عزل وتوصيف مسبب مرض تكلس الحضنة chalkbrood من بعض المناحل في سورية

عبدالنبي بشير* نورالدين حجيج عدنان نحلاوي****
أحمد أبو السل*** باسل الشديدي*** باسم سليمان خالد***

الملخص

أجريت الدراسة في مخابر مركز بحوث ودراسات المكافحة الحيوية في كلية الزراعة– جامعة دمشق خلال موسمي 2015–2016 لتوصيف الفطر المسبب لمرض تكلس حضنة نحل العسل مورفولوجياً. جُمعت العينات المصابة من مناحل متفرقة من محافظتي دمشق واللاذقية. أظهر الوصف المورفولوجي أن الفطر المسبب لمرض تكلس الحضنة في المناحل المدروسة في محافظتي دمشق واللاذقية هو الفطر *Ascosphaera apis*. بينت النتائج أيضاً وجود اختلاف في متوسط أقطار الثمار البوغية لعزلات اللاذقية (73.77) ميكرون عن عزلات دمشق (89) ميكرون، وفي متوسط قطر الأكياس البوغية لعزلات اللاذقية (14.43) ميكرون عن عزلات دمشق (13.85). كانت عزلات اللاذقية الأسرع نمواً والأكثر تبوغاً من عزلات دمشق وبفارق معنوي عند مستوى احتمالية 0.01.

كلمات مفتاحية: تكلس الحضنة، *Ascosphaera apis*، نحل العسل، سورية.

* قسم وقاية النبات–كلية الزراعة– جامعة دمشق.
** إدارة بحوث وقاية النبات–الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية– دمشق.
*** مركز بحوث ودراسات المكافحة الحيوية– كلية الزراعة– جامعة دمشق.

Using of the Larval Morphology in Identification and Characteristic of some Species of Ladybird Beetles (Coleoptera: Coccinellidae).

Basheer, A[*] N. Y. Daher Hjaij[**] A. Nahlawi[**]
A. Abualsel[***] B. Alshadidi[***] B.S. Khaled[*]

Abstract

This study was conducted in biological control studies and research center at Faculty of Agriculture/University of Damascus in 2015-2016 to morphologically identify the causal fungus of chalkbrood of honey bee. Infected samples were collected from different apiaries from Damascus and Latakia. Morphological description showed that *Ascosphaera apis*is the causal agent of chalkbrood disease in tested apiaries from Damascus and Latakia. Also, The result showed differences in average of ascoma diameter of latakia isolates (73.77µm) in comparison with Damascus isolates (89 µm), and in of Spore balls average of latakia isolates (14.43µm) in comparison with Damascus isolates (13.58 µm). Isolates from Latakia were more rapid in growth and sporulation in comparison with those from Damascus with significant difference at P= 0.01.
Keywords: chalkbrood, Ascosphaeraapis,honey bees, Syria

[*] Department of Plant Protection- Faculty of Agriculture- Damascus University

[**] General Commission for Scientific Agricultural Research- Damascus.

[***] Biological Control Studies and Research Center (BCSRC)- Faculty of Agriculture, Damascus University.

المقدمة:

