Biological and molecular characterization for controlling mango malformation disease

Mohamed Esmail Abdel Wahab Hassan

تعتبر المانجو من محاصيل الفاكهة الهامة فى مصر وكل انحاء العالم . طبقا لاحصائيات وزارة الزراعة واستصلاح الاراضى تقدر المساحة الاجمالية للمانجو بحوالى 151 ألف فدان بأجمالى انتاجية 596 مليون طن فى مصر ومتوسط محصول الفدان حوالى 5.41 طن.يصيب أشجار المانجو كثير من الأمراض الفطرية والبكتيرية والفيروسية والفسيولوجية التى تؤثر على إنتاجية المحصول ومن أهم هذة الامراض مرض التشوة الزهرى بالمانجو الذى هو محل دراسة هذا البحث ويمكن تلخيص أهم النتائج كما يلى:أختبارات مرضية :1- أظهرت العينات التى تم تجميعها من أماكن مختلفة من محافظات الجمهورية وهم :البحيرة والجيزة والإسماعيلية أعراض التشوة وتكتل خضرى وزهرى بالمانجو وتلون الأوعية الداخلية .2-أوضحت النتائج الفحص الميكروسكوبى الضوئى للعزلات التى تم عزلها من محافظات مختلفة أنة يوجد عديد من أنواع عزلات Fusarium التى تم عزلها من الشماريخ الخضرية الزهرية المتكتلة كالتالى : F. subglutinans, F. solani, F. oxyspoum, F. sterilihyphosum, F. proliferatum, F. moniliforme, F.avena F.chlamydspore و F. subglutinans .3-المرضية القدرة نتائج اوضحت تحت ظروف العدوى الصناعية بالصوبة للعزلات المختلفة من فطريات Fusarium أن الفطر F. subglutinans يليها المرضية القدرة حيث من العزلات اقوى وهى للمرض الرئيسى المسبب هو F. oxysporum, sterilihyphosum and F.proliferatum حيث الأصابة بحدوث يرتبطوا انهما و أحداثا أصابة بنسب أقل سواء عند حقن التربة بجراثيم الفطريات أو حقن البراعم بنواتج الراشح الأيضى . بينما العزلات الأخرى أظهرت أعراض أعفان جذور .4-أظهرت دراسة القدرة المرضية بأن الفطر لجميع يصيب أنة والزهرى الخضرى التشوة لمرض الرئيسى المسبب هو Fusarium subglutinans الأصناف المحلية والمستوردة5-أوضحت نتائج الدراسات التشريحية للبراعم القمية للشتلات التى تم حقنها عن طريق التربة عن الكشف عن تشوه في البراعم ووجود مناطق تحلل وتضخم للعزلات الممرضة بالمقارنة بالعزلات الغير محدثة للممرض.6- كما أوضحت الدراسات بأستخدام الميكروسكوب الألكترونى الماسح عند الحقن بالمسبب الرئيسى للتشوة الزهرى هو F. subglutinans بعد ثلاثة أشهر من تلقيح التربة حدوث أعراض المرض تتضمن تكتل للبراعم الخضرية والزهرية وأنتشار فطر الفيوزاريوم في النسيج بتركيزات عالية فى الجذرو الأوعية والبراعم الجانبية والقمية .7-ولمزيد من الدراسة ؛ خضعت هذه العزلات للدراسات التعريفية وتحاليل الشكل الظاهرى لخلايا وجراثيم تلك العزلات وعن طريق إستخدام البيئات الغذائية المتخصصة ومقارنتها بما ورد فى مفاتيح التعريف المعتمدة .الإختبارات الكيميائية :8 - أجريت دراسات لأنتاج هذة العزلات للتوكسينات السامة والمحدثة للتشوة وكذلك التغيرات الكيميائية فى الشتلات نتيجة الأصابة بالممرضات وقد أتضح الآتى:•تم فصل و تقدير معدل أنتاج توكسين المونيليفورمين لفطريات الفيوزاريوم التى تم زراعتها على بيئات سائلة باستخدام جهاز التحليل الكروماتوجرافيا باستخدام السوائل ذات الضغط العالى (HPLC) وأظهرت النتائج مايلى :أن أعلى أنتاج للمونيليفورمين للفطر F. subglutinans بمعدل 8.51 µg/ml للفطر F.oxysporum و 6.30 بمعدل 6.90 µg/ml كميات الأخرى الفطريات أنتجت بينما , F. proliferatum للفطر µg/ml و4.10 F.moniliforme µg/ml متوسطة من المونيليفورمين حيث أنتج الفطر F.avenacum (3.88 ml/µg) , chlamydospore.F توكسين أنتاج معدل تقدير و فصل تم •. F. sterilihyphosum((µg/ml 1.10) و (60. µg/ml) الفيومونسين لفطريات الفيوزاريوم التى سبق زراعتها على بيئات سائلة باستخدام جهاز التحليل

