

الخصائص الجزيئية لعزلات فطر *Alternaria solani* على نبات الطماطم *Lycopersicon esculentum* Mill

عمار خليفة السلوقي	عبد النبي محمد أبوغنية	هيفاء محمد دوزان	نورية علي العامري	*هاجر محمد الصويد
مركز بحوث التقنيات الحيوية، طرابلس	قسم النبات، كلية العلوم، جامعة طرابلس	قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة طرابلس	قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة طرابلس	قسم علم النبات، كلية العلوم، الجامعة الأسلمية الإسلامية، زليتن

gegealamamy1984@gmail.com

<https://doi.org/10.36602/jmuas.2019.v01.01.29>

الملخص

يسبب مرض اللفحة المبكرة early blight أضراراً كبيرة للمجموع الخضري على نباتات العائلة الباذنجانية ومنها الطماطم، مُجمعت خمسة عشر عزلة (12 عزلة من الطماطم، عزلتان من البطاطس، عزلة واحدة من الفلفل) لفطر *A. solani* من مصادر مختلفة بطرابلس. أُجريت بعض الدراسات الحقلية والمعملية لتحديد الاختلافات بين تلك العزلات، وذلك من حيث النمو على الوسط الغذائي PDA، الخصائص الظاهرية، القدرة الإراضية والاختلافات الجزيئية، أظهرت مستعمرات العزلات المختبرة اختلافاً فيما بينها عند إستبتها على الوسط الغذائي PDA يتراوح بين النمو القطبي إلى المسطح وبلون زيتوني إلى زيتوني غامق، أنتجت العزلات صبغات غيرت من لون الوسط الغذائي الذي تتراوح بين اللون الرمادي والبي، بينت دراسة الخصائص الظاهرية للفطر تكون حوامل كونيدية قصيرة تحمل جراثيم كونيدية تختلف في عددها من عزلة إلى أخرى فهي إما جرثومة كونيدية مفردة أو على هيئة سلاسل من جرثومتين؛ كما أوضحت الدراسة وجود فروقات معنوية في حجم كونيديا عزلات الفطر، تتراوح أبعادها من 23.45 إلى 46.90 × 7.70 إلى 14.00 ميكرومتر، أظهرت العزلات تبايناً كبيراً عند اختبار قدرتها الإراضية على ثمار نباتات وأوراق طماطم منفصلة، تتراوح بين: شديدة، متوسطة، إلى ضعيفة الإراضية. إن دراسة التنوع الوراثي لعزلات فطر *A. solani* باستخدام RAPD-PCR وبادئات عشوائية قصيرة، قد أظهر اختلافات معنوية تمثلت في وجود أنماط مختلفة من حزم DNA متعددة وأحادية المظهر، استطاعت ثلاث بادئات من أصل عشرة (OPA-07، OPA-09، OPJ-09) تحديد البصمة الوراثية للعزلات الخمسة عشر، وقد أظهر التحليل العنقودي لنواتج RAPD-PCR أن البادئ OPA-07 تمكن من تصنيف العزلات إلى خمس مجموعات: مجموعة A (TF4، TF7، TL1، TL3)، مجموعة B (TF1، TF3، TF8، PEF)، مجموعة C (TF5، TF6، TF9، POL1، POL2)، في حين أن العزلتين المتبقيتين TL2 و TF2 ذاتا نمط تحزيمي فريد أطلق عليهما المجموعة U1 و U2 على التوالي، أما البادئ OPA-09 فقد وضع العزلات في أربعة مجاميع وهي: مجموعة A (TF4، TF6، TF7، TF8، TL2)، مجموعة B (POL1، TL3، TF3)، مجموعة C (POL2، TF5) ومجموعة D (PEF، TF9، TF2، TF1، TL1)، في حين أن البادئ OPJ-09 قد استطاع تصنيف تلك العزلات إلى أربعة مجاميع وراثية محددة هي: مجموعة A (PEF، TL3، TF7، TF1)، مجموعة B (POL2، TF8، TF3)، مجموعة C (TF2، TF6، TF9، TL2) ومجموعة D (TF4، TF5). لقد برهنت نتائج RAPD-PCR على وجود اختلافات جزيئية جديرة بالاهتمام بين عزلات *A. solani* يمكن من خلالها تصنيف تلك العزلات ضمن مجموعات مختلفة وأنماط فريدة، دون وجود علاقة تربط بين مجاميع الأنماط العنقودية وكل من العائل النباتي، الخصائص الظاهرية والقدرة الإراضية لتلك العزلات.

كلمات مفتاحية: الطماطم - اللفحة المبكرة - *Alternaria solani* - RAPD-PCR.

المقدمة

مرض اللفحة المبكرة Early blight أحد الأمراض الشائعة التي تصيب نبات الطماطم، يمكن أن يحدث المرض على نطاق واسع من الظروف المناخية ولكن أبرزها في المناطق التي يتوفر بها الندى والأمطار والرطوبة النسبية العالية (Chaerani, 2006)، يُسبب هذا المرض فطر *Alternaria solani* وكان Jones و Grout (Ellis and Martin) أول من صنفاه سنة 1882، حيث كان يعرف في السابق باسم *A. porri* f. sp. *solani* (Neergaard, 1945)، يصنف الفطر بطائفة الفطريات الناقصة *Deuteromycotina*، ميسيليوم الفطر مقسم، متفرع وداكن اللون، ويكون الفطر حوامل كونيديية تحمل جراثيم كونيديية فردية أو في سلاسل تتكون من جرثومتين ولا يكون الفطر طور جنسي، ويبقى الفطر لعدة أيام داخل العائل ويسبب عدوى أولية في الموسم التالي ويبقى لمدة طويلة في التربة أو على أجزاء بديلة من العائل (Agrios, 2005).

ينتشر مرض اللفحة المبكرة في جميع أنحاء العالم حيث يزرع الطماطم والبطاطس (Kumar وآخرون، 2008؛ Shahbazi وآخرون، 2010). ويشكل خطورة على أغلب نباتات الفصيلة الباذنجانية ويسبب خسائر للمحصول تتراوح ما بين 50-86 % في الهند (Mathur و Shekhawat، 1986). ينتشر هذا المرض في مناطق مختلفة من ليبيا (سعيد وآخرون، 2002).

يؤثر مرض اللفحة المبكرة في المقام الأول على الأوراق حيث تظهر الأعراض على شكل دوائر يحيط بعضها البعض متحدة المركز، يتراوح لونها من البني الداكن إلى اللون الأسود مما يؤدي إلى جفاف الأوراق المصابة وسقوطها وتظهر الأعراض على السيقان على شكل بقع بنية أو سوداء غائرة عن مستوى الأنسجة السليمة شكلها دائري أو طويل وتؤدي إلى سقوط النبات على الأرض، يهاجم الفطر الثمار عند اقتراب النضج حيث تظهر الإصابة على شكل بقع ذات لون بني إلى أسود مستديرة الشكل وغائرة وفي بعض الأحيان ينمو الفطر على سطح البقع ويكون جراثيمه الكونيديية (Kemmitt، 2002؛ Agrios، 2005).

لقد كان التركيز في المرحلة الماضية مُنصباً على الدراسات البيئية فيما يخص الكائن المسبب لمرض اللفحة المبكرة على الطماطم والبطاطس في ليبيا (أبوغنية، 1998)، أما الدراسات الوراثية لهذا الكائن فإنها لم تلاق الاهتمام الكافي، نظراً لقلة الإمكانيات المعملية سابقاً، لذلك أصبح من الضروري دراسة ومعرفة مدى تنوع عزلات فطر *A. solani* وذلك للوصول إلى استراتيجية فعالة لإدارة ومكافحة المرض (Chan و Jeger، 1995).

أكدت الدراسات وجود اختلافات وراثية بين عزلات فطر *A. solani* التي تم الحصول عليها من مناطق مختلفة من العالم (Martinez وآخرون، 2004؛ Van der Waals وآخرون، 2004) واستخدمت عدة تقنيات لتحديد الاختلافات

الوراثية بين عزلات *A. solani* منها استخدام نظائر الإنزيمات Isozymes (Christ و Petrunk، 1992)، وأوضحت النتائج وجود تنوع وراثي كبير بين تلك العزلات .

