مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية ـ (2012) المجلد (28) ـ العدد 2 ـ الصفحات: 177-193

الكشف عن انتشار *Polymyxa betae* Keskin و*Polymyxa graminis* Led. في سورية

أحمد محمد مهنا[1]

الملخص

أجريت مسوحات لحقول الشوندر السكري والقمح والشعير خلال الأعوام 2007-2010 في الحسكة، والرقة، وحلب، وإدلب، وحماة وحمص، جُمعت خلالها 25 عينة تربة من 16 موقعاً و312 عينة نباتية من 35 موقعاً موزعة كالآتي 85 عينة من الشوندر السكري، 121 عينة من الشعير و107 عينات من القمح من نباتات أظهرت أعراض الشحوب أو التقزم والاصفرار. فحصت الجذور مجهرياً، وتبين إصابة عدد من عينات الشوندر السكري بـ *P. beta*. وكُشف عن *P. graminis* في جذور بعض نباتات القمح والشعير. قُسّمت عينات التربة التي ثبت مجهرياً انتشار *P. betae* أو *P. graminis* فيها إلى قسمين: زرع في الأول بذور الشعير (عربي أسود)، وفي الثاني بذور شوندر سكري (هيلما)، وذلك ضمن ظروف الحاضنة، فُحصت الجذور مجهرياً بعد عشرة أسابيع، وأكدت النتائج انتشار كلا النوعين في معظم عينات التربة المجموعة من حقول القمح والشعير أو الشوندر السكري. لتحديد نوع *Polymyxa* spp. بدقة، استخلص الدنا DNA من جذور الشوندر والشعير المصابة وفحص باستخدام PCR. كشف التحليل وجود *P. graminis* وكان في أغلب الأحيان مترافقاً مع *P. betae*. وما سبق يعدُّ أول تقرير عن انتشار *P. graminis* في الحسكة وإدلب وحلب وحمص وحماة.

الكلمات المفتاحية: الشعير، الشوندر السكري *Polymyxa graminis, Polymyxa betae*، DNA, سورية

[1] قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

Occurrence And Distribution Of *Polymyxa Betae* Keskin And *Polymyxa Graminis* Led In Syria

Ahmad M. Mouhanna[1]

ABSTRACT

Surveys of sugar beet, wheat and barley fields in Al-Hassakh, Al-Raqqa, Aleppo, Idleb, Hama and Homs Governorates were conducted through the years 2006 - 2010. Thereupon, 25 soil samples from 16 locations and 312 root samples as following: 85 sugar beet,121 barley and 107 wheat were collected from 35 locations of the 6 provinces. Samples were collected from plants showing symptoms of dwarf and chlorosis. All roots were checked under microscope. Some roots of barley and wheat were detected to be infected by *P. graminis*. In addition, *P. betae* was detected in sugar beet.

Soil samples found infected by *P. betae* and *P. graminis* were divided into two groups: The first group was planted with barley (Arabi Aswad), the second group was planted with sugar beet (Hilma). Ten weeks later, plants were examined under microscope. Results showed the widespread of the two species of *Polymyxa* in most soil samples collected from fields of barely and sugar beet.

To identify accurately the species of *Polymyxa,* DNA was extracted from infected sugar beet and barley roots and tested by PCR. Results showed a widespread presence of *P. graminis* in most fields under investigation. *P. betae* was found mostly associated with *P. graminis*. This is the first report on the spread of *P. graminis* in Homs, Hama, Aleppo, Idleb and Al-Hassakeh.

Keywords: *Polymyxa graminis, Polymyxa betae,* DNA, Sugar beet barley, Syria

[1] Plant Protection Dep., Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria.

المقدمة

تعدُّ الفطور التابعة للجنس *Polymyxa* من الفطور إجبارية التطفل وتتبع عائلة Plasmodiophoracae ورتبة Plasmodiophorales، التي تضم عشرة أجناس منها جنس *Polymyxa*، الذي يعدُّ مهماً من الناحية الاقتصادية الزراعية كناقل فيروسي (Karling 1968; Kanyuka *et al*. 2003).

بعد أكثر من 100 عام من الدراسات المستفيضة على Plasmodiophorales فإن موقعها التصنيفي ما زال قيد النقاش. ومن الناحية التقليدية التاريخية مازالت تسمى بالفطور، في حين يظهر التحليل الجزيئي لتتابع النيكلوتيدات rDNA في الوحدة الفرعية لمورثة الجسيم الريبي S5.8 وS18 وما بينهما أي الفاصل الداخلي المستنسخ ITS1 وITS2 (Internal transcript spacer) بأنها مجموعة صغيرة متباينة لا ترتبط مباشرة بالفطور الحقيقية لذلك وضعت في شعبة الأوالي الحيوانية Protozoa (Schloesser, 1997; Ward and Adams,1998; Kanyuka, *et al.*,2003; Cavalier-Smith and Chao, 2003)

ضمن الجنس *Polymyxa*، سجل نوعان: Keskin *P. betae* و *P. graminis* Ledingham متشابهان من الناحية المرفولوجية ويمكن التمييز بينهما من خلال المدى العوائلي: فالنوع *P. graminis* يتطفل على نباتات أحادية الفلقة في العائلة النجيلية (Ledingham, 1939; Barr 1979, Kanyuka, *et al*., 2003) في حين يتطفل النوع *P. betae* على نباتات ثنائية الفلقة في العائلة السرمقية Chenopodiaceae ونباتات أخرى تتبع فصائل نباتية أخرى كالقرنفلية Caryophyllaceae وعرف الديك Amaranthaceae والرجلية Portulacaceae والنجمية Asteraceae والباذنجانية Solanaceae (Abe and Ui., 1986). فضلاً عن أن هناك بعض التقارير التي تشير إلى أن *P. graminis* يصيب بعض الأنواع من ثنائية الفلقة و*P.betae* يصيب بعض الأنواع من أحادية الفلقة مع الإشارة إلى أن *P. graminis* هو ناقل للفيروسات التابعة للجنس Pecluviruses على الفول السوداني (Barr and Asher 1992; Legrève, *et al*., 2002; Rush 2003; Mouhanna, *et al.*,2008; Thompson, *et al*., 2011).

