تأثير بعض مصادر النيتروجين والكربون على نمو الفطر *Mauginiella scaettae* cav. المسبب لمرض خياس طلع النخيل

عبد الله حمود السعدون سمير خلف عبد الله عبد النبي هادي العيسى

جامعة البصرة / كلية العلوم / قسم علوم الحياة

الخلاصة

درس تأثير مصادر من النيتروجين والكربون على نمو ثلاث عزلات من الفطر ***Mauginiella scaettae*** المسبب لمرض خياس طلع النخيل، وقد ظهر أن أفضل نمو لعزلات الفطر كان بوجود مصادر النيتروجين العضوية وأبرزها الببتون، أما بوجود مصادر النيتروجين اللاعضوية فكان ضعيفاً وخاصة على المصدرين $NaNO_3$ و KNO_3 ، ووجد أن أفضل مصادر الكربون تمثيلاً من قبل عزلات الفطر هي الكالاكتوز والكلوكوز واقلها استغلالاً البكتين والنشأ.

المقدمة

بالرغم من الاهمية الاقتصادية للفطر *Mauginiella scaettae* المسبب لمرض خياس طلع النخيل Date palm inflorescence rot، الا انه لم ينل الاهتمام الكافي خاصة في الجوانب الفسلجية سواء في العراق او العالم، ومن الدراسات التي تناولت هذا الجانب الحسن ووليد (١٩٧٧) و Michael و Sabet (١٩٧٠).

يعد النيتروجين مصدراً ضرورياً للنمو والتطور الفطري، فالفطريات تحتاج الى النيتروجين لصنع مختلف المكونات الخلوية الضرورية والتي تشمل الاحماض الامينية والبروتينات والاحماض النووية والكايتين ومختلف الفيتامينات، وان اغلب الفطريات قادرة على استغلال النيتروجين غير العضوي البسيط بالاضافة الى المصادر العضوية مثل الاحماض الامينية . اما مصادر الكربون فانها تؤدي وظيفتين اساسيتين في فسلجة الفطريات والاحياء المتباينة التغذية heterotrophic وهما: تجهيز الكربون الضروري لتصنيع المكونات الاساسية مثل الكربوهيدرات Carbohydrates والبروتينات Proteins والدهون Lipids والاحماض النووية Nudeic acid، اكسدة هذه المركبات يجهز مصدراً للطاقة للوظائف الخاصة في عمليات الحياة الاساسية في الفطريات Garraway و Evans (١٩٨٤). من خلال الاطلاع على المصادر المتوفرة، دراسة واحدة Michael و Sabet (١٩٧٠) تناولت تاثير بعض مصادر النيتروجين والكربون على نمو الفطر *M. scaettae* ولهذا اجريت هذه الدراسة لتغطية هذا الجانب من فسلجة الفطر.

المواد وطرائق العمل

جمع نماذج الطلع:

اختبر موقعين من بساتين النخيل لجمع نماذج الطلع منها، الاول في منطقة كتيبان شرق محافظة البصرة والثاني في قضاء سوق الشيوخ جنوب محافظة ذي قار . جمعت نماذج الطلع المصاب لاصناف مختلفة من نخيل التمر، وضعت في اكياس من النايلون كلاً على انفراد ، وجلبت الى المختبر لغرض عزل الفطر الممرض منها.

عزل المسبب الممرض:

اخذت قطع صغيرة (٣سم تقريباً) من الاجزاء المصابة وعقمت بمحلول الصوديوم هايبوكلورايت ١% لمدة دقيقتين، ثم غسلت بماء مقطر معقم، ثم جففت بورق ترشيح معقم، ولغرض حث الفطر على انتاج الابواغ Sporulation ، وضعت القطع المصابة التي المعقمة في اطباق بتري معقمة ذات قطر (١٥سم) ، حاوية على اوراق ترشيح معقمة ومبللة بالماء المقطر المعقم، حضنت هذه الاطباق تحت درجة حرارة (25°م) لمدة خمسة ايام. بعد الحضن ، نقلت ابواغ او خيوط فطرية من القطع المصابة بوساطة ابرة معقمة تحت مجهر التشريح Microscope Dissecting الى اطباق بتري ذات قطر (٩ملم) حاوية على وسط اكار الدكستروز والبطاطا (PDA) وحضنت الاطباق تحت درجة حرارة (25°م).

