استخدام تقنية الفاصل الداخلي المستنسخ (ITS) وتقنيات جزيئية مساعدة أخرى في الكشف عن الإصابة بالفطر *Ascochyta rabiei* في بذور الحمص

نزيهة حسن[1]، سامر مراد[2]، بسام بياعة[1]، سهام أسعد[2] ومايكل باوم[2]
(1) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة حلب، سورية؛ (2) المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (ايكاردا)،
ص.ب. 5466، حلب، سورية، البريد الالكتروني: b.bayaa@cgiar.org

الملخص

حسن، نزيهة، سامر مراد، بسام بياعة، سهام أسعد ومايكل باوم. 2011. استخدام تقنية الفاصل الداخلي المستنسخ (ITS) وتقنيات جزيئية مساعدة أخرى في الكشف عن الإصابة بالفطر *Ascochyta rabiei* في بذور الحمص. مجلة وقاية النبات العربية، 29: 108-117.

يعدّ مرض لفحة الأسكوكيتا من أكثر الأمراض التي تصيب الحمص أهمية، إذ يمكن أن يسبب نقصاً كبيراً في الغلة في السنوات التي يتطّور فيها المرض على نحو وبائي. ينتشر الممرض في الحقل بوساطة رذاذ الماء، البقايا النباتية والبذور المصابة وبالتالي، فإن التبادل التجاري للمادة النباتية أو البذور، على مدى واسع، يسرّعان من إمكانية انتشاره. وعليه تعتمد الإدارة الفعالة للمرض على الكشف السريع والتحديد الدقيق للمُمْرض. هدفت الدراسة الحالية إلى تحديد مؤشرات تمكّن من الكشف عن الإصابة بالفطر الممرض في البذور المصابة غير المترافقة بأعراض ظاهرية. جُمعت بذور حمص من أربعة أصناف مختلفة (غاب 1، غاب 2، غاب 3 و غاب 4) مصابة طبيعياً بلفحة الأسكوكيتا، من حقول المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (إيكاردا)، تل حديا، حلب، سورية في عام 2007. تم استخلاص الـــ DNA من البذور باستخدام طريقة CTAB، واستخدم كذلك DNA لعزلات من فطر *A. rabiei* كشاهد إيجابي، وDNA لبذور حمص سليمة كشاهد سلبي. أظهرت نتائج المكاثرة باستخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) باستخدام البادئتين ITS4 وITS5 وجود حزمتين واضحتين من كل عينة من العينات المصابة :الأولى خاصة بالحمص، ناتجة عن مكاثرة المنطقة المستهدفة من مجين الحمص ذات وزن جزيئي 750 زوج قاعدي؛ والحزمة الثانية ذات وزن جزيئي 565 زوج قاعدي ناتجة من مجين الفطر *A. rabiei* ويدل ظهورها بالتالي على وجود الممرض. وقد أعطت الاختبارات الجزيئية الأخرى كتلك التي تدرس التباينات في التكرارات المتتابعة البسيطة والمعروفة بـــSSR، وتقنية الكشف عن الأنماط التزاوجية نتائج متطابقة لنتائج اختبار الـــ ITS. من شأن هذه الاختبارات أن تزيد من دقة نتائج اختبارات صحة البذور التقليدية وذلك لضمان سلامة دخول بذور سليمة إلى البلدان عبر مراكز الحجر الزراعي.

كلمات مفتاحية: الحمص، لفحة الأسكوكيتا، الفاصل الداخلي المستنسخ ITS.

المقدمة

يصاب الحمص بعديد من الأمراض التي تؤثّر في كمية الإنتاج ونوعيته. وتشمل الممرضات الفطور، البكتريا، الفيروسات، الميكوبلازما والنيماتودا. وقد سجل أكثر من 50 ممرضاً على الحمص، على مستوى العالم، والقليل منها يسبب أضراراً خطيرة على المحصول (29). وتعدّ الأمراض التي تحدثها الفطور الأكثر خطورة وضرراً كونها تؤثر في كمية الإنتاج ونوعيته (37).

تعدّ لفحة الأسكوكيتا التي يحـــدثها الفطـــر *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab أحد أهم الإجهادات الأحيائية وأكثرها أهمية كونها تؤثر بشدة في غلة المحصول (26، 30، 37، 38، 39). تكثر الإصـــابة بهذا المرض على الحمص الشتوي المزروع مبكراً؛ حيـــث وصـــلت نسبة الإصابة به في بعض مناطق الغاب في سورية إلـــى 65-70% (1).

يتبـــع الفطـــر فـــي طـــوره النـــاقص/اللاجنـــسي لفـــصيلة Sphaerioidaceae ورتبة Sphaeropsidales فـــي طائفـــة الفطـــور الناقصة Deuteromycetes. وكان العـــالم Kovachevski أول مـــن لاحظ الطور الجنسي لهذا الفطر عام 1936 في بلغاريا (21) وأسماه *Mycosphaerella* Kovacheveski *rabiei*. ثم أعيدت تسميته إلـــى *Didymella rabiei* v.Arx (Kovacheveski). ويتبع الفطـــر فـــي طوره الجنسي الفطور الزقية من رتبة Pseudosphaeriales وفصيلة Mycosphaerellaceae (Dothidiomycetes)، ويتـــشكل الطـــور الجنسي لهذا المرض في بقايا الحمص المصابة طبيعياً ضمن أجـــسام ثمرية من نوع Pseudothecia (18).