نظراً إلى أن المشاهدات الحقلية لأعراض المرض على النباتات المصابة هي دليل غير كافٍ للتمييز بين عزلات النوعين المرضيين *A. solani* و *A. alternata* فقد استخدمت طرق تعتمد على تقنيات حديثة أمكن بواسطتها تحديد الفرق بين النوعين المرضيين (Leiminger وآخرون، 2010). كما أن الاختلاف الواضح في الشكل الظاهري المجهرى والقدرة الإمراضية لعزلات فطر *Alternaria* خير دليل على وجود سلالات عديدة له، مما شجع على إجراء عدد من الدراسات لمعرفة الاختلافات الوراثية الجزيئية بين النوعين *A. solani* و *A. alternata* وبين السلالات لنفس النوع *A. solani* (Leiminger وآخرون، 2010) وقد شجع ذلك على استخدام تقنيات بديلة لمثل هذه الدراسات الجزيئية. ونظراً لقلّة المعلومات عن مدى التنوع الوراثي للعزلات المحلية من فطر *A. solani* فإن هذه الدراسة تهتم باستخدام تقنية RAPD-PCR لتحديد الفروقات الوراثية بين تلك العزلات، وتوظيف النتائج المتحصل عليها لإجراء أبحاث مستقبلية لمكافحة مرض اللفحة المبكرة في ليبيا.

لذا تهدف هذه الدراسة إلى عزل وتعريف الكائن المسبب لمرض اللفحة المبكرة على الطماطم واختبار الإمراضية ودراسة خصائص الشكل الظاهري لعزلات الفطر، واستخدام التقنيات الجزيئية (RAPD-PCR) كوسيلة لتحديد البصمة الوراثية لجينوم عزلات *Alternaria solani*.

مواد وطرق البحث

جمع العينات

جمعت العينات عشوائياً من منطقة طرابلس وضواحيها إضافة إلى الأسواق المحلية بتلك المنطقة خلال الفترة من شهر نوفمبر 2012 حتى شهر أبريل 2013 واحتوت هذه العينات على أوراق وثمار طماطم وأوراق بطاطس وثمار فلفل ظهرت عليها أعراض الإصابة، (عزلات الفطر التي تم الحصول عليها من نباتي البطاطس والفلفل استخدمت للمقارنة).

العزل من الأجزاء النباتية

تم تحضير الأوساط الغذائية المختلفة وشملت آجار البطاطس والدكستروز (Potato dextrose agar) PDA والآجار المائي WA إضافة إلى البيئة الرطبة Boltter Method (Akhter وآخرون، 2004) .

تقطع الأجزاء المصابة من الأوراق والثمار إلى ؟؟؟؟ يصل قطرها حوالي 2سم بحيث تشمل كل قطعة على جزء مصاب وآخر سليم من النبات، تمت معاملتها سطحياً بالكحول تركيزه 70% لمدة دقيقتان ثم غُسلت بالماء المقطر والمعقم مرتين، وضعت العينات على ورقة ترشيع معقمة لتجفيفها ثم وُزعت على سطح الوسط المغذي PDA بمعدل 5 قطع لكل طبق بتري واستخدمت ثلاث أطباق لكل عينة، تركت الأطباق لمدة 7 أيام عند درجة حرارة 27°س، وهي فترة التحضين.

طرائق عزل الفطر بصورة نقية :

1. طريقة نقل النمو الطري من العزل الفطري :

في هذه الطريقة يؤخذ نمو طري من الفطر ويُوضع في أطباق بتري محتوية على الوسط المغذي PDA ثم يحضن عند درجة حرارة 27°س لمدة 7 أيام.(أبو غنية 1988).

2. طريقة عزل بوغ واحد

استعملت طريقتا (Peever وآخرون 1999 ، Goyal وآخرون، 2011) للحصول على مزارع نقية من فطر *Alternaria solani* يتم إعداد معلق من أبواغ الفطر وذلك بكشط نمو الفطر من مزرعة نقية بواسطة مشرط أو العصا الزجاجية glass rod بعد وضع 1.5 مل من ماء مقطر ومعقم داخل المرعة ووضعها في أنبوبة اختبار بها ماء مقطر ومعقم مع الرج جيداً، نقل 1 مل من المعلق إلى أنبوبة اختبار بها 9 مل ماء مقطر ومعقم ويرج جيداً، يتم تخفيف العينة ثلاث تخفيفات متتالية، باستخدام الماصة ينقل 1 مل من كل تركيز لأطباق بتري تحتوي على الآجار المائي (WA) water agar تركيزه 2 %، وزع المعلق جيداً داخل الآجار المائي بتحريك الطبقة دائرياً وباستخدام العصا الزجاجية ثم وضع في الحضان عند درجة حرارة 27°س لمدة 7 أيام مع تعريضها لمدة 16 ساعة إضاءة و 8 ساعة ظلام (Salvov وآخرون، 2004 ; Shabazi وآخرون، 2010). استخدم مجهر ضوئي stereoscope للكشف عن نمو الفطر داخل الأطباق وتحديد مناطق نموه المراد نقلها والناجمة من إنبات بوغ واحد وذلك بوضع دوائر كعلامات دالة بقاعدة الطبقة حول تلك المناطق، نقل النمو الفطري بواسطة الثاقب المعدني وإبرة العزل ويوضع على أطباق بها PDA، يحضن لمدة 7 أيام عند درجة حرارة 27°س في الحضان، وضعت الأطباق التي بها النمو الفطري النقي في براد درجة حرارته 4°س إلى حين استخدامها، تم تحضير وتعقيم الوسط الغذائي PDA في أنابيب زجاجية توضع مائلة، ثم تنقل جميع العزلات إلى هذه الأنابيب لغرض حفظها وتترك عند درجة حرارة 4°س إلى حين استخدامها.

التعريف المجهرى

حضر شريحة مجهرية من النمو الفطري وذلك باستعمال إبرة العزل لنقل جزء من هذا النمو ويضاف إليه قطرة من صبغة أزرق الميثيلين تم تغطى بغطاء الشريحة ويتم فحصها مجهرياً وذلك باستعمال عدسة شبيبة بقوة 40، تم تسجيل الملاحظات الخاصة بالحوامل والأبواغ الكونيدية، ترتيب الكونيديا على الحوامل الكونيدية، تم قياس أبعاد الكونيديا للعزلات المختلفة باستعمال عدسة قياس micrometer ocular and stage (Prescott وآخرون، 1996).

القدرة الإراضية:

1. حقن نباتات الطماطم

أجري اختبار الإراضية على شتلات طماطم وثمار طماطم لأصناف محلية كعائل للفطر، تم اتباع طريقة Peever وآخرون (1999) حيث ترع النباتات في تربة معقمة ليصل عمرها إلى (24-40) يوماً قبل عملية الحقن. نمت العزلات على بيئة غذائية PDA لمدة 7 أيام، وتم تحضير معلق جراثيم الفطر بواسطة غمر الأطباق التي بها العزلات بماء مقطر معقم.

يُكشط النمو الفطري في كل طبق باستعمال مشروط معقم ثم ينقل المعلق إلى أنابيب للطررد المركزي لغسلها والتخلص من الماء الزائد، أخضعت جميع الأنابيب للطررد المركزي عند سرعة 5000 rpm.

تم تقدير تركيز الكونيديا باستخدام شريحة hemacytometer عند 10×10^6 كونيديا / ملم .

تم رش نباتات الطماطم (عمر 4 أسابيع) بمعلق الأبواغ الكونيدية، وضعت النباتات عند درجة حرارة 23 ± 2 °س عند 16: 8 ضوء وظلام بعد تغطيتها بأكياس بلاستيكية (مدة 24-48 ساعة) لتوفير الرطوبة اللازمة، استخدمت ثلاث مكرارات نباتية لكل عذلة إضافة إلى ثلاث مكرارات رُشت نباتاتها بماء مقطر ومعقم لاستعمالها كشاهد (Abo-Elyouser و Nashwa، 2012)، تم ملاحظة وتسجيل ظهور الأعراض على النباتات التي تم حقنها، وتصويرها فوتوغرافياً. أُعيد عزل الفطر من النباتات التي ظهرت عليها أعراض المرض وتمت مقارنتها بالعزلات الأصلية وذلك لترسيخ فرضيات كوخ (أبوغنية، 1998؛ Agrios، 2005).