بعد سبعة ايام من الحضن تم الحصول على عزلات نقية مصدرها كونيدات مفردة او اطراف هايفات مفردة . حفظت العزلات النقية في الثلاجة لاستخدامها في اجراء الاختبارات المختلفة .

استخدم في هذه الدراسة وسط اساسي basic medium هو Czapek Dox لتحديد تمثل Assimilation مختلف مصادر النيتروجين والكربون.

ولتوحيد نسب النيتروجين والكربون في المصادر المختلفة طبق القانون التالي:

$$\frac{\text{الوزن الذري Atom. Wt}}{\text{الوزن الجزيئي Mol. Wt}} \times \text{الوزن wt =وزن النيتروجين او الكاربون في المصدر المثبت في الوسط القاعدي}$$

وبعمل نسبة وتناسب استخرجت اوزان المصادر المراد اضافتها الى الوسط ، اما المصادر التي لا تعرف او غير محددة اوزانها الجزيئية، وهي البكتين Pectin والببتون Peptone والنشا Starch وملح الصوديوم لكربوكسي مثيل السيليلوز Carboxymethyl cellulose sodium salt (CMC) فقد اضيفت بنسبة ١%.

في الجزء الاول من الدراسة ثبت فيها مصدر الكربون وهو السكروز وغير مصدر النيتروجين، وقد اختبر (١١) مصدراً للنيتروجين مع عمل سيطرة Control وهي احتواء الوسط على مصدر للكربون (السكروز).

في الجزء الثاني ، عكست العملية فقد ثبت مصدر النيتروجين وهو نترات الصوديوم $NaNO_3$ وغير مصدر الكربون، وفيه استخدم (١٣) مصدراً للكربون مع سيطرة أي احتواء الوسط على مصدر نيتروجين فقط.

بعد تحضير الاوساط الحاوية على مصادر مختلفة، قسمت في دوارق زجاجية سعة (١٠٠) مل بحيث احتوى كل منها على (٢٥) مل من كل وسط وبثلاث مكررات لكل عزلة، ثم عقمت الدوارق في جهاز التعقيم، وتم قياس الرقم الهيدروجيني لكل مجموعة من الدوارق في كل حالة بعد التعقيم.

باستخدام المثقب الفليني Cork borer قطر (٤) ملم نقل لقاح من مزارع نقية للعزلات المنتخبة C و H و K بعمر عشرة ايام الى الدوارق المعدة للاختبار، ثم حضنت الدوارق تحت درجة حرارة (٢٥°م) ولمدة (١٠) يوماً.

بعد الحضن اجريت عملية الترشيح لاستخراج الوزن الجاف لكل عزلة، وتم قياس الرقم الهيدروجيني النهائي في كل حالة.

تم قياس الرقم الهيدروجيني النهائي في كل حالة، ونظمت النتائج في جداول لايجاد اكثر المصادر تمثيلاً من العزلات المختلفة للفطر المسبب.

