عزل وتعريف البكتيريا المسببة لمرض لفحة أوراق الكافور في بعض مناطق الجبل الأخضر *Xanthomonas axonopodis pv. Eucalypti*

نجية محمد جادالله، غزالة ابراهيم الفضيل ، حنان صالح عبدربه
قسم وقاية النبات - كلية الزراعة- جامعة عمر المختار- البيضاء ليبيا ص ب ٩١١.

Submitted August 7, 2022; Accepted November 20, 2022; Published December 18, 2022

الملخص

أجريت هذه الدراسة في بعض مناطق الجبل الأخضر(البيضاء , الستلونة ,المنصورة , قصر ليبيا) ، لتحديد مسبب إصابة أشجار الكافور بالبقع واللفحة البكتيرية خلال العام ٢٠٢٠/٢٠٢١ ,حيث تم الحصول علي أربعة عزلات بكتيرية من أوراق الكافور المصابة لمختلف المناطق, تم تعريفها عن طريق الإختبارات المورفولوجية والفسيولوجية والباثولوجية, تبين أن العزلات جميعها سالبة الصبغة عصوية الشكل مفردة الخلايا وأعطت أعراض موت علي نباتات التبغ والتي تدل علي إيجابيتها لإختبار فرط الحساسية وأظهرت نتائج القدرة على أحداث المرض إيجابيتها مع العزلات البكتيرية وأعطت أعراض التبقع واللفحة بعد أسبوع علي الطماطم وأما أوراق الكافور أعطت تلون الأوراق خلال ٤٨ ساعة بناء علي الخصائص الحيوية والبيوكيمائية والقدرة على أحداث المرض التي تتميز بها العزلات ،تبين إرتباط الإعراض بيكتيريا Xanthomonas axonopodis pv.Eucalyptorum وبينت نتائج تأثير درجات الحرارة علي نمو البكتيريا بأن هناك فروق معنوية بين العزلات حيث كانت علي نمو للبكتيريا عند درجة ٣٧ درجة مئوية وكذلك لاحظنا الفروق باختلاف المواقع وسجل نمو جميع العزلات خلال ٢٤ ساعة أعلي معدل للنمو.

الكلمات المفتاحية : Xanthomonas axonopodis pv.Eucalyptorum ولفحة البكتيريا, صبغة جرام , البيئات الإنتقائية للبكتيريا الإختبارات الفسيولوجية والبيوكيماوية

المقدمة INTRODUCTION

يعد اليوكالبتوس / الكينا *Eucalyptus spp.* من الأشجار دائمة الخضرة تنتمي للعائلة الآسية Myrtaceae (Brooker, 2000) ويضم هذا الجنس أكثر من٦٠٠ نوع وتعد استراليا الموطن الأصلي له (بدر،٢٠٠٣) يستخرج من هذه الأشجار زيت طيار(زيت الكافور) يمكن إستخدامه طبياً وتأتي قوتها العلاجية من خلاله, يمكن إستعمال خشبها في مجالات عديدة كتحضير العجينة الورقية وصناعة السيليلوز والخشب والفحم وغيرها (السويدي وآخرون،٢٠٢٠).

أدخلت أنواع عديدة من هذه الشجرة إلي ليبيا في ١٩٠٠, إلا أن بعضها لم ينجح وأفضل أنواع اليوكالبتوس التي ثبت نجاحها نوعين هما *E.gomphocephala, E.camaldulensis* (الشقلاف, ٢٠٠٩) وبُسبب سرعة النمو وملائمتها لمختلف الأجواء والأراضي فقد إنتشرت زراعة اليوكالبتوس في العديد من أقطار العالم (Gessesse and Teklu, 2011) وينتشر فطر *Harkenessia sp* علي مدي واسع مرفقاً لأوراق وأفرع عدة غوائل نباتية (Sankaran *et.al.*,1995) وقد سجل الفطر المسبب لمرض لفحة الأوراق علي أشجار النوع *E.pulverulenta* في استراليا Barber *et al.*, (2003). وهو أحد الأشجار دائمة الخضرة، المعمرة، تتعرض أشجار اليوكالبتوس في العديد من دول العالم للعديد من الأمراض النباتية حيث سجل أكثر من ٤٠٠ نوعا لمرض تبقع ولفحات الأوراق في العالم (Crousal *et al.*, 1993) من بين الأمراض التي تصيب الأوكالبتوس مرض اللفحة البكتيرية في الأوراق.

إرتبطت أنواع بكتيرية مختلفة مصاحبة للأوراق في العديد من البلدان وفقًا (Gonçalves *et al.*,2008) للسجلات الأولى لفحة الأوراق البكتيرية في البرازيل تعود إلى أوائل التسعينيات، عندما تم الكشف عن مسببات الأمراض *Pseudomonas cichorii* و *Xanthomonas sp* في نبات الكينا، ميز المرض بوجود لفحة علي الأوراق والعنق نخر، مصحوبًا في كثير من الأحيان بالثقوب المركزية. يمكن أن يؤثر أيضًا على السيقان والفروع يمكن أن تسبب لفحة الأوراق البكتيرية أضرارًا كبيرة وتساقطًا شديدًا للأوراق نتيجة للإصابة (Alfenas, 2009, Gonçalves *et al.*, 2008) في ظل ظروف مواتية للمرض، يعتبر من أهم أمراض اليوكالبتوس خلال مرحلة إنتاج الشتلات في البرازيل، وخاصة في المناطق الدافئة، بشكل أساسي عندما يقترن بكثافة وتكرار أكبر من هطول الأمطار في الآونة الأخيرة، من بين اللفحات البكتيرية العوامل الرئيسية المحددة التي تساعد البكتيريا بالنمو والتكاثر لليوكالبتوس (Gonçalves *et al.*, 2008) على وجه الخصوص تقدر الخسائر بما يقرب من ٨ مليون دولار، سببها *Xanthomonas* تم تسجيل لفحة الأوراق البكتيرية العصوية في مختلف المشاتل في البرازيل (Alfenas *et al.*, 2001). تؤثر أيضًا على السيقان والفروع (Neves *et al.*, 2014). مدي إنتشار المرض لوحظ تساقط الأوراق بشكل شائع في الأصناف الحساسة في ظل الظروف البيئية المناسبة للمرض.في جنوب أفريقيا ، أعراض مماثلة لوحظت في أنواع مختلفة من أصناف الكافور ونسب المرض التي تزداد في الآونة الأخيرة علي اليوكالبتوس (Coutinho *et al*, 2015).