2. طريقة الأوراق المنفصلة Detached leaves

استعملت طريقة الأوراق المنفصلة (Peever وآخرون، 1999؛ Halterman و Weber، 2012)، لتحديد القدرة الإراضية للفطر استخدمت أوراق يافعة سليمة عمرها 4 أسابيع تقريباً (ثلاثة أوراق في كل طبق وثلاثة أطباق لكل عذلة)، تم غسل الأوراق بالماء وتجفيفها على أوراق ترشيع معقمة قبل نقلها على أطباق بتري بها بيئة الآجار المائي Water agar،

ونقلت عزلات الفطر حديثة النمو على الوسط الغذائي PDA باستعمال الثاقب المعدني (قطره 4ملم)، ووضع على كل ورقة قرص آجار يحتوي على نمو الفطر، مع مراعاة أن يكون النمو الفطري في اتجاه ملامس للورقة ونحو محورها. أما في حالة الأوراق النباتية المستعملة للمقارنة كشاهد فقد استعملت أقراص PDA نظيفة وخالية من أي نمو علي تلك الأوراق، تم تحديد شدة الإصابة على كل ورقة باستخدام سلم القياس (Rating scale) التالي :

1= لا توجد أعراض مرض 2= ظهور تبقع على الورق 5= موت الأنسجة حول البقعة 7= إصابة شديدة 10= موت الورقة بالكامل.

تم تصوير النتائج المتحصل عليها فوتوغرافياً، أُعيد عزل الفطر بنقل جزء من المناطق التي ظهرت عليها إصابة على بيئة (PDA) ومقارنة النمو الفطري بالعزلات الأصلية لتأكيد فرضيات كوخ.

3. القدرة الإراضية علي ثمار طماطم

حُقنت ثمار طماطم سليمة بعد غسلها وتعقيمها سطحياً بالكحول الايثلي تركيزه 70% ومن ثم عمل جرح بمكان اتصال الثمرة بالساق وحقنت بمعلق الفطر تم تغطيتها بالأكياس البلاستيكية لمدة 24-48 ساعة حتى تتوفر الرطوبة ومراقبتها حتى ظهور الأعراض، وتم تسجيل الملاحظات اللازمة للنتائج المتحصل عليها وتصويرها فوتوغرافياً.

4. تعيين أبعاد الشكل الظاهري للجراثيم الفطرية

أُعدت شرائح مجهرية من كل عذلة وتم فحصها بالمجهر باستخدام العدسة القياسية (أبوغنية، 2014 غير منشور).

5. فصل الحمض النووي DNA لجينوم عزلات *A. solani*

- يُطحن ما يعادل 1 جم من النمو الفطري الذي تم تجميده بواسطة النيتروجين السائل (Liquid Nitrogen) باستخدام أداة طحن أو ما يعرف (بالمدقة)، استخدمت العدة الكيميائية الموجودة بالمختبر DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, GmbH).
- أُضيف للعينة 400 ميكروليتر من المحلول المنظم AP1 buffer، 4 ميكروليتر إنزيم هضم RNA ((RNase A)). رُج المخلوط باستخدام رجاج Vortex (BioCote, UK) وحُضن لمدة 10 دقائق عند درجة حرارة 65°س، تم قلب الأنبوبة إلى الأسفل والأعلى من 2-3 مرات خلال التحضين.
- يضاف 130 ميكروليتر من المحلول المنظم AP2، ويُخلط جيداً ثم يُوضع في الثلج لمدة 5 دقائق ومنها إلى جهاز الطرد المركزي (eppendorf. centerifuge, 5417R) لمدة 5 دقائق عند سرعة 14.000 دورة في الدقي rpm.

- يوضع المخلووط الذي تم تحلله (Lysate) في عمود يعرف بـ (QIA shreder, spin column) ويوضع العمود في أنبوب تجميع سعته 2مل، من ثم يُفصل بجهاز الطرد المركزي لمدة دقيقتين عند سرعة 14.000 دورة في الدقيقة.
- يُنقل الراشح المتجمع في الأنبوب إلى أنبوبة جديدة بعناية مع مراعاة عدم تعكيره بالراسب إن وجد، ويضاف له بعد ذلك 1.5 حجم من المحلول المنظم AP3/E ويُخلط باستخدام الماصة pipetting.
- يُنقل 650 ميكروتر من المخلووط إلى العمود (DNeasy Mini spin column) الذي وضع بدوره في أنبوب تجميع سعة 2مل. يستخدم جهاز الطرد المركزي في عملية الفصل ولمدة دقيقة واحدة عند سرعة 8000 دورة بالدقيقة، ثم يتم التخلص من الراشح، أُعيدت هذه الخطوة لبقية العينات.
- يوضع العمود المستعمل في الخطوة السابقة في أنبوب تجميع جديد سعة 2مل ويضاف له 500 ميكروتر من المحلول AW، فُصل بجهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة عند سرعة 8000 دورة في الدقيقة، ويتم التخلص من الراشح.
- أُضيف للعمود 500 ميكروتر محلول منظم AW، ويفصل بجهاز الطرد المركزي لمدة 2 دقيقة عند سرعة 14.000 دورة في الدقيقة.

التضخيم بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR amplification

- أجريت عملية تضخيم الحمض النووي DNA بواسطة RAPD-PCR في حجم كلي قدره 15ميكروليتر حيث تتم برمجته الزمنية والحرارية على النحو التالي:
- دورة واحدة للفصل المبدئي لخيطي DNA (Denaturation) عند 95°س لمدة دقيقتين.
 - 40 دورة للفصل النهائي لخيطي DNA عند درجة حرارة 95°س لمدة دقيقة.
 - ثم التبريد والتحام البادئ Annealing عند 36°س لمدة دقيقة واحدة .
 - الاستطالة للبادئ Elongation لمدة دقيقتين عند 72°س يلي ذلك دورة واحدة عند 72°س لمدة 5 دقائق (للاستطالة النهائية).

تحليل نواتج PCR باستخدام الهجرة الكهربائية لهلام الأجاروز:

- تم هذا التحليل باستخدام جهاز الترحيل الكهربائي (Electrophoresis B10-RAD gel apparatus) apparatus

النتائج والمناقشة

عزل و تعريف الكائن المسبب لمرض اللفحة المبكرة على نبات الطماطم

أثبتت النتائج المتحصل عليها من الفحص المخبري ودراسة الخصائص المزرعية للفطر على تواجد فطر *A. solani* الذي يسبب مرض اللفحة المبكرة على نبات الطماطم (شكل 1 و 2) في كل حالات العزل المباشر من النباتات التي ظهرت عليها أعراض المرض (عثيق وآخرون 2007 ؛ بركة وآخرون ، 2010) .