النتائج والمناقشة

ظهر في هذه الدراسة ان الفطر *M. scaettae* له القدرة على استغلال مصادر مختلفة من النتروجين وان اختلفت كمية النمو بوجود المصادر مع قدرة اعلى للفطر في استغلال معظم مصادر النتيروجين العضوية المختبرة مما هو عليه في المصادر اللاعضوية وعليه فان الفطر يوضع في الصنف الثالث Class٣ حسب التقسيم الذي وصفه Garraway و Evans (١٩٨٤) والذي تم فيه تقسيم الفطريات الى اربع اصناف غذائية Nutritional classes اعتماداً على قدرتها على استغلال النيتروجين الجزيئي (N_2)

والنترات Nitrate والنتريت Nitrite والامونيا ومركبات النيتروجين العضوية فالصنف الثالث Class٣ لـه القدرة على استغلال مصادر النيتروجين العضوية او الامونيا ولكن ليس النترات وان بعض انواع مركبات النيتروجين في هذا الصنف قد تستخدم بفعالية اكبر من المركبات الاخرى وهو ما حدث بالنسبة للفطر *M. scaettae* جدول (١) ويلاحظ من الجدول ايضاً ان هناك اختلاف في كمية النمو بين عزلة واخرى بوجود المصدر نفسه.

يذكر Garraway و Evans (١٩٨٤) ان التباين في استغلال المصادر النيتروجينية موجود حتى بين العزلات المختلفة للنوع نفسه. من ملاحظة الجدول (١) فان احسن مصادر النيتروجين تمثيلاً من قبل عزلات الفطر *M. scaettae* هو الببتون peptone ولو ان الوزن الجاف لعزلة (K) بوجود هذا المصدر اقل بقليل مما بوجود حامض الكلوتاميك Glutamic acid ولكن عموماً فان الفرق واضح باستخدام هذا المصدر قياساً للمصادر الاخرى، وان هذه النتيجة تتطابق مع ما توصل لها Michael و Sabet (١٩٧٠) في ان الببتون من حيث النيتروجين ملائمة للنمو، يلي الببتون من حيث كفاءة النمو حامض الكلوتاميك Glutamic acid واليوريا Urea وكبريتات الامونيوم $(NH_4)_2SO_4$.

يذكر Garraway و Evans (١٩٨٤) ان اغلب الفطريات يمكنها استخدام الامونيا كمصدر للنيتروجين وان استغلال الامونيا من اغلب الفطريات مترافق مع انخفاض في الرقم الهيدروجيني (pH) في الوسط الزرعي . وهو ما ثبت في هذه الدراسة حيث انخفض الرقم الهيدروجيني الابتدائي من (٧,٣) الى (٤,٤) وهو الرقم الهيدروجيني النهائي.

اما مصادر الاسبارجين Asparagine والالاينين Alanine وحامض الاسبارتك Aspartic acid استغلت من قبل عزلات الفطر ولكن اقل مما في المصادر السابقة ويلاحظ ايضاً التفاوت في النمو بين العزلات في هذه المصادر الثلاثة وغيرها من المصادر الاخرى المستخدمة.

لم تكن مصادر النيتروجين العضوية المتمثلة بالاحماض الامينية الكلايسين Glycine واللايسين Lysine مشجعة لنمو عزلات الفطريات وكان الوزن الجاف اقل من السيطرة Control وعلى هذا تعتبر كمصادر غير مستغلة من الفطر، وان سبب عدم استغلال المصدر الاخير اللايسين Lysine هو اما عدم

كفاءة خطوة ما في الممر المعقد لتحطم اللايسين أو لتكوين مواد وسطية ضارة والتي تتجمع عندما يكون اللايسين كمصدر وحيد للنيتروجين .(Leslie ، ١٩٨٦).

اما مصادر النيتروجين اللاعضوية ، نترات الصوديوم ونترات البرتاسيوم KNO_3 فيلاحظ كما هو واضح في الجدول (١) ان الوزن الجاف بوجود هذه المصادر ولكل العزلات اقل مما هو في السيطرة Control ، وهذا يعني عدم قدرة الفطر على استخدامها كمصادر للنيتروجين، ولقد ذكر Whitaker (١٩٧٦) ان بعض المجاميع الفطرية غير قادرة على استخدام النترات ويعزى سبب ذلك الى عدم قدرتها على تصنيع انزيم Nitrate reductase ، وللسبب نفسه يمكن تعليل عدم قدرة نمو الفطر *M. scaettae* بوجود النترات. وهذه النتيجة لاتتفق مع ما توصل لها Michael و Sabet (١٩٧٠) فقد ظهر ان الوزن الجاف للفطر عند استخدام نترات البوتاسيوم KNO_3 كمصدر للنيتروجين اعلى مما في السيطرة ، ولو ان الفرق قليل وان هذا المصدر اضعف المصادر النيتروجينية الخمسة المختبرة في دراستهم لنمو الفطر .