تصاب طوائف نحل العسل بالعديد من الأمراض الفطرية، والبكتيرية والطفيليات محدثةً الكثير من الأضرار، وتؤدي في بعض الأحيان إلى موت كامل أفراد الخلية، ومن الأمراض المهمة التي تصيب حضنة النحل مرض تكلس الحضنة chalkbrood مُسببه الفطر *Ascosphaera apis* (Ascomycota: Ascosphaeriaceae) Spiltoir وOlive(Spiltoir وOlive، 1955; Rehner وزملاؤه، 2009 ;Jensen وزملاؤه، 2009)، والذي يُعد من أهم الأمراض ضرراً على نحل العسل مسبباً خسائر كبيرة في طوائفه وبالتالي انخفاض إنتاجيته (Zaghloul وزملاؤه، 2013). ينتشر مرض التكلس على نطاق واسع في المناطق المعتدلة من نصف الكرة الشمالي، وسُجل منذ فترة طويلة في أوروبا والدول الإسكندنافية وروسيا (Betts، 1932)، ونيوزيلاندا (Seal، 1957)، بينما سُجل في الولايات المتحدة وكندا عام 1970، حيث وجد بصورة خاصة في المناطق الوسطى والغربية، وتم الكشف عن هذا المرض منذ ذلك الحين في الأرجنتين، واليابان، والفلبين، وأمريكا الوسطى والمكسيك (Heath، 1985). وأكدت دراسة أخرى أن هذا المرض يُعد الأكثر انتشاراً على نحل العسل في مناحل المكسيك (Wilson وزملاؤه، 1984)، وهو الأكثر خطورة على نحل العسل في النرويج وبريطانيا (Heath، 1985). انخفضت إنتاجية العسل في الطوائف المصابة بمرض التكلس ما بين 5 و37%، وموت 80% من الحضنة (Aizen وزملاؤه، 2009 ; Aronstein وMurray، 2010). يقتصر تأثير الفطر على حضنة النحل، وتكون اليرقات بعمر 3–4 أيام حساسة جداً للإصابة بالفطر (Heath وGaze، 1987; Aronstein وMurray، 2010)، وبينت دراسة أخرى أن اليرقات بعمر 1–2 يوم عالية الحساسية لهذا الفطر، ويتم انتقال أبواغ الفطر مع الغذاء الملوث، وهذه الأبواغ تنتش داخل تجويف الأمعاء، ويتم تنشيط عملية الإنتاش بفعل CO_2 المفرز في الأنسجة، ينمو الميسيليوم داخل تجويف الأمعاء وعلى وجه الخصوص في النهاية الخلفية (Heath وGaze، 1987)، تخترق الميسيليوم بعد

ذلك جدار الأمعاء ويخرج من النهاية الخلفية لجسم اليرقة المصابة، حيث أن الرأس يبقى سليماً ولا يتأثر بنموات الفطر، وتتشكل الأجسام الثمرية للفطر خارج جسم اليرقة الميتة (Gochnauer وMargetts، 1979). يمكن للفطر *A.apis* أن يدخل من خلال بشرة اليرقة عن طريق الضغط الميكانيكي (ضغط النفاذية الناتج لغزو الأنسجة)، وبفعل بعض الأنزيمات (Proteolytic، Lipolytic، N-acetyl-glucosaminidas) وتتم العدوى بواسطة الأبواغ الأسكية ascospores (Heath، 1982)، وقد تحدث العدوى عن طريق الهيفات (Gilliam، 1978). تبقى الأبواغ محتفظة بحيويتها وعلى قيد الحياة (قابلة للنمو) 15سنة على الأقل، وهناك دلائل حالياً تشير إلى حدوث ارتفاع في نسب الإصابة بمرض التكلس، وانتشاره في كل مكان من العالم (Aronstein وMurray، 2010).

الهدف من البحث:

عزل ودراسة الصفات المورفولوجية (الشكلية) للفطر المسبب لمرض تكلس الحضنة chalkbrood المعزول من نحل مصاب من طوائف نحل العسل المحلية من مناطق بيئية مختلفة.

مواد البحث وطرائقه:

نُفذ البحث في مركز بحوث ودراسات المكافحة الحيوية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية وبالتعاون مع الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية. جُمعت عينات من يرقات النحل الميتة المحنطة (المومياات) من طوائف نحل العسل المصابة من عدة مناحل من محافظتي دمشق واللاذقية خلال موسم 2015.

تم جمع العينات من محافظتين متباينتين مناخياً، حيث تقع محافظة دمشق في الجزء الجنوبي الغربي من سورية بين خطي عرض (32.30-34.30) وخطي طول (36.00-39.00)، بينما تقع محافظة اللاذقية في الجزء الشمالي الغربي من سورية بين خطي عرض (35.31–35.56) وخطي طول (35-36). يسيطر على محافظة اللاذقية مناخ

البحر الأبيض المتوسط الذي يتميز باعتدال درجات الحرارة على مدار العام، مع ملاحظة فروق في درجات الحرارة حيث تنخفض كلما ارتفعنا عن سطح البحر، أو بالانتقال من الغرب إلى الشرق، كما يتميز مناخ اللاذقية بارتفاع الرطوبة الجوية صيفاً وشتاءً. كما تهطل الثلوج في فصل الشتاء على المناطق الجبلية التي يزيد ارتفاعها عن 1200/متر عن سطح البحر (صلنفة والمناطق المجاورة).

