

طريقة جديدة لتحديد القدرة الإراضية لعزلات من فطر *Fusarium oxysporum f.sp. lentis*نعيم الحسين¹، بسام بياعة²، سعيد أحمد³، مايكل باوم³ وموفق يبرق¹

(1) الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، مركز البحوث العلمية الزراعية بحلب، حلب، سورية،

البريد الإلكتروني: naiem64@hotmail.com؛ (2) كلية الزراعة، جامعة حلب، حلب، سورية؛ (3) ايكاردا، حلب، سورية.

المخلص

الحسين، نعيم، بسام بياعة، سعيد أحمد، مايكل باوم وموفق يبرق. 2014. طريقة جديدة لتحديد القدرة الإراضية لعزلات من فطر *Fusariumoxysporum f.sp. lentis*. مجلة وقاية النبات العربية، 32(2): 131-139.

هدفت الدراسة إلى تقويم ثلاثة طرائق مختلفة في الإعداء، وهي: (1) استخدام أنابيب اختبار تحتوي مستنبت هوجلاند شبه الصلب؛ والإعداء بأقراص من مستعمرات الممرض، (2) ري بادرات الصنف القابل للإصابة المزروعة في أصص بمعلق بوعي للفطر المسبب، (3) تحميل الفطر على حبوب القمح، وتحديد ميزات وعيوب كل منها من أجل استخدام الطريقة الأفضل في غرلة عزلات العدس إزاء الإصابة بهذا الفطر. أظهرت النتائج وجود فروق معنوية بين الطرائق المختبرة لدى استخدامها في تقويم النبات في طور البادرة، ولم تكن معنوية في الطور المتقدم من عمر النبات. وكانت نتائج توصيف العزلات متقاربة في جميع الطرائق المستخدمة، مع أفضلية للطريقة الأخيرة (التحميل على حبوب القمح).

كلمات مفتاحية: عدس، ذبول، طرائق اختبار القدرة الإراضية، التحميل على حبوب القمح.

المقدمة

يعتبر مرض الذبول الوعائي الذي يحدثه الفطر *Fusarium oxysporum Schlecht and Snyder f.sp. lentis* من أهم الأمراض التي تصيب العدس وأخطرها، نظراً للخسائر الكبيرة التي يحدثها في الغلة والتي قد تصل، عند توافر الظروف المناسبة في المناطق الموبوءة، إلى 100% (1، 11، 13، 15، 17، 20). وهو من الأمراض العالمية الانتشار (14، 20)، حيث سُجل في أكثر من 22 بلداً بما فيها سورية (8)، ويعدّ العامل الحيوي الأهم المحدد لإنتاجية العدس في العالم (12). وفي سورية، أشار الحسين وآخرون (1) إلى انتشار المرض في كل مناطق زراعة العدس بحدود 5.22-29.05%. يتأثر الممرض في التربة على هيئة أبواغ كلاميدية يمكن أن تحتفظ بحيوتها لعدة مواسم زراعية (13)، ولذلك فإن الوسيلة الفضلى في مكافحة المرض هي استخدام أصناف مقاومة من العائل (10). صنفت العزلات التي تتميز بمدى عوالت واحد أو متشابه بشكل متخصص، وقد وجد أكثر من 70 شكلاً متخصصاً للفطر المسبب (6). وبالرغم من التنوع الكبير لعزلات الممرض من حيث الخصائص الشكلية أو قدرتها الإراضية، فلم تسجل له سلالات على العدس حتى الآن (4، 10). استخدمت طرائق عديدة في اختبار القدرة الإراضية في الأصص، مثل ري بادرات البندورة بعمر ثلاثة أسابيع بمعلق بوعي من الفطر المسبب (16)، أو غمس جذور البادرات لمدة 2-5 دقائق في المعلق البوعي لغرلة أصناف من العدس إزاء الفطر المسبب لذبول

بعذ العدس (*Lens culinaris Medik.*) المحصول الأقدم في العالم، إذ يعتقد بأنه استؤنس منذ أكثر من 13000 سنة قبل الميلاد (17، 22). ونظراً لغنى بذوره بالبروتين النباتي الذي يصل إلى 28.5% (18)، والعديد من الكربوهيدرات والفيتامينات والعناصر المعدنية (21)، تستخدم بذوره في تغذية الإنسان، ويستفاد من تنبهه في تغذية الحيوانات. كما يُزيد من خصوبة التربة بفعل بكتريا العقد الجذرية التي تتعايش مع جذوره وتثبت الأزوت الجوي، الأمر الذي يجعله يسهم بدور مهم في الدورة الزراعية (22).

تتركز زراعة العدس في معظم قارات العالم القديم والجديد، حيث يزرع في الهند وبنغلادش وباكستان ومصر واليونان وإيطاليا ومنطقة حوض البحر المتوسط، والساحل الأطلسي لإسبانيا والمغرب، وشمال أمريكا (22). أما في سورية، فتنتشر زراعته في المناطق الشمالية والشرقية والوسطى، بمساحة بلغت عام 2011 حوالي 139903 هكتاراً أنتجت 112470 طناً بمردود وسطي قدره 804 كغ/هـ (5). وتعدّ محافظات الحسكة وحلب وإدلب المناطق السورية الرئيسية لزراعة المحصول، حيث بلغت مساحة العدس المزروعة بها 58219، 53081، 20031 هكتاراً، أنتجت 29595، 67615، 27363 طناً بمردود وسطي 508، 886، 1366 كغ/هـ، على التوالي (5).

