

توصيف عزلتين محليتين من الفطر المسبب لذبول الزيتون الوعائي *Verticillium dahliae* ورد فعل صنف الزيتون خضيري إزاء الإصابة به

خيّام علي محرز* وباسمة أحمد برهوم

مركز بحوث اللاذقية، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، اللاذقية، سورية.

* البريد الإلكتروني للباحث المراسل: muhrezk@yahoo.com

الملخص

محرز، خيّم علي وباسمة أحمد برهوم. 2024. توصيف عزلتين محليتين من الفطر المسبب لذبول الزيتون الوعائي *Verticillium dahliae* ورد فعل صنف الزيتون خضيري إزاء الإصابة به. مجلة وقاية النبات العربية، 42(1): 1-8. <https://doi.org/10.22268/AJPP-001219>

هدف البحث إلى عزل وتوصيف عزلتين محليتين من الفطر *Verticillium dahlia*، العزلة Vd1 من منطقة تل التوت، حماه، والعزلة Vd2 من منطقة الدروقيات، اللاذقية، ودراسة قدرتهما الإراضية على الصنف خضيري تحت ظروف العدوى الاصطناعية. كانت المستعمرات الفطرية لدى كلا العزلتين دائرية منتظمة الحواف سطحها العلوي بلون أبيض يتحول إلى اللون الأسود عند تشكل الجسيمات الحجرية باليوم 12 لدى العزلة Vd1 مع نسبة تغطية 70%، وباليوم 19 لدى العزلة Vd2 مع نسبة تغطية 40%. اختلفت العزلتان من حيث الصفات البيومترية (المجهرية) إذ تراوح عدد الفياليات المتفرعة عن كل حامل كونيدي لدى العزلة Vd1 4-5 و4 لدى العزلة Vd2، الجسيمات الحجرية (*Microsclerotia*) بنيتة قائمة اللون ذات شكل كروي غير منتظم لدى كلا العزلتين بأبعاد 49.7×43.3 ميكرومتر لدى العزلة Vd1 و 39.3×32.1 ميكرومتر لدى العزلة Vd2. قُيم تفاعل المرض على غراس زيتون صنف خضيري خلال 140 يوماً بعد العدوى الاصطناعية بكلا العزلتين، فأحدثت العزلة Vd1 نسبة إصابة 100% بعد 50 يوماً فقط من العدوى الاصطناعية مقارنةً مع 95 يوماً بالنسبة للعزلة Vd2. دلّت نتائج المساحة تحت منحنى تطوّر المرض (AUDPC) أن معدل تطوّر مرض الذبول لدى العزلة Vd1 كان أعلى من معدل تطوّر لدى العزلة Vd2 بنحو 1.5 ضعفاً.

كلمات مفتاحية: ذبول، عزلة فطرية، عدوى اصطناعية، *Verticillium dahliae*.

المقدمة

(Mercado-Blanco, 2020) ومنها أقاليم حوض المتوسط (Levin et al., 2007).

سُجّل المرض لأول مرة في سورية عام 1983 من قبل Al-Ahmad & Mosli (1993). أظهرت بعض المسوحات المحلية زيادة في انتشار مرض ذبول الزيتون حيث وصلت إلى 34.7% في وسط وشمال سورية (الأحمد وآخرون، 1992)، وسجّلت 30% في بعض البساتين (مطر والأحمد، 2010)، و 22.58% في بعض المناطق في سورية (برهوم، 2012). وتكمن خطورة مرض الذبول في تعدّد عوائله حيث يسبب أعراض الذبول الوعائي لأكثر من 160 من الأنواع النباتية المهمة زراعياً من ضمنها الزيتون (Fradin & Thomma, 2006)، بالإضافة لصعوبة استهداف الفطر خلال الأوعية الخشبية للنباتات المصابة بالذبول، كما أن الفطر يقوم بتشكيل الجسيمات الحجرية وهي تراكيب فطرية ساكنة يحافظ بها الفطر على بقاءه حياً بغياب عائله حيث يمكنها أن تتأثر تحت الظروف الحقلية لمدة تصل إلى 14 عام

تعد شجرة الزيتون (*Olea europaea* L.) الشجرة الأكثر رمزية وانتشاراً في بلدان حوض المتوسط حيث تتركز 80% من المساحة المزروعة بالزيتون بالعالم (Debbabi et al., 2022)، كما يعد محصول الزيتون من ركائز الأمن الغذائي في سورية حيث يساهم مساهمة فاعلة في الناتج القومي الإجمالي. اتسعت المساحة المزروعة بأشجار الزيتون في سورية حتى بلغت بحسب آخر إحصائيات منظمة الأغذية والزراعة (الفاو) 696,363 هكتاراً (FAO, 2020).

تصاب شجرة الزيتون بالعديد من الآفات، ويعد مرض ذبول الزيتون المتسبب عن الفطر المنقول بواسطة التربة *Verticillium dahliae* Kleb. من الأمراض الفطرية المهمة على شجرة الزيتون. هذا المرض واسع الانتشار في جميع مناطق زراعة الزيتون حول العالم ويعد عاملاً محدداً لزراعة الزيتون في العديد من البلدان (Montes-Osuna &

مواد البحث وطرائقه

عزلات الفطر المُمرض *Verticillium dahliae* Kleb.

تم الحصول على عزلات من الفطر *V.dahliae* من أشجار زيتون تظهر عليها أعراض الإصابة بمرض الذبول الفريسيليومي من شحوب الأوراق والتفافها وتساقطها، بعد أخذ 20 عينة (أقلام) من بساتين زيتون في كل من محافظتي حماة (تل الثوت في السلمية) واللاذقية (الدروقيات) خلال الموسم 2020 ووضعت في أكياس بلاستيكية شفافة مزودة ببطاقات تعريفية، ثم نقلت إلى المختبر لعزل المسبب الفطري.

المادة النباتية

تم تأمين 40 غرسة زيتون بعمر سنتان من الصنف "خضيري" المنتشر بكثرة في الساحل السوري من مشتل الزيتون في بوقا التابع للمركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة (أكساد).