وصف فطر *A. solani* Jones & Grout (Ellis and Martin)

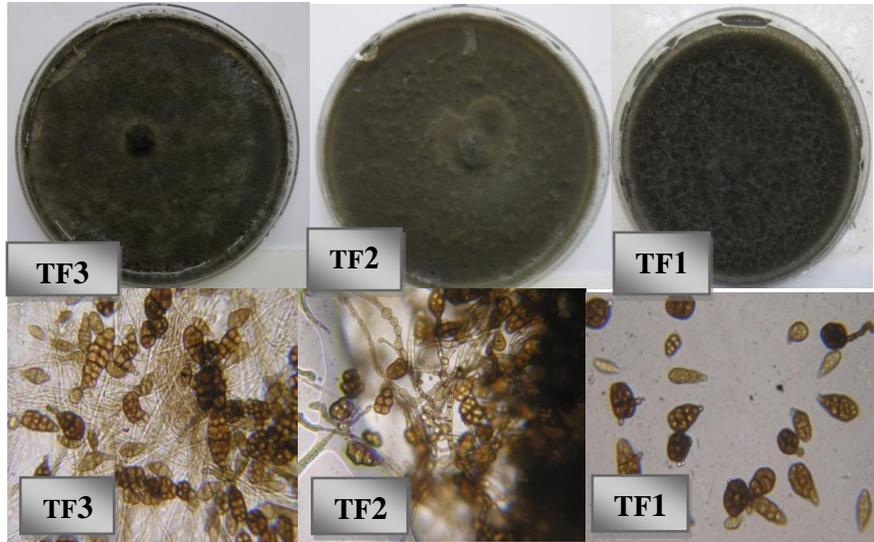
يكون الفطر ميسيليوم مقسم ومتفرع، لونه بني زيتي إلى زيتي غامق كما يُكون الفطر حوامل كونيديية قصيرة تحمل جراثيم كونيديية مفردة أو في سلاسل تتكون من جرثومتين، الجراثيم الكونيديية كبيرة، عديدة الخلايا، تتراوح قياسات أبعاد جراثيم العزلات التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة ما بين 23.4 إلى 46.9 ميكرومتر في الطول و7.7 إلى 14 ميكرومتر في العرض الجدول (1)Naik.(2010)؛ Khalaf؛(2012)؛ Sofi وآخرون (2013). كما يكون الفطر عند تنميته على الوسط الغذائي PDA مستعمرات ذات لون زيتوني داكن وتنطبق نتائج هذه الدراسة مع وصف وتعريف الفطر الصادر عن المعهد البريطاني وكذلك مع الدراسات التي أجراها كل من Slavov وآخرون (2004)؛ Calis؛(2011)Topkaya وWeber؛(2012) Halterman، أثبتت نتائج هذه الدراسة أن الوسط الغذائي PDA يعتبر وسطا ملائما لنمو الفطر وهذا ما أكدته العديد من الدراسات السابقة على أن عزلات فطر *A. alternata* قد أظهرت نموا جيدا عند تنميتها على الوسط الغذائي PDA عند درجة حرارة 25°س، حيث غطت كتلة الميسيليوم المساحة الكلية لطبق بتري خلال 14 يوماً (Salvov وآخرون، 2004؛ Sofi وآخرون، 2013)، من ناحية أخرى فإن هذه الدراسة تختلف تماما عن دراسة سابقة أكدت أن فطر *Alternaria* لا يمكنه النمو وإنتاج جراثيم بصورة جيدة على PDA في عدم وجود مصدر للضوء (Kumar وآخرون، 2008).



شكل (1) أعراض مرض اللفحة المبكرة التي يسببها فطر *A. solani* على أوراق نبات الطماطم



شكل (2) أعراض مرض اللفحة المبكرة التي يسببها فطر *A. solani* على ثمار الطماطم



شكل (3) الخصائص الظاهرية (المورفولوجية) لفطر *A. solani* (TF3, TF2, TF1) مستعمرة *A. solani* على PDA بعد 7 أيام عند درجة حرارة 27°س. (TF3, TF2, TF1) الحوامل الكونيدية والكونيديا لفطر *A. solani* عند قوة تكبير 40×10.

جدول (2) متوسط قياس الجراثيم الكونيدية لعزلات فطر *Alternaria solani*

العزلات	الطول μm	العرض μm
TF1	41.65	11.2
TF2	43.05	9.8
TF3	36.05	7.7**
TF4	46.5	12.25
TF5	31.5	14*
TF6	23.45**	11.2
TF7	34.65	12.25
TF8	35.35	10.15
TF9	30.45	12.25
TL1	45.85	13.3
TL2	35.35	10.85
TL3	30.45	13.3
PEF	44.1	12.6
POL1	46.9*	13.3
POL2	36.05	13

• كل رقم في الجدول يمثل متوسط عشر قراءات لأبعاد جراثيم عزلات *A. solani*

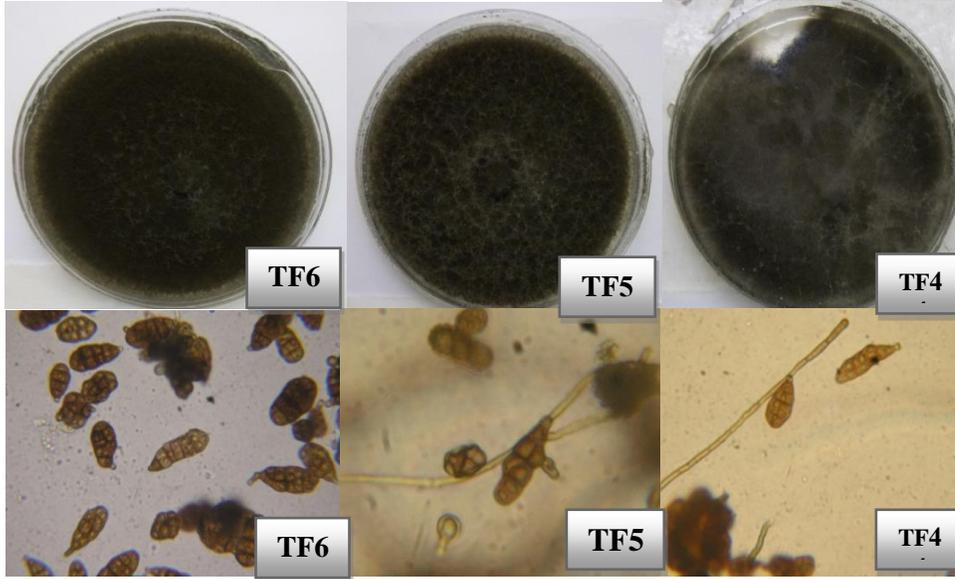
* أعلى متوسط في الطول والعرض. ** أقل متوسط في الطول والعرض

اختبار القدرة الإراضية ودراسة الخصائص الظاهرية لعزلات الفطر

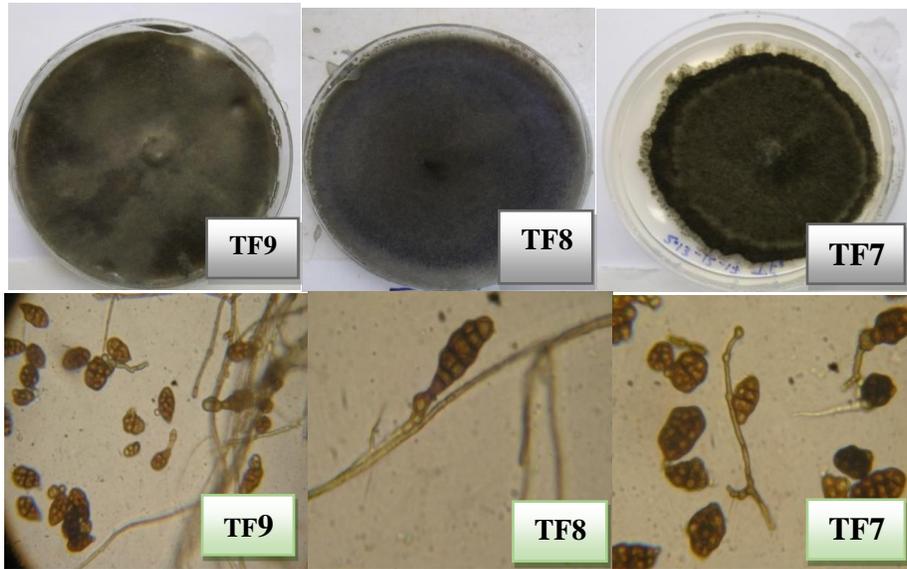
بينت النتائج أن عزلات الفطر التي تم الحصول عليها عند تركيز 10^6 كانت ممرضة لشتلات الطماطم، حيث ظهرت أعراض مختلفة الشدة، فبعد مرور خمسة أيام من الحقن ظهرت بقع صفراء، ثم تغير لونها للون البني وكانت حوافها واضحة ومنتحة المركز ومحاطة بمالة صفراء، كما جفت الأوراق بعد مرور 30 يوماً من الحقن، هذه الأعراض التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة هي أعراض مرض اللفحة المبكرة على الطماطم، وهي مماثلة لنتائج الدراسة التي أجراها الصفدي وآخرون (2012)، وتأكيداً على أن هذه الأعراض متسببة عن الفطر *A. solani* فقد أخذت أجزاء من الأوراق المصابة ونقلت إلى الوسط الغذائي PDA، وبعد مرور أسبوع تم فحص المستعمرة والتأكد من وجود فطر *A. solani* مجهرياً.