العدس، أو اختبار القدرة الإراضية لبعض عزلاته تحت ظروف الدفيئة (15، 19). كما استخدمت طريقة غمس جذور بادرات العدس في المعلق البوغي ومن ثم زراعتها في أنابيب اختبار تحتوي مستنبت هوجلاند السائلة (19)، أو شبه الصلبة (3). وأجري الإعداء بأقراص بقطر 5 مم مأخوذة من مستعمرات فتية لتقويم بادرات مدخلات من العدس في ظروف المختبر، كما استخدمت طريقة ري المخاريط الحاوية على خليط من التربة والرمل، والمزروعة ببادرات بعمر أسبوعين، بكمية 10 مل من معلق بوغي تركيز 10×2.5 بوغة كونيديا/مل ضمن ظروف الدفيئة للسبب ذاته، فيما استخدمت طريقة ري الأصص الحاوية على خليط معقم من الرمل والتربة والمزروعة ببادرات مدخلات العدس بكمية 200 مل/أصيص من معلق بوغي تركيزه 10×2.5 بوغة كونيديا/مل لتقويم أداء تلك المدخلات في طور النبات البالغ تحت ظروف الدفيئة (4)؛ واستخدم اسماعيل وآخرون (2) طريقة غمس البادرات المزروعة ضمن كؤوس بقطر 10 سم في معلق بوغي تركيزه 10×2 بوغة/مل لمدة 5 دقائق بعد سحبها وغسلها من التربة، ومن ثم إعادتها للكؤوس وإضافة 10 مل من المعلق لكل كأس لاختبار القدرة الإراضية لعزلات الفطر المسبب لمرض ذبول العدس تحت ظروف المختبر.

ونظراً لانتشار المرض وتوزعه الجغرافي الكبير، والجدل الحاصل حول وجود أو عدم وجود سلالات/أنماط مرضية للفطر المسبب للمرض، فقد هدفت الدراسة الحالية إلى تقويم طرائق مختلفة لتقويم القدرة الإراضية لعزلات مختلفة من الفطر *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis* المسبب لمرض الذبول الوعائي على العدس والتي جمعت من محافظات سورية مختلفة لتحديد درجة شراسة كل منها، ليصار لاحقاً إلى تحليل هذه السلالات جزيئياً بحثاً عن تباينات في مجتمع الفطر في سورية.

مواد البحث وطرائقه

المادة النباتية

تم إجراء اختبار القدرة الإراضية باستخدام الصنف "بريكوز" ILL4605 وهو صنف قابل للإصابة، ومعتمد عالمياً في هذا النوع من الاختبارات.

المادة الفطرية

تم اختبار عشرون عزلة مختلفة من الفطر المسبب لمرض الذبول الوعائي على العدس، تم عزلها وتلقيتها من نباتات مريضة جمعت عامي 2009 و2010 من حقول المزارعين ومراكز ومحطات الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية في سورية. واستخدم مستنبت بطاطا- دكستروز- آجار (PDA) في عزل اللقاح المعدي وإكثاره.

عزل الفطر

عزل الفطر من أجزاء الساق الواقعة فوق المنطقة التاجية بحدود 6-7 سم، إذ غسلت هذه المنطقة بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم تركيزه 0.525% لمدة خمس دقائق، ثم نشفت بين ورقتي نشاف، وقطعت إلى عشرة أجزاء، أعطيت أرقاماً تسلسلية، بحيث يشير رقم 1 للقطعة الأقرب للمنطقة التاجية، ورقم 10 للقطعة الأبعد عن منطقة التاج. زرعت القطع على سطح مستنبت PDA في أطباق بتري بشكل دائرة، وحضنت الأطباق عند 20°س لمدة 72 ساعة. أخذت نموات الفطر من القطع الأخيرة (ذات الأرقام 9 و10)، وتم تلقيتها على المستنبت نفسه، للحصول على مستعمرات وحيدة البوغ، والتي استخدمت في ما بعد لتحضير اللقاح المعدي.

طرائق الإعداء الاصطناعي

طريقة مستنبت هوجلاند مختبرياً - تم تقويم أداء عزلات الفطر المختبرة (20 عزلة) بتلقيتها في أنابيب اختبار زجاجية بطول 19 سم وقطر 2.5 سم، يحتوي كل منها على 20 مل من مستنبت هوجلاند شبه الصلب المعقم مع الأنابيب عند 121°س لمدة 20 دقيقة، ويتميز هذا المستنبت بأنه يناسب نمو الفطر والعائل النباتي (العدس) بأن واحد (9).

طُهرت بذور الصنف "بريكوز" ILL4605 بغمسها في محلول هيبوكلوريت الصوديوم تركيزه 0.525% لمدة خمس دقائق، ثم نُشفت بين ورقتي ترشيح، وزُرعت بواقع بذرة واحدة/أنبوب، وحُضنت الأنابيب عند 22 ± 3 °س لفترة إضاءة : ظلام 12:12 ساعة، وروقت لمدة 50 يوماً. تم التخلص من الأنابيب الملوثة وتلك التي احتوت على بذور غير نابذة. أُجري الإعداء الاصطناعي لبادرات بعمر أسبوعين، وذلك بوضع قرص (قطره 5 مم)، من كل مستعمرة من العزلات المدروسة بعمر أسبوع، بجانب منطقة التاج، أما معاملة الشاهد فقد اقتصر على مستنبت هوجلاند وبذور المدخل القابل للإصابة "بريكوز" ILL4605 بدون إعداء بالعزلات، ثم وُزعت الأنابيب وفقاً لتصميم العشوائي الكامل بثلاثة مكررات لكل عزلة. تم تقدير درجة الإصابة- باستخدام سلم النقييس 1-9 (9)، حيث: 1 = النباتات سليمة، لا توجد أعراض للإصابة، 3 = ظهور اصفرار بسيط غير مترافق بذبول، 5 = اصفرار يعم ثلثي النبات مترافق بعلائم ذبول بسيطة، 7 = ذبول يظهر على معظم أجزاء النبات غير مترافق بالموت، 9 = موت النبات أو أحد فروعه بشكل كامل. روقبت البادرات بانتظام وأخذت أربعة قراءات؛ بعد 15 يوماً، 20 يوماً، 25 يوماً و 30 يوماً من العدوى.

تحضير محلول هوجلاند - تم تحضير مستنبت هوجلاند شبه الصلب وفقاً للطريقة التي وصفت سابقاً (4) (جدول 1).

جدول 1. المحاليل الأساسية لتحضير مستنبت هوغلاند شبه الصلب.
Table 1. Basic solutions in Hoagland semi-solid medium.