على الرغم من الأهمية المتزايدة لهذا المرض، لا يُعرف الكثير عن العوامل التي تؤثر على البكتيريا , تحديد الظروف المثلى للعدوى ضرورية لدعم الدراسات على *X.axonopodis. pv. Eucalypti* وقد هدفت هذه الدراسة إلى عزل المسبب المرضي لمرض تبقع ولفحة أوراق أشجار اليوكالبتوس الذي يصيب النوع *Eucalyptus* ودراسة تأثير درجات الحرارة في نمو البكتيريا في المعمل.

مواد البحث وطرائقه MATERIALS AND METHODS

موقع الدراسة:

أُجريت عمليات العزل من الأشجار التي ظهرت عليها أعراض الإصابة في منطقة الجبل الأخضر (البيضاء –الستلونة - قصر ليبيا – المنصورة) بينما أجريت الدراسة المعملية في معمل قسم أمراض النبات بقسم وقاية النبات كلية الزراعة جامعة عمر المختار شكل (١).

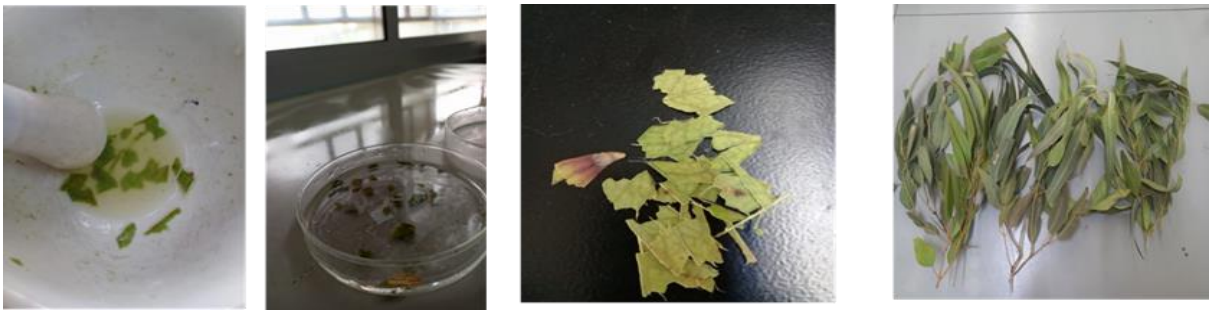
شكل (١): أعراض اللفحة والتبقع البكتيري على أوراق الكافور في مناطق الدراسة.

أعراض وعزل البكتريا:

إستند وصف الأعراض وعلامات المرض إلي ملاحظة عينات من الأوراق والأغصان لنباتات الكافور المصابة بشكل طبيعي والتي ظهرت عليها أعراض لفحة الأوراق بشكل بقع مائية في العروق والتي تتطور إلي بقع بنية أو نخر تتلون باللون الأصفر والأحمر علي الحواف علي طول نصل الورقة شكل (٢) عادة ما يلاحظ تشوهات في طرف الورقة والتي تم الحصول عليها من المناطق المختلفة حيث تم تجميعها من أعلى و أسفل الأشجار وذلك بواقع ثلاثة أغصان من كل إتجاه بمعدل خمس أشجار عشوائياً وتم نقلها إلي المعمل خلال الفترة من سبتمبر ٢٠٢٠ حتى يونيو ٢٠٢١. لتأكيد المسببات البكتيرية للمرض خضعت أنسجة الأوراق المصحوبة بأعراض الإصابة إلى الإختبار الأول حيث تم قطع حوالي ٠,٥ × ٠,٥ سم من حواف الإصابة ويوضع على قطرة معقمة من الماء على شريحة زجاجية ويتم ملاحظتها تحت المجهر الضوئي (Kado and Heskett., 1970).

شكل (٢): أعراض مرض تبقع ولفحة الأوراق *Harknessia eucalypti* على أوراق نباتات اليوكالبتوس.

تم تقطيع الأوراق المريضة إلى قطع صغيرة. وعقمت بنسبة ٥٪ هيبوكلوريت الصوديوم لمدة ٢-٣ دقائق وغسلها ثلاث مرات بالماء المعقم. بعد تعقيم السطح تم الإحتفاظ بالقطع المقطوعة لمدة ٣٠ دقيقة في ٢مل من الماء المعقم.



شكل (٣): يوضح خطوات العزل.

أُخذ المستخلص بواسطة إبرة ذات عقدة وتم تخطيط الطبق يحتوي على Nutrient Agar بواقع ثلاث مكررات لكل منطقة تم تحضين الأطباق عند ٢٨ درجة مئوية. بالمحصن وتم نمو البكتيريا لمدة ٢٤ ساعة و ٤٨ ساعة. (شكل٣) ثم تنقية المستعمرات المنفردة وقد تم الحرص علي تحليل العينات من مختلف المناطق والأشجار بشكل منفصل (Kado and Heskett, 1970).

التعرف علي البكتيريا المسببة للأمراض النباتية:

تم وصف المستعمرات مورفولوجيا بعد الزراعة في البيئة (Kado and Heskett, 1970) لمدة ٧٢ ساعة علي درجة حرارة ٢٨ درجة مئوية في الظلام وتم تحديد ١٥ مزرعة مميزة الشكل لمعرفة مدى كفاءتها في تفاعل فرط الحساسية وكذلك في الإختبارات الفسيولوجية وقد تم التعرف علي مستوي الجنس علي أساس إختبار صبغة جرام وKOH وتحليل النشا و بيئة King B وإختبار الكتاليز والحركة.