عزل الفطر (زراعة الفطر):

جُمعت الموميات التي ترميها الشغالات على قواعد ومداخل الخلايا المصابة خلال شهري آذار ونيسان، ومن ثم نُقلت للمخبر لإجراء عملية العزل والتوصيف، وكان لون اليرقات المختبرة بنية أو سوداء يتخللها بقع بيضاء. عُقمت اليرقات المصابة سطحياً بمحلول هيبوكلوريد الصوديوم تركيز 5% لمدة 5 دقائق ثم غُسلت بالماء المقطر المعقم لمدة دقيقتين، قُسمت كل يرقة إلى عدة أقسام، ثم وضعت في أطباق بتري تحوي مستنبت بطاطا دكستروز أغار (PDA) على درجة حرارة 24 سْ لمدة ثلاثة أيام. وعند ظهور النموات الفطرية وللحصول على عزلات نقية من الفطر أُخذ جزء من خيط قمي لميسيليوم الفطر من كل من الفطريات النامية تحت المكبر الضوئي وزُرعت مرة أخرى على مستنبت (PDA) وحضنت على درجة حرارة 24 سْ لمدة عشرة أيام. وعند نمو مستعمرات الفطر دُرست الخصائص الشكلية لكل من العزلات وسرعة النمو وإنتاج الأبواغ حتى وصولها إلى كامل الطبق وذلك حسب المراجع المعتمدة في توصيف فطر *Ascosphaera apis* (Jensen وزملاؤه، 2009). عُرفت العزلات تبعاً لسرعة نموها وإنتاجها. تم قياس أبعاد الثمار الأسكية والأكياس البوغية والأبواغ تحت المجهر الضوئي Nikon phase contrast-2 عند تكبير 40X.

النتائج والمناقشة:

تُبين النتائج الواردة في الجدول (1) أن العزلات المأخوذة من مناحل محافظة اللاذقية كانت الأسرع نمواً مقارنة مع عزلات مناحل محافظة دمشق، فقد كان متوسط قطر عزلات مناحل اللاذقية 1.375 ملم بعد 48 ساعة من التحضين، بينما تأخر ظهور النمو الفطري لعزلات دمشق حتى اليوم الرابع من بداية التحضين، كذلك غطى النمو الفطري كامل الأطباق بعد سبعة أيام من التحضين بالنسبة لعزلات اللاذقية، بينما تأخرت لليوم التاسع بالنسبة لعزلات مناحل محافظة دمشق. وكان الفارق معنوياً عند مستوى احتمالية 0.01 في سرعة النمو بين عزلات اللاذقية ودمشق بعد 2 و4 و7 يوم من التحضين، ويبين الجدول (1) أقطار المستعمرة الفطرية خلال 9 أيام لعزلات محافظة اللاذقية ودمشق.

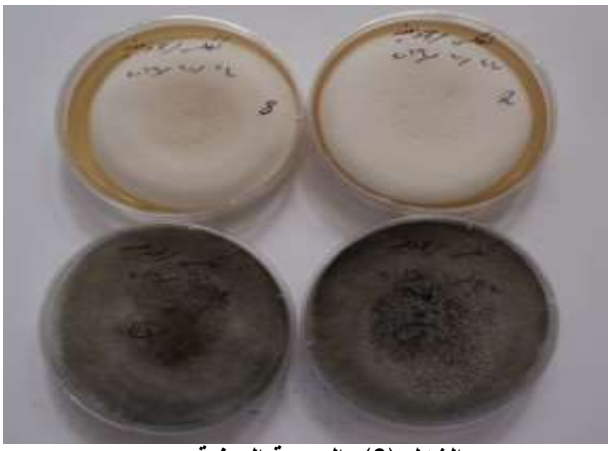
الجدول(1): قطر النمو لعزلات الفطر*Ascosphera apis* خلال التحضين.