المزارع الفطرية وتعريف العزلات

غسلت العينات المصابة بالماء المقطر لمدة 10 دقائق، ثم عقت سطحياً بغمسها في محلول 0.5% Sodium Hypochlorite لمدة 3 دقائق، غُسلت ثلاث مرات تباعاً بالماء المقطر المعقم وجففت على ورق ترشيع معقم، قطعت إلى قطع صغيرة بوساطة شفرة معقمة، ووضعت داخل أطباق بترتي 9 سم حاوية على المستتبت الغذائي PDA مضافاً له المضاد الحيوي Oxytetracyclin 50 بتركيز مغ/ليتر، وحُضنت بالظلام عند حرارة 24 ± 2 °س لمدة 14 يوماً.

ومن أجل الدراسات المورفولوجية والبيومترية حضّرت مزارع وحيدة البوغة من كل عزلة اعتماداً على طريقة طرف الهيفا، ثم جرى إكثارها بأقراص قطرها 5 مم أخذت من حواف مشيخة حديثة بعمر 10 أيام، ونقلت إلى أطباق بترتي تحوي وسط PDA وحُضنت في الظلام عند حرارة 24 ± 2 °س لمدة 10 أيام. تم اختيار عدد من العزلات ممثلة للمناطق المدروسة لدراسة مواصفاتها المزرعية وإجراء اختبار القدرة الإراضية (Pathogenicity). حفظت العزلات في البراد عند حرارة 4°س وتم تجديدها شهرياً. تم إجراء الاختبار في محطة أبحاث السن التابعة للمركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة (ACSAD)، وسُجّلت خصائص المزرعة الفطرية مثل: اللون والشكل والتركيب، كما تم جمع الأبواغ الكونيدية بإضافة 10 مل ماء مقطر معقم لكل طبق مع رجّ الأطباق من أجل تحرير الأبواغ. تم قياس طول وعرض 20 بوغة كونيدية وكذلك 20 جسيم حجري تحت المجهر الضوئي. فُحصت مشائج العزلات مجهرياً بشكل دوري. تم تعريف العزلات الفطرية من الأشجار المريضة

(Wilhelm, 1995)، إضافة إلى أنها تعد مصدراً للعدوى الأولية في الإصابات الطبيعية (Montes-Osuna & Mercado-Blanco, 2020). كما تتبع أهمية المرض من تأثيره في غلة الزيتون، إذ سبب المرض بالسابق خسارة في غلة الزيتون على الصنف Picual في فلسطين وصلت إلى 75-89% (Levin et al., 2003)، كما تبين تأثيره السلبي في نوعية الزيت المستخرج وتحديداً في المركبات الطيارة والفينولات المسؤولتان عن الرائحة العطرية لزيت الزيتون ومذاقه وبالتالي خفض القيمة التسويقية (Landa et al., 2019).

تنتش الجسيمات الحجرية بتأثير مفرزات جذور أشجار الزيتون معطيةً هيفاً فطرية تخترق جذور العائل وتتمو حتى تصل إلى النظام الوعائي، وعندها تصبح الأوعية الناقلة مستعمرة من قبل الممرض الفطري نتيجة تطوّر الميسليوم والأبواغ الكونيدية مؤدياً ذلك لانسداد الجهاز الوعائي نتيجة امتلائه بالمواد الهلامية والتيلوزات (Tyloses) فيحدث عندها إجهاد مائي وتبدأ أعراض الذبول بالظهور (López-Moral et al., 2022). تبدأ الأعراض عادةً في جهة واحدة من الشجرة المصابة على شكل جفاف للأوراق وتفقّد بريق اخضرارها وتجف وتلتف نحو الداخل وتتحول إلى اللون الفضي وتسقط تدريجياً ابتداءً من الأعلى باتجاه الأسفل، يتزامن ذلك مع تلون الأوعية الناقلة باللون البني (يظهر ذلك بالمقطع العرضي للغصن المصاب) (Blanco-Lopez et al., 1984). تعتمد شدة أعراض الذبول على أشجار الزيتون على النمط الممرض من الفطر *V.dahliae* حيث سجل تواجد النمط المسقط للأوراق (Defoliating Pathotype D) D في سورية من قبل برهوم (2012)، والتي ينتج عنها المتلازمة الأشد خطورة المتميزة بسقوط الأوراق على نطاق واسع وانخفاض حاد في نمو النبات وفي النهاية موت الشجرة (López-Escudero & Mercado-Blanco, 2011). تتم مكافحة هذا المرض باستخدام بعض المبيدات الكيميائية (محرز وآخرون، 2020)، وباستخدام مواد طبيعية مثل ماء الجفت (محرز وآخرون، 2021)، إن دراسة خصائص عزلات الفطر الممرض أمر أساسي من أجل تطوير استراتيجيات مكافحة مرض الذبول ويشمل ذلك برامج التربية من أجل إنتاج أصناف زيتون مقاومة للمرض.

تتبع أهمية هذا البحث من أهمية شجرة الزيتون في الاقتصاد السوري، وبسبب الخسائر والأضرار التي يتسبب بها مرض ذبول الزيتون على مستوى الإنتاج كماً ونوعاً، بالإضافة إلى صعوبة مكافحة هذا المرض، فقد هدف هذا البحث إلى عزل ودراسة خصائص عزلتين محليتين من الفطر *Verticillium dahliae* من منطقتين جغرافيتين مختلفتين، ودراسة رد فعل صنف الزيتون خضيري (الأكثر انتشاراً في الساحل السوري) تجاه الإصابة تحت ظروف العدوى الاصطناعية.