اختبار الأمراض ودراسة الخصائص المورفولوجية لعزلات الفطر

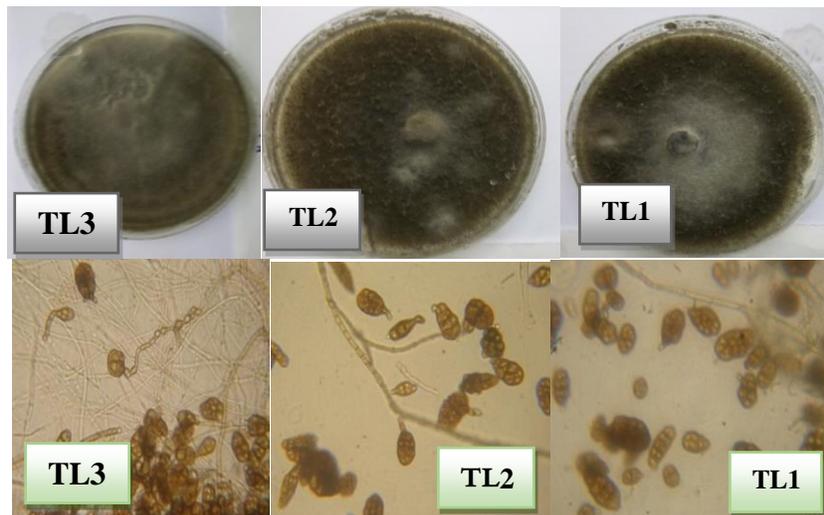
بينت النتائج أن عزلات الفطر التي تم الحصول عليها عند تركيز عند تركيز 10⁶ كانت ممرضة لشتلات الطماطم وأشارت النتائج كما هو موضح في الشكل (3-8) وشكل (3-9) والجدول (3-2) إلى أن جميع عزلات فطر *A. solani* لها القدرة على إصابة نبات الطماطم ودرجات مختلفة من شدة الإصابة (Nashwa, 2012).



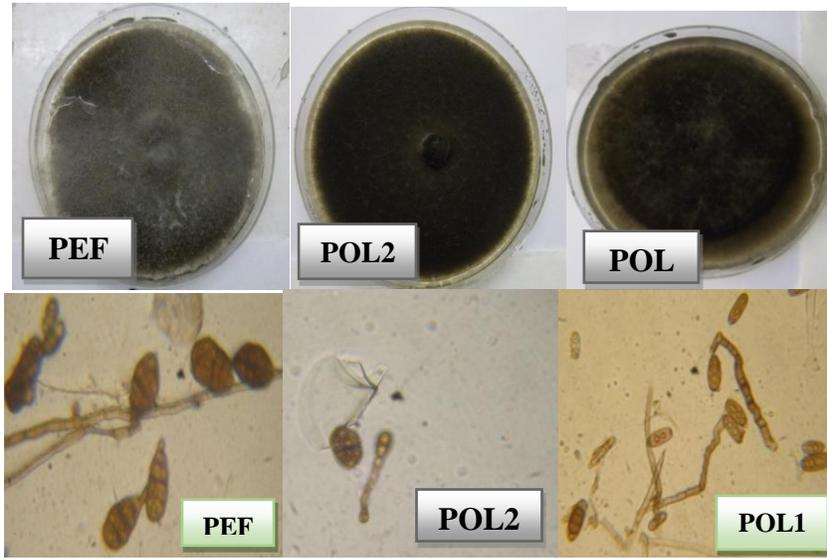
شكل (4) الخصائص الظاهرية (المورفولوجية) لفطر *A. solani* (TF6, TF5, TF4) مستعمرة *A. solani* على PDA بعد 7 أيام عند درجة حرارة 27°س. (TF6, TF5, TF4) الحوامل الكونيدية والكونيديا لفطر *A. solani* عند قوة تكبير 40×10.



شكل (5) الخصائص الظاهرية (المورفولوجية) لفطر *A. solani* (TF9، TF8، TF7) مستعمرة *A. solani* على PDA بعد 7 أيام عند درجة حرارة 27°س. (TF9، TF8، TF7) الحوامل الكونيدية والكونيديا لفطر *A. solani* عند قوة تكبير 40×10.



شكل (6) الخصائص الظاهرية (المورفولوجية) لفطر *A. solani* (TL3، TL2، TL1) مستعمرة *A. solani* على PDA بعد 7 أيام عند درجة حرارة 27°س. (TL3، TL2، TL1) الحوامل الكونيدية والكونيديا لفطر *A. solani* عند قوة تكبير 40×10.

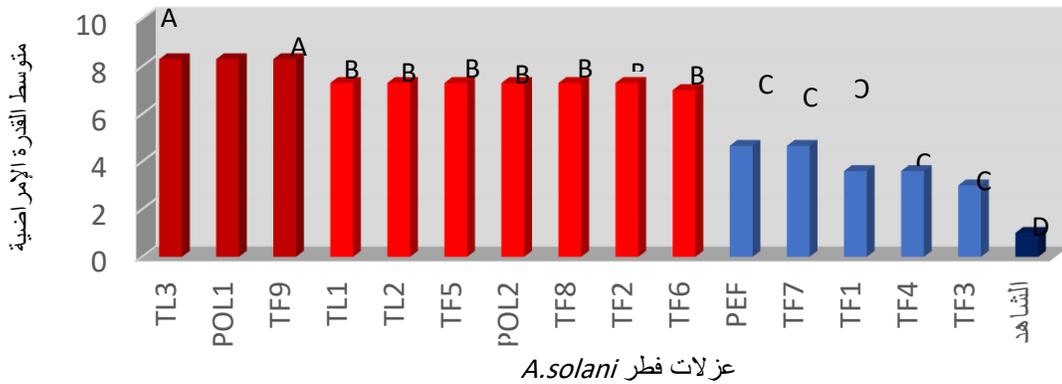


شكل (7) الخصائص الظاهرية (المورفولوجية) لفطر *A. solani* (PEF، POL2، POL1) مستعمرة *A. solani* على PDA بعد 7 أيام عند درجة حرارة 27°س. (PEF، POL2، POL1) الحوامل الكونيدية والكونيديا لفطر *A. solani* عند قوة تكبير 10-40.

جدول (3) متوسط القدرة المرضية بين عزلات فطر *A. solani* على شتلات نبات الطماطم

PEF	Pol2	Pol1	TI3	TI2	TI1	TF9	TF8	TF7	TF6	TF5	TF4	TF3	TF2	TF1	الشاهد	العزلات
4.66	7.3	8.3	8.3	7.3	7.3	8.3	7.3	4.66	7	7.3	3.6	3	7.3	3.66	1	متوسط القدرة المرضية

*المتوسطات التي تشترك في نفس الحرف ليس بينها فروق معنوية، اختبار $1.78 = LSD$ لعزل المتوسطات عند $\alpha = 0.05$



شكل (8) القدرة المرضية لعزلات فطر *A. solani* على نبات الطماطم.