سجل *P. betae* أول مرة على الشوندر السكري من قبل كيسكين (Keskin, 1964). ويعدُّ الناقل الحيوي الوحيد لعدد من الفيروسات النباتية التي تصيب الشوندر السكري، ومن أكثرها خطورة فيروس اصفرار وتماوت عروق الشوندر السكري *Beet Necrotic Yellow Vein Bennyvirus* (BNYVV) وفيروس الشوندر المنقول بالتربة *Beet Soil Borne Furovirus* (BSBV) وهما المسببان الرئيسان لمرض الريزومانيا (Giunchedi and Langenberg, 1982; Ivanovic and McFarelane 1982) وفيروس موزاييك الشوندر المنقول بالتربة *Beet soil borne mosaic Bennyvirus* وفيروس الشوندر Q *Beet Q Furovirus* (Heidel, *et al*., 1997; Meunier, *et al*., 2003).

سجلت الإصابة بـ *P. betae* Keskin في سورية بشكل مترافق مع انتشار مرض الريزومانيا سواء بشكل مباشر أو غير مباشر، إذ إن وجود مرض الريزومانيا دليل قاطع على وجود *P. betae* في التربة، في حين أن وجود *P. betae* لا يعني بالضرورة وجود الفيروسات التي تصيب الشوندر أو غيره من المحاصيل (Schloesser, 1997).

أمّا *P. graminis* Led. فيتطفل على جذور نباتات العائلة النجيلية، وهو ناقل لعديد من الأمراض الفيروسية الخطرة المنقولة بالتربة كفيروس الموزاييك المعتدل على الشعير *Barley mild mosaic Bymovirus*، وفيروس الموزاييك الاصفر على القمح *Wheat yellow mosaic Bymovirus* وفيروس الموزاييك المخطط المغزلي على الشعير *Wheat spindle streak mosaic Bymovirus* (Teakle, 1983; Kanyuka, *et al.*, 2003). تسبّب هذه الأمراض الفيروسية المنقولة بالتربة التي تصيب النجيليات خسارة اقتصادية فقط في بعض الأجزاء من أوروبا، آسيا وشمال أمريكا وفي استراليا (PaDIL 2009; Jones,2004). لـ *Polymyxa* sp. القدرة في أطواره الحياتية كلّها على حمل الفيروسات ويمكن للفيروسات البقاء داخل الأبواغ الساكنة Resting spores عدة سنوات (Rush, 2003; Kanyuka, *et al.*, 2003). في سورية لا يوجد إلا تقرير واحد يشير إلى التسجيل الأولي لوجود الفطر *P. graminis* في شمال سورية (Mouhanna *et al.*, 2007).

هَدفت هذه الدراسة إلى معرفة هل كان *P. graminis* منتشراً في مناطق أخرى من سورية مع تأكيد انتشار *P. betae* عن طريق الكشف عن البثرات الحويصلية Cystosori في جذور الشعير والقمح والشوندر السكري باستخدام المجهر، وجزيئياً باختبار تفاعل بوليميراز المتسلسل PCR عن طريق تضخيم مناطق محددة من الحمض النووي DNA الريبوزومي لـ *P. graminis* و*P. betae* المستخلص من الجذور وباستخدام بادئات متخصصة لكل منهما.

مواد البحث وطرائقه

1- المشاهدات الحقلية وجمع العينات النباتية وعينات التربة:

نُفّذ هذا البحث على عدة مراحل بالتعاون بين الهيئة العامة للتقانة الحيوية بدمشق، سورية ومعهد الأمراض النباتية وعلم الحيوان التطبيقي بألمانيا، في المدة الواقعة من منتصف شهر شباط حتى بداية شهر آذار، ومن منتصف نيسان حتى نهاية شهر أيار. وخلال الأعوام 2006-2010 أجريت مسوحات حقلية للعديد من حقول القمح والشعير والشوندر السكري في محافظات الحسكة (القامشلي، القحطانية، عامودا)، الرقة (تل

أبيض)، حلب (مارع، أخترين، السفيرة، جبل سمعان، تل حديا، ومسكنة)، إدلب (سراقب، خان شيخون، الهبيط، كرناز، جسر الشغور، معرة النعمان، معرتمصرين، سلقين)، حماة (سهل الغاب: نهر البارد، عين الكروم، العشارنة، حورات عمورين، تل سكين، السقيلبية، محردة، سلحب) وحمص (تلبيسة، محطة البث الغربية، الغنطو، أم شرشوح، السعن الغربي، قطينة، القصير، محيط معمل السكر) للكشف عن انتشار *P. betae* و*P. graminis* اللذين ينقلان العديد من الأمراض الفيروسية.

خلال تلك المسوحات الحقلية جمعت عينات من جذور القمح والشعير باستخدام شوكة الحفر بهدف الحصول على أكبر كمية من الشعيرات الجذرية من النباتات التي أبدت أعراض الاصفرار أو التقزم أو ضعف النمو. أمّا بالنسبة إلى حقول الشوندر السكري فجرت زيارة الحقول المزروعة بالشوندر السكري، وكذلك الحقول المعروفة مسبقاً إصابتها بمرض الريزومانيا سواء أكانت مزروعة بالشوندر أم بغيره من المحاصيل، حيث جُمعت عينات من جذور الشوندر السكري سواء أبدت أعراض إصابة بالريزومانيا أم لا. أزيل التراب الموجود على الجذور بعناية ووضعت كل عينة نباتية سواء من القمح أو الشعير أو الشوندر بشكل منفرد في كيس بلاستيكي كتب عليه نوع العينة ورقمها والموقع وأهم الأعراض على المجموع الخضري. كما جُمعت عينات تربة من المنطقة المحيطة بجذور النباتات المجموعة ومن مناطق مختلفة من الحقل وفقاً للطريقة الموصوفة من قبل Grunewald وزملائه (1983)، بلغت كل عينة نحو 2 كغ، وهي عبارة عن خليط من 5-10 عينات ثانوية جُمعت من عدّة مواقع في الحقل على عمق يراوح بين 0 و20 سم. حفظت العينات ضمن أكياس بلاستيكية في الظل عند درجة حرارة لا تتجاوز 15ْ س إلى حين استخدامها.

2- الكشف عن *P. betae* و*P. graminis* في جذور النباتات المجموعة باستخدام المجهر الضوئي

أُحضرت العينات النباتية جميعها من قمح وشعير وشوندر سكري إلى المختبر ونقعت كل عينة على حدة بالماء مدة عشر دقائق لإزالة التراب العالق بالجذور بسهولة، ومن ثم غُسلت جيداً بالماء العادي وبهدوء فوق منخل ذي ثقوب لا يتجاوز قطرها 500 ميكرومتر حرصاً على عدم خسارة الشعيرات الجذرية.