فترة التحضين/ يوم Incubation/day	2		4		7		9
رقم العزلة Number source	مصدر العزلة Isolate source						
	دمشق Damascus	اللاذقية Latakia	دمشق Damascus	اللاذقية Latakia	دمشق Damascus	اللاذقية Latakia	دمشق Damascus
1	0	1.5	1.7	4.0	5.5	9.0	9.0
2	0	1.5	1.0	3.5	5.4	9.0	9.0
3	0	1.5	1.5	4.5	6.5	9.0	9.0
4	0	1.5	1.9	3.8	6.5	9.0	9.0
5	0	0	1.4	2.5	6.0	9.0	9.0
6	0	1.5	2.0	4.0	6.0	9.0	9.0
7	0	1.5	2.0	4.0	7.5	9.0	9.0
8	0	2	2.0	4.5	8.0	9.0	9.0
9	0	-	1.5	-	7.0	-	9.0
10	0	-	2.0	-	7.5	-	9.0
11	0	-	2.0	-	7.5	-	9.0
12	0	-	2.2	-	7.5	-	9.0
المتوسط Average	**0 b**	**1.375 a**	**1.767 a**	**3.850 b**	**6.742 a**	**9 b**	
	LSD 0.01 = 0.523		LSD 0.01 = 0.696		LSD 0.01 = 0.989		

كانت المستعمرات الناتجة ذات نمو دائري منتظمة الحواف، ولون الميسيليوم أبيض إلى وردي خفيف، مدمجاً وزغبي بعض الشيء، وهوائي، وعلى الأغلب لماع (الشكل1)، والوجه السفلي للنموات الفطرية ذو لون كريمي (شكل 2). بدأ تلون المستعمرات في المراحل المتقدمة وذلك نتيجة تشكل الجسيمات البوغية وتحولها إلى اللون الرمادي (الشكل3)، وقد لوحظ عدم تبوغ 66.67 و37.50% من العزلات المأخوذة من مناحل دمشق واللاذقية على التوالي.

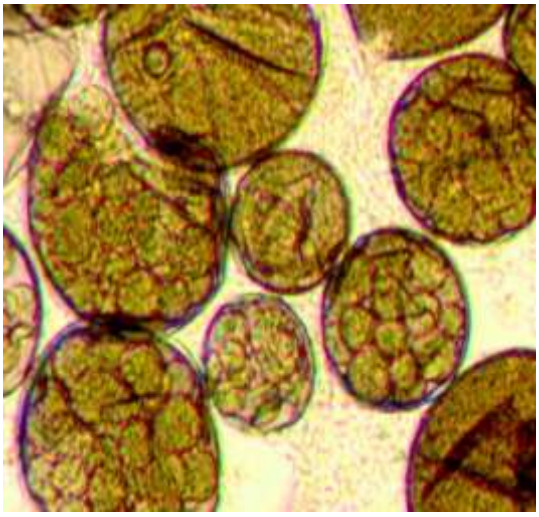
الشكل(1): الوجه العلوي لمستعمرة الفطر *Ascosphera apis*

الشكل (2): الوجه السفلي لمستعمرة الفطر *Ascosphera apis*



الشكل (3): المزرعة البوغية.

أ- غير متبوغة، ب- متبوغة.



الشكل (4): الحويصلات البوغية لفطر تكلس الحضنة مملوءة بالأكياس البوغية.

بينت الدراسة أن هناك الكثير من العوامل المؤثرة على العدوى كصيانة خلايا المنحل، والعوامل الوراثية، ومحتوى حبوب الطلع والماء والرحيق من الأبواغ، كما أشارت الدراسة إلى ارتفاع درجة الحرارة أكثر من 35 سْ، وعدم توفر الشغالات بأعداد كافية لرعاية الحضنة، والخلايا الصغيرة والتي يكون فيها نسبة الحضنة إلى الشغالات مرتفعة هي الأكثر عرضة للإصابة بهذا المرض لأن لديها مساحات كبيرة نسبياً ولا تستطيع تدفئة الخلية

(Hornitzky، 2001 ;Davis وWard، 2003)، وأشارت دراسة (Koenig وزملاؤه، 1987) إن انخفاض نسبة الأفراد الكاملة (الشغالات) إلى الحضنة يشجع على الإصابة بمرض تكلس الحضنة.