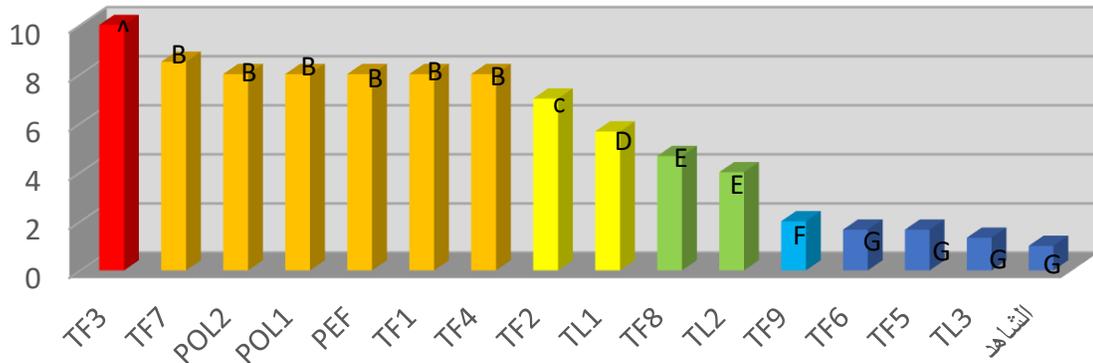
جدول (4) متوسط القدرة المرضية بين عزلات فطر *A. solani* على أوراق نبات الطماطم

العزلات	الشاهد	TF1	TF2	TF3	TF4	TF5	TF6	TF7	TF8	TF9	TF1	TF2	TF3	TF4	TF5	TF6	TF7	TF8	TF9	Pol1	Pol2	PEF	
متوسط القدرة المرضية	1	8	7	10	8	1.66	1.66	8.5	4.6	2	5.66	4	1.33	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

*المتوسطات التي تشترك في نفس الحرف ليس بينها فروق معنوية. اختبار $LSD = 0.97$ لعزل المتوسطات عند $\alpha = 0.05$

دراسة التنوع الوراثي لعزلات فطر *Alternaria solani* عن طريق تحديد البصمة الوراثية باستخدام مؤشرات تضاعف DNA العشوائي لتفاعل البلمرة المتسلسل RAPD-PCR

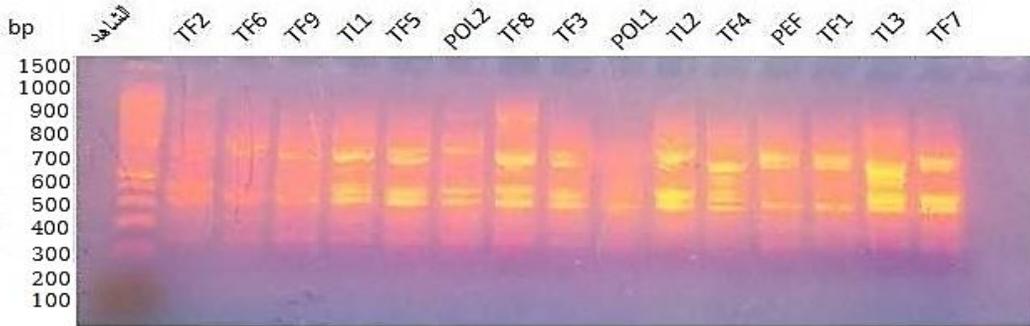
أظهرت النتائج أن عينات الحمض النووي DNA التي تم تحضيرها قبل إجراء تضخيم DNA العشوائي متعدد المظاهر لتفاعل البلمرة المتسلسل RAPD-PCR كانت مناسبة لدراسة بصمة خمسة عشر عذلة من *A. solani* وتم استخلاص DNA باستخدام طريقة النيتروجين السائل (Liquid Nitrogen)، كما حد الناتج النهائي لحمض النووي والذي كان 15 ميكروتر، عملية إكثار الحمض النووي بواسطة RAPD تتأثر بالعوامل المحيطة بالتجربة، وبينت النتائج أن نوعية DNA الجينومي الذي تم استخلاصه كانت مناسبة لاستعمالها كقالب لعملية تضخيم DNA بواسطة PCR.

عزلات فطر *A. solani*

شكل (9) القدرة المرضية لعزلات فطر *A. solani* على أوراق نبات طماطم.

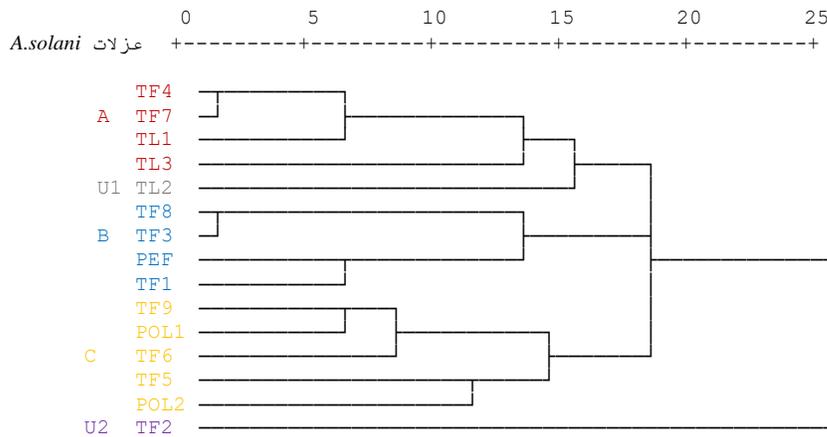
أجريت تجارب لاختبار 10 بادئات عشوائية حيث أجريت تجارب منفصلة لكل بادئي وقد أظهرت النتائج أن ثلاثة بادئات فقط قد أعطت نتائج أكثر استقراراً وهذه البادئات OP A-07 و OP A-09 و OP J-09 حيث أن نتائج PCR كانت كافية لإظهار الاختلاف بين خمسة عشر عذلة من فطر *A. solani* والجداول (4، 5، 6) والأشكال (7، 11، 9) توزيع الحزم الناتجة من تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام البادئات الثلاثة التي تم اختبارها، كما يبين شكل (8، 10، 12) التحليل العنقودي التجميعي لنواتج RAPD-PCR لعزلات *A. solani* باستخدام

البرنامج الإحصائي SPSS للحزم الناتجة من هذا التفاعل وذلك لتحديد درجة التشابه الوراثي بين العزلات المختبرة، واستخدم لذلك التحليل الإحصائي العنقودي (Cluster analysis)

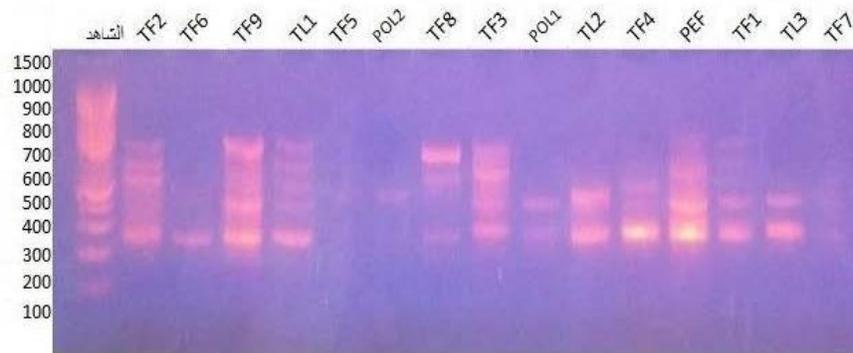


شكل (10) تضخيم DNA الجينومي لعزلات *A. solani* باستعمال البادئ العشوائي OP A-07 ل RAPD-PCR . تم فصل الحزم على هلام الأجاروز 1.8% ، M, 100 bp= ، TF7 -TF2 عزلات *A. solani*

جدول (5) . تحليل RAPD-PCR خمسة عشر عزلة من <i>Alternaria solani</i> باستعمال البادئ OPA-07															الوزن الجزيئي للحزم (زوج من القواعد)
عزلات الفطر <i>Alternaria solani</i>															
TF7	TL3	TF1	PEF	TF4	TL2	POL1	TF3	TF8	POL2	TF5	TL1	TF9	TF6	TF2	
									+						1330
		++	++		++		++	++							1300
														+	1290
													+		1280
++	++			++	++						++				1250
							++	++							1240
++	++	++	++	++						++					1220
	++													++	1180
++			++	++		++	++	++	++		++	++			1150
++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++				1200
++	++	++	++	++	++	++	++	++			++	++	++	++	1170
5	5	4	5	5	4	3	5	5	3	2	4	2	2	3	العدد الكلي للحزم
=+ وجود الحزم المضخمة أحادية المظهر (MAF) Monomorphic amplified fragment =++ وجود الحزم المضخمة متعددة المظهر (PAF) Polymorphic amplified fragment															