وفي هذه الدراسة تم اختبار تاثير مصادر مختلفة من الكربون على نمو عزلات الفطر *M. scaettae* ، وظهر كما هو واضح في الجدول (٢) ان الفطر له القدرة على استغلال معظم المصادر المختبرة وان الفرق في الوزن الجاف بوجود المصادر المختلفة ليس كبيراً ماعدا بوجود المصادر البكتين Pectin والنشا Starch وCMC فهي (أي عزلات الفطر) تستخدم السكريات الاحادية Monosaccharides الخماسية الكاربون Pentose (الزايلوز Xylose) والسداسية Hexoses (الكالاكتوز Galactose والكلوكوز Glucose والفركتوز Fructose) اضافة الى السكروز Sucrose من السكريات الثنائية Disaccharides افضل من المصادر الاخرى.

عند مقارنة تاثير مصادر السكروز والفركتوز على نمو عزلات الفطر في هذه الدراسة مع دراسة Michael و Sabet (١٩٧٠) نجد التقارب واضحاً في النمو بين الدراستين السكروز هو المصدر الاكثر ملائمة لنمو الفطر في دراستهم ، في حين في هذه الدراسة تفادت نمو العزلات بوجود السكروز ولكن عموماً كما ذكر سابقاً فان الفرق في النمو بين العزلات على هذا المصدر والمصادر المذكورة اعلاه ليس كبيراً. يستغل السكروز من اغلب الفطريات المرضية Pathogenic fungi افضل من السكريات الاخرى

Asina وجماعته (١٩٧٧) . وفي هذه الدراسة يظهر بوضوح ان هذا السكر يستغل من عزلات الفطر بصورة جيدة ولكن يقل قليلاً عن بعض المصادر الاخرى من خلال الوزن الجاف، اما الكلوكوز يستغل بشكل واسع كمصدر للكربون خاصة وانه السكر المكون لكثير من السكريات الثنائية والمعقدة Griffin (١٩٨١) وفي هذه الدراسة يستغل بشكل جيد من عزلات الفطر وخاصة عزلة (K) ويلاحظ من الجدول (٢) ان اعلى وزن جاف كان باستخدام هذا المصدر الكربوني. وذكر Griffin (١٩٨١) ان الفركتوز من السكريات الشائعة والتي تلي الكلوكوز ويستغل بشكل واسع، وفي هذه الدراسة نلاحظ تمثيل هذا المصدر بشكل واضح.

ذكر Mayer وجماعته (١٩٧٣) ان الزايلان Xylan وهو متعدد polymer من سكر الزايلوز ويعد من مكونات بعض جدران خلايا النباتات . اما السكر السداسي السوربوز Sorbose فقد استغل بصورة جيدة من عزلات الفطر وخاصة عزلة (H) ، وهذا يعني ان الفطر يمتلك طريق التفاعل الاختباري Alternative pathway في التنفس، وذكر Hasija و Agarwal (١٩٧٨) ان السوربوز يتداخل مع طريق تفاعل التنفس Respiratory pathway ، وان الفطريات التي تمتلك طريق التفاعل الاختباري Alternative pathway هي فقط تستطيع ان تستغل هذا المصدر الكربوني.