الكمية Amount	الصيغة الكيميائية Chemical Name	اسم المادة Material Name
236.1 غ/ل	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	نترات الكالسيوم المائية Hydrated calcium nitrate
101.1 غ/ل	KNO ₃	نترات البوتاسيوم Potassium nitrate
136.1 غ/ل	KH ₂ PO ₄	بيكربونات البوتاسيوم Potassium bicarbonate
246.5 غ/ل	MgSO ₄ .7H ₂ O	كبريتات المغنيزيوم المائية Hydrated Magnesium sulfate
محلول العناصر النادرة/الصغرى يتكون مما يلي:		
2.8 غ/ل	H ₃ BO ₄	حمض البوريك Uric acid
1.8 غ/ل	MnCl ₂ .4H ₂ O	كبريتات المنغنيز المائية Hydrated manganese sulfatem
0.2 غ/ل	ZnSO ₄ .7H ₂ O	كبريتات الزنك المائية Hydrated zinc sulfate
0.1 غ/ل	CuSO ₄ .5H ₂ O	كبريتات النحاس المائية Hydrated copper sulfate
0.025 غ/ل	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	فوق موليبيدات الصوديوم المائية Hydrated sodium permolybdate
محلول أساسي لشلات الحديد Basic FeEDTA- solution		
10.4 غ	EDTA 2Na	شلات الصوديوم Chelated sodium
7.8 غ	FeSO ₄ .7H ₂ O	كبريتات الحديد المائية Hydrated iron sulfate
56.1 غ	KOH	ماءات البوتاسيوم Potassium hydroxide
لتحضير محلول شلات الحديد يتم تحضير ليتر واحد من ماءات البوتاسيوم ثم يضبط الـ pH على 5.5 بإضافة حمض الكبريت، بعدها تضاف مادة EDTA 2Na، ثم مادة FeSO ₄ .7H ₂ O ويتم تحضير ليتر واحد من محلول هوغلاند المراد استخدامه بأخذ ليتر واحد من الماء المقطر والمعقم ويضاف له:		
7 مل	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	نترات الكالسيوم المائية Hydrated calcium nitrate
5 مل	KNO ₃	نترات البوتاسيوم Potassium nitrate
2 مل	KH ₂ PO ₄	بيكربونات البوتاسيوم Potassium bicarbonate
2 مل	MgSO ₄ .7H ₂ O	كبريتات المغنيزيوم المائية Hydrated magnesium sulfate
1 مل	محلول العناصر النادرة	محلول العناصر النادرة Rare elements solution
1 مل	FeEDTA	شلات الحديد Chelated Iron
6 غ	آجار لجعل المستنبت شبه صلب	Agar

طريقة إعداد بادرات العدس في أصص بلاستيكية تحت ظروف الدفيئة - تم تقويم أداء 20 عذلة من الفطر المسبب لمرض ذبول العدس، تحت ظروف الدفيئة البلاستيكية، في أصص بلاستيكية، بأبعاد 25×20 سم مملوءة بخلطة معقمة من التراب والرمل بنسبة 1:1 بمعدل 3 كغ تربة/أصيص.

طُهرت بذور مدخل العدس القابل للإصابة ILL4605 سطحياً بغمسها في محلول هيبوكلووريت الصوديوم تركيز 0.525% لمدة خمس دقائق، ثم نشفت بين ورقتي ترشيح، وزرعت بواقع عشرة بذور/أصيص، وحُصنت عند 22±3°س نهاراً و 15±3°س ليلاً وفترة إضاءة 12:12 ساعة. رويت الأصص دورياً بمعدل ريتين في الأسبوع حتى عمر أسبوعين، ثم أجري الإعداد الاصطناعي للبادرات بطريقة الري بمعلق بوغي للفطر تركيزه 10×1⁶ بوغة كونيديا/مل، وبمعدل 200 مل/أصيص لكل عذلة من العزلات المدروسة فيما رويت معاملة الشاهد بكمية 200 مل ماء/أصيص. وبعد ذلك، تم تخفيف الري إلى رية واحدة في الأسبوع بغية إخضاع النبات لإجهاد رطوبي لتحفيز المرض على النمو وإحداث المرض (7).

نفذت التجربة وفق التصميم العشوائي الكامل بواقع ثلاثة مكررات لكل عذلة. وقدرت درجة الإصابة عند أول ظهور لأعراض الذبول على البادرات وبفترات زمنية منتظمة، إذ أخذت أربعة قراءات: بعد 20، 30، 40، و50 يوماً من الإعداد، وذلك باستخدام سلم التقييس 1-9 سابق الذكر.

طريقة الإعداد بتحميل الفطر على حبوب القمح والزراعة في أصص تحت ظروف الدفيئة - وُضعت كمية 450 غ من حبوب القمح في كيس مصنوع من النايلون الحراري، ثم أغلق الكيس بسدادة من القطن المثبت بالمطاط، وورق الألمنيوم، وتم تعقيمه عند 121°س لمدة 30 دقيقة. أعدت حبوب القمح المعقم، بخمسة أقراص (5 مم)، مأخوذة من كل مستعمرة من العزلات المدروسة عمرها أسبوع، وإضافة 50 مل من الماء المعقم والمقطر، وأغلق الكيس وتم رجّه من أجل تجانس اللقاح، ثم حُصنت الأكياس عند 22±3°س وفترة إضاءة 12:12 ساعة لمدة 15 يوماً مع تحريك الأكياس دورياً لضمان توزيع اللقاح المعدي على جميع الحبوب، وقد تم التخلص من الأكياس الملوثة.

حُصرت الأصص البلاستيكية سعة 3 كغ وملئت بخليط معقم من التربة والرمل بنسبة 1:1. وقبل الامتلاء، تم الإعداد بالفطر بإضافة ثلث حبوب القمح الحاملة للفطر/أصص، بينما أضيف لمعاملة الشاهد حبوب قمح معقمة غير حاملة للفطر ثم غطيت الأصص بطبقة رقيقة من التربة وقليلاً من البيتموس.

وبناءً على ما سبق يمكن تقسيم أداء العزلات في طوري البادرة والنبات البالغ (20 و 50 يوماً بعد الإعداء، على التوالي) إلى أربع مجموعات (ضعيفة الشراسة، متوسطة الشراسة، شرسة، وعالية الشراسة).