تبعاً لصفاتها الشكلية والأجسام الحجرية الدقيقة (Hawksworth & Talboys, 1970؛ Smith, 1965)

اختبار القدرة الإراضية لعزلة الفطر *V.dahliae* على غراس الزيتون
صنف خضير بعمر سنتين

تحضير لقاح الفطر *V.dahliae*

جرى إكثار العزلة Vd1 بالمختبر على أطباق بتري تحوي المستنبت المغذي PDA، أخذت المشائج الفطرية النامية على المستنبت المغذي بعمر 14 يوم، ووضعت في خلّاط كهربائي (سبق تعقيمه بالكحول الإيثيلي 70%) أضيف له ماء مقطر معقم، وأجريت عملية الخلط لمدة 3 دقائق بدايةً على السرعة البطيئة، تم ترشيح المعلق البوغي الناتج باستخدام طبقتين من الشاش المعقم، وتم ضبط تركيز الأبواغ في المعلق على 10×10^7 بوغ/مل بواسطة شريحة عد كريات الدم (Hemocytometer).

تحضير الغراس والعدوى الاصطناعية

عمقت التربة والرمل بمادة الفورمالين (Formaldehyde) 37.5% بمعدّل 1 لتر/م³ تربة، ثم غُطيت برقائق بولي إيثيلين لمدة أسبوع، تم تهوية التربة بعد ذلك لمدة أسبوعين آخرين تخلّله تحريك وتقليب المستنبت عدة مرات للتخلص من بقايا المادة المعقّمة. جرى قلع الغراس من الأصص وغسلها بالماء الجارٍ بشكل جيّد لإزالة بقايا الأتربة العالقة ثم غُسلت مرة واحدة بالماء المعقم، تُركت لتجف مدة 5 دقائق، قُلّمت نهايات الجذور تقليماً بسيطاً بواسطة مقص زراعي معقم (لضمان دخول اللقاح المعدّي إلى جذر الغرسة)، أُجريت عملية العدوى الاصطناعية لغراس الزيتون وذلك بطريقة Trapero *et al.* (2013) حيث تم غمر جذور غراس الزيتون ضمن المعلق البوغي المحضّر سابقاً (تركيزه $10^7 \times 1$ بوغ/مل) الخاص بكل عزلة لمدة نصف ساعة، كما تم غمر غراس معاملة الشاهد بالماء المقطر المعقم، جرى بعدها إعادة زراعة الغراس في أكياس من البولي إيثيلين الزراعية (سعة 5 لتر) حاوية على المستنبت الزراعي (تربة معقّمة: تورب معقم: رمل معقم) بنسبة (1:1:1)، ثم أضيف المعلق البوغي السابق رياً على الغراس بمعدّل 150 مل/غرسة وذلك لضمان نجاح عملية العدوى الاصطناعية، اعتمدت 3 مكررات لكل معاملة والمكرر الواحد عبارة عن 4 غراس زيتون بعمر سنتين، تم سقاية الغراس بشكل دوري (500 مل ماء مرة كل أسبوع).

أخذ القراءات

تم إجراء عدة قراءات وكانت الأولى بعد 50 يوماً من العدوى الاصطناعية وذلك بفحص أوراق الغراس، تم تدوين درجة الإصابة لكل غرسة حسب سلّم إصابة مؤلف من 6 درجات تبعاً للنسبة المئوية لأجزاء الغرسة

المصابة من النفاق الأوراق وشحوبها وسقوطها (Tjamos *et al.*, 1991) على الشكل التالي: 0= نبات سليم ولا يوجد أعراض، 1= النبات مصاب بنسبة 1-20%، 2= النبات مصاب بنسبة 21-40%، 3= النبات مصاب بنسبة 41-60%، 4= النبات مصاب بنسبة 61-80%، 5= النبات مصاب بنسبة 81-100% أو الغرسة ميّنة.

كُررت القراءة 6 مرات خلال 90 يوماً (قراءة كل 15 يوماً). وتم تقييم شدة الإصابة اعتماداً على المعادلة التالية (Michenny, 1923):

$$\text{شدة الإصابة \%} = \frac{\text{مجموع (عدد النباتات في كل درجة} \times \text{قيمة الدرجة)}}{\text{العدد الكلي للنباتات} \times \text{قيمة أعلى درجة (5)}} \times 100$$

كما تم حساب المساحة تحت منحني تطوّر المرض (Area Under Diseases Progress Curve, AUDPC) من العلاقة التالية (Shaner & Finney, 1977):

$$\text{AUDPC} = \sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

حيث: Y = شدة الإصابة عند كل قراءة، T = عدد الأيام التي تفصل بين كل قراءة والتالية، N = عدد القراءات.

تصميم التجربة والتحليل الإحصائي

تم تنفيذ هذه التجربة ضمن الحقل المكشوف في موقع بحوث دبا التابع لمركز البحوث العلمية الزراعية باللاذقية خلال الموسم الزراعي 2019-2020 على غراس زيتون صنف خضير بعمر سنتان (مصدرها مشتل أكساد في بوقا). وزعت الغراس ضمن قطع عشوائية، تضمنت القطعة الواحدة 12 غرسة، بواقع 3 مكررات للمعاملة الواحدة، المكرر الواحد عبارة عن 4 غراس.

خُلّلت النتائج إحصائياً باستخدام برنامج التحليل الإحصائي Genstat 12th Edition باستخدام التصميم العشوائي الكامل وقُورنت قيم المتوسطات الحسابية باستخدام اختبار أقل فرق معنوي (L.S.D) واختبار دنكان (Duncan) لترتيب الفروق المعنوية بين المعاملات وذلك عند مستوى احتمال 5%.