ان العزلات المختلفة للفطر اظهرت نمو متقارباً عند اضافة سكر المالتوز كمصدر للكربون ، وان هذا المصدر في دراسة Michad و Sabet (١٩٧٠) جاء بعد السكروز والفركتوز والكلوكوز من ناحية كفاءة النمو عند استخدامه في الوسط القاعدي. كذلك يظهر من الجدول (٢) ان الفطر له القدرة على تمثيل السكر الثنائي اللاكتوز ولكن النمو اقل مما بوجود السكريات السابقة الذكر.

ويتبين من الجدول (٢) قدرة الفطر على استغلال حامض الستريك وهو من الاحماض العضوية الثلاثية الكربوكسيل والتي تشترك في دورة كريبس Kreds cycle في عملية التنفس.

ان استغلال عزلات الفطر حامض التانيك Tannic acid كمصدر للكربون يؤكد قدرة الفطر على افراز انزيم الفينول اوكسيديز Phenol oxidase السعدون واخرون (٢٠٠٤). ان اكسدة حامض

التانيك تعتبر فحصاً موجباً لفعالية انزيم البولي فينول اوكسيديز والذي يشترك في عملية تحليل اللكنين Davidson وجماعته (١٩٣٣)، Gessner (١٩٨٠)، Trigiano و Fergus (١٩٧٩).

ان المصادر التي لم يتمكن الفطر من تمثيلها هي ملح الصوديوم لكربوكسي مثيل السيليلوز Carboxymethyl cellulose sodium salt (CMC)) والبكتين Pectin والنشأ Starch .

فالمصدر الاول (CMC) لم يتمكن الفطر من استغلاله خلال فترة الحضن (٢٠) يوماً ، ولكن لوحظ بعد فترة تجاوزت الاربعين يوماً تحلل مادة (CMC) حتى اصبح بالامكان ترشيح الوسط بعد هذه الفترة من الحضن ، وهذا مما يتطابق مع الفعالية الضعيفة لانتاج انزيم السليوليز Cellulase من عزلات الفطر كافة. السعدون واخرون (٢٠٠٤).

اما عدم استغلال البكتين من قبل عزلات الفطر فلم تتطابق هذه النتيجة مع ما تم التوصل له في دراسة السعدون (١٩٨٩) عن الفعالية العالية جداً لعزلات الفطر في انتاج انزيم البكتنيز بنوعيه Polygalacturonase والـ Pectate Lyase . ويرجع السبب الاساس لعدم استخدام الفطر البكتين هو الرقم الهيدروجيني (pH) غير الملائم لانتاج الانزيمين اعلاه المحللين للبكتين، فيظهر من الجدول (٢) ان الرقم الهيدروجيني الابتدائي هو (٤) . ويذكر Rombouts و Pilnik (١٩٨٠) ان الرقم الهيدروجيني (٥) هو المثالي لفعالية انزيم البولي كلاكتوروينز Polygalacturonase في اغلب الفطريات.

يؤكد Hankin و Anagnostakis (١٩٧٥) انه لملاحظة او الكشف عن الانزيمات اعلاه (البولي كالاكتورونيز والبكتين لايبيز) يجب ان تكون الاوساط في الرقم الهيدروجيني الصحيح أي في (٥ و ٧).

تتفق نتيجة الكشف السالب لانزيم الاميليز لعزلات الفطر السعدون واخرون (٢٠٠٤) مع عدم قدرة العزلات على تمثيل النشا عند استخدامه كمصدر للكربون . فالنشأ يتحلل بفعل الانزيمات المسماة الاميليزات Amylases . Agrios (١٩٧٨) ، وبما ان الفطر في دراسة السعدون واخرون (٢٠٠٤) غير قادر على افراز أي منها لذا فالنمو ضعيف جداً بوجود النشا و اقل من السيطرة رغم النمو الضعيف جداً في السيطرة ايضاً (أي عند استخدام مصدر النيتروجين فقط).