ويلاحظ أن جميع العزلات، في طور البادرة (بعد 20 يوماً من الإعداء) كانت في المجموعات الثلاث الأولى، بينما كانت جميعها في طور النبات البالغ (بعد 50 يوماً من الإعداء) في المجموعتين الثالثة والرابعة (جدول 3)، وهذا يعكس تطور المرض مع مرور الزمن، وتتوافق هذه النتيجة مع دراسات سابقة (4، 10) نفذت على المرض ذاته في كل من سورية والجزائر.

تقويم الأثر المشترك لطرائق الإعداء ورد فعل صنف العدس القابل للإصابة بإزاء العزلات المختلفة

يشير التحليل الإحصائي إلى وجود فروق معنوية للفعل المشترك بين طريقة الإعداء والعزلات المختلفة في طور البادرة (شكل 3)، حيث كان المتوسط العام لدرجة المرض 4.69 في مختلف طرائق الإعداء. واختلف تفاعل الصنف المختبر بإزاء العزلات المختلفة للفطر باختلاف طريقة الإعداء، فعند استخدام أنابيب هوجلاند كانت العزلة رقم 13 هي العزلة الأقل شراسة (غير شرسة) إذ كانت درجة الإصابة بها 2.33، بينما سجلت كل من العزلات 1، 7، 12، 14، 17، 18، 19 و 20 أعلى شدة للمرض (7.0). وفي طريقة الإعداء بري الأخص بمعلق بوغي، سجلت أدنى قيمة لدرجة المرض مع العزلات 8، 9 و 13، حيث كانت 1.67، بينما سجلت أعلى درجة إصابة (6.33) مع العزلة 2.

جدول 2. سلم مقترح لتصنيف العزلات السورية للفطر *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis* في مجموعات شراسة اعتماداً على السلم 1-9.

Table 2. Suggested scale for grouping Syrian isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis* into virulence groups based on a 1-9 scale.

مجموعة الشراسة للعزلات	درجة الإصابة	المجموعة
Isolates virulence group	Disease Severity	Group
ضعيفة الشراسة Avirulent	3.0-1.0	1 st group الأولى
متوسطة الشراسة Moderately Virulent	5.0-3.1	2 nd group الثانية
شرسة Virulent	7.0-5.1	3 rd group الثالثة
عالية الشراسة Highly virulent	9.0-7.1	4 th group الرابعة

طُهرت بذور مدخل العدس ILL4605 سطحياً بغمرها في محلول هيبوكلوريت الصوديوم كما سبق وصفه، وزرعت بواقع عشرة بذور/أصيص، ثم حُصنت في الدفيئة كما سبق ذكره. رويت الأصص دورياً بمعدل ريتين في الأسبوع حتى عمر أسبوعين، ثم خفف الري إلى رية واحدة في الأسبوع للأسباب سابقة الذكر.

نفذت التجربة وفق التصميم ذاته وقدرت درجة الإصابة بالطريقة السابقة.

التحليل الإحصائي

حللت البيانات إحصائياً باستخدام برنامج GenStat-12، وتمت المقارنة بين المتوسطات باستخدام اختبار دنكان عند مستوى احتمالية 5%.

النتائج والمناقشة

تقويم طرائق العدوى

اعتمدت القراءة الأولى (طور البادرة) والأخيرة (طور النبات البالغ) لدرجة الإصابة، في جميع طرائق العدوى، للتحليل الإحصائي. ومن الملاحظ ازدياد درجة الإصابة في طور النبات البالغ مقارنة مع مثيلتها في طور البادرة، إذ وصلت إلى 4.69 و 6.93، على التوالي. ويعزى هذا الاختلاف إلى تطور المرض بشكل تدريجي مع مرور الزمن.

بينت نتائج التحليل الإحصائي (شكل 1) وجود فروق عالية المعنوية بين طرائق العدوى، سواء في في طور البادرة أو في طور النبات البالغ. وكانت طريقة إضافة اللقاح المعدي إلى أنابيب هوجلاند هي الأفضل من حيث فترة حضانة المرض على النبات، أي سرعة تعبير العزلة عنذاتها. وتلتها طريقة العدوى بتحميل الممرض على حبوب القمح، وأخيراً طريقة العدوى في الأخص. وانتهت فترة الحضانة بعد 35، 60 و 95 يوماً بعد الإعداء بالطرائق الثلاث، على التوالي.

تقويم رد فعل صنف العدس "بريكوز" إزاء العزلات المختلفة

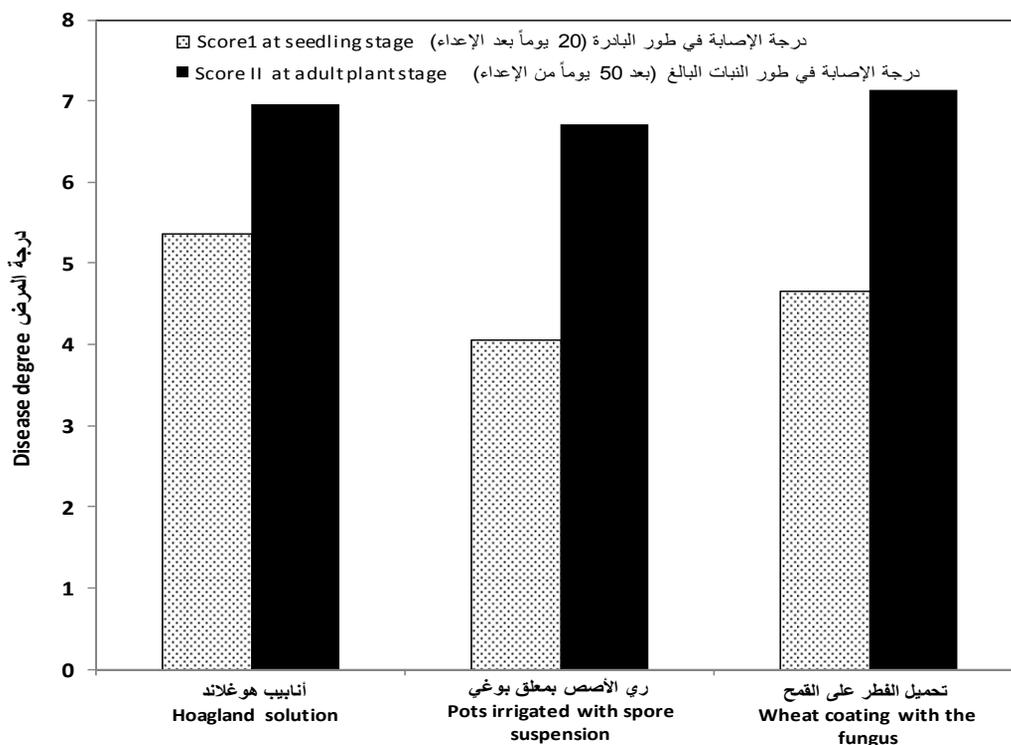
تباينت ردود فعل الصنف ILL4605 للعزلات المختلفة المدروسة بطرائق التقويم الثلاث سواء في طور البادرة أو في طور النبات البالغ. وقد بين التحليل الإحصائي وجود فروق عالية المعنوية بين العزلات عند كلتا القراءتين، وكانت أدنى قيمة لمتوسط درجة الإصابة في طور البادرة 1.89 مع العزلة 13 وأعلىها 6.56 مع العزلة 20. وكان أداها في طور النبات البالغ 5.0 مع العزلة 3 وأعلىها 8.78 مع العزلتين 17 و 20 (شكل 2).