طرق الكشف والفحص:

١ ـالفحص الميكروسكوبي:

تلقيح البكتيريا في بيئة غذائية سائلة إنتخابية من مستعمرات أجار بعمر ٢٤ ساعة تم التحصين . ومن ثم إجراء خطوات صبغ جرام والكشف بالمجهر الضوئي (شكل ٤).

شكل (٤): يوضح طريقة صبغ جرام.

الصفات المزرعية:

النمو علي بيئة YDC:

لقحت بيئة YDC بمزرعة بكتيرية حديثة ، وحضنت من ٢ إلى ٦ أيام عند ٢٨ درجة مئوية (Mary, 2017).

النمو على بيئة King B :

لقحت البيئة (King B) التي وصفها (King *et al.*, 1954) بمزرعة بكتيرية حديثة ، ثم حضنت على درجة حرارة ٢٨ درجة مئوية لمدة يومين ، ووصفت بعدها المستعمرات النامية مع ملاحظة تكون الصبغات من عدمها لتمييزها عن عزلات البكتيريا *Pseudomonas* التي تفرز صبغات لامعة على هذه البيئة.

الاختبارات الفسيولوجية والبيوكيماوية: Physiological and biochemical tests:

الإختبارات التالية تم إجراؤها وفقًا لـدليل المختبر لتحديد مسببات الأمراض النباتية البكتيريا (Schaad *et al.*, 2001):

١ ـاختبار هيدروكسيد البوتاسيوم: KOH test (Potassium hydroxide):

تم وضع قطرتين ، حوالي ٥٠ ميكرولتر ، من محلول ٣٪ (وزن / حجم) من هيدروكسيد البوتاسيوم على شريحة زجاجية. تم نقل الخلايا البكتيرية من وسط المزرعة بطريقة معقمة باستخدام عود أسنان خشبي مسطح ووضعها في قطرة KOH مع التحريك الدائري السريع. بعد ٥-٨ ثوانٍ ، تم رفع عود الأسنان وخفضه بالتناوب من سطح الشريحة. يعتبر إختبار KOH إيجابيًا إذا زادت اللزوجة حدث ذلك في غضون ١٥ ثانية (Ryu, 1940).

٢ ـ التحلل المائي للنشا: Starch hydrolysis:

أجار النشا المعقم والمبرد تم سكب الوسط في طبق بتري معقم وعند تصلب الوسط ، تم التلقيح بمستعمرة نقية لبكتيريا الاختبار واحتضنت لمدة ٩٦ ساعة عند ٢٨ درجة مئوية. ومن ثم غمر الصفائح باليود ugol's iodine وبترك لبضع دقائق. تشير المناطق ذات اللون الأحمر إلى رد فعل سلبي وظهور مناطق صفراء واضحة حول نمو البكتيريا يشير إلى رد فعل إيجابي (Suslow *et al.*, 1982).

٣ ـحركة مانيتول: Manuitol motility:

بإبرة معقمة تم اخذ مستعمرة معزولة جديدة والتقاطها في الوسط حتي تصل الجزء السفلي من الأنبوب مع إبقاء الإبرة في نفس خط المسار في الإدخال وكذلك في أخراج الأجار متوسط ومن ثم إجراء الحضانة عند ٢٨ درجة مئوية لمدة ٢٤ ساعة (Elkhalfi *et al.*, 2013).

٤ ـإختبار الكتاليز (Catalase):

تم إختيار مستعمرة بكتيرية عمرها ٢٤ ساعة على شريحة زجاجية نظيفة وخلطها مع قطرة من بيروكسيد الهيدروجين (شكل ٥) بنسبة ٣٪ وتركها تتفاعل لبضع دقائق وتم ملاحظتها لتكوين الفقاعات (Lelliott and Stead , 1987).

شكل (٥): خطوات اختبار إنزيم الكتاليز (Catalase)

٥ ـتعيين درجة الحرارة المثلى للبكتيريا:

أنابيب إختبار محتوية على بيئة أجار مغذي مائل ومزارع بكتيرية (شكل ٦) حديثة العمر وحضانات مضبوطة عند درجات حرارة مختلفة (٥٥م /٢٥°م وهكذا).

يفضل أن تكون على هيئة خط يبدأ من الطرف الداخلي لسطح الاجار متجه إلى الطرف الخارجي لسطح الاجار. تحضن الأنبوبة الأولى عند درجة حرارة ٥٥°م (الثلاجة) لمدة ٢٤ ساعة، الأنبوبة الثانية عند درجة حرارة ٢٥°م حرارة الغرفة لمدة ٢٤ ساعة، الأنبوبة الثالثة عند درجة حرارة ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة والأنبوبة الرابعة عند درجة حرارة ٥٥°م لمدة ٢٤ساعة.

شكل (٦):يوضح تلقيح الأنابيب بالبكتيريا.

٦-إختبار القدرة على أحداث المرض: Pathological test capability:

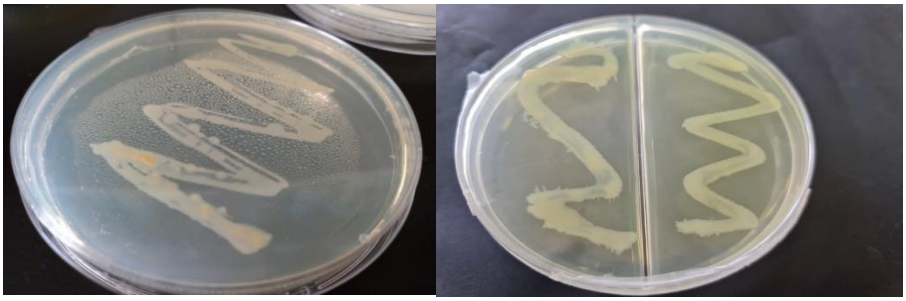
تم زراعة شتلات من نبات الدخان والطماطم ولقحت بمعلق لمزرعة بكتيرية حديثة $١٠^{٨}$ CFU/mL (وذلك بواسطة ثاقب فليني ثم وضعت نقطة واحدة من المعلق البكتيري داخل الثقب ووضعت الشتلات في غرفة نمو عند ٢٥ درجة مئوية بنسبة ٨٠٪ الرطوبة النسبية والضوء الكافي لنمو النبات. أعراض تم تسجيلها بعد ٤-٥ و٨-١٠ و ١٤ يومًا ومقارنتها مع الضوابط الإيجابية والسلبية. تم تقييم الأعراض المرضية على تلقيح الشتلات على أساس شدة النخر على السيقان و حدوث أعراض نموذجية على الأوراق تم تقييم المستعمرات البكتيرية (شكل ٧) المشتبه فيها *Xanthomonas* باستخدام إختبار القدرة على إحداث المرض على نبات الكافور (Marquez-Villavicencio *et al.*, 2011) عزلة البكتيرية. كانت *Xanthomonas axonopodis.pv. Eucalypti* تم الحصول عليها من أوراق الكافور وتم عزل المستعمرات الصفراء بشكل متكرر من الأوراق المصحوبة بأعراض بعد ٢٤-٤٨ ساعة من التحصين على المادة الصلبة.