النتائج والمناقشة

تعريف عزلات الفطر *Verticillium dahliae*

تم الحصول على عزلتين (بعد الغرلة واختيار الأسرع نمواً والأعلى بنسبة التغطية بالجسيمات الحجرية) من الفطر (Vd1 و Vd2) ممثلتين لمحافظة حماة واللاذقية، على التوالي. تم تشخيص الفطر اعتماداً على المفتاح التصنيفي بما يتعلق بالصفات المورفولوجية (التفرع السواري

اختبار القدرة الإراضية لعزلتين من الفطر *Verticillium dahliae* على غراس زيتون صنف خضيري بعمر سنتين

تم تسجيل مجموعة من الأعراض على غراس الزيتون المعدة بكل من العزلتين: بداية ظهور الأعراض كانت على شكل شحوب للأوراق والتفافها بشكل بسيط بالبداية وسقوطها على مراحل في وقت لاحق. ظهرت خلال تجربة القدرة الإراضية أعراض مرض الذبول الفرتسيلومي النموذجية على غراس الزيتون بالإضافة لأعراض تساقط أوراق الغراس المعدة صناعياً بكلتا العزلتين (تعريية)، وهذا يُثبت أن كلتا العزلتين ممرضتان للزيتون وتنتميان إلى الطراز D المسقط للأوراق (Defoliating pathotype D). تتفق هذه النتيجة مع نتائج عديد من الدراسات التي أكدت انتشار الطراز الوراثي D المسقط للأوراق على الزيتون في معظم مناطق زراعة الزيتون وخاصة في بلدان حوض المتوسط (Dervis et al., 2010؛ Jiménez-Díaz et al., 2011؛ Pérez-Artés et al., 2000)، كما جاءت هذه النتائج متوافقة مع بروهوم (2012) التي وجدت انتشاراً للطراز D المسقط للأوراق في عدد من المحافظات السورية ومنها إدلب وحماة ودرعا.

أظهرت النتائج في نهاية التجربة أن غراس الزيتون المعدة صناعياً (بالعزلة Vd1) قد ماتت بالنهاية (تعريية كاملة مع يباس) وهذا يتفق مع عدة دراسات أشارت أن إصابة الزيتون بالطراز D ينتج عنه أعراض تساقط الأوراق وموت الأشجار (López-Keyhasaber et al., 2018؛ Escudero & Mercado-Blanco, 2011). بينما يتسبب الطراز غير المسقط للأوراق ND بأعراض ذبول خفيفة تختفي مع الزمن ومن الممكن أن تشفى الأشجار المصابة بالمرض كما لا تؤدي إلى موت الشجرة بالنهاية (Lazarovits, 2004؛ López-Escudero & Blanco-Lopez, 2005). اختلف موعد ظهور الأعراض حسب العزلة حيث ظهرت أعراض الإصابة بالعزلة Vd1 بعد 38 يوماً من العدوى، في حين بدأت أعراض الإصابة بالعزلة Vd2 بعد 50 يوماً من العدوى وهذا ينسجم مع اختلاف سرعة نمو كلتا العزلتين مختبرياً كما وجدنا سابقاً.

تمثلت الأعراض الظاهرة بشكل عام بشحوب عدد من الأوراق بالبداية على فرع واحد من الغرسة ثم بعد فترة من الزمن تلتف هذه الأوراق نحو الداخل بشكل بسيط بالبداية ثم بشكل شديد، وبمرحلة لاحقة تبدأ بالتساقط تدريجياً من الأعلى باتجاه الأسفل، وقد تم الحصول على الفطر *V. dahliae* من خلال إعادة عزل الفطر من الأفرع المصابة مما يعزز العلاقة بين المرض ومسببه كما وردت في الأعراض أعلاه. ويبين الشكل (1) والجدول (2) نتائج اختبارات القدرة الإراضية للعزلتين Vd1 و Vd2 من الفطر *V. dahliae* من الطراز D المسقط للأوراق.

للحوامل البوغية) المميزة للجنس *Verticillium* بالإضافة إلى تشكيل الجسيمات الحجرية كصفة مميزة للنوع *V. dahliae* (Hawksworth & Talboys, 1970؛ Smith, 1965). ظهر ميسليوم الفطر عند كلاً من العزلتين شفافاً مقسماً، تتصل به حوامل كونيدية تحمل مجموعة من الفيااليدات متفرعة بشكل كوكبي عددها 4-5 لدى العزلة Vd1 و 4 لدى العزلة Vd2 والتي تحمل الأبواغ الكونيدية على طرفها. البوغ الكونيدي بيضوي لدى كلا العزلتين أبعاده 5.1 x 4.3 ميكرومتر لدى العزلة Vd1 و 3.5 x 4.8 ميكرومتر لدى العزلة Vd2، وهذا ما يتفق مع Karapapa et al. (1997)، الذين بينوا أن عدد الفيااليدات التي يشكلها الفطر *V. dahliae* يتراوح بين 4 إلى 5 كما يشكل أبواغ كونيدية طولها أقل من 5.5 ميكرومتر. الجسيمات الحجرية كانت بنية قاتمة اللون ذات شكل كروي غير منتظم لدى كلا العزلتين بأبعاد 49.7×43.3 ميكرومتر لدى العزلة Vd1 و 39.3×32.1 ميكرومتر لدى العزلة Vd2، وتتطابق هذه النتيجة مع ما أشار إليه Gomez-Alpizar (2001) الذي أوضح أن هذه الصفات تنطبق على الفطر *V. dahliae*.

كانت المزارع الفطرية دائرية منتظمة الحواف سطحها العلوي بلون أبيض وقوام قطني سرعان ما يتحول إلى اللون الأسود مباشرة عند تشكل الجسيمات الحجرية وذلك بدءاً من المركز الذي يبقى بلون أبيض أو يتحول إلى دوائر متداخلة بلون بني غامق وأصبحت سوداء لاحقاً بسبب تشكل الجسيمات الحجرية، وتعد هذه الصفات مميزة للفطر *Verticillium dahliae* (Göre, 2009؛ Inderbitzin et al., 2011؛ Zare et al., 2001). كان نمو المشيجة لكلا من العزلتين بطيئاً نسبياً 2.71 و 1.55 م/م/مزرعة/يوم وهذا يتوافق مع Sun et al. (2016) كما يتوافق مع Smith & Cothren (1999) الذي أكد أن فطر *V. dahliae* يشكل مشيجة بطيئة النمو، تتطور بمعدل 2-3.5 م/م/يوم.