واعتماداً على السلم 1-9 والمعدل بما يتناسب مع العزلات والمعتمد على درجة الإصابة، يمكن اقتراح سلم لتصنيف شراسة العزلات المختبرة (جدول 2).

جدول 3. مجموعات شراسة عزلات الفطر *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis* على المدخل ILL4605 المعدي بطرائق مختلفة تبعاً لدرجة إصابته في موعدين مختلفين، وفق السلم 1-9.

Table 3. Isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis* virulence groups, on ILL 4605 using different inoculation methods based on date of scoring disease severity on a 1-9 scale.

عالية الشراسة Highly Virulent	شراسة Virulent	متوسطة الشراسة Moderately virulent	غير شراسة Avirulent	موعد قراءة درجة الإصابة Timing of disease severity score
-	18، 6، 14، 7، 5، 1، 20، 12، 2، 19، 17	16، 15، 11، 8، 3	9، 4، 10، 13	الأولى (بعد 20 يوماً من الإعداء) First (20 days after inoculation)
6، 14، 7، 5، 1، 16، 20، 12، 2، 19، 17، 18	15، 11، 8، 3، 9، 4، 10	13	-	الأخيرة (بعد 50 يوماً من الإعداء) Last (50 days after inoculation)



شكل 1. تأثير ثلاث طرائق إعداء بالفطر *Foxysporum* f.sp. *lentis* في متوسط درجة إصابة المدخل القابل للإصابة (ILL4605) في القراءتين المبكرة (بعد 20 يوماً من الإعداء) والمتأخرة (بعد 50 يوماً من الإعداء)

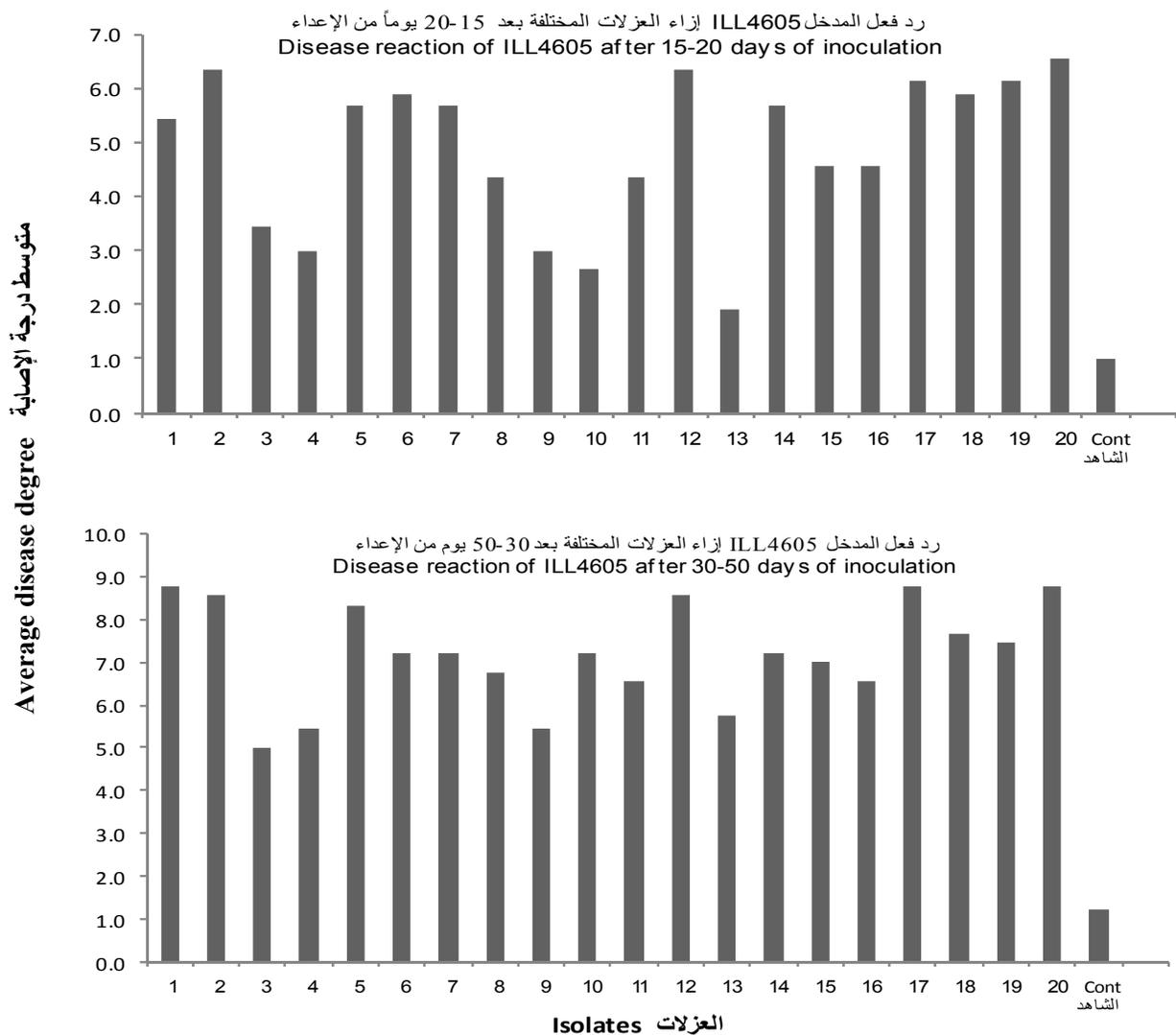
Figure 1. Effect of three inoculation methods by *F. oxysporum* f.sp. *lentis* on average disease severity of ILL 4605 at both early (20 days after inoculation) and late score (50 days after inoculation).