النتائج RESULTS

-تعريف البكتيريا:

قد تختلف أعراض المرض تبعا لعمر الورقة ومرحلة تطور مرض اللفحة وأنواع نبات الكافور والتي تتميز عموما ببقع مائية داخل العروق والتي تتطور إلي بقع بنية أو نخر تتلون باللون الأصفر والأحمر علي الحواف علي طول نصل الورقة شكل (٢) عادة مايلاحظ تشوهات في طرف الورقة.

بعد أربعة أيام من التحصين علي بيئة NA تشكلت في تخفيف ١٠-١-١٠-٢. كانت صفراء فاتحة ، محدبة ، لامعة ، وقطرها ٢-٣ مم وتحول الوسط المحيط بالمستعمرة إلى اللون الأصفر الفاتح.



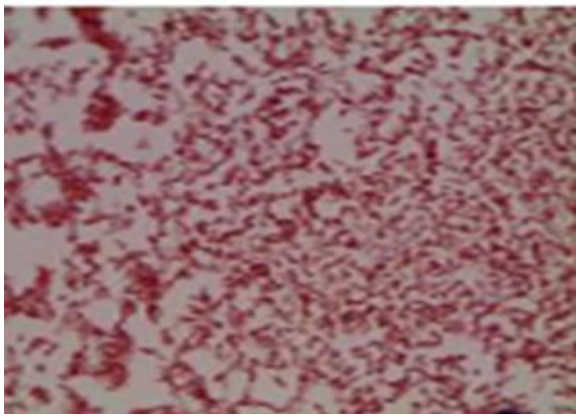
شكل (٧): يوضح لون المستعمرة البكتيرية علي بيئة الاجار المغذى (NA).

تشخيص البكتريا المسببة للمرض:

الصفات المظهرية والمجهرية لعزلات البكتريا قيد الدراسة:

صبغ جرام: Gram Staining:

الفحص ألمجهري لصبغة جرام أوضح أن بكتيريا الاختبار لم تحتفظ باللون البنفسجي للبقعة الأولية (البنفسجي الكريستالي) ولكن الخلايا ظهرت باللون الوردي (صبغة السفرانيين). ومن ثم كانت بكتيريا الاختبار عبارة عن عصويات قصيرة مستقيمة وبالتالى فهى سالبة الجرام ، وهي السمة المميزة للبكتيريا الممرضة للنبات (شكل ٨).



(شكل ٨): يوضح شكل البكتيريا تحت المجهر الضوئي.

يوضح جدول رقم (١) النتائج التي تم الحصول عليها من دراسة الصفات المظهرية و المجهرية للبكتريا المعزولة من الأوراق المصابة بمرض لفحة أوراق نبات الالكبتوس

الصفة	الملاحظات
التفاعل مع صبغة جرام	سالب
شكل الخلايا	عصوي قصير
تجمع الخلايا	غالبيتها مفردة
لون المستعمرات وشكلها علي وسط NA	كريمي إلي ابيض لامع دائرية ذات حواف منتظمة وكاملة ,محدبة وبقطر٠.٥-١ملم

يوضح جدول رقم (٢) طبيعة نمو العزلات البكتيرية قيد الدراسة وصفات المستعمرات النامية على بعض الأوساط المختلفة

الوسط الزراعي	الملاحظات
طبيعة نمو البكتيريا علي NA	مستعمرات كريميه
طبيعة نمو البكتيريا علي YDC	مستعمرات صفراء إلي كريميه محدبة لامعه دائرية ذات حافة كاملة
طبيعة نمو البكتيريا علي KB	مستعمرات بيضاء إلي كريميه حافة كاملة مستديرة محدبة غير شفافة

كانت بكتيريا مخاطية صفراء يتم عزلها باستمرار من عينات المناطق المختلفة مع أعراض بقع الأوراق البكتيرية النموذجية التي تم جمعها من الحقول , سالبة لصبغة جرام ، على شكل عصويات قصيرة ، كما كان شكل وحجم المستعمرة متوسطًا ومحدبًا ومخاطيًا والبكتيريا متحركة.

الاختبارات البيوكيميائية والفسيولوجية: Physiological and Biochemical tests

التحلل المائي للنشا: Starch hydrolysis:

أوضحت النتائج أن بكتيريا الإختبار أنتجت منطقة عديمة اللون حول النمو البكتيري على وسط أجار نشا مغمور باليود وقد أظهرت النتائج إيجابية اختبار التحلل المائي للنشا.

اختبار هيدروكسيد البوتاسيوم: Test KOH :

كشفت الدراسة الحالية أن بكتيريا الاختبار أظهرت تفاعلًا إيجابيًا لإختبار KOH (شكل ٩).

شكل(٩): يوضح ايجابية اختبار KOH.

إختبار إنزيم الكتاليز: (Catalase):

جميع العزلات كانت لديها القدرة علي أنتاج إنزيم الكتاليز وظهرت فقاعات إثناء الإختبار دليل إيجابية التفاعل.

