leaf Pathogens of *Eucalyptus* and the Diseases they Cause in South Africa. South African Forestry Journal, 149: 9-16. <https://doi.org/10.1080/00382167.1989.9628987>
- Crous, P.W., P.S. Knox-Davies and M.J. Wingfield.** 1989b. Newly-recorded foliage pathogens of *Eucalyptus* spp. in South Africa. Phytophylactica, 21: 85-88.
- Crous, P.W., M.J. Wingfield and T.R.N. Raj.** 1993. *Harknesia* species occurring in south Africa. Mycologia, 85: 103-118.
- Crous, P.W., C. Mohammed, M. Glen, G.J.M. Verkley and J.Z. Groenewald.** 2007. *Eucalyptus* micro fungi known from culture. 3. *Eucasphaeria* and *Symptoventuria* genera nova and new species of *Furcaspora*, *Harknessia* *Heteroconium* and *Phacidiella*. Fungal Diversity, 25: 19-36.
- Crous, P.W., B.A. Summerella, A.C. Alfenas, J. Edwards and I.G. Pascoe.** 2012a. Genera of *Diaporthalean coelomycetes* associated with leaf spots of tree hosts. Persoonia. Molecular Phylogeny and Evolution, 28: 66-75. www.ingtacooect.com/nhn/pimj
- Crous, P.W., R. G. Shivas and M.J. Wingfield.** 2012b. Fungal Plant Description Sheets, 128-123.
- Crous, P.W., B.A. Summerell, R.G. Shivas, A.J. Carnegie and J.Z. Groenewald.** 2012c. A re-appraisal of Harknessia (Diaporthales) and the introduction of Harknessiaceae fam. Nov. Persoonia, 28: 49-65. www.ingentconnect.com/content/nhn/pimj.
- Crous, P.W., M.H. Wingfield, R. Cheewangkoon, A.J. Carnegie, T.I. Burgess, B.A. Summerell, J. Edwards, P.W.J. Tylor and J.Z. Groenewald.** 2019. Foliar pathogens of *Eucalyptus*. Studies in Mycology, 94: 125-298.
- Danew, J.R. and P. Klossek.** 1989. The dependence of the physiological properties of *Trichophyton mentagrophytes* on the pH value of the culture medium. Mycoses, 32: 302-303.
- de Marañón, I.M., N. Chaudanson, N. Joly and P. Gervais.** 1999. Slow heat rate increase yeast thermotolerance by maintaining plasma membrane integrity. Biotechnology and Bioengineering, 65: 176-181.
- El-Gali, Z.Y.** 2017. Effect of some ecological factors on growth of *Pestalotiopsis* spp. isolated from mastic shrubs leaves. Journal of Advanced Botany and Zoology, 5: 1-5.
- El-Meleigi, M.A., A.A. Al-Rokibah and G.H. Ibrahim.** 1986. Study of fungi leaf spots of date palm in Al-Qassim region, Saudi Arabia. Pages 401-410. In: **بدر، مصطفى الدسوقي.** 2003. موسوعة الأشجار والبيئة. منشأة المعارف الإسكندرية، مصر. 846 صفحة.
- البوني، عبد العزيز محمد.** 1990. أساسيات الفطريات العملية، الطبعة الأولى، منشورات جامعة طرابلس، ليبيا. 256 صفحة.
- الجالبي، زهرة إبراهيم.** 2010. دراسة الخصائص المزرعية والمورفولوجية والفسولوجية لبعض عزلات الفطر *Sclerotinia sclerotiorum*. المجلة الليبية لوقاية النبات، 1: 72-59.
- حسون، إبراهيم خليل.** 2009. مكافحة المتكاملة لمرض تقرح ساق البطاطا المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani* تحت الظروف الحقلية. مجلة جامعة بابل للعلوم الصرفة والتطبيقية، 17: 120-130.
- السويدي، طه موسى محمد، زينب عليوي محمد التميمي، عدنان عبدالجليل لهوف وعلا طالب العامري.** 2020. تأثير بعض العوامل البيئية في الأداء الحياتي لدبور التورم *Ophelimus maskelli* (Ashmead) على أوراق اليوكالبتوس *Eucalyptus camaldulensis* حقلياً في كربلاء، العراق. مجلة وقاية النبات العربية، 38: 9-1. <https://doi.org/10.22268/AJPP-38.1.001009>
- شاكر، كوثر عبد الوهاب.** 2008. تعفن ساق وتبقع أوراق اليوكالبتوس ومكافحته. مجلة الأنبار للعلوم الزراعية، 6: 310-315.
- الشقلاف، عبد الحميد عمران عبد الله.** 2009. تأثير أشجار الكافور *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh على خواص التربة في غابة النصر، طرابلس، ليبيا. رسالة ماجستير، كلية الموارد الطبيعية وعلوم البيئة، جامعة عمر المختار، البيضاء، ليبيا. 80 صفحة.
- العتيبي، فاطمة عليان.** 2008. مذكرة مادة فسيولوجيا الفطريات العملية. كلية العلوم، جامعة الملك سعود، المملكة العربية السعودية.
- محمد، نورة علي، غزالة إبراهيم فضيل ونجوى صالح.** 2018. تأثير بعض المتغيرات الفسيولوجية على نمو الفطر *Fusarium oxysporum*. المجلة الليبية لوقاية النبات، 8: 46-56.
- Ababutain, I.M.** 2013. Effect of some ecological factors on the growth of *Aspergillus niger* and *Cladosporium sphaerosporum*. American Journal of Applied Science, 10: 159-163.
- Akhtar, N., J.H. Mirza, Bajwar and A. Javaid.** 2007. Fungi associated with seeds of some economically important plants. Myopathy, 5: 35-40.
- Amrita, S. and S. Richa.** 2014. Biocontrol and environmental studies on paper degrading mycoflora isolated from Sanganer area, Jaipur, India. International Journal of Current Microbiology and Applied Science, 3: 948-956.
- Ayyasamy, R. and P. Baskaran.** 2005. Effect of temperature and relative humidity on radial growth and sporulation of *Paecilomyces frainnosus*. Journal of Food, Agriculture and Environment, 3: 137-138.
- Barber, P.A., I.W. Smith and P.J. Keane.** 2003. Foliar disease of *Eucalyptus* spp. grown for ornamental cut foliage. Australasian Plant Pathology, 32: 109-111.
- Barnett, H.L. and B.B. Hunter.** 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Publishing Company, Minnesota, USA. 214 pp.
- Bennett, J.W.** 2010. An Overview of the Genus *Aspergillus*. Pages 238-255. In: *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. M. Machida and K. Gomi (eds.). Horizon Scientific Press, Wymondham, Norfolk, UK.