كانت السمة النموذجية للفطر بأن الثمار البوغية خارجية، تتواجد في الميسيليوم الهوائي، غزيرة، كروية الشكل، تراوحت أبعادها مابين 54 و150 ميكرون بمتوسط قدره 89 ميكرون للعزلات المأخوذة من مناحل دمشق، بينما كانت أقطار الثمار في عزلات اللاذقية أصغر بمتوسط قدره 73.77 ميكرون. أما الأكياس البوغية فهي كروية الشكل تراوح قطرها بين 10 و17.5 وبمتوسط قدره 13.85 ميكرون بالنسبة لعزلات دمشق، وما بين 8 و22 ميكرون وبمتوسط قدره 14.43 ميكرون. بينما كانت الأبواغ بيضوية الشكل بمتوسط أبعاد3.23×1.30 و3.27×1.77 ميكرون بالنسبة لعزلات دمشق واللاذقية (الجدول 2).

الجدول(2): مقارنة الصفات المورفولوجية في عزلات *Ascosphaera apis*.

العزلات Isolates	أبعاد الثمرة الأسكية/ ميكرون Spore cysts (ascoma) /µm			الكيس البوغي/ ميكرون Spore balls (asci)/µm			الأبواغ/ ميكرون Ascospores/µm						نسبة الطول/العرض Ratio L:W
							الطول Length (W) (µm)			العرض Width (W) (µm)			
	الأدنى	الأعلى	المتوسط	الأدنى	الأعلى	المتوسط	الأدنى	الأعلى	المتوسط	الأدنى	الأعلى	المتوسط	
دمشق	45	150	89 a	10	17.5	13.85a	2.5	3.75	3.23a	0.75	1.75	1.30a	2.48
اللاذقية	35	133	73.77a	8	22	14.43a	2.8	3.70	3.27a	1.50	1.80	1.77b	1.85
Skou, 1972	45	119	80.2	7	18	12.5	2	3.5	2.7	1	2	1.4	1.9
Anderson, Gibson (1998)	36	131	82	6	19	13	1.9	3.7	2.9	1.1	2.2	1.4	2.07
Anderson, Murray (2010)	–	–	60	–	–	12	–	–	2.9	–	–	1.4	2.07
Bissett (1987)	40	110	70	7	20	12	2.1	3.9	2.9	1.1	1.7	1.4	2.07
Chorbiński, Ryputa (2003)	35.0	118.0	84.5	6.8	15.3	12.1	2.7	3.5	2.9	1.1	1.8	1.5	1.93

تطابقت القياسات المورفولوجية للفطر في معظمها مع الدراسات السابقة، فمثلاً كان الحد الأدنى والأعلى للحويصلات البوغية في عزلات اللاذقية متطابقة مع دراسة (Anderson وGibson، 1998)، بينما متوسط أقطار الثمار البوغية لعزلات دمشق تُطابق نتائج دراسة سابقة (Chorbiński وRyputa ، 2003)). بالنسبة لمتوسط أقطار الأكياس البوغية فهي أكبر من القياسات الواردة في الدراسات الأخرى بمتوسط قدره 3.23 و3.27 ميكرون لعزلات دمشق واللاذقية على التوالي، وكانت أقربها دراسة(Anderson وGibson ، 1998) بمتوسط قدره 13 ميكرون، بينما كان المتوسط 12 ميكرون في معظم الدراسات (Bissett، 1987 ;Campano، 1999 ;Aronstein وMurray، 2010)، بينما تميزت الأبواغ الناتجة بأنها أكبر حجماً من القياسات الواردة

في الدراسات الأخرى، بينما كانت النسبة بين الطول والعرض نموذجية في عزلات اللاذقية بنسبة تقارب 1.9، بينما وصلت النسبة إلى 2.48 في عزلات دمشق. يتبين مما سبق الاختلافات في بعض القياسات ولكنها جميعاً ضمن الحدود المعتمدة للنوع *Ascosphaera apis*، وقد يعزى ذلك للاختلافات البيئية بين مواقع العينات، لذلك تحتاج هذه العزلات إلى توصيف أدق من خلال توصيفها جزيئياً، وإجراء العدوى على خلايا عامرة لدراسة شراسة هذه العزلات، وبالتالي اختيار الطريقة المناسبة للحد من تطور هذا المرض داخل الطوائف.