أُخذ من كل عينة نحو 2غ من الشعيرات الجذرية الناعمة، ووُضعت في أنابيب اختبار سعة كل منها 15 مل. ولسهولة ملاحظة الأبواغ الساكنة ضمن الشعيرات الجذرية، لُوّنت بأزرق التريبان؛ وذلك بعد أن نقعت الجذور مدة 16 ساعة بهيدروكسيد البوتاسيوم KOH 1 نظامي، ثم حُفظت الأنابيب بالمجمدة عند -10ْ م إلى حين فحصها بالمجهر العادي. فُحصت الجذور الملونة تحت المجهر العادي باستخدام التكبير 40 × 10 للكشف عن الأبواغ الساكنة.

3- الكشف عن *P. betae* و*P. graminis* في عينات التربة المجموعة من حقول القمح والشعير والشوندر السكري باستخدام النباتات الدالة والمجهر الضوئي

نُقّيت عينات التربة (كلّ على حدة) من الحصى وبقايا الجذور والشوائب المختلفة، ونُعّمت بواسطة هاون يدوي، وغُربلت، ومن ثمّ خُلطت بالرمل المعقم بنسبة 1/1 ووُضّبت ضمن أصص بقطر 12سم، قُسّمت الأصص إلى قسمين: القسم الأول عبارة عن أصيصان زرعا ببذور الشعير (عربي أسود) والقسم الثاني كذلك أصيصين زرعا ببذور الشوندر السكري (الصنف هيلما Hilma الحساس للإصابة بمرض الريزومانيا). كما جُهّزت أصص أخرى تحوي خلطةً ترابية معقمة عند درجة حرارة 120 ْس داخل الأوتوكلاف لاستخدامها كشاهد. وضعت الأصص ضمن صوانٍ بلاستيكية على أطباق بتري مقلوبة منعا لانتقال الأبواغ بماء السقاية من عينةٍ إلى أخرى. وضعت الصواني ضمن حاضنة ضُبطت عند درجة حرارة 20 ْس نهاراً و15 سْ ليلاً ورطوبة تراوح بين 80-85% مع مدة إضاءة 16 ساعة (10000 لوكس). بعد 10 أسابيع من الزراعة قُلعت النباتات بهدوء (تجنباً لتقطّع الشعيرات الجذرية) وغُسلت جذورها بعناية بالماء العادي كما ورد في الفقرة السابقة. قُسّمت جذور كل عينة من الشعير والشوندر السكري إلى قسمين وضع كل منها في أنابيب اختبار سعة 15 مل: القسم الأول نقع مدة 16 ساعة بـ 1 نظامي من هيدروكسيد البوتاسيوم KOH، ثم لُوّنت بأزرق التريبان وفُحصت تحت المجهر الضوئي للتأكد من إصابتها بـ *Polymyxa* sp. (Barr, 1979; Barr and Allan, 1982)، القسم الثاني غمر بالآزوت السائل وحُفظ عند حرارة -20 س لاستخلاص الـ DNA منها لاحقاً.

4- الكشف عن *Polymyxa* sp. باستخدام تفاعل البوليمراز المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR):

- **استخلاص الـ DNA**: فضلاً عن المشاهدات المجهرية اعتمد على الطرائق الجزيئية التي تعطي بنتائجها الدليل القاطع عن وجود *Polymyxa* sp.. استخدمت تقنية PCR بحيث مثلت كل عينة تربة موقعاً. استُخلص DNA من جذور الشعير والشوندر السكري التي أثبت مجهرياً إصابتها سواء بكل من *P. betae* و*P. graminis* أو بأحدهما، وذلك بحسب الطريقة الموصوفة من قبل (Doyle & Doyle,1990) بعد عملية طحن جذور أُخذ 200 مغ منها وأذيبت بـ 0.5 مل من محلول الاستخلاص (100 مليمول من Tris-HCl، 20 مليمول من EDTA (PH=8)، 1.4 مول من NaCl، 2% CTAB و1% من صوديوم ثنائي الكبريتيت ($Na_2S_2O_5$) وأضيف إليها 0.2 % من بيتا ميركابتوإيثانول ß-mercaptoethanol المحضر حديثاً، ومن ثم وضعت بحمام مائي مدة 20 – 30 دقيقة. بعد المعاملة بالفينول/ كلوروفورم رُسّب مستخلص DNA بواسطة أيزوبروبانول، غُسل الراسب بعدها بـ 70% إيثانول ثم جُفّف بهدوء تحت المخلية

الهوائية بعدها ذوب بـ 50 µl من محلول موقي TE مكون من (10 ميليمول Tris-Hcl PH=8 و1 ميليمول من EDTA). قُدِّرت كمية الـ DNA ونوعيتها باستخدام جهاز المطياف الضوئي (السبكتروفوتومتر) عند طولي الموجة 260 و280 نانومتراً، ضُبط تركيز الـ DNA بمعدل 50 نانوغراماً/ ميكرولتر وحُفظت العينات عند درجة حرارة ـ 20 °س إلى حين الاستخدام.

- **البادئات المستخدمة واختبار تفاعل البوليمراز المتسلسل PCR** :

استخدمت عدة بادئات منها متخصصة في تحديد الجنس *Polymyxa* sp، وبادئات أخرى متخصصة في تحديد كل من *P. graminis* و*P. betae* باستخدام الـ PCR على الشكل الآتي:

1- بادئات متخصصة في تحديد النوع *P. graminis*

Pgfwd2: 5`-GGA AGG ATC ATT AGC GTT GAA T-3`

Pxrev7: 5`-GAG GCA TGC TTC CGA GGG CTC T-3`

ويحصران المجال ITS1-rDNA الذي يقدر بـ 320 زوجاً قاعدياً في تحديد *P. graminis* (Ward & Adams,1998).