- Sankaran, K.V., B.S. Sutton and D.W. Minter.** 1995. A checklist of fungi recorded on Eucalyptus. Mycological Papers No. 170. 376 pp.
- Sellal, Z., J. Dahmani, R. Benkirane, A.O. Touhami and A. Douira.** 2017. Pathogenic capacity of *Botrytis cinerea* on leaves of *Pyrus mamorensis*, an endemic tree of Mamora forest in Morocco. Atlas Journal of Biology, 2:125-129.
- Sharma, J.K and C. Mohanan.** 2007. Effect of some nursery practices on incidence and severity of diseases and growth of *Eucalyptus grandis* seedlinge. Forest Pathology, 22: 125-135.
- Townsend, G.R. and J.W. Heuberger.** 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. Plant Disease Reporter, 27:3 40-343.
- Treena, T.B and J.W. Michael.** 2016. Pathogens on the Move: A 100-year global experiment with planted Eucalyptus. Bioscience, 67 (Abstract).
- Verhoeff, K.** 1980. The infection process and host-pathogen interactions. Pages 153-180. In: The Biology of Botrytis. R. Colysmith, K. Verhoeff and W.R. Jarvis (eds.). Academic Press, London.
- Wingfield, M.J., P.W. Crous and H.L. Peredo.** 1995. A preliminary annotated list of foliar pathogens of *Eucalyptus* spp. in Chile. South African Forestry Journal, 173: 53-57. <https://doi.org/10.1080/00382167.1995.9629692>
- Zape, A.S., R.M. Gade and R. Singh.** 2013. Physiological studies on different media, pH and temperature on *Sclerotium rolfsii* isolates of soybean. Scholarly Journal of Agricultural Science, 2: 238-241.
- Proceedings of the Second Symposium on Date palm, Alahssa, Saudi Arabia.
- FAO.** 1979. *Eucalyptus* for planting. FAO Forest 737 Series No. II. Roma, Italy. 94 pp.
- Gessesse, D. and E. Teklu.** 2011. Eucalyptus in East Africa, socio-economic and environmental Issues. Forestry Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy. 7 pp.
- Goncalves, F.L.T., H. Bauer, M.R.A. Cardoso, S. Pukinskas, D. Matos, M. Melhem and H. Puxbaum.** 2010. Indoor and outdoor atmospheric fungal spores in the São Paulo metropolitan area (Brazil): species and numeric concentrations. International Journal of Biometeorology, 54: 347-355.
- Hanks, L.M., T.D. Pains, J.G. Millar and J.L. Hom.** 1995. Variation among *Eucalyptus* species in resistance to *Eucalyptus* long horned borer in southern California. Entomologia Experimentalis et Applicata, 74: 185-194.
- Hardiyantom, E.B and A.M. Tridasa.** 2000. Early performance of *Eucalyptus urophyllaxe grandis* hybrid on several axe sites in Indonesia. Pages 9-14. In: Proceedings of a Symposium on "Hybrid Breeding and Genetics of Forest Trees.
- Lee, S., J.Z. Groenewald and P.W. Crous.** 2004. Phylogenetic reassessment of the coelomycete genus *Harknessia* and its teleomorph *Wuestneia* (*Diaporthales*), and the introduction of *Apharknessia* gen. nov. Studies in Mycology, 50: 235-252.

Received: May 26, 2020; Accepted: December 6, 2020

تاريخ الاستلام: 2020/5/26؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2020/12/6