يوضح جدول رقم (٣) الإختبارات البيوكيميائية والفسيولوجية للعزلات البكتيرية للمناطق المختلفة

المناطق	Gram reaction	Motility indole	Catalase test	Starch hydrolysis	Oxidase test	Tobacco hypersensitivity
البيضاء	_	+	+	+	+	+
الستلونة	_	+	+	+	+	+
المنصورة	_	+	+	+	+	+
قصر ليبيا	_	+	+	+	+	+

القدرة على إحداث المرض:

أوضح إختبار القدرة على إحداث المرض (شكل ١٠) بأن العزلات الإيجابية لإختبار فرط الحساسية على نبات التبغ كانت لها القدرة على أحداث الأعراض النموذجية لمرض اللفحة البكتيرية على أوراق نبات الطماطم حيث تمثلت الأعراض بظهور تلون في الأوراق باللون الأصفر ثم تتحول للون البني وأيضا الاعراض علي أوراق الكافور المحقونة باللقاح البكتيري تلون الأوراق باللون البني خلال ٤٨ ساعه من التحضين.

شكل (١٠): أعراض القدرة على إحداث المرض علي أوراق الطماطم وأوراق الكافور.

أظهرت نتائج المتحصل عليها أن مرض اللفحة البكتيرية راجع إلى جنس *Xanthomonas axonopodis pv. Eucalyptorum* حيث تم ظهور أعراض الموت على نباتات الطماطم وأوراق الكافور التي تم حقنها بهذه البكتريا كما تم إعادة العزل من النباتات المصابة وتم الحصول على نفس عزلة البكتريا.

إختبار فرط الحساسية على التبغ: Hypersensitive Reaction Test:

أظهرت العزلات التي حُقنت في أوراق نباتات التبغ أعراض فرط الحساسية بعد٤٨ ساعة حيث ظهرت على المناطق المحقونة أعراض الموت الموضعي Necrosis بينما لم يظهر على الأوراق المحقونة بالماء أي أعراض.

أثبتت نتائج اختبار فرط الحساسية على أوراق نبات التبغ (شكل١١) إن كل العزلا ت البكتيرية التي تم الحصول من المناطق كانت قادرة على إحداث المرض ، إذ ظهرت بقع صفراء في المنطقة

شكل (١١): يوضح اختبار فرط الحساسية على أوراق نبات التبغ.

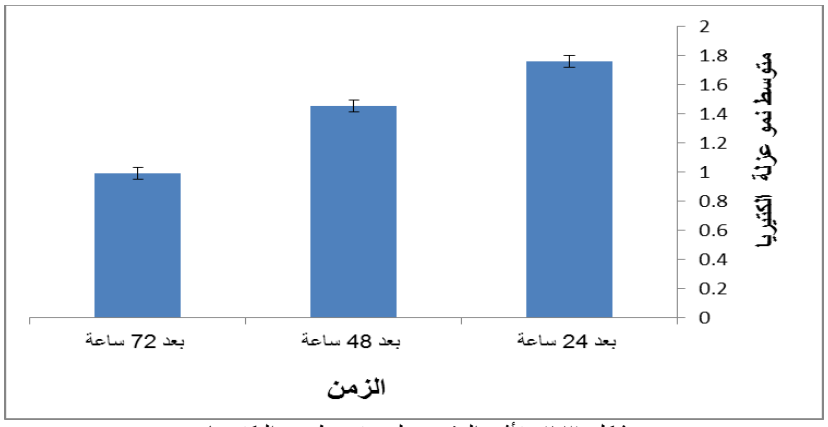
الملقحة تحولت بعدها إلى اللون البني الفاتح وتفاوتت العزلات البكتيرية فيما بينها في سرعة ظهور هذه الأعراض وتفوقت العزلات البيضاء 1، الستلونة 2 ، على العزلات الأخرى المنصورة 3، قصر ليبيا 4 ، إذ تحولت المنطقة الملقحة إلى اللون الأصفر بعد ١٠ ساعات من حقن اللقاح البكتيري في الفراغ الخلوي لهذه الأوراق ثم إلى اللون البني بعد ٤٨ ساعة من عملية الحقن.

تأثير درجات الحرارة المختلفة:

تطور أعراض المرض، بمجرد بدء العدوى تتأثر بدرجة الحرارة وكثافة اللقاح. حضانة المرض القصيرة، فترات المرض وشدة المرض العالية تحدث في درجات الحرارة المثلى (٢٥-٣٠ درجة مئوية). وكثافة عالية من اللقاح (≤ $١٠^{٦}$ CFU / مل) بالنسبة لدرجات الحرارة المختلفة لوحظ أن النمو الأمثل للبكتيريا عند درجة حرارة ٣٠ درجة مئوية بينما لم تظهر درجات الحرارة ٥ , ٣٧ درجة مئوية أي نمو علي بيئة Kings B medium.

تأثير الوقت على متوسط نمو عزلة البكتيريا: Xanthomonas axonopodis pv. Eucalyptorum:

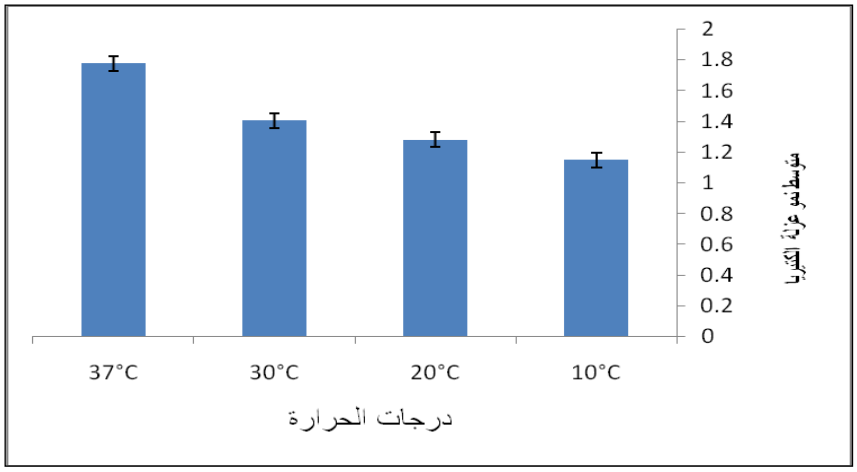
من الشكل (١٢) نلاحظ أن متوسط نمو عزلة البكتيريا *Xanthomonas* تأثرت مع مرور الزمن حيث دلت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق بين متوسط نمو عزلة البكتيريا عند ٢٤ ساعة و٤٨ ساعة و٧٢ ساعة بمتوسطات (١.٧٥، ١.٤٥، ٠.٩٩)علي التوالي، حيث قل النمو مع الوقت وربما رجع ذلك لقلة الغذاء وتراكم المواد الضارة.