2- بادئات متخصصة في تحديد النوع *P. betae*

Pb-3a: 5`-ACG ATG GAC GAC TAT TGA GGG G-3`

Pb-3b: 5`-GCA GCC TAG TCA CAA ATG GGG-3`

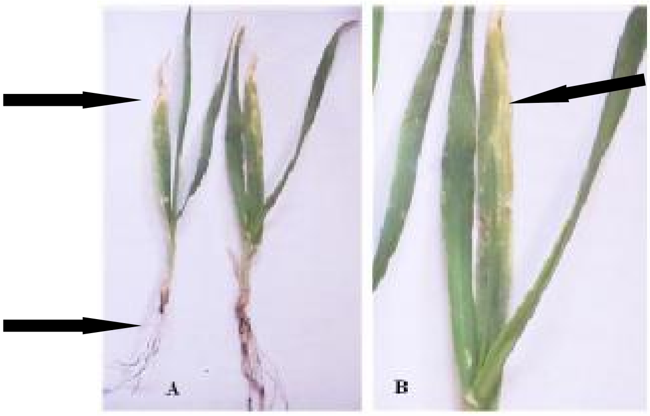
ويحصران المجال ITS1-rDNA الذي يقدر بـ 630 زوجاً قاعدياً في تحديد *P. betae* (Mutasa *et al.*, 1995)

أنجز تفاعل البلمرة المتسلسل PCR باستخدام 25 ميكرولتراً من الحجم الكلي للمواد المكونة من 2,5 µl محلول التفاعل (100 mM Tris-HCl و500 mM KCl)، 2,5 µl dNTP-Mix، 1,5 µl $MgCl_2$، 0,5 µl من كل بادئ Primer، 0,5 µl (2,5 وحدة) من أنزيم البلمرة *Taq*-DNA-Polymerase، و1,0 µl (50 ng) DNA. رُحِّلت نواتج الـ PCR على هلامة من الأغاروز 1,5% تحتوي على صبغة ايثيديوم بروميد (8 ميكرولتر/100 مل محلول TBE) في جهاز الرحلان الكهربائي، ووثقت النتائج بتصوير هلامة الأغاروز باستخدام الأشعة فوق البنفسجية.

النتائج

1- المشاهدات الحقلية: لوحظ خلال المسح ظهور أعراض اصفرار وتقزم في بعض الحقول المزروعة بالقمح والشعير، وبشكل خاص في سهل الغاب وحمص وكانت على شكل بقع مختلفة بالحجم وموزعة بشكل غير منتظم راوحت مساحة هذه البقع في الحقل من 2-3 م² ووصلت الى 40-70م² في بعض الحالات. ولوحظ أحياناً أن أعراض

الاصفرار وجفاف الأوراق تبدو على شكل خطوط تتماشى مع خطوط الفلاحـــة. بـــشكل عام، كانت الكثافة النباتية في هذه البقع أقل مقارنة بالكثافة النباتية في كامل الحقل. عنـــد قلع عددٍ من النباتات التي أبدت أعراض اصفرار تبيّن أن مجموعها الجذري كان صغيراً وجافاً على الرغم من رطوبة التربة الكافية (شكل 1). بشكل تقديري فإن نسبة الإصابة لم تتجاوز 2-5% من المساحة المزروعة. أما بالنسبة إلى حقول الشوندر السكري فلم تبـــد أية أعراض إصابة بالريزومانيا مع أنّ بعض الحقول المدروسة كانـــت مـــصابة ســـابقاً بالريزومانيا، والسبب في ذلك اعتماد المزارعين للأصناف وحيدة الجنين المتحملـــة فـــي معظمها لمرض الريزومانيا.



الشكل (1) نباتات شعير تظهر أعراض اصفرار وجفاف لقمة الأوراق (B) مـــع ضـــعف فـــي المجموع الجذري (A)

2- نتائج الفحص المجهري في الكشف عن *Polymyxa* sp. في جـــذور عينـــات القمح، الشعير والشوندر السكري

- بلغ عدد العينات المجموعة من القمح 107 عينات وكـــان عـــدد العينـــات المـــصابة بـــ*P. graminis* 11 عينة موزعة على الشكل الآتي حمص 22/1 عينة فقط، إدلب 19/3 عينة، حلب18/4 عينة والحسكة 22/3 عينة. أمّا في حماة والرقة فبلـــغ عـــدد العينات المجموعة 15 و11عينة على التوالي، ولم يكشف عـــن إصـــابة بـــأي منهـــا (جدول1).
- أمّا بالنسبة إلى عدد العينات المجموعة من الشعير فبلغ 121 عينة وبلغ عدد العينـــات المصابة بـــ*P. graminis* 36 عينة موزعة على الشكل الآتي: حمص 25/6 عينـــة، حماة 22/5 عينة، إدلب 17/9 عينة، حلب 21/8 عينة والحسكة 22/8 عينـــة. أمّـــا الرقة فلم تشاهد أية إصابة (جدول 1).

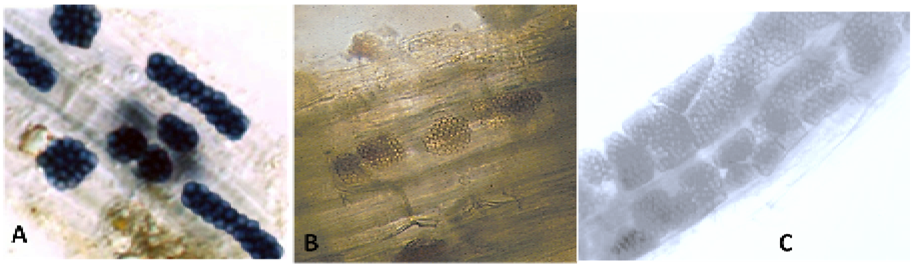
- بالنسبة إلى عينات الشوندر السكري بلغ عددها 85 عينة والمصاب 36 بـ*P. betae* عينة موزعة على الشكل الآتي: حمص 25/18 عينة، حماة 20/4 عينة، إدلب 18/6، حلب 12/4 والرقة 10/4 عينات (جدول 1).