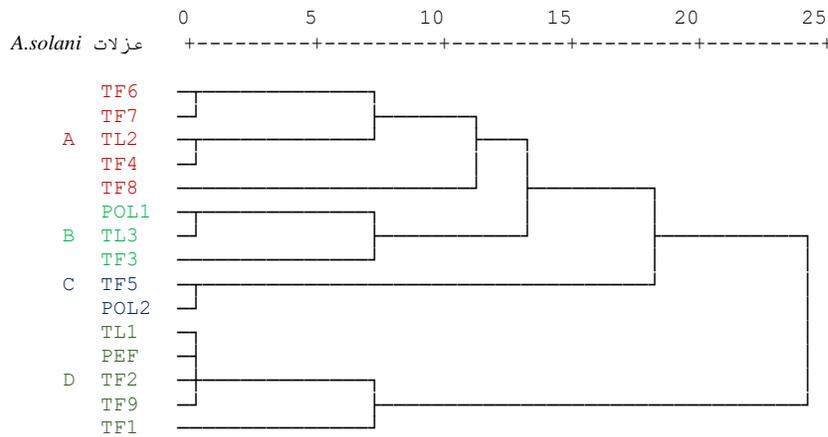
شكل (11) التحليل العنقودي التجميعي لنواتج RAPD-PCR لعزلات فطر *A. solani* باستخدام البادئ العشوائي OPA-07



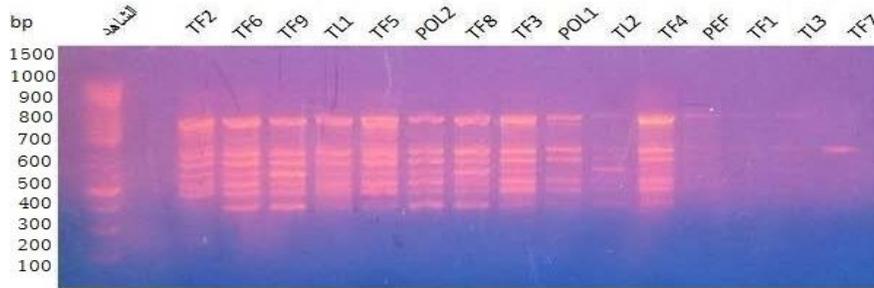
شكل (12) تضخيم DNA الجينومي لعزلات *A. solani* باستخدام البادئ العشوائي OPA-09 لـ RAPD-PCR تم فصل الحزم على هلام الأجاروز 1.5% ،M, 100 bp= TF7 - TF2 عزلات *A. solani*

جدول (6) تحليل RAPD لخمسة عشر عزلة من *Alternaria solani* باستخدام البادئ OP A- 09

عزلات فطر <i>Alternaria solani</i>															الوزن الجزئي للحزم
TF7	TL3	TF1	PEF	TF4	TL2	POL1	TF3	TF8	POL2	TF5	TL1	TF9	TF6	TF2	
		++	++								++	++		++	1350
		++	++				++	++			++	++		++	1300
			++	++	++				++	++	++	++		++	1260
	++	++	++			++	++				++	++		++	1200
++	++	++	++	++	++	++	++	++			++	++	++	++	1150
1	2	4	5	2	2	2	3	2	1	1	5	5	1	5	العدد الكلي
Monomorphic amplified fragment (MAF) = وجود حزم مضخمة أحادية المظهر Polymorphic amplified fragment (PAF) = وجود الحزم المضخمة متعددة المظاهر															

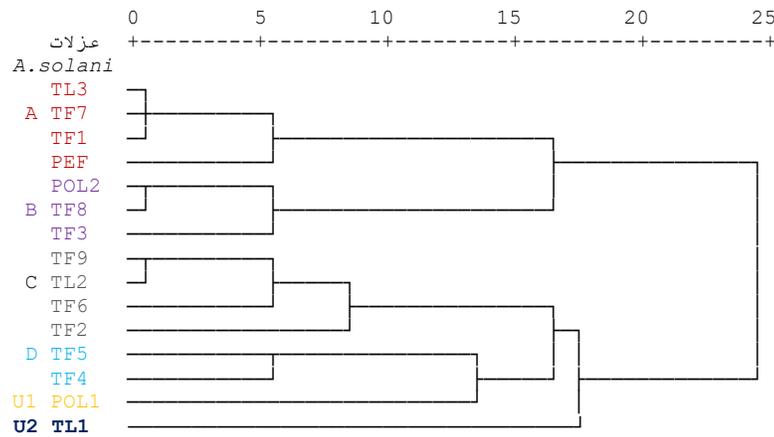


شكل (13) التحليل العنقودي التجميعي لنواتج RAPD-PCR لعزلات فطر *A. solani* باستعمال البادئ العشوائي OPA-09



شكل (14) تضخيم DNA الجينومي لعزلات *A. solani* باستعمال البادئ العشوائي OPJ-09 RAPD-PCR ، تم فصل الحزم على هلام الأجاروز 1.5% ، M, 100 bp= TF7 -TF2 عزلات *A. solani*

جدول (7) تحليل RAPD-PCR - خمسة عشر عذلة من <i>Alternaria solani</i> باستعمال البادئ OPJ-09															الوزن الجزيئي للحزم
عزلات الفطر <i>Alternaria solani</i>															
TF7	TL3	TF1	PEF	TF4	TL2	POL1	TF3	TF8	POL2	TF5	TL1	TF9	TF6	TF2	
++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	1300
				++		++				++	++				1280
				++		++	++			++					1270
				++						++			++	++	1220
++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	1150
			++	++	++	++	++	++	++	++	++		++	++	1080
				++	++		++	++	++	++	++	++	++	++	1050
				++	++	++				++		++	++	++	1020
				++	++	++				++	++	++	++	++	1000
				++	++	++	++	++	++			++	++		970
2	2	2	3	10	7	8	6	5	5	9	6	7	8	7	العدد الكلي للحزم
++ = وجود الحزم المضخمة أحادية المظهر (MAF) fragment Monomorphic amplified +++ = وجود الحزم المضخمة متعددة المظاهر (PAF) fragment Polymorphic amplified															



شكل (15) التحليل العنقودي التجميعي لنواتج RAPD-PCR لعزلات *A. solani* باستعمال البادئ العشوائي OP-J09

إن نتائج هذه الدراسة قد أوضحت وجود تنوع وراثي كبير بين عزلات فطر *A. solani*، وهذا يؤكد وجود اختلافات وراثية ضمن عزلات فطر (*Alternaria* Leiminger وآخرون، Dhahi، 2010 وآخرون، 2011؛ Sofi وآخرون، 2013).

أكدت نتائج RAPD-PCR المتحصل عليها خلال هذه الدراسة ودراسات جزيئية سابقة (Kumar وآخرون، 2008؛ Leiminger وآخرون، 2010؛ Weber و Halterman، 2012؛ Sofi وآخرون، 2013) وجود درجة عالية من التنوع الوراثي ضمن عزلات النوع الواحد لفطر *Alternaria*، إن التفسير المحتمل لهذا التنوع الوراثي الكبير قد يكون راجعاً إلى ظهور طفرات طبيعية ترافقت مع قدرة الفطر على إنتاج عدد وفير من الجراثيم (الأبواغ) في فترة زمنية قصيرة (Sofi وآخرون، 2013)، من ناحية أخرى فإن الاختلافات الوراثية الكبيرة عادة ما تكون ناتجة عن إعادة ترتيب وراثي genetic recombination وهو ما يظهر خلال التكاثر الجنسي أو اللاجنسي من خلال ما يعرف بـ Para sexual cycle. ولكن من غير المعروف ظهور Parasexual cycle بشكل منتظم في جنس *Alternaria*، كما أنه لا يوجد طور جنسي لفطر *A. solani*. إن تفسير الاختلافات الوراثية المتحصل عليها خلال هذه الدراسة قد يكون راجعاً إلى زراعة خليط من الأصناف النباتية غير المتجانسة وراثياً في البيئة اللبية، ومن ناحية أخرى فقد يكون هذا التنوع نتيجة إلى ضغط الانتقاء الطبيعي الناتج عن الاستخدام غير المرشد للمبيدات الفطرية وهذا يتفق مع ما جاء في دراسة (Sofi وآخرون، 2013).