شكل (١٢): تأثير الوقت على متوسط نمو البكتيريا.

تأثير درجات الحرارة على متوسط نمو البكتيريا: Xanthomonas axonopodis pv. Eucalyptorum:

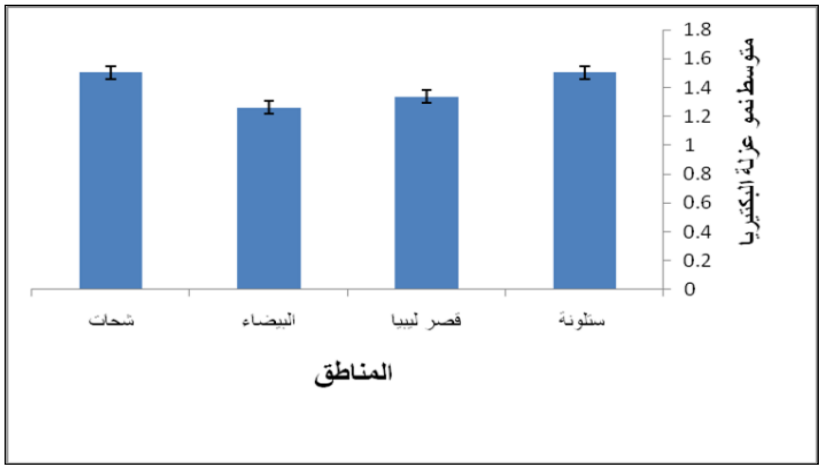
من الشكل (١٣) نلاحظ أن متوسط نمو عزلة البكتيريا *Xanthomonas* تأثر بدرجات الحرارة حيث دلت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق بين متوسط نمو عزلة البكتيريا عند ١٠°م و٢٠°م و٣٠°م و٣٧°م بمتوسطات (١,٤١،١,٢٨،١,١٥،١,٧٨) علي التوالي، حيث زاد النمو مع إرتفاع درجات الحرارة.



شكل (١٣): تأثير درجات الحرارة على متوسط نمو البكتيريا.

تأثير المناطق على متوسط نمو البكتيريا: *Xanthomonas axonopodis pv. Eucalyptorum:*

من الشكل (١٤) نلاحظ أن متوسط نمو عزلة البكتيريا تأثر باختلاف المناطق التي تم عزل البكتيريا منها حيث دلت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق بين متوسط نمو عزلة البكتيريا من منطقة ستلونه وقصر ليبيا والبيضاء وشحات بمتوسطات (١.٥١، ١.٢٤، ١.٥١ ١.٢٦) علي التوالي، حيث كان النمو في عزلة شحات وستلونه أعلى من عزلة البيضاء و قصر ليبيا.



شكل (١٤): تأثير المناطق على متوسط نمو البكتيريا.

تأثير التداخل بين الزمن والمناطق ودرجات الحرارة على متوسط نمو عزلات البكتيريا:

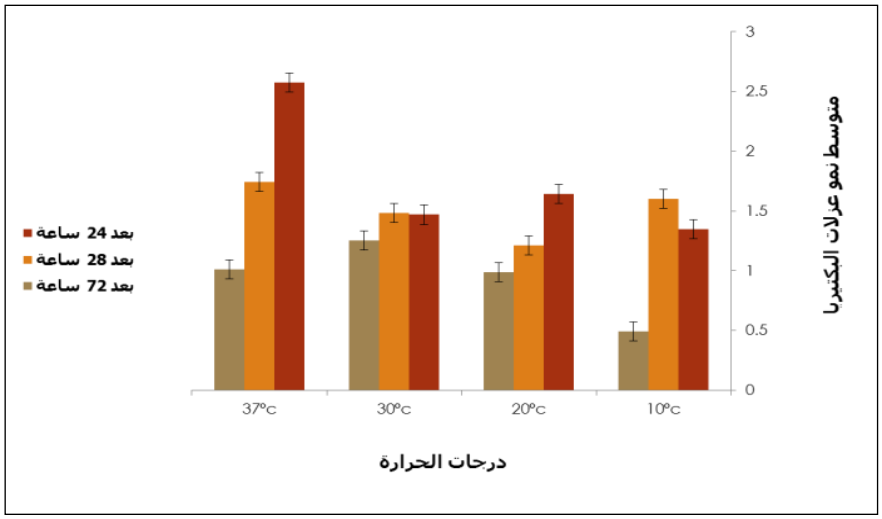
دلت النتائج فى جدول (٤) وشكل (١٥) على التالى:

١ - بعد ٢٤ ساعة كان متوسط نمو البكتيريا عالي، حيث كانت أفضل درجة لنمو عزلة بكتيريا.*Xanthomonas* . منطقة ستلونه ومنطقة البيضاء كانت ٣٧°م بينما كانت في منطقة شحات أفضل درجة لنمو عزلة بكتيريا٣٧°م و٣٠°م، وكانت في منطقة قصر ليبيا أفضل درجة لنمو البكتيريا ٣٧°م.

٢- بعد ٤٨ ساعة كان متوسط نمو البكتيريا منخفض، حيث كانت أفضل درجة حرارة لنمو البكتيريا في منطقة ستلونه ٣٧°م و٣٠°م ثم٢٠°م و أخيرا ١٠°م أما منطقة قصر ليبيا فكانت أفضل درجة حرارة لنمو البكتيريا ٣٧°م ثم ٣٠°م و أخيرا ٢٠°م و ١٠°م وفى منطقة البيضاء فكانت ٣٧°م يليها ٣٠°م ثم ٢٠°م أخيرا ١٠°م، أما منطقة شحات فكانت أفضل درجة حرارة لنمو البكتيريا درجتي ٣٧°م و٣٠°م يليها ٢٠°م و أخيرا ١٠°م.