أظهرت مزارع الفطر لدى كلتي العزلتين تبايناً في بعض الصفات المزرعية، حيث تميز لون سطح المشيجة لدى العزلة Vd1 باللون الأبيض القطني في البداية ثم يبدأ بالتحول إلى اللون الأسود في وقت لاحق وذلك بالتزامن مع تشكل الجسيمات الحجرية باليوم الـ 12 مع بقاء المركز بلون أبيض، وبلغ متوسط سرعة نمو المشيجة 2.71 م/م/يوم، مع نسبة تغطية بالجسيمات الحجرية قدرت بـ 70%. أما بالنسبة للعزلة Vd2 فكان لون سطح المشيجة أبيض قطني بالبداية تحول لاحقاً إلى اللون الأسود عند تشكل الجسيمات الحجرية باليوم 19 مع بقاء مساحة قليلة بيضاء في المركز (مساحتها هنا أقل من مثيلتها لدى العزلة Vd1)، وبلغ متوسط سرعة نمو المشيجة 1.55 م/م/يوم، ونسبة التغطية بالجسيمات الحجرية 40% (جدول 1).

جدول 1. بعض الخصائص المزرعية لعزلتين مختلفتين من الفطر *V. dahliae* على مستنبت بطاطا-دكستروز-آجار.

Table 1. Some morphological properties of two different *V. dahliae* fungal isolates on PDA medium.

| رقم ومصدر العزلة | لون سطح المشيخة | طبيعة نمو المشيخة | معدل النمو ملم/يوم | الفترة الضرورية لتشكّل الجسيمات الحجرية (يوم) | نسبة التغطية بالجسيمات الحجرية (%) |
|--------------------------------------|---|---------------------------|-----------------------|---|------------------------------------|
| Code and source of isolate | Colony surface color | Nature of colony's growth | Growth average mm/day | Period required for microsclerotia formation (days) | Microsclerotia coverage rate (%) |
| Vd1-حمّاه Vd1-Hama province | أبيض بدايةً ثم يتحول إلى الأسود مع مركز أبيض White at first, turning black with a white center | قطني Cottony | 2.71 | 12 | 70 |
| Vd2-اللاذقية Vd2-Latakia province | أبيض بالبداية ثم يتحول إلى الأسود White at first, then turns black | قطني Cottony | 1.55 | 19 | 40 |

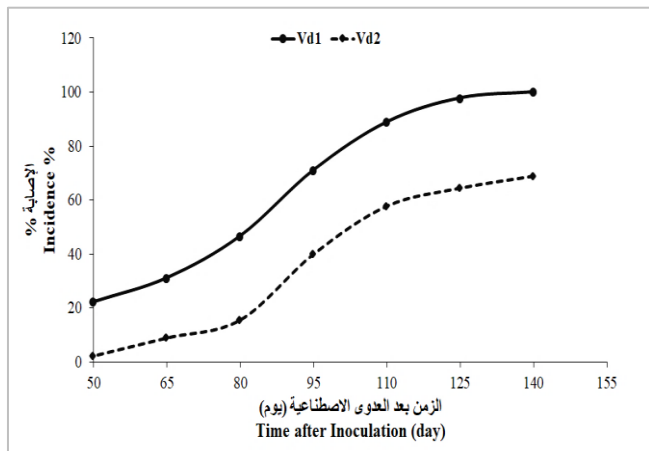
أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية واضحة بين العزلتين Vd1 و Vd2 عند القراءات الأربع الأخيرة، كما وجدت فروق معنوية بين كل من العزلتين والشاهد السليم لناحية شدة الإصابة وذلك خلال القراءات الأربع الأخيرة، أي بعد 90 يوم من إجراء العدوى الاصطناعية وحتى 140 يوم من العدوى. ويبين الشكل 2 المساحة تحت منحنى تطور المرض بتأثير كل من العزلتين Vd1 و Vd2.

بلغت المساحة تحت منحنى تطور المرض (AUDPC) بالنسبة للعزلة Vd1 5950 وحدة مساحة مقارنةً مع 3333.36 وحدة مساحة بالنسبة للعزلة Vd2، أي أن معدل تطور مرض الذبول المتسبب عن العزلة Vd1 كان أعلى من معدل تطوره لدى العزلة Vd2 بنحو 1.5 ضعفاً.

نستنتج مما سبق بأن العزلة Vd1 كانت الأسرع نمواً والأعلى بنسبة التغطية بالجسيمات الحجرية والأعلى بالمساحة تحت منحنى تطور المرض والأكثر شراسة على صنف الزيتون خضيرى وتقوّقت معنوياً على العزلة Vd2 من ناحية شدة الإصابة حيث بلغت شدة الإصابة 100% لدى العزلة Vd1 بعد 140 يوماً من العدوى الاصطناعية في حين لم تسجّل سوى 68.89% لدى العزلة Vd2. ويعود اختلاف العزلات في قدرتها الإراضية إلى التباين الوراثي بينها (Bautista-Jalón *et al.*, 2021). كان هناك تباين في الصفات المورفولوجية والبيومترية بين العزلتين Vd1 و Vd2 على المستنبت PDA، وأن العزلتين Vd1 و Vd2 تنتمي إلى النمط D المسقط للأوراق. وأظهر صنف الزيتون خضيرى قابلية عالية للإصابة بمرض الذبول. هناك ضرورة للقيام بالمزيد من اختبارات الشراسة على عزلات الفطر *V. dahliae* من مناطق جغرافية أخرى وإدخال النتائج في برامج التربية ضمن استراتيجية الإدارة المتكاملة لمرض الذبول على الزيتون.