الجدول (1) يبيّن المواقع التي جمعت منها عينات جذور القمح والشعير و الشوندر السكري ونتيجة الفحص المجهري للكشف عن *Polymyxa* sp. فيها

المحافظة	الموقع	نتيجة الفحص المجهري في الكشف عن *Polymyxa* sp.		
		قمح عدد العينات المصابة/ عدد العينات المختبرة	شعير عدد العينات المصابة/ عدد العينات المختبرة	شوندر عدد العينات المصابة/ عدد العينات المختبرة
حمص	تلبيسه	3/0	3/0	4/4
	الغنطو	4/0	5/0	3/3
	محطة البث الغربية	3/1	5/3	3/3
	أم شرشوح	3/0	4/1	3/1
	محيط معمل السكر	1/0	0/0	2/1
	السعن الغربي	2/0	3/0	3/2
	قطينة	2/0	2/2	5/3
	القصير	4/0	3/0	2/1
حماة	عين الكروم	1/0	5/3	2/2
	حورات عمورين	2/0	2/0	2/0
	العشارنة	3/0	3/1	4/1
	نهر البارد	3/0	3/0	4/0
	سلحب	1/0	2/0	3/0
	محردة	2/0	4/0	4/1
	تل سكين	3/0	3/1	1/0
إدلب	خان شيخون	3/0	2/1	2/0
	الهبيط	4/0	3/1	4/1
	كرناز	2/0	3/3	2/1
	جسر الشغور	2/2	3/1	3/1
	معرتمصرين	5/1	3/3	3/2
	سلقين	3/0	3/0	4/1
حلب	مارع	3/2	4/4	2/2
	أخترين	4/0	5/2	4/2
	السفيرة	2/2	5/2	-
	جبل سمعان	3/0	2/0	-
	تل حديا	4/0	2/0	2/0
	مسكنة	2/0	3/0	4/0
الرقة	زورشمر	3/0	2/0	2/2
	السمرة	4/0	4/0	3/2
	طاوي رومان	1/0	3/0	1/0
	الحمرة	3/0	5/0	4/0
الحسكة	محيط مدينة الحسكة	6/0	6/0	-
	القامشلي	3/0	5/1	-
	القحطانية	5/1	5/3	-
	العامودا	8/2	6/4	-

3- نتائج الفحص المجهري في الكشف عن *Polymyxa* sp. في عينات التربة المجموعة من حقول القمح، الشعير والشوندر السكري

دُرست عدد من عينات التربة المأخوذة من الحقول التي أخذت منها عينات الجذور من الشعير والقمح والشوندر السكريٍ والتي أثبت إصابتها بـ *Polymyxa* sp. لمعرفة هل كان *Polymyxa* sp. منتشراً في التربة. بحيث يكون كل موقع ممثلاً بعينتي تربة: الأولى من حقول الشعير من أجل الكشف مجهرياً عن *P. graminis*، والثانية من حقول الشوندر السكري من أجل الكشف عن *P. betae* (جدول 2). قُسّمت كل عينة إلى قسمين ووضعت بأصص بقطر 12 وارتفاع 12 سم، حيث زرع بالقسم الأول بذور شعير (عربي أسود) وبالثاني بذور شوندر سكري (هيلما). بعد عشرة أسابيع من الزراعة تبيّن ما يأتي: تطابقت نتائج فحص عينات جذور الشعير والشوندر السكري المزروعة ضمن ظروف الحاضنة من عينات الأتربة المجموعة مع نتائج الفحص المجهري لجذور الشعير والشوندر السكري المجموعة مباشرة من الحقول التي أبدت أعراض اصفرار وشحوب. وقد كانت عينات التربة المختبرة جميعها والمجموعة من حقول الشوندر مصابة بـ *P. betae*، وكذلك الأمر بالنسبة إلى عينات التربة المختبرة والمجموعة من حقول الشعير (جدول 2 وشكل 2).



الشكل (2) يبيّن البثرات الحويصلية Cystosori وبداخلها الأبواغ الساكنة Resting spores لكل من *P. graminis* في جذور الشعير(A) باستخدام أزرق التريبان و*P. betae* في جذور الشوندر السكري (B) من دون استخدام أزرق التريبان (C) باستخدام أزرق التريبان حيث الإصابة شديدة.

فضلاً عن ذلك وجدت الأبواغ الساكنة لـ *P. graminis* في جذور الشعير المزروع ضمن ظروف الحاضنة في عينات التربة المجموعة من حقول الشوندر السكري وخاصة في مواقع: محطة البث الغربية (حمص)، وعين الكروم (حماة) وأخترين (حلب). بالمقابل وجدت الأبواغ الساكنة من *P. betae* في جذور الشوندر السكري المزروع ضمن ظروف

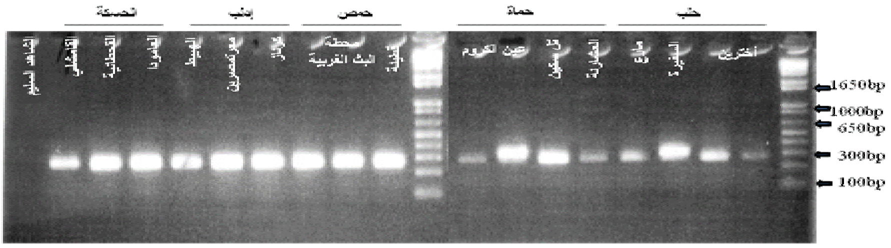
الحاضنة في عينات التربة المجموعة من حقول الشعير، كما في المواقع: عــين الكــروم (حماة)، كرناز ومعرتمصرين (إدلب) ومارع وأخترين (حلب) (جدول 3 وشكل 2)

الجدول (2) يبين المواقع التي جمعت منها عينات التربة من حقول القمح والشعير والــشوندر السكري ونتيجة الفحص المجهري للكشف عن *Polymyxa* sp. فيها

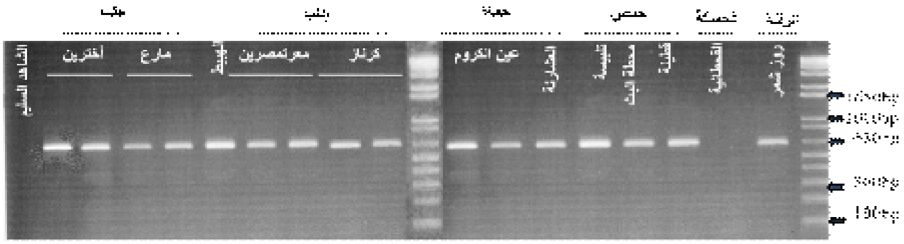
المحافظة	الموقع	مصدر عينة التربة	نتيجة الفحص المجهري في الكشف	
			عن *P. garminis* في الشعير	عن *P. betae* في الشوندر
حمص	تلبيسه	حقل شوندر	-	+
	محطة البث الغربية	حقل شوندر	+	+
		حقل شعير	+	-
	قطينة	حقل شوندر	-	+
		حقل شعير	+	-
حماة	عين الكروم	حقل شوندر	+	+
		حقل شعير	+	+
	العشارنة	حقل شوندر	-	+
		حقل شعير	+	-
	تل سكين	حقل شعير	+	-
إدلب	الهبيط	حقل شوندر	-	+
		حقل شعير	+	-
	كرناز	حقل شوندر	-	+
		حقل شعير	+	+
	معرتمصرين	حقل شوندر	-	+
		حقل شعير	+	+
حلب	مارع	حقل شوندر	-	+
		حقل شعير	+	+
	أخترين	حقل شوندر	+	+
		حقل شعير	+	+
	السفيرة	حقل شعير	+	-
الرقة	زورشمر	حقل شوندر	-	+
الحسكة	القحطانية	حقل شعير	+	-
	القامشلي	حقل شعير	+	-
	العامودا	حقل شعير	+	-