ان هذه النتيجة –عدم قدرة الفطر على استغلال النشأ – مغايرة تماماً للنتيجة التي توصل لها Michael و Sabet (١٩٧٠) وهي امكانية الفطر على النمو بوجود النشا وان هذا المصدر من اكثر المصادر الخمسة في دراستهم ملائمة لنمو الفطر وخاصة بعد (١٥) يوماً من الحضن فهو يلي الكلوكوز.

المصادر

الحسن، خليل كاظم وبرهان خالد وليد (١٩٧٧). دراسة بايولوجية على الفطر *Mauginiella scaettae* cav. المسبب لمرض خياس طلع النخيل. الكتاب السنوي لبحوث وقاية المزروعات. ١: ١٨٤-٢٠٦. بغداد .

السعدون، عبد الله حمود، عبد الله، سمير خلف والعيسى ، عبد النبي هادي (٢٠٠٤). دراسة النشاط الانزيمي خارج الخلوي للفطر *Mauginiella scaettae* الممرض لخياس طلع النخيل. مجلة البصرة لابحاث نخلة التمر. المجلد ٣ : ١-١٢.

Agrios, G.N. (1978). Plant pathology. Second edition pp. 39-57, Academic press, New York, London.

Asina, S. ; Jain, K. and Cain, R.F. (1977). Factors influencing ascopore germination in three species of *Sporormiella.* Can. J. Bot. 55(14): 1908-1914.

Davidson, R.W. ; Campbell, W.A. and Blaisdell, D.J. (1938). Differentiation of wood-decaying fungi by their reaction on gallic or tannic acid medium Jour. Agric. Res. 57: 683-695.

Garraway, M .O. and Evans, R.C. (1984). Fungal nutrition and physiology. John Wiley and sons. New York and Toronto.

Gessner, R.V. (1980). Degradative enzyme production by salt-marsh fungi. Bot. Mar. 23: 133-139.

Griffin, H.A. (1981). Fungal physiology. John Wiley and sons. New York and Toronto.

Hasija, K. and Agarwal, H.C. (1978). Nutritional physiology of *Trichothecium roseum*. Mycologia, 70: 47-60.

Leslie, J.F. (1986). Utilization of nitrogen sources by *Gibberella zeae*. Mycologia 78(4): 568-576.

Meyer, B.S. ; Anderson, D.B. ; Bohning, R.H. and Fratiame, D.G. (1973). Introduction to plant physiology. D.Van nostrand company. New york.

Michael, I.F. and sabet, K.A. (1970). Biology and control of *Mauginiella scaettae* cav. The pathogen of klamedj disease in the United Arab Republic. Ann. Date Grower's Instit. 47:5-8.

Rombouts, F.M. and Pilnik, W. (1980). Pectic enzymes In: Microbial enzymes and bioconversious 9A.H. Rose, ed.) Academic press, London, pp. 227-282.

Trigano, R.N. and Fergus, C.L. (1979). Extracellular enzymes of some fungi associated with mushroom culture. Mycologia 71: 908-917.

Whitaker, A. (1976). Amino acid transport in fungi: An essay. Trans. Brit. Mycol. Soc. 67: 365-376.

Effect of different nitrogen and carbon sources on the growth of *Mauginiella scaettae* the causal pathogen of inflorescence rot disease of date palm

Abdullah H. AL-Saadoon , Samir K. Abdullah and Abdulnabi H. AL-Issa.

Biology Department , College of Science , University of basrah

Abstract

The effect of different nitrogen and carbon sources on the growth of the three isolates of *Mauginiellae scaettae* were investigated . The study revealed that the fungus utilized a broad range of nitrogen and carbon sources. Among nitrogen sources, maximum growth was obtained on medium containing organic nitrogen sources such as peptone. Less growth occurred in Inorganic nitrogen sources such as $NaNO_3$ and KNO_3. Maximum growth occurred on media supplemented with galactose or glucose as carbon sources , while less growth was observed on media containing pectin or starch.