المراجع

- أبوغنية، عبد النبي محمد. (1998). أمراض المحاصيل البستانية وطرق مكافحتها. شركة المطبوعات للتوزيع والنشر، الطبعة الثانية-363 صفحة.
- أبوغنية، عبد النبي محمد. (2014). دليل أمراض النبات العملي (غير منشور).
- البركي، علي. (2009). تقدير دالة استجابة عرض الطماطم الصيفي في ليبيا خلال الفترة (1980-2005). رسالة ماجستير، جامعة طرابلس.
- سعيد، محمد علي، نورة علي محمد، مجدى السمان وعيسى أبو غرسة. (2002). الفصل والتقييم الحيوي لتوكسينات عزلت مختلفة لفطر *Alternaria solani* المسببة لمرض الفحة المبكرة على الطماطم بمنطقة الجبل الأخضر. منشورات المختار للعلوم. البيضاء. ليبيا.
- عتيق، عمر، أحمد الأحمد، محمد أبوشعر ومحمد موفق يبرق. (2007). مسح حقلى لأمراض البندورة /الطماطم المتسببة عن جنس *Alternaria* والبحث عن مصادر وراثية مقاومة لهذه الأمراض في سورية. مجلة وقاية النبات العربية، 25:129-137.
- Agrios, G. N. (2005). Plant pathology .Fifth Edition. Academic Press, a division of Harcourt, Brace and Company. USA.
- Akhtar, K.P., Saleem, M.Y., Asghar and Haq, M.A. (2004). New report of *Alternaria alternata* causing leaf blight of tomato in Pakistan. *Plant Pathology* 53: 816.
- Chaerani, R. (2006). Early blight resistance in tomato screening and genetic study. *Msc Thesis. van Wageningen Universiteit*. Indonesia.
- Chaerani, R. Groenwold, R, Stam P and Voorrips RE. (2007). Assessment of early blight (*Alternaria solani*) resistance in tomato using a drop inoculation method. *Journal of General Plant Pathology* 73: 96-103.
- Goyal, P. Chahar, M. Mathur, A P, Kumar, A, and Chattopadhyay, C. (2011). Morphological and cultural variation in different oilseed *Brassica* isolates of *Alternaria brassicae* from differnt geographical regions of India. *Indian Journal of Agricultural Sciences*.81: 1052-8.
- Kemmitt, G. (2002). Early blight of potato and tomato. The plant health instructor. *American Phytopathological Society*.2002-0809-01.

- Kumar, V., Haldar, S., Pandey, K..K., Singh, R. P., Singh, A K., Singh, P. C. (2008). Cultural, morphological, pathogenic and molecular variability amongst tomato isolates of *Alternaria solani* in India. *World Journal of microbiology and Biotechnology* 24: 1003-1009.
- Martinez, S.P., Snowdon, R., Pons-Kuhnemann, J., (2004). Variability of cuban and interational populations of *Alternariasolani* from different hosts and localities: AFLP genetic analysis . *Europian. Journal of Plant Pathology*.110, 399-409.
- Mathur, K. and Shekhawat, K.S. (1986). Chemical control of early blight in khairf sown tomato. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*.16:235-238.
- Milgroom, M. G, Peever, T.L.(2003). Population biology of plant pathogens. The synthesis of plant disease epidemiology and population genetics. *Plant Disease*87:608-617.
- Nashwa, S.M.A., ABO-Elyousr, K.A.M. (2012). Evaluation of various plant extracts against the early blight disease of tomato plants under greenhouse and field conditions . *Plant ProtectionSciences*48: 74-79.
- Neergaard, P., (1945). Danish species of *Alternaria* and *Stemphylium*, HamphryMillfor. *Oxford University press, London* .
- Peever, T. L., Canihos, Y., Oisen, L., Ibanez, A., Liu, Y.-C., and Timmer, L.W. (1999). Population genatic structure and host specificity of *Alternaria spp.* causing brown spot of *Minneola tangelo* and *rough lemon* in Florida. *Phytopathology*89:851-860
- Shahbazi, H., Aminian, H., Sahebani, N., and Halterman, D.A. (2010). Biochemical evaluation of resistance responses of potato to different isolates of *Alternaria solani* :*Phytopathology*100:454-459.
- Slavov, S., Mayama, S., Atanassov, A. (2004). Some aspects of epidermiology of *Alternaria alternata* tobacco pathotype. *Biotechnology. & Biotechnological. Equipment*.657-8501.
- van derWaals, J.E., Korsten, L.,Slippers, B. (2004). Genetic diversity among *Alternaria solani* isolates from potatoes in south Africa. *Plant Disease*88: 959-964.
- Weber, B., Halterman, D. A. (2012). Analysis of genetic and pathogenic variation of *Alternaria solani* from a potato production region. *European Journal of Plant Pathology* 134: 847-858.

Molecular characterization of *Alternaria solani* isolates on tomato plant *Lycopersicon esculentum* Mill

Hajer M. Alsouyid*
Faculty of
Science,
Zliten, University
of Alasmaria

Nuria A. Elamri
Faculty of
Agriculture,
University of
Tripoli

Haifa M. Duzan
Faculty of
Agriculture,
University of
Tripoli

Abdunabi M. Abughania
Faculty of Science,
University of
Tripoli

Ammar K. Aslougi
Biotechnology
Research Center,
Tripoli

gegealamamy1984@gmail.com

<https://doi.org/10.36602/jmuas.2019.v01.01.29>

Abstract

Early blight disease causes severe damage to the foliar part of solanaceous crops including tomato. Fifteen isolates (12 from tomato, 2 from potato, 1 from pepper) were collected from different sources in Tripoli. Field and laboratory studies were conducted to determine cultural behaviour on PDA medium, morphological, pathogenic and molecular variation between isolates tested. Colonies of isolates revealed variation in their cultural behaviour on PDA medium ranging from cottony to appressed growth, with colour ranging between light to dark olivaceous. The pigments released by the isolates changed the medium colour to grey or brown. Morphological studies of the fungal isolates exhibited short conidiophores bearing a single or chains of paired conidia. This study revealed a significant variation in conidial size for the isolates tested ranging from 23.45 to 46.90 x 7.70 to 14.00 µm. Pathogenicity testes on fruits, plants, and detached leaves of tomato indicated a high significant variation between isolates tested ranging from highly to moderate or weak pathogenic. Genetic diversity of *A. solani* isolates using RAPD-PCR with oligonucleotide primers revealed significant differences in the appearance of polymorphic and monomorphic banding patterns. Three primers (OPA-07, OPA-09, OPJ-09) out of ten were able to determine the genetic fingerprints of tested isolates. Cluster analysis of RAPD-PCR products showed that primer OPA-07 was able to classify the isolates into five groups: group A (TF4, TF7, TL1, TL3), group B (TF1, TF3, TF8, PEF), group C (TF5, TF6, TF9, POL1, POL2), whereas the remaining two isolates TL2 and TF2 were unique in their patterns and were designated as group U1 and U2 respectively. Primer OPA-09 revealed four distinct genetic groups designated as: group A (TF4, TF6, TF7, TF8, TL2), group B (POL1, TL3, TF3), group C (TF5, POL2) and group D (TL1, TF1, TF2, TF9, PEF). However primer OPJ-09 was able to split the isolates tested into four distinct clusters: group A (TF1, TF7, TL3, PEF), group B (TF3, TF8, POL2), group C (TF2, TF6, TF9, TL2) and group D (TF4, TF5). The results of RAPD-PCR demonstrate existence of considerable variation in molecular characteristics of *A. solan* isolates. Accordingly these isolates were classified into different groups and unique patterns with no obvious association between the pattern of clustering of the isolates and their host of origin, morphological characteristics and pathogenicity.

Keywords: *Alternaria solani*, Tomato, early blight, RAPD-PCR.