ومن الواضح (جدول 4) أن هناك تقارباً كبيراً في رد فعل صنف العدس المدروس إزاء العزلات المختبرة باستخدام طرائق الإعداء المختلفة، مع الإشارة إلى أن هناك تقارباً أكبر ما بين طريقتي الإعداء باستخدام أنابيب هوغلاند وتحميل اللقاح المعدي على حبوب القمح، في هذه المرحلة. ويعزى هذا التقارب إلى محاكاة كلتا الطريقتين لظروف المرض الطبيعية في الحقل، لذا واعتماداً على هذه النتائج يمكن النصح بهما لتقويم وغرلة العزلات المختلفة للمرض على الصنف الحساس في طور البادرات (4، 10).

أما في طريقة الإعداء بتحميل اللقاح المعدي على حبوب القمح، فكانت أقل درجة إصابة مع العزلة 13 (1.67) بينما سُجّلت أعلى درجة إصابة (7.0) مع العزلة 12. وعلى الرغم من هذه التباينات، يمكن القول أن جميع طرائق الإعداء استطاعت أن ترصد تعبير العزلات المختلفة على المدخل القابل للإصابة ILL4605. وباستخدام السلم المعدل الأنف الذكر، يمكن تقسيم العزلات تبعاً لشراستها إلى ثلاثة.

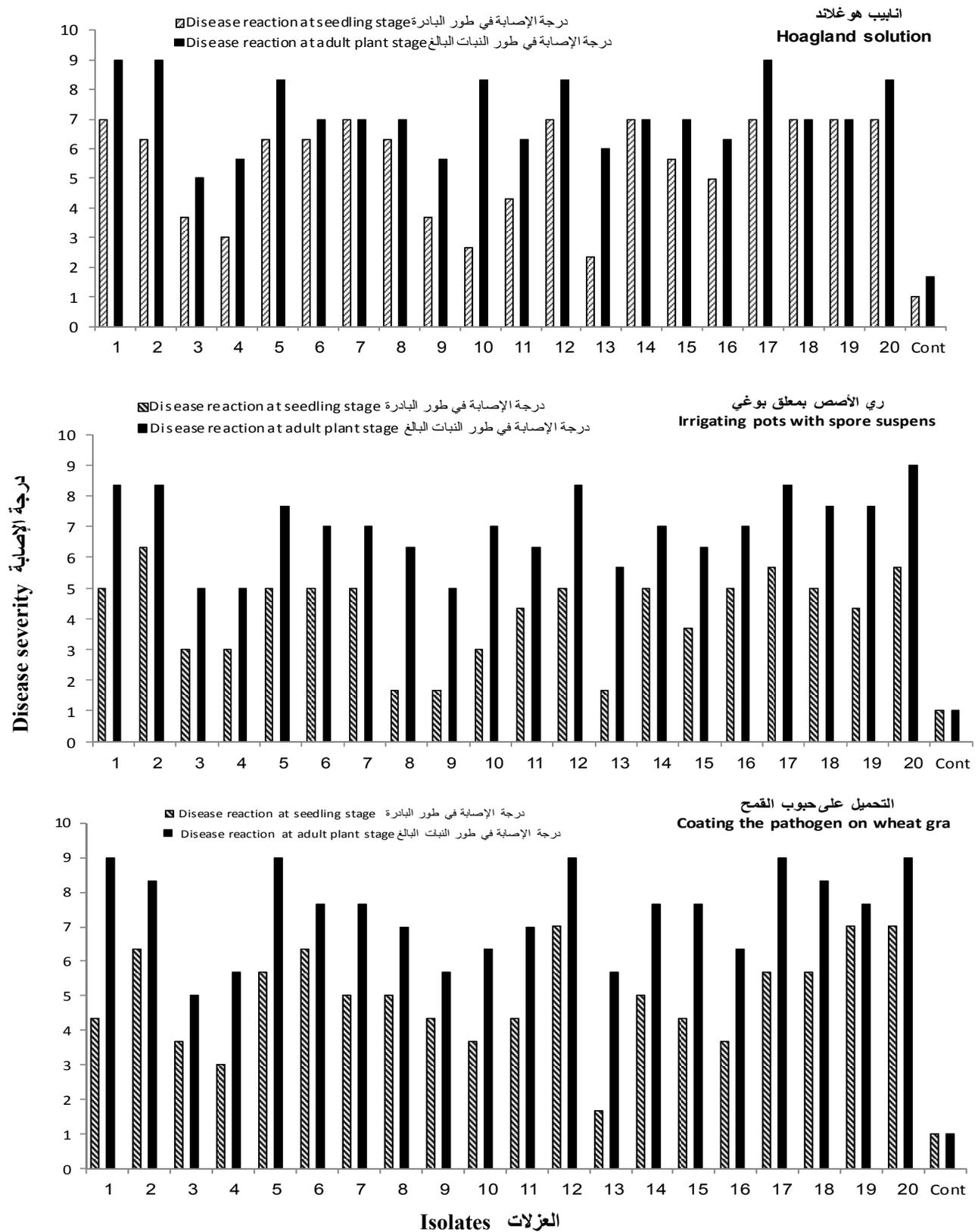
جدول 4. تصنيف العزلات تبعاً لشراسيتها على مدخل العدس القابل للإصابة ILL 4605 بطرائق مختلفة وفق السلم المعدل في طور البادرة.
Table 4. Virulence grouping of isolates at seedling stage using three inoculation methods.