٣- بعد ٧٢ ساعة كان متوسط نمو البكتيريا منخفض جدا، حيث كانت أفضل درجة حرارة لنمو البكتيريا في منطقة ستلونه ٣٧°م و٣٠°م ثم٢٠°م و أخيرا ١٠°م أما منطقة قصر ليبيا فكانت أفضل درجة حرارة لنمو البكتيريا ٣٧°م ثم ٣٠°م و أخيرا ٢٠°م و ١٠°م وفى منطقة البيضاء فكانت ٣٧°م يليها ٣٠°م ثم ٢٠°م أخيرا ١٠°م، أما منطقة شحات فكانت أفضل درجة حرارة لنمو البكتيريا درجتي ٣٧°م و٣٠°م يليها ٢٠°م و أخيرا ١٠°م.

حيث دلت نتائج التحليل الاحصائى وجود فروق معنوية بين متوسطات نمو البكتيريا فى المناطق (ستلونه وقصر ليبيا والبيضاء وشحات) وعند درجات الحرارة المختلفة (١٠°م و٢٠°م ٣٠°م و٣٧°م) و بعد فترات زمنية مختلفة (٢٤ ساعة و٤٨ ساعة و٧٢ ساعة).



شكل (١٥): تأثير تداخل الوقت مع درجات الحرارة على متوسط نمو عزلات بكتيريا *Xanthomonas axonopodis pv. Eucalyptorum*.

جدول (٤) تأثير التداخل بين الوقت والمناطق ودرجات الحرارة على متوسط نمو عزلات البكتيريا *Xanthomonas axonopodis pv. Eucalyptorum*

الزمن (الساعات)	المناطق	١٠درجة مئوية	٢٠ درجة مئوية	٣٠ درجة مئوية	٣٧ درجة مئوية
	الستلونة	١,٠٤	١,٢٩	١,٧٤	٤,٦٧
٢٤	قصر ليبيا	١,١٥	١,٢٨	١,٩٠	٢,١٩
	البيضاء	١,٠٢	١,٢٠	١,٢٤	١,٩٨
	شحات	١,١٤	١,٣٨	٢,٤٣	٢,٥٠
	الستلونة	٠,١٦	٠,٧٣	٠,٨٩	٠,٩١
٤٨	قصر ليبيا	٠,٢٥	٠,٤٦	١,٣٦	١,٥١
	البيضاء	٠,٦٤	١,٠٨	١,٥١	١,٢٨
	شحات	٠,٩٣	١,٣٥	١,٤٣	١,٤٣
	الستلونة	١,٦١	١,٦٣	١,٦٥	١,٧٤
٧٢	قصر ليبيا	٠,٧٩	١,٣٩	١,٩٠	١,٨٨
	البيضاء	٠,٦١	١,٢١	١,٦٦	١,٧٤
	شحات	٠,٣٤	١,٧٣	١,٧٠	١,٧٠

LSD (P≤0.05)

تبين أن أفضل درجة حرارة تنمو عليها البكتيريا ما بين (٢٥ - ٣٧°م) وهي تعتبر درجة النمو المثلى للبكتريا , أما عن درجات الحرارة الملائمة لنمو هذه البكتيريا يعتبر نمو البكتيريا عند درجة الحرارة ٣٧°م أحد العوامل المهمة لتميز هذه البكتيريا حيث يعتبر مجال نموها ما بين صفر – ٣٧°م.

CONCLUSIONS

بكتيريا *Xanthomonas axonopodis eucalypt* تم عزلها والتعرف عليها من أوراق اليوكالبتوس على أساس اختبار القدرة على إحداث المرض وكذلك اختبار فرط الحساسية علي نبات التبغ و نمو البكتيريا على الوسائط المختلفة والاختبارات البيوكيمائية كانت هناك علاقة متبادلة بين درجة الحرارة تحت كل حالة نمو وأشارت النتائج أن نمو البكتيريا قد تغير بتغيرات درجات الحرارة المختلفة حيث أنتج نموان بقع أو لفحة بيضاء كريمة عند درجة حرارة ٢٠ و٣٠و٣٧ درجة مئوية وهذا ما اتفق مع (Du-Plessis, 1987) و (Goto, 1992) و (عز الدين وآخرون, ٢٠١٣).

أن العوامل البيئية كدرجات الحرارة تسهم بدور مهم في زيادة النمو البكتيري في المدى الحراري ٢٠ – ٣٥ °م ترجع إلى فعاليته الحيوية في النمو والتي تصل إلى قمة نشاطها عند درجة الحرارة المثلى ومن ثم يسهل لها استغلال المصادر الغذائية في الوسط الغذائي وبناء الجزيئات الكبيرة في بناء كتلة البكتيريا في دراستنا آفة الأوراق المصابة عينات من المعرفة تم جمعها وعزل *X.axonopodis eucalypti* وتنقيته.

اختبارات كيميائية حيوية مختلفة مثل تفاعل صبغة جرام و التحلل المائي والنشا، واختبار أوكسيديز، التميع والصبغ الفلوري و KOH. وصف *X.axonopodis eucalypti* بأنها بكتيريا سالبة كما تتشابه النتائج مع نتائج مماثلة في وقت سابق من قبل العديد من الأبحاث (Mubeen *et al.*, 2015 ؛ McGuire *et al.*, 1988).

التوصيات

القيام بدراسات حول الأمراض التي تصيب أشجار الكافور وحصر المسببات المرضية وذلك لقلة الدراسات وعدم الإهتمام بالشجرة كمصدر للعديد من المنتجات الصناعية.