4- الكشف عن*Polymyxa* sp. وتحديـد الأنـواع المنتـشرة باسـتخدام تفاعـل البوليمراز المتسلسل (PCR)

لتأكيد نتائج الفحص المجهري عن انتشار *P. graminis* و*P. betae* فـي سـورية. استخلص الـ DNA من جذور الشعير المصاب بــ *P. graminis* والمــزروع فــي عينات التربة المأخوذة سواء من حقول الشعير أو الشوندر السكري والبــالغ عــددها 17 عينة كما يأتي: حمص (عينتان من محطة البث الغربية، وعينة من قطينة)، حماة (عينتان من عين الكروم وعينة من كل العشارنة وتل سكين)، إدلب (عينة من كل مــن الهبــيط، وكرناز ومعرتمصرين)، حلب (عينة من كل من مارع والسفيرة وعينتان مــن أختــرين) والحسكة (عينة من كل من القحطانية، والقامشلي وعامودا). كما اســتخلص الـــ DNA من جذور الشوندر السكري المصاب بـــ *P. betae* والمزروع في عينات التربة المأخوذة سواء من حقول الشوندر السكري أو الشعير والبالغ عددها 17 عينة كما يــأتي: حمــص (عينة من كل من تلبيسة، ومحطة البث الغربية و قطينة)، حماة (عينة واحدة من العشارنة وعينتان من عين الكروم)، إدلب (عينتان من كل من كرناز ومعرتمصرين وعينة واحــدة من الهبيط)، حلب (عينتان من كل من مارع وأخترين)، الرقة (عينة من روزشمر) وفــي الحسكة عينة من موقع القحطانية على الرغم من عدم مــشاهدة *P. beate* فــي جــذور نباتات الشوندر السكري المزروعة في عينة تربة مصدرها حقل شعير وعُدّت شاهداً.



الشكل (3) يبيّن نتائج الرحلان الكهربائي لمنتجات الـPCR الناتجة عن استخدام الـــ DNA المستخلص من جذور الشعير المصابة بــــ *P. graminis* والبادئـــات (Pgfwd2 وPxrev7 الخاصة بالكشف عن *P. graminis* وتحصر المجال 320 زوجاً قاعدياً وذلك على هلامة الأجاروز (1.5%). إذ تبدو العينـــات المجموعـــة مـــن المواقـــع المذكورة أعلاه جميعها مصابة بـــ *P. graminis*



الشكل (4) نتائج الرحلان الكهربائي لمنتجات الـPCR الناتجة عن استخدام الـ DNA المستخلص من جذور الشوندر السكري المصابة بـ *P. betae* والبادئات Pb-3a وPb-3b الخاصة بالكشف عن *P. betae* وتحصر المجال 630 زوجاً قاعدياً على هلامة الأجاروز (1.5 %) وتبدو العينات جميعها مصابة بـ *P. betae* باستثناء العينة المجموعة من القحطانية (الحسكة) تبدو غير مصابة

جاءت نتائج اختبارات تفاعل البلمرة المتسلسل PCR باستخدام البادئات المتخصصة في تحديد *P. graminis* و *P. betae* في جذور نباتات الشعير والشوندر السكري مطابقة لنتائج الكشف المجهري. حيث كانت جذور نباتات الشوندر السكري المزروعة في تربة مجموعة من حقول شوندر السكري مصابة بـ *P. betae* (الشكل 4). كذلك الأمر كانت جذور نباتات الشعير المزروعة في تربة مجموعة من حقول شعير مصابة بـ *P. graminis* (الشكل 3). كما تم التأكد من أن أتربة بعض الحقول مصابة بكلا النوعين وبغض النظر عن المحصول المزروع. كما هو الحال في بعض حقول الشوندر السكري في كل من محطة البث الغربية، وعين الكروم وأخترين وحقول وبعض حقول الشعير في كل من عين الكروم، وكرناز، ومعرتمصرين، ومارع وأخترين.

المناقشة

لم تكن هذه الدراسة الأولى في تسجيل *P. graminis* في سورية إذ أن هناك تقرير سابق أشار إلى الكشف عنه في محافظة حلب (Mouhanna, *et al*., 2007) ولكن تشير أول مرة إلى انتشار *Polymyxa* sp. في بعض الحقول في مناطق أخرى من سورية، سواء عن طريق الكشف عنه مجهرياً في العينات النباتية من القمح والشعير أو الشوندر السكري المجموعة من الحقل مباشرة، وأظهرت النباتات أعراض نمو غير طبيعية من اصفراراً وشحوباً مع تقزم، أو عن طريق نباتات الشعير والشوندر السكري التي زرعت ضمن ظروف الحاضنة في عينات تربة جمعت من تلك الحقول. كما تظهر هذه الدراسة وبشكل واضح أول مرة مجهرياً وجزيئياً انتشار كلا النوعين *P. graminis*

و*P. betae* في مناطق مختلفة. فالدراسة المجهرية أظهرت أول مرة البثرات الحويصلية Cystosori وبداخلها الأبواغ الساكنة Resting spors في الشعيرات الجذرية لكل من نباتات الشعير والشوندر السكري المصابة، واعتمد في تحديد النوع المنتشر على أكثر من مؤشر منها:

- المضيف الطبيعي المفضل لكل منهما، فالشعير يعدُّ مضيفاً لـ *P. graminis* والشوندر السكري مضيفاً لـ *P. betae* ولا يمكن أن يكون مضيفاً لـ *P. graminis*. ويجب أن نؤكد هنا أنه بالنسبة إلى *P. betae*، فقد أشير إليه وبشكل غير مباشر منذ عدة سنوات عن طريق الكشف عن مرض الريزومانيا في عدد من الأراضي السورية (Mouhanna, *et al.*, 2002).
- التحليل الجزيئي للحمض النووي المنقوص الأوكسجين الريبوزومي rDNA المستخلص من جذور نباتات الشعير المصابة بـ *P. graminis* ونباتات الشوندر السكري المصابة بـ *P. betae* وباستخدام بادئات متخصصة لتحديدهما في تقانة PCR.