عالية الشراسة Highly Virulent	شرسة Virulent	متوسطة الشراسة Moderately virulent	غير شرسة Avirulent	طريقة الإعداء Inoculation method
-	12, 7, 1, 8, 6, 5, 2, 15 20, 19, 18, 17, 14	16, 11, 9, 3	4, 10, 13	أنابيب هوغلاند Hoagland Tubes
-	2, 20, 17	6, 5, 1, 19, 11, 15 18, 16, 14, 12, 7	4, 3, 13, 9, 8 10	ري الأخص بمعلق بوعي Irrigating pots with spore suspension
-	18, 2, 6, 12, 19, 20 5, 17	15, 1, 9, 7, 8, 14 3, 10, 16, 11	4, 13	تحميل الفطر على حبوب القمح Coating the fungus on wheat grains



شكل 2. درجة الإصابة بالعزلات المختلفة على الصنف العدس القابل للإصابة (ILL 4605) في القراءتين المبكرة (بعد 20 يوماً من الإعداء) والمتأخرة (بعد 50 يوماً من الإعداء).

Figure. 2 Disease degree recorded on ILL 4605 with different isolates at both early (20 days after inoculation) and late score readings(50 days after inoculation).



شكل 3. التأثير المشترك لطرائق الإعداء والعزلات في متوسط درجة إصابة المدخل القابل للإصابة "بريكوز" IL 4605 وفق سلم التقييس (1-9) في طوري البادرة (بعد 20 يوم من الإعداء) والنبات البالغ (بعد 50 يوماً من الإعداء).

Figure 3. Effect of both inoculation methods and different isolates on average of disease severity of IL 4605 (at 1-9 scale) at seedling (20 days after inoculation) and adult plant (50 days after inoculation).

تقويم مدخلات من العدس إزاء عزلات ممرضة للفطر *F. oxysporum* f.sp. *lentis* (2، 3، 4، 10، 11). وعلى هذا، يمكن الاعتماد على أي من هذه الطرائق في تقويم شراسة العزلات المختلفة، ولا سيما طريقتي العدوى باستخدام أنابيب هوجلاند وتحميل اللقاح المعدي على حبوب القمح. وعلى حد علمنا، فإن الطريقة الأخيرة تستخدم لأول مرة في هذا النوع من الدراسات، وكانت الأفضل إذ أنها تحاكي الظروف الطبيعية للمرض في الحقل إلى حد كبير. وعموماً يمكن تلخيص ميزات وعيوب الطرائق السابقة المستخدمة بما يلي:

تتميز طريقة أنابيب هوجلاند بالسرعة في الحصول على النتيجة (30-35 يوماً بعد الإعداء)، ولا تحتاج إلى كميات كبيرة من الممرض أو بذور العائل؛ لكنها تتطلب دقة كبيرة في عملية الإعداء لتجنب التلوث. ويمكن أن ينمو الممرض على النبات العائل خارجياً، مما قد يقود إلى نتائج مضللة؛ أما طريقة ري البادرات بمعلق بوغي، فهي طريقة معتمدة من قبل العديد من الباحثين بيد أنها تتطلب دقة وجهداً كبيرين في تحضير اللقاح المعدي بالتركيز المطلوب، ومع ذلك فهي طريقة جيدة، لكنها تحتاج لوقت طويل قد يزيد عن ثلاثة أشهر؛ وأما طريقة تحميل الفطر الممرض على حبوب القمح، فهي طريقة جديدة، متوسطة من حيث الوقت المطلوب إذ تحتاج إلى 60 يوماً فقط، كما أنها تحاكي الظروف الطبيعية لتطور المرض.

أما فيما يخص القراءة الثانية (طور النبات البالغ) (جدول 5)، فقد أشار التحليل الإحصائي إلى عدم وجود فروق معنوية للتفاعل ما بين طريقة الإعداء والعزلات المختلفة، أي أنه يمكن استخدام جميع طرائق الإعداء لتقويم شراسة العزلات المختلفة. وقد بلغ المتوسط العام لدرجة الإصابة في هذه القراءة 6.93 في مختلف طرائق الإعداء، وكانت العزلة رقم 3 في طريقة الإعداء باستخدام أنابيب هوجلاند هي العزلة الأقل شراسة حيث كانت درجة الإصابة بها 5.0 بينما سجلت العزلات 1، 2 و 17 أعلى درجة إصابة للمرض (9.0).

وعند الري بمعلق بوغي للأصص، سجلت أدنى درجة إصابة (5.0) مع العزلات 3، 4 و 9، مقارنة مع العزلة 20 التي أعطت أعلى درجة إصابة (9.0). أما عند تحميل اللقاح المعدي على حبوب القمح، فسجلت أدنى درجة إصابة (5.0) مع العزلة 3، بينما سجلت أعلى درجة إصابة (9.0) مع العزلات 1، 5، 12، 17، 19 و 20. وباستخدام السلم المعدل الأنف الذكر يمكن تقسيم العزلات إلى ثلاثة مجموعات (جدول 5).

ولدى المقارنة ما بين نتائج شراسة العزلات وفق الطرائق المختلفة، يمكن القول أن هناك تشابهاً كبيراً ما بين جميع هذه الطرائق، أي أن جميع الطرائق كانت فاعلة من حيث تقويم درجة الإصابة. ويتوافق ذلك مع الكثير من الباحثين الذين استخدموا طرائق مختلفة في

جدول 5. تصنيف العزلات تبعاً لشراستها على مدخل العدس القابل للإصابة ILL4605 بطرائق مختلفة وفق السلم المعدل في طور النبات البالغ.
Table 5. Virulence grouping of isolates at adult plant stage using three inoculation methods.

طريقة الإعداء	غير شرسة Avirulent	متوسطة الشراسة Moderately virulent	شرسة Virulent	عالية الشراسة Highly Virulent
أنابيب هوجلاند Hoagland Tubes	-	3	4، 6، 7، 8، 9، 11، 13، 14، 15، 16، 18، 19	1، 2، 5، 10، 12، 17، 20
ري الأصص بمعلق بوغي Irrigating pots with spore suspension	-	3، 4، 9	7، 8، 10، 11، 13، 14، 15، 16	1، 2، 5، 12، 17، 18، 19، 20
تحميل الفطر على حبوب القمح Coating the fungus on wheat grains	-	3	4، 8، 9، 10، 11، 13، 16	1، 2، 5، 6، 7، 12، 14، 15، 17، 18، 19، 20

Abstract

Hussien, N.H., B. Bayaa, S. Ahmed, M. Baum and M.M. Yabraq. 2014. New method to screen *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis* isolates for pathogenicity. Arab Journal of Plant Protection, 32(2): 131-139.