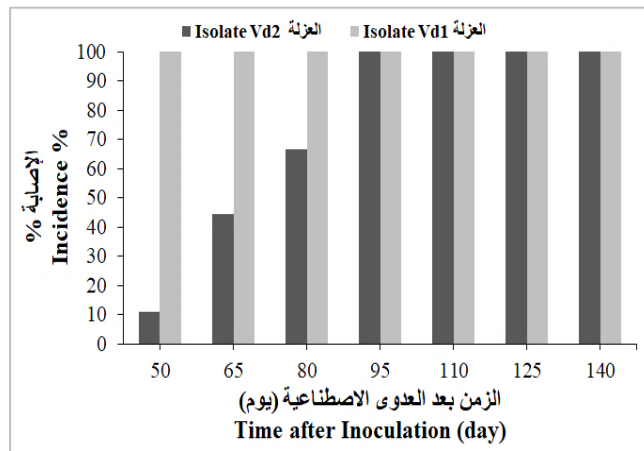
وُجد تباين في نسبة إصابة غراس الزيتون بمرض الذبول بتأثير كل من العزلتين Vd1 و Vd2 بعد 50 يوماً من العدوى الاصطناعية (شكل 1)، إذ كانت نسبة الإصابة 11.11% لدى العزلة Vd2 مقارنةً مع نسبة إصابة 100% لدى العزلة Vd1 وعدم إصابة الشاهد غير المُعدى. ارتفعت نسبة الإصابة تدريجياً خلال القراءات لتسجل العزلة Vd2 نسبة إصابة 44.44% مقارنةً مع العزلة Vd1 التي سجّلت 100% وذلك بعد 65 يوم من إجراء العدوى الاصطناعية، كما ارتفعت نسبة الإصابة لاحقاً بعد 80 يوماً من العدوى فكانت 66.66% لدى العزلة Vd2 مقارنةً مع 100% لدى العزلة Vd1 و 0% لدى الشاهد غير المُعدى. لم تبلغ نسبة الإصابة 100% لدى العزلة Vd2 إلا بعد 95 يوماً من العدوى الاصطناعية. يوضح جدول 2 شدة إصابة (%) غراس الزيتون بمرض الذبول بتأثير العدوى الاصطناعية بالعزلتين Vd1 و Vd2.

تؤكد النتائج (جدول 2) أنه بعد 50 يوم من العدوى الاصطناعية كان هنتاك اختلاف في شدة الإصابة إذ بلغت 2.22 و 22.22% لكل من العزلتين Vd1 و Vd2، على التوالي، وخلال نفس الفترة ومقارنةً مع شدة إصابة 0% لدى الشاهد غير المُعدى. ارتفعت شدة الإصابة تدريجياً خلال القراءات لتسجل العزلة Vd2 8.89% شدة إصابة مقارنةً مع العزلة Vd1 التي سجّلت 31.11% شدة إصابة وذلك بعد 65 يوم من إجراء العدوى الاصطناعية، في حين سجّلت شدة الإصابة بعد 80 يوم من العدوى 15.56 و 46.67% لكل من العزلتين Vd1 و Vd2، على التوالي. ارتفعت شدة الإصابة في القراءة التالية فكانت 40% لدى العزلة Vd2 مقارنةً مع 71.11% لدى العزلة Vd1، واستمرت شدة الإصابة بالارتفاع خلال القراءات اللاحقة وسجّلت 100% لدى العزلة Vd1 في حين لم تسجّل سوى 68.89% لدى العزلة Vd2 وذلك بعد 140 يوم من العدوى.



شكل 2. المساحة تحت منحني تطور المرض بعد العدوى الاصطناعية بالعتلتين Vd1 و Vd2.

Figure 1. Area under disease progress curve after artificial inoculation with Vd1, Vd2 Isolates of *V. dahliae*.



شكل 1. تطور نسبة الإصابة بمرض الذبول على غراس الزيتون صنف خضيرى خلال 140 يوم بعد العدوى الاصطناعية.

Figure 1. Development of olive wilt disease incidence on olive plants (Khudairi cultivar) during 140 days after artificial inoculation.

جدول 2. تطور شدة إصابة (%) غراس الزيتون صنف خضيرى بمرض الذبول بعد الإعداء الاصطناعي بعتلتين من الفطر *V. dahlia*.
Table 2. Development of Verticillium wilt disease severity (%) on olive plants (Khderi cultivar) after artificial inoculation with two isolates of *V. dahliae*.

| الزمن بعد العدوى الاصطناعية (يوم) Time after artificial inoculation (days) | | | | | | | المعاملة Treatment | |
|---|---------|---------|---------|-------|-------|-------|-----------------------|------------|
| 140 | 125 | 110 | 95 | 80 | 65 | 50 | | |
| 100.0 a | 97.78 a | 88.89 a | 71.11 a | 46.67 | 31.11 | 22.22 | Isolate Vd1 | العتلة Vd1 |
| 68.89 b | 64.44 b | 57.78 b | 40.00 b | 15.56 | 8.89 | 2.22 | Isolate Vd2 | العتلة Vd2 |
| 0.00 c | 0.00 c | 0.00 c | 0.00 c | 0.00 | 0.00 | 0.00 | Control | الشاهد |

القيم التي يتبعها نفس الأحرف في نفس العمود لا يوجد بينها فرق معنوي عند احتمال 5%.

Values followed by the same letters in the same column are not significantly different at P=0.05.

Abstract

Muhrez, K.A. and B. Barhoum. 2024. Characterization of Two Local Isolates of the Fungus *Verticillium dahliae* that Causes Vascular Olive Wilt, and the Reaction of Olive Cultivar Khudairi to Infection with this Pathogen. Arab Journal of Plant Protection, 42(1): 1-8. <https://doi.org/10.22268/AJPP-001219>

This Study aimed to isolate and characterize two local isolates of the fungus *Verticillium dahlia* Kleb., Vd1 from Tal al-Tout region, Hama, and Vd2 from Al-Darouqiyat region, Lattakia, and assess their pathogenicity on Khudairi olive cultivar under artificial inoculation conditions. The fungal cultures of both isolates were circular with regular edges, with a white upper surface that turns black when microsclerotia are formed on day 12 of isolate Vd1 with a coverage rate of 70%, and on day 19 of isolate Vd2 with a coverage rate of 40%. The two isolates differed in biometric characteristics. 4-5 phialides branched from each conidiophore in isolate Vd1 and 4 in isolate Vd2. Microsclerotia produced were dark brown in color with an irregular spherical shape in both isolates with dimensions of 43.3x49.7 μm for isolate Vd1 and 32.1x39.3 μm for isolate Vd2. The disease reaction was evaluated on Khderi olive plants during 140 days after the artificial inoculation with both isolates. Isolate Vd1 caused 100% infection 50 days after artificial inoculation compared with 95 days for the isolate Vd2. The Area under the disease progress curve (AUDPC) indicated that the rate of disease progress in isolate Vd1 was about 1.5 times higher than that of isolate Vd2.