أظهرت النتائج أن معظم العينات النباتية من الشعير ومن عينات التربة التي زرعت بالشعير كانت مصابة بـ *P. graminis*؛ وهذا يشير إلى أن الشعير العربي الأسود قابل للإصابة بالطراز المنتشر من *P. graminis* أكثر من القمح . كما لوحظ أن كثافة البثرات الحويصلية Cystosori في الشعيرات الجذرية لنباتات الشعير والقمح المجموعة من الحقل مباشرة كانت أقل بكثير مما هو عليه في الشوندر السكري وهذا يعود إلى الرطوبة المحيطة بجذور كل منها. فمعظم زراعات القمح والشعير زراعات بعلية تكون فيها الرطوبة خلال أيام محدودة من العام، أمّا زراعة الشوندر السكري فهي زراعة مروية، وهذا ما يسهل للأبواغ التحول إلى الشكل المتحرك لتهاجم خلايا وشعيرات جذرية أخرى جديدة، وهذا يتفق مع دراسات سابقة (Tuitert and Hofmeester, 1992) مثل هذه الملاحظة لم نجدها في عينات التربة التي زرعت ضمن ظروف الحاضنة، وهذا ما يؤكد فرضية ضرورة توافر الرطوبة في التربة من أجل الانتشار الكثيف لـ *P. graminis* فضلاً عن ذلك يجب أن لاننسى أن العينات النباتية كانت قد جمعت في أغلبها من مواقع منخفضة ضمن الحقل. من الجدير بالملاحظة عدم الكشف عن *P. betae* في مناطق الدراسة في الحسكة على الرغم من انتشار *P. graminis*؛ وهذا يعود إمّا لأن زراعة الشوندر السكري غير منتشرة كما هو الحال في حمص وحماة وإدلب، أو لأن الأراضي هناك غير مصابة بـ *P. betae*.

عالمياً سجل أكثر من طراز من *P. graminis* اعتماداً على تتابع النيكلوتيدات للـ DNA الريبوزومي الواقع في الحبيبة الصغيرة من الجسيم الريبي التي تضم ITS1، 5.8S rDNA وITS2، وتبيّن أنها تختلف فيما بينها بالمدى العوائلي وبمتطلباتها

الحرارية وبالمنشأ الجغرافي، وبناء عليه اقتُرح وجود عدة طرز/ أشكال خاصة منها *P. graminis* f. sp. *tepida* ويتميّز بأن درجة الحرارة المناسبة له تراوح مابين 15-20 ْس وينحصر مداه العوائلي بالفصيلة النجيلية وعلى وجه الخصوص الشعير والشوفان والقمح (Legrève *et al*., 2002)، وتشير دراسات أخرى إلى أن هذا النوع هو الأكثر إصابة للقمح ويسهم بنقل فيروس موزاييك الحبوب المنقول بالتربة Soil-borne cereal mosaic virus (Ward *et al*., 2004). بينما الطراز *P. graminis* f. sp. *temperata* كان أكثر انتشاراً في حقول الشعير. في حين تؤكد دراسات أخرى بأن كلا الطرازين كانا موجودين معاً في التربة نفسها (Vaianopoulos *et al*., 2007). أمّا الطرز *P. graminis* f. sp. *subtropicalis* فكُشف عنه في المناطق تحت المدارية في الهند وباكستان وقد أشارت الدراسات الجزيئية الوراثية إلى أنه قريب من الطراز *P. gramins* f. sp. *tepida* إلا أن درجة الحرارة المناسبة له أعلى من 23 ْس ومداه العوائلي نباتات الفصيلة النجيلية كالذرة البيضاء والشعير والقمح، كما يصيب نباتات من الفصيلة البقولية كالفول السوداني والسرمقية كالشوندر السكري (Legrève *et al*., 2002). لابدّ من تحديد الطرز المنتشرة في سورية ومعرفة المدى العوائلي الخاص بها ودرجة الحرارة المناسبة لنشاطها، وهو دورها أو كفاءتها في نقل الأمراض الفيروسية سواء إلى الفصيلة النجيلية أو إلى غيرها من الفصائل النباتية.

من المعروف أنه نادراً ما تظهر أعراض إصابة على النباتات المصابة بالجنس *Polymyxa* sp. أو تحدث أضرار اقتصادية على النباتات المصابة سواء من الشوندر السكري أو الشعير والقمح، وضرره ينحصر بأنه ناقل للأمراض الفيروسية الخطرة على الإنتاج والإنتاجية (Schloesser, 2007; Thompson, *et al*., 2011). مع العلم أنه جُمعت العينات من مواقع أبدت فيها النباتات ضعفاً في النمو، وأحياناً اصفراراً وشحوباً باللون مترافقاً أحياناً مع التقزم، وهذا يوحي بأنّ القمح والشعير مصابان بأمراض أخرى أدت إلى ظهور مثل هذه الأعراض. إلا أن بعض الدراسات أظهرت أن مثل هذه الأعراض قد شوهدت في الحقل الذي كُشف فيه عن انتشار *P. graminis*، وعند اختبار النباتات تبيّن أنها خالية من أية إصابة فيروسية (Thompson, *et al*., 2011). تؤكد هذه النتائج ضرورة الاستمرار في البحث مع التركيز على الكشف عن الأمراض الفيروسية التي يمكن أن تكون مترافقة مع الإصابة بـ *P. graminis* أو الكشف عن مسببات مرضية أخرى بغرض الحد من انتشارها ومن الخسائر التي يمكن أن تسببها مستقبلاً.