شكر خاص: للدكتور عبد الله حاطوم لتقديمه عينات النحل المصابة، والتي جُمعت من مناحل محافظة اللاذقية.

References:

- **Aizen, M.A., L.A. Garibaldi. S.A. Cunningham and A.M. Klein**. **2009**. How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production. Ann. Bot., 103: 1579–1588
- **Anderson, D.L and N.L. Gibson. 1998**. New species and isolate of spore-cysts fungi (Plectomycetes: Ascosphaerales) from Australia. Austral. Syst. Bot. 11: 53-72.
- **Aronstein, K.A and K.D. Murray. 2010**. Chalkbrood disease in honey bees. Journal of Invertebrate Pathology 103. 20– 29.
- **Betts, A.D., 1932**. Fungus diseases of bees. Bee World 40, 156.
- **Bissett, J., 1987**. Contribution toward a monograph of the genus *Ascosphaera*. Can. J. Bot. 66, 2541-2560.
- **Campano F., J.M. Flores. F. Puerta. J.A. Ruiz and J.M. Ruz.1999**. Fungal diseases of the honeybee (*Apismellifera* L.). CIHEAM. 61-68.
- **Chorbiński, P and K. Ryputa. 2003**. Studies on the morphology of strains *Ascosphera apis* isolated from chalkbrood disease of the honey bees. EJPAU 6 (2).
- **Davis, C and W. Ward 2003**. Control of chalk brood disease with natural products: a report for the RIRDC. Publication No. 03/107. Kingston, ACT, AU. 23 pp.
- **Gilliam, M., 1978**. Fungi. In: Morse, R.A. (Ed.), Honey Bee Pests, Predators, and Diseases. Cornell University Press, Ithaca, NY, pp. 78–101.
- **Gochnauer, T.A and V.J. Margetts. 1979**. Properties of honeybee larvae killed by chalkbrood disease. Journal of Apicultural Research 18(3):212-216.
- **Heath, L.A.F. 1985**. Occurrence and distribution of chalk brood disease of honeybees. Bee World 66, 9–15.
- **Heath, L. A. F. 1982**. Development of chalk brood in a honey bee colony; chalk brood pathogens: a review. Bee World 63 (3): 119-135.
- **Heath, L.A.F and B.M Gaze. 1987**. Carbon dioxide activation of spores of the chalkbrood fungus *Ascosphaeraapis*. J. Apicult. Res. 26 (4), 243–246.
- **Hornitzky, M., 2001**. Literature review of chalkbrood. A report for the RIRDC. Publication No. 01/150. Kingston, ACT, AU. 17pp.
- **Jensen, A.B., B.V. Pedersen and J. Eilenberg.2009**. Differential susceptibility across honey bee colonies in larval chalkbrood resistance. Apidologie 40, 524–534

- **Koenig, J.P., Boush. G.M. and Erickson. E.H. 1987**. Effects of spore introduction and ratio of adult bees to brood on chalkbrood disease in honeybee colonies. J. Apicult. Res. 26, 191–195.
- **Rehner, S.A and J. D. Evans. 2009**. Microsatellite loci for fungus *Ascosphaera* apis: cause of honey bee chalkbrood disease. Molecular Ecology Resources, Journal compilation.
- **Seal, D.W.A., 1957**. Chalk brood disease of bees. New Zealand. J. Agricult. 95, 562.
- **Spiltoir, C.F and L.S. Olive. 1955**. A reclassification of the genus Pericystis betts. Mycologia 47, 238–244.
- **Wilson, W.T., Nunamaker, R.A and D. Maki. 1984**. The occurrence of brood diseases and the absence of the Varroa mite in honeybees in Mexico. Am. Bee J. 124, 51–53.
- **Zaghloul, O.A., A.K. Mourad. M.B. El Kady. F.M. Nemat and M.E. Morsy. 2005**. Assessment of losses in honey yield due to the chalkbrood disease, with reference to the determination of its economic injury levels...