Keywords: Wilt, fungal isolate, microsclerotia, *Verticillium dahliae*.

Affiliation of authors: K.A. Muhrez*, and B. Barhoum. Latakia Research Center, General Authority for Scientific Agricultural Research, Latakia, Syria. Email address of the corresponding author: muhrezk@yahoo.com

Reference

[Al-Ahmad, M., M.N. Mosally and A.R. Duksi. 1992. Olive wilt disease in central and north Syria, and the effect of varieties, age and agricultural practices in its development and spread. Arab Journal of Plant Protection, 10(2):131-139. (In Arabic)].

الأحمد، ماجد، محمد نذير موصللي وعبد الرزاق دقسي. 1992. مرض ذبول الزيتون في وسط وشمال سورية وأثر عوامل الصنف والعمر وبعض العمليات الزراعية في انتشاره وتطوره. مجلة وقاية النبات العربية، 10(2):131-139.

- cultivars. *European Journal of Plant Pathology*, 127:287-301.
<https://doi.org/10.1007/s10658-010-9595-z>
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations)**. 2020. FAOSTAT Database. Rome, Italy.
<http://faostat3.fao.org/home/E>.
- Fradin, E.F. and B.P.H.J. Thomma**. 2006. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology*, 7(2):71-86.
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2006.00323.x>
- Gomez-Alpizar, L.** 2001. Pathogen Profiles: *Verticillium dahliae*. NC State University, 728 pp.
- Göre, M.E.** 2009. Vegetative compatibility and pathogenicity of *Verticillium dahliae* isolates from *Chrysanthemum* in Turkey. *Phytoparasitica*, 37:87-94.
<https://doi.org/10.1007/s12600-008-0001-8>
- Hawksworth, D.L. and P.W. Talboys**. 1970. *Verticillium albo-atrum*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Wallingford, UK: CABI Publishing, 225 pp.
- Inderbitzin, P., R.M. Bostock, R.M. Davis, T. Usami, H.W. Platt and K.V. Subbarao**. 2011. Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. *PLoS ONE*, 6(12): e28341.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028341>
- Jiménez-Díaz, R.M., C. Olivares-García, B.B. Landa, M.M. Jiménez-Gasco and J.A. Navas-Cortés**. 2011. Region-wide analysis of genetic diversity in *Verticillium dahliae* populations infecting olive in southern Spain and agricultural factors influencing the distribution and prevalence of vegetative compatibility groups and pathotypes. *Phytopathology*, 101:304-315.
<https://doi.org/10.1094/phyto-07-10-0176>
- Karapapa, V.K., B.W. Bainbridge and J.B. Heale**. 1997. Morphological and molecular characterization of *Verticillium longisporum* comb. nov., pathogenic to oilseed rape. *Mycological Research*, 101(11):1281-1294.
<https://doi.org/10.1017/S0953756297003985>
- Keykhasaber, M., B.J. Thomma and J.A. Hiemstra**. 2018. *Verticillium* wilt caused by *Verticillium dahliae* in woody plants with emphasis on olive and shade trees. *European Journal of Plant Pathology*, 150(1):21-37.
<https://doi.org/10.1007/s10658-017-1273-y>
- Lazarovits, G.** 2004. Managing soil borne plant diseases through selective soil disinfestation by a knowledge-based application of soil amendments. *Phytoparasitica*, 32:427-432. <https://doi.org/10.1007/BF02980436>
- Landa, B.B., A.G. Pérez, P. Luaces, M. Montes-Borrego, J.A. Navas-Cortés and C. Sanz**. 2019. Insights into the effect of *Verticillium dahliae* defoliating-pathotype infection on the content of phenolic and volatile compounds related to the sensory properties of virgin olive oil. *Frontiers in Plant Science*, 10:1-12.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00232>
- Levin, A.G., S. Lavee and L. Tsrer (Lahkim)**. 2003. Epidemiology of *Verticillium dahliae* on olive (cv. Picual) and its effect on yield under saline conditions. *Plant Pathology*, 52(2):212-218.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00809.x>
- برهوم، باسمة أحمد**. 2012. استخدام التقانات الحيوية في دراسة تباين التركيب الوراثي في مجتمع الزيتون البري وفطر الذبول (*Verticillium dahliae*) وتأثرهما في سورية. أطروحة دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة حلب، سورية. 179 صفحة.
- [Barhom, B. 2012. Use of biotechnologies in studying the genetic variation in the population of wild olive and wilt fungus (*Verticillium dahliae*) and their interaction in Syria. PhD thesis, Faculty of Agriculture, Aleppo University, Syria. 179 pp. (In; Arabic).]**
- محرز، خيام علي، محمد زكريا طويل وباسمة برهوم**. 2020. تأثير المبيدات الفطرية fosetyl-aluminium, azoxystrobin, hexaconazole في مكافحة مرض الذبول الفريستيليومي على أشجار الزيتون المتسبب عن الفطر *Verticillium dahliae*. *Kleb. مجلة جامعة البعث*, 33(7): 11-33.
- [Muhrez, K. A., M. Z. Tawil and B. Barhoum. 2020. Effect of Fungicides fosetylene-aluminium, hexaconazole, azoxystrobin in control of Olive Wilt Disease on Olive trees Caused by *Verticillium dahliae* Kleb. *Journal of Al-Baath University*, 33(7):11-33. (In Arabic)]**
- محرز، خيام علي، محمد زكريا طويل وباسمة برهوم**. 2021. تأثير ماء الجفت في مكافحة مرض ذبول فريستيليوم على الزيتون المتسبب عن الفطر *Verticillium dahliae* Kleb. *مجلة وقاية النبات العربية*, 39(4):273-280.
<https://doi.org/10.22268/AJPP-39.4.273280>
- [Muhrez, K. A., M. Z. Tawil and B. Barhoum. 2021. Effect of olive mill wastewater in the control of olive verticillium wilt caused by *Verticillium dahliae* Kleb. *Arab Journal of Plant Protection*, 39(4):273-280. (In Arabic)]** <https://doi.org/10.22268/AJPP-39.4.273280>
- مطر، محمد، وأحمد الأحمد**. 2010. البحث عن صفة المقاومة لمرض ذبول الفريستيليوم في بعض الأصول البرية في سورية. *مجلة بحوث جامعة حلب*, 84: 139-154.
- [Matar, M. and A. Al-Ahmad. 2010. Search for resistance to verticillium wilt disease in some wild stocks in Syria. *Research Journal of Aleppo University*, 84: 139-154. (In Arabic)]**
- Al-Ahmad, M.A. and N.N. Mosli**. 1993. *Verticillium* wilt in Syria. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 23: 521-529.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1993.tb01364.x>
- Bautista-Jalón, L.S., O. Frenkel, L. Tsrer, G.M. Malcolm, B.K. Gugino, S. Lebiush and M. Del Mar Jiménez-Gasco**. 2021. Genetic differentiation of *Verticillium dahliae* populations recovered from symptomatic and asymptomatic hosts. *Phytopathology*, 111(1):149-159.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-20-0230-FI>
- Blanco-López, M.A., R.M. Jiménez-Díaz and J.M. Caballero**. 1984. Symptomatology, incidence and distribution of *Verticillium* wilt of olive trees in Andalucía. *Phytopathologia Mediterranea*, 23:1-8.
- Debbabi, O.S., F.B. Amar, S.M. Rahmani, F. Taranto, C. Montemurro and M.M. Miazzi**. 2022. The status of genetic resources and olive breeding in Tunisia. *Plants*, 11(13):1759. <https://doi.org/10.3390/plants11131759>
- Dervis, S., J. Mercado-Blanco, L. Erten, A. Valverde-Corredor and E. Pérez-Artés**. 2010. *Verticillium* wilt of olive in Turkey: A survey on disease importance, pathogen diversity and susceptibility of relevant olive