REFERENCES

Abe , H. and T. Ui, (1986): Host Range of *P. betae* Keskin Strains in Rhizomania-infected Soils of Sugar Beet Fields in Japan. Ann. Phytopath. Soc. Japan 52: 394-403

Barr, D.J.S. and ME Allan (1982): Zoospore ultrastructure of *P. graminis* (Plasmodiophoromycetes). Can J Bot 60:2496–2504

Barr KJ, and MJC Asher (1992): The host range of *P. betae* in Britain. Plant Pathology 41:64–68

Barr, K. J. S. (1979): Morphology and host range of *P. graminis*, *P. betae* and *Ligniera pilorum* from Ontario and some other areas Can. J. Pl. Path. 1:85-94.

Cavalier-Smith T, and E-Y Chao (2003): Phylogeny and classification of Phylum Cercozoa (Protozoa). Protist 154:341–358

Doyle, J.J. and J.L. Doyle. (1990): Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.

Giunchedi, L. and W.G. Langenberg, (1982): Beet necrotic yellow vein virus transmission by *P. betae* Keskin zoospores. Phytopath. Medit. 21: 5- 7

Grünewald I., I. Horak and E. Schlösser (1983): Rhizomania. III. Verbreitung im Hessischen und Worms sowie Beziehungen zum Boden-pH und zur Fruchtfolge. Zuckerind 108, 650-652.

Heidel, G.B.; C.M. Rush, T.L. Kendall, S.A. Lommel, and R. C. French, (1997): Characteristics of beet soil-borne mosaic virus, a furo-like virus infecting sugar beet. Pl. Dis. 81: 1070-1076

Ivanoviç, M. and I. Macfarlane. (1982): A tubular virus associated with infection of sugar beet by *P. betae*. Annals report of Rothamsted Experimental Station for 1981, 190-191.

Jones R (2004): A national diagnostic protocol for soil-borne viruses of wheat. Department of Agriculture, State of Western Australia, 1– 5., pp 42

Kanyuka K, E, Ward and MJ Adams (2003): *Polymyxa graminis* and the cereal viruses it transmits: a research challenge. Mol Plant Pathology 4:393–406

Karling JS (1968): The Plasmodiophorales: including a complete host index, bibliography, and a description of diseases caused by species of this order. Hafner, New York, p 240

Keskin, B. (1964): *P. betae* f. sp., ein Parasit in den Wurzeln von *Beta vulgaris* Tournefort, besonders während der Jugendentwicklung der Zuckerrübe. Arch. Mikrobiol. 68 : 218-226

Ledingham GA (1939): Studies on *Polymyxa graminis* n.gen. n.sp., a plasmodiophoraceous root parasite of wheat. Can J Res C 17:38–51

Legrève A, P, Delfosse and H. Maraite. (2002): Phylogenetic analysis of *Polymyxa* species based on nuclear 5.8S and ITS ribosomal DNA sequences. Mycol Res 106:138–147

Meunier, A.; J.F.O. Schmit, A. Stas, N. Kutluk, and C. Bragard, (2003): Multiplex Reverse Transcription-PCR for Simultaneous Detectin of Beet Necrotic Yellow Vein Virus, Beet Soilborne Virus and Beet Virus Q and their Vector *P. betae* keskin on Sugar beet. Applied and Environmental Microbilogy 69, 2356-2360. ish Society for Plant Pathology.

Mouhanna, A. M.; A. Nasrallah, G. Langen, and E. Schloesser, (2002): Surveys for Beet Necrotic Yellow Vein Virus (the cause of Rhizomania), other Viruses, and Soil-borne Fungi Infecting Sugar Beet in Syria. J. Phytopathology 150, 657-662

Mouhanna, A.M.; A.H. Kassem, F. Alkhateeb, O. Othman, A. Alshaikh, and A. Alkhalf, (2007): The First Report of *Polymyxa graminis* Led. in Northern Syria. Arab and Near East, Plant Protection newsletter, 39 ANEPPNEL 45.

Mouhanna, A. M.; G. Langen, and E. Schloesser, (2008): Weeds as alternate hosts for BSBV, BNYVV and the vector *P. betae*.(German Isolate) Journal of Plant Diseases and Protection, 115 (5), 193–198

Mutasa, E.S.; D.M. Chwarszczynska, M.J. Adams, E. Ward, and M.J.C. Asher. (1995): Development of PCR for the detection of *P. betae* in sugar-beet roots and its application in field studies. Physiological and Molecular Plant Pathology 47: 303-313.

PaDIL (Pests and Diseases Image Library) (2009): Plant biosecurity toolbox. Wheat spindle streak mosaic virus (WSMV). http: // www. padil.gov.au/pbt/index.phpq= node/46&pbtID

Rush CM (2003): Ecology and epidemiology of Benyviruses and plasmodiophorid vectors. Annual Review Phytopathology 41:567–592

Schloesser, E. (1989): Rizomania., XI. Weeds as alternate hosts for virus and vector. Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent 54

Schloesser, E. (1997): Allgemeine Phytopathologie. 2. neubearbeite Auflage. Thieme. Stuttgart, New York. S. 271-276

Teakle, D.S. (1983): Zoosporic fungi and viruses. In: Buczacki ST (ed) Zoosporic plant pathogens. Academic, London, pp 233–248

Thompson, J. P; T. G. Clewett; R. E. Jennings; J. G. Sheedy; K. J. Owen and D. M. Persley. (2011): Detection of *Polymyxa graminis* in a barley crop in Australia. Australasian Plant Pathology. (2011) 40:66–75

Tuitert, G., and Y Hofmeester (1992): Epidemiology of Beet necrotic yellow vein virus in sugar beet at different initial inoculum levels in the presence or absence of irrigation: Dynamics of inoculum. Neth J Plant Pathol 98:343–360

Vaïanopoulos, C.; C. Bragard, V. Moreau, H. Maraite, and A. Legrève, (2007): Identification and quantification of *Polymyxa graminis* f. sp. *temperata* and *P. graminis* f.sp. *tepida* on barley and wheat. Plant Dis 91:857–864

Ward E, K, Kanyuka, J. Motteram, D. Kornyukhin and MJ. Adams (2004): The use of conventional and quantitative real-time PCR assays for *P. graminis* to examine host plant resistance, inoculums levels and intraspecific variation. New Phytol 165:875–885

Ward, E. and M.J. Adams, (1998): Analysis of ribosomal DNA sequences of *Polymyxa* species and related fungi and the development of genus- and species specific PCR primers. Journal Mycology Research. 102: 965-974

Received	2011/08/14	إيداع البحث
Accepted for Publ.	2012/02/28	قبول البحث للنشر