This study aimed to evaluate three methods of inoculation, (i) inoculation of lentil seedlings grown in test tubes containing Hoagland semi-solid medium, (ii) seedling inoculation with small disks of colony isolates, (iii) seedlings irrigated with spore suspension in pots, iv) coating wheat grains with the pathogen. The advantages and disadvantages of each method were evaluated in order to select the best one to screen the isolates for pathogenicity. Results showed significant differences between the methods studied in the early seedling stage, but differences were not significant at the advanced plant stage. Results of isolates characterization for pathogenicity were close to each other in all methods used, with preference of coating wheat grains with the pathogen.

Keywords: lentil, *Fusarium* wilt, screening methods, pathogenicity test, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis*, Syria

Corresponding author: Bassam Bayaa, Faculty of Agriculture, Aleppo University, Syria, Email: b.bayaa@cgiar.org

References

12. **Bhalla, M.K., C. Nozzolillo and E. Schneider** 1992. Observation on the responses of lentil root cells to hypha of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology Journal*, 135: 335-341.
13. **Erskine, W. and B. Bayaa.** 1996. Yield Loss, Incidence and inoculum density associated with vascular wilt of lentil. *Phytopathology Mediterranean*, 36: 24-32.
14. **Khare, M.N.** 1981. Diseases of lentil. Pages 163-172. In: *Lentils*. C. Webb and G. Hawtin (eds.) ICARDA/CAB, UK.
15. **Mohammadi, N., H. Puralibaba, E. Mohammadi Goltapeh, A. Babaie Ahari and B. Pakdaman Sardood.** 2012. Advanced lentil lines screened for resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis* under greenhouse and field conditions. *Phytoparasitica*, 40: 69-76.
16. **Rozalianah, F.S. and M. Sariah.** 2006. Characterization of Malaysian Isolates of *Fusarium* from Tomato and Pathogenicity Testing. *Research Journal of Microbiology*, 1: 256-272.
17. **Sarker, A. and W. Erskine.** 2006. Recent progress in the ancient lentil. *Journal of Agricultural Science*, 144: 19-29.
18. **Stoilova, T. and G. Pereira.** 1999. Morphological characterization of 120 lentil (*Lens culinaris* Medik.) accessions. *Lens Newsletter*, 1&2: 7-9.
19. **Taheri, N., M. Fallahati Rostegar, B. Jafapour, A.R. Bagheri and V. Jahanbaghsh.** 2010. Pathogenic and Genetic Characterization of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis* by RAPD and IGS Analysis in Khorasan Province. *World Append Science Journal*, 9: 239-244.
20. **Tosi, L. and C. Cappelli.** 2001. First report of *Fusariumoxysporum* f. sp. *lentis* of lentil in Italy. *Plant Disease*, 85: 562.
21. **Wang, N. and J.K. Daun.** 2006. Effects of variety and crude protein content on nutrients and anti-nutrients in lentils (*Lens culinaris*). *Food Chemistry*, 95: 493-502.
22. **Yadav, S.S., D.L. McNeil and Ph.S. Stevenson.** 2007. *Lentis An Ancient Crop for Modern Times*. P.O. Box 17, 3300 AA Dordrecht, the Netherlands. 443pp
1. **الحسين، نعيم حسين، بسام بياعة، سعيد أحمد، مايكل باوم ومحمد موفق يبرق.** 2013. توزع مرض الذبول الوعائي المتسبب عن الفطر *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis* على محصول العدس في سورية، والعوامل المؤثرة في وبائية انتشاره. مجلة وقاية النبات العربية، 31: 29-37.
2. **إسماعيل، محمد فرحان، محمد هشام الزينب وأحمد الأحمد.** 2008. مسح حقلي للنيماطودا المتطفلة على العدس ومرض الذبول الوعائي الفيوزاريومي في محافظتي حلب وادلب، سورية. مجلة وقاية النبات العربية، 26: 110-117.
3. **بياعة، بسام، ويلي ارسكين وعباس عباس.** 1994. تقويم طرائق مختلفة لغربلة مدخلات من العدس لمقاومة/تحمل مرض ذبول العدس المتسبب عن الفطر *Fusarium oxysporum* f. *lentis* sp. مجلة وقاية النبات العربية، 12: 83-91.
4. **عباس، عباس.** 1995. التباين في بعض الصفات المزرعية والفيزيولوجية والتأثر عائلي/ممرض في فطر *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*. وتوريث المقاومة لذبول العدس في سورية. رسالة دكتوراة، كلية الزراعة، جامعة حلب، سورية، 143 صفحة.
5. **المجموعة الإحصائية السنوية.** 2012. جدول رقم (14)، وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، سورية.
6. **Armstrong, G.M. and J.K. Armstrong.** 1981. *Formae specialis and races of Fusarium oxysporum caused wilt diseases*, University Park, Pennsylvania State University Press. Pages 391-399.
7. **Bayaa, B. and W. Erskine.** 1990. A screening technique for resistance to vascular wilt in lentil. *Arab Journal of Plant Protection*, 8: 30-33.
8. **Bayaa, B., W. Erskine and L. Khoury.** 1986. Survey of wilt damage on lentils in northern Syria. *Arab Journal of Plant Protection*, 4: 118-119.
9. **Bayaa, B., W. Erskine and A. Hamdi.** 1995. Evaluation of a wild lentil collection for resistance to vascular wilt. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 42: 231-235.
10. **Belabid, L., M. Baum, Z. Fortas, Z. Bouznad and I. Eujayl.** 2004. Pathogenic and genetic characterization of Algerian isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis* by RAPD and AFLP analysis. *African Journal of Biotechnology*, 3: 25-31.
11. **Belabid, L., Z. Fortas, D. Dalli, M. Khiare and D. Amdjad.** 2000. Importance du flétrissement de la pourriture racinaire de la lentille dans le nord-ouest Algérien. *Cahiers Agricultures* 9: 515-518.

Received: March 11, 2013; Accepted: April 16, 2013

تاريخ الاستلام: 2013/3/11؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2013/4/16