- Shaner, G. and R.E. Finney.** 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology*, 67: 1051-1056.
<https://doi.org/10.1094/Phyto-67-1051>
- Smith, C. W. and J.T. Cothren.** 1999. Cotton, Origin, History, Technology and Production. John Wiley & Sons, 782 pp.
- Smith, H.C.** 1965. The morphology of *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae* and *V. tricorpus*. New Zealand Journal of Agricultural Research, 8(3):450-478.
<https://doi.org/10.1080/00288233.1965.10419889>
- Sun, F.F., S.L. Sun, and Z.D. Zhu.** 2016. Occurrence of verticillium wilt caused by *Verticillium dahliae* on mung bean in northern China. *Plant Disease*, (100)8: 1792-1792.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-01-16-0084-PDN>
- Tjamos, E.C., D.A. Biris and E.J. Paplomatas.** 1991. Recovery of olive trees with Verticillium wilt after individual application of soil solarization in established olive orchards. *Plant Disease*, 75:557-562.
<https://doi.org/10.1094/PD-75-0557>
- Trapero, C., C.M. Díez, L. Rallo, D. Barranco and F.J. López-Escudero.** 2013. Effective inoculation methods to screen for resistance to Verticillium wilt in olive. *Scientia Horticulturae*, 162:252-259.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.08.036>
- Wilhelm, S.** 1955. Longevity of the *Verticillium* wilt fungus in the laboratory and field. *Phytopathology*, 45:180-181.
- Zare, R., W. Gams and H.C. Evans.** 2001. A revision of *Verticillium* section Prostrata. V. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora*. *Nova Hedwigia*, 73(1-2):51-86.
<https://doi.org/10.1127/nova.hedwigia/73/2001/51>
- Levin, A.G., S. Lavee, and L. Tsrur.** 2007. The influence of salinity on *Verticillium dahliae* in stem cuttings of five olive cultivars. *Journal of Phytopathology*, 155(10): 587-592.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01283.x>
- López-Moral, A., C. Agustí-Brisach, C. Ruiz-Blancas, B.I. Antón-Domínguez, E. Alcántara and A. Trapero.** 2022. Elucidating the effect of nutritional imbalances of N and K on the infection of *Verticillium dahliae* in olive. *Journal of Fungi*, 8(2):139.
<https://doi.org/10.3390/jof8020139>
- López-Escudero, F.J. and M.A. Blanco-López.** 2005. Recovery of Young Olive Trees from *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology*, 113: 365-375.
<https://doi.org/10.1007/s10658-005-3145-0>
- López-Escudero, F.J. and J. Mercado-Blanco.** 2011. Verticillium wilt of olive: a case study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen. *Plant and Soil*, 344:1-50.
<https://doi.org/10.1007/s11104-010-0629-2>
- Michenny, H.H.** 1923. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedling by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research*, 26:195-217.
- Montes-Osuna, N. and J. Mercado-Blanco.** 2020. Verticillium wilt of olive and its control: what did we learn during the last decade?. *Plants*, 9(6):735.
<https://doi.org/10.3390/plants9060735>
- Pérez-Artés, E., M.D. García-Pedrajas., J. Bejarano-Alcázar, and R.M. Jiménez-Díaz.** 2000. differentiation of cotton-defoliating and nondefoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* by RAPD and specific PCR analyses. *European Journal of Plant Pathology*, 106(6): 507-517.
<https://doi.org/10.1023/A:1008756307969>

Received: December 13, 2022; Accepted: May 17, 2023

تاريخ الاستلام: 2022/12/13؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2023/5/17