الكروماتوجرافيا باستخدام السوائل ذات الضغط العالى (HPLC) وأظهرت النتائج أن أعلى معدل أنتاج للفيومونسين للفطر moniliforme.F (ml/µg 8.30), وقد قدر بمعدل ml/µg 8.30 للفطر F. proliferatum و µg/ml.50 للفطر F.subglutinans بينما كان انتاجة معدل ضعيف بالنسبة للفطر F.avenacum (0.16 µg/ml) , بينما لم تنتج أى فطر من F.sterilihyphosum و والمسئول المنجفرين الفيتوأليكسن مستوى على المصاب النبات استجابة مدى دراسة تم•F.oxysporum عن مقاومة أشجار المانجو للممرضات وذلك باستخدام جهاز التحليل الكروماتوجرافيا باستخدام السوائل ذات الضغط العالى (HPLC) لشتلات نامية فى تربة حقنت صناعيا بالممرضات الفطرية وأظهرت النتائج أن تركيز المنجفرين لشتلات المقارنة الغير محقونة وهو 0.96 µg /g_1 FW بينما كان تركيزة فى الشتلات المصابة والمحقونة بفطر F. sterilihyphosum 0. 52 µg /g_1 FW و F.subglutinans 0.15 µg/ g_1 FW بفطر و F.proliferatum 0.12 µg/ g_1 FW و F.oxysporum 0.0039 µg/ g_1 FW فطر و g_1 FW دراسات بيولوجيا الجزيئية9- أجريت أختبارات تشخيصية على المستوى الجزئيى لدراسة القرابة بين فطريات الفيوزاريوم للربط بين أنتاجها للمواد السامة والبروتينات والقدرة المرضية وقد تبين التالى:•أستخلصت البروتينات للعزلات الفطرية المسببة للمرض باستخدام تحليل التفريد الكهربى للبروتينات (الإلكتروفوريسيس) وعلية اتضح وجود أحزمة بروتينات مميزة لكل فطر على حدة ووجود بعض الحزم البروتينية المشتركة بين بعض الفطريات الممرضة والمنتجة للتوكسين•تم التمييز على مستوى الحامض النووى DNA)) لكل من العزلات الفطرية الممرضة وتم عمل البصمة الجزيئية للحامض النووى عن طريق إجراء تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل (PCR) باستخدام تتابع عشوائى لثلاث النيوكليوتيدات للحامض النووى (RAPD Primers) وعلية اتضح وجود بعض أجزاء من الحامض النووى ((DNA النووى الحامض من أجزاء بعض حدة على فطر لكل مميزة DNA) المشتركة بين بعض الفطريات وتم عمل أيضا شجرة الصلة او القرابة بين الفطريات واوضحت وجود وجة تشابة بين F. proliferatum وفطر بين تشابة ووجود F.subglutinans وبين F.moniliforme بين القرابة صلة وايضاF.sterilihyphosum فطر oxysporum.F وبين فطر chlamydospore.F ؛واوضحت النتائج ووجود صلة قرابة بين فطر صلة وجود النتائج وأوضحت F.sterilihyphosum. و F. Proliferatum ى فطر وبين F.subglutinans قرابة بين فطر sterilihyphosum.F وبين الفطريات subglutinans.Fوmoniliforme.F مواد انتاج الى الدراسة هذة تهدف -10:الحيوية الأختباراتF. proliferatum. و F.sterilihyphosum بيواوجيه نشطه جهازية و ذات تأثير مضاد لفطريات الفيوزاريم من عزلات ميكروبية والغير ضارة بالإنسان والبيئة وكذلك المحصول الناتج والمعد للتصدير بهدف تقليل استخدام المبيدات الكيميائية لأضرارها البيئية المختلفة بدلا من المبيدات الكيميائيه لكى تساهم فى تقليل التلوث البيئى ولذا:•تم إجراء دراسة لاختبار النشاط التضادى لبعض كائنات المكافحة الحيوية وهى: Trichoderma harzianum, T. longibrachiatmu, T. hamatum, T. koningii, T. viride and T. roseeii , Penicillium oxalicum, Bacillus brevis, Pseudomonas fluorescens Pseudomonas putida, Paenobacillus polymyxa, Streptomyces hygroscopicus and Streptomyces aureofaciens ضدالفطريات الممرضة والمسببة للتشوة , وهى كل من F. sterilihyphosum., F. subglutinans, F. oxysporum, F .proliferatum•تم اختيار تلك العزلات على وتنميتها الغذائية البيئة السائلة وتحضينها باستخدام جهاز هزاز سرعة 250 لفة في الدقيقة لمدة ثمانية أيام وبعد إنتهاء فترة التحضين تم ترشيح المنبت الغذائي وإجراء إختبارات أخرى لراشح هذه العزلات. تم عمل إختبار لراشح هذه العزلات لتثبيط فطريات الفيوزاريم تحت الإختبار وقد حيث أمكن الحصول علي ستة عزلات لهما نشاط تضادى متميز كأقوى العزلات نشاطا وهى Trichoderma harzianum, Penicillium oxalicum, Bacillus brevis, Pseudomonas fluorescens Pseudomonas putida, and Streptomyces aureofaciens وأستخدمت فى الدراسة التالية.•تحت ظروف الأصابة الطبيعية بالحقل فقد أظهر رش أن اشجار المانجو صنفى الصديق وعويس بمنطقة النوبارية براشح المنتج الأيضى لهذة العزلات و المحملة مع مواد جيلاتينية عديدة التسكر الى حدوث مكافحة معنوية لمرض التشوة الخضرى والزهرى وقورنت ببعض المواد الكيميائية الطبيعية مثل عديد الأمين ومضاد الأكسدة والكنترول.•كان أفضل المعاملات وهى: أدت وقد•Trichoderma harzianum و Pseudomonas putida و Streptomyces aureofaciens بعضها الى زيادة جميع مقاييس النمو كما كان المحصول متمثلا فى كمية الثمار أعلى معنويا بالمقارنة بنباتات الكونترول الغير معاملة