REFERENCES المراجع

المراجع العربية

السويدي, طه موسى محمد, زينب عليوي محمد التميمي, عدنان عبدالجليل لهوف وعلا طالب العامري, ٢٠٢٠. تأثير بعض العوامل البيئية في الأداء الحياتي لدبور التورم maskelli (Ashemead) camaldulensis على أوراق اليوكالبتوس EucalyptusOphelimus حقليا في كربلاء, العراق. مجلة وقاية النبات العربية ١:٣٨-٩.

الشقلاف, عبد الحميد عمران عبد الله, ٢٠٠٩. تأثير أشجار الكافور على خواص التربة في Eucalyptus camaldulensis Dehnh غابة النصر, طرابلس, ليبيا, رسالة ماجستير, كلية الموارد الطبيعية وعلوم البيئة, جامعة عمر المختار, البيضاء, ليبيا. صفحة ٨٠.

بدر, مصطفى الدسوقي, ٢٠٠٣. موسوعة الأشجار والبيئة. منشأة المعارف الإسكندرية, مصر. صفحة ٨٤٦.

عزالدين محمد العوامي, محمد علي سعيد ونجية محمد جادالله, ٢٠١٣. تحديد انتشار مرض التدرن التاجي وتعريف مسببه بمنطقة الجبل الاخضر في ليبيا .المجلة الليبية لوقاية النبات, ٢٠١٣ (٣) :٥٠-٦٥.

المراجع الإنجليزية

Alfenas, A.C., Zauza, E.A.V., Mafia, R.G., and Assis, T.F. 2009. Clonagem e doenças do eucalipto. 2nd Ed. Viçosa, MG, Brazil. Editora UFV.

Alfenas, A.C., Gonçalves, R.C., Romeiro, R.S., and Assis, .T.F. 2001. Mancha foliar e desfolha de Eucalyptus urophylla x E. maidenii Fitopatologia Brasileira 26:294. (Abstract).

Barber, J. P., Liese, B., and Abrams, M.J. 2003. Development of the Cognitive Therapy Adherence and Competence Scale. Psychotherapy Research, 13, 205-221.

Brooker, M.I.H. 2000. A new classification of the genus Eucalyptus L'Hér. (Myrataceae). Australian Systematic Botany, 13: 79-148.

Coutinho, T. A., Westhuizen, L., Roux, J., McFarlane, S.A., and Venter, S.N. 2015. Significant host jump of Xanthomonas vasicola from sugarcane to a Eucalyptus grandis clone in South Africa. Plant Pathol. 64:576-581.

Crous, P.W., Wingfield, M.J., and Raj, T.R.N. 1993. Harknesia species occurring in south Africa Mycologia, 85: 103-118.

Du-Plessis, H.J. 1987. Canker development on plum shoots following systemic movement of Xanthomonas campestris pv. Pruni from inoculated leaves. (Abst) Rev plant pathol. 67: 379.

Elkhalfi, B., Essari, A., Serrano, A., and Soukri, A. 2013. Antibacterial activity of plant methanolic extracts on a field isolate of Pseudomonas syringae pv tomato from the Casablanca region (Morocco), Advances in Bioscience and Biotechnology, vol.4, pp.1-9.

Gessesse, D., and Teklu, E. 2011. Eucalyptus in East Africa,socio–economic and environmental Issues. Forestryn Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy. 7 pp. Gonçalves RC, Alfenas AC, Oliveira JR, Silva IT, Oda S, Assis.

Gonçalves, R. C., Douglas, L.,.Oliveira, J.R., Maffia, L.A., Cascardo, J., and Alfenas, A.C. 2008. Etiology of bacterial leaf blight of eucalyptus in Brazil. Trop. Plant Pathol. 33:180-188.

Goto, M. 1992. Fundamentals of bacterial plant pathology San Diego, Academic Press.

Kado, E.I., and Heskett, M.G. 1970. Selective media for isolation of Agrobacterium, Corynebacterium, Erwinia, Pseudomonas and Xanthomonas. Phytopathology 60:969-976.

King, E.O., Ward, M.K., and Raney, D.E. 1954. Two Simple Media for the Demonstration of pyocyanin and fluorescein, Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 44: 301- 307.

Lelliott, R.A., Stead, D.E. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial disease of plants vol.2. British Society for Plant Pathology. Blackwell, London.

Mary, N.Chege., Fred, W.K., Joseph, K., and Evans. N. Nyaboga. 2017. Phenotypic and genotypic diversity of Xanthomonas axonopodis pv.manihotis causing bacterial blight disease of cassava in Kenya. Journal of Applied Biology & Biotechnology Vol. 5 (02), pp.038-044.

Mubeen, M., Arshad, M., Hafiz,I., Yasir, I., Muhammad, I., and Bilqees, I. 2015. Bio-chemical characterization of Xanthomonas axonopodis pv. citri: a gram negative bacterium causing citrus canker. I. J. S. N., 6(2): 151-154.

Marquez-Villavicencio, M.D., Weber, B., Witherell, A., Willis, D.K., and Charkowski, A.O. 2011. The3-Hydroxy-2-Butanone Pathway Is Required for Pectobacterium carotovorum Pathogenesis. Plos one.6: 1-11.

McGuire, R.G. 1988. Evaluation of bactericidal chemicals for control of Xanthomonas on citrus plant disease. American Phytopath. Society. 72(12): 1016-1020.

Neves, D.A., Guimarães, L., Ferraz, H.G.M., and Alfenas, A.C. 2014. Favorable conditions for Xanthomonas axonopodis infection in Eucalyptus spp. Trop. Plant Pathol. 39:428-433.

Ryu, E., 1940. A simple method of differentiation between Gram-positive and Gram-negative organisms without staining. Kitasa to Archives of Experimental Medicine 17, 58-63.

Schaad, N.W., Jones,J.B., and Chun, W. 2001. Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria. American Phytopathological Society (APS Press), MN, USA.

Sankaran, K.V., Sutton, B.C., and Balasundaran, M. 1995. Cryptosporiopsis eucalypti sp. nov. causing leaf spots of eucalypts in Australia, India and USA. Mycological Research 99:827–830

Suslow, T.V., Schroth, M.N., and Isaka, M. 1982. Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining, Phytopathology, vol.72, n°7, pp.917-918.