تعدّ البذور المصابة أو الملوثة العامل الأهم في نقل الممـــرض إلى مناطق بعيدة، وإلى مناطق لم يكن المرض موجوداً فيها بالأصل (16، 21) مشكلة بذلك مصدراً مهماً للقاح المعـــدي الأولـــي (26). ومن المحتمل أن تُحمل الأبواغ خارجياً على سطح البـــذور، وتبقـــى محتفظة بحيويتها لمدة 5 أشهر عند 2-5 °س (17). كما يمكـــن أن

يستقر الفطر على هيئة ميسيليوم ساكن في غلاف البذرة أو فلقتيها أو حتى في جنينها. وتؤدي هذه البذور المصابة، ولو بنسبة بسيطة، إلى إدخال الكائن الممرض إلى مناطق جديدة (23) حيث يصعب كـشفه بطرائق الكشف التقليدية المتبعة في مراكز الحجر.

إن الكشف المبكر عن الفطر فـي البـذور، قبـل زراعتهـا، واستخدام بذارحمص سليم، هي الخطوات الأولى لاجتنـاب حـدوث المرض، وخفض الوحدات المُعدية، وبالتالي خفـض الخـسارة فـي الإنتاج والغلة، ومنع إدخال الممرض إلى مناطق زراعية خالية مـن الإصابة به، وبخاصة تلك التي تتوافر فيها ظـروف بيئيـة مناسـبة لحدوث المرض وانتشاره.

في سورية، يطبق قانون الحجر الصحي الزراعي وتعديلاتـه على لفحة أسكوكيتا الحمص (2)، وذلك لمنع إدخال سلالات/أنمـاط جديدة من الممرض غير موجودة في القطر، وكـذلك لمنـع انتقـال سلالات/أنماط مرضية للممرض مع البذور إلـى دول أخـرى مـن العالم. ومن هنا تأتي أهمية مختبرات صحة البذور في الكشف عـن الممرضات المنقولة بالبذار قبل زراعتها أو قبل إرسـالها إلـى دول أخرى.

يتزايد الإعتماد على المؤشرات الجزيئية نظراً لبعض العيوب في الطرائق التقليدية. فظروف نمو الممرض وتبويغه، والظروف البيئية، والاختلاف في المراحل التطورية للعوائل يمكن أن تجعل التشخيص غير دقيق. بالإضافة إلى أن الطرائق التقليدية تتطلب غالباً وقتاً طويلاً للحصول على عزلات نقية لإجراء اختبارات المقدرة الإمراضية والتحاليل للكشف عن السمات الشكلية/المورفولوجية. استخدمت الواسمات الجزيئية Molecular markers بتقنيات مختلفة في عديد من الدراسات لتمييز التباين بين الكائنات المسببة للأمراض النباتية وعزلاتها المختلفة ووصفها. وقد استخدمت هذه الواسمات للتحرّي عن التنوع في مجتمعات الممرضات، والأنماط/السلالات المرضية، والأنماط التزاوجية، ونظم الخرائط الوراثية، ونشأة الأوبئة والتكيّف مع النبات العائل (3، 4، 9). وقد استخدمت هذه التقنيات ليس فقط في الفطور الممرضة للنبات ولكن على عوائلها النباتية أيضاً (41). تسمح تقنيات الوراثة الجزيئية بالكشف المباشر عن تسلسل الحمض النووي الخاص بالممرض والذي لا يتأثر بتنوع العوامل البيئية. كما تستخدم تقانة الفاصل الداخلي المستنسخ (ITS: Internal Transcribed Spacers للـ RNA الريبوزومي بشكل واسع مع تقنية التفاعل المتسلسل للبوليميراز الـ PCR بغية تمييز الأنواع الفطرية والكشف عن علاقات القربى بينها (27، 41). فقد كانت الاختلافات في مناطق الفاصل الداخلي المستنسخ ITS في فطور الذبول *Verticillium dahliae* و *Verticillium albo – atrum* كافية لتصميم بادئة خاصة لتضخيم مناطق متخصصة بالحمض النووي الخاص في كل نوع (27). كما استخدمت تقنية ITS لتطوير اختبارات التفاعل المتسلسل للبوليميراز (PCR) لكشف وتمييز الـ *Stagonospora nodorum* و *Septoria tritici* اللذان يسببان مرض التبقع السبتوري في القمح، وذلك بإنتاج قطع fragments متخصصة بكل نوع (5).

تستطيع تقانات الوراثة الجزيئية المعتمدة على تفاعل الـPCR الكشف عن المُمْرض حتى عندما تكون كمية مادته الوراثية DNA قليلة جداً، وعادة ما يحدث ذلك عندما تكون الطاقة اللقاحية المنقولة مع البذور منخفضة (14). وقد أجريت دراسات عديدة للكشف عن الفطر *A. rabiei* وتطوير بادئات متخصصة بمواقع من الـDNA الريبوزومي للفطر، منها الاختبارات التي أجريت في معهد تطوير الأبحاث في جنوب أستراليا (SARDI) لدراسة تتابعات معينة من سلاسل الـ DNA لفطر *A. rabiei* باستخدام تقانة الفاصل الداخلي المستنسخ (ITS). وجرت مقارنة النتائج المتحصل عليها بالطرائق الجزيئية مع تلك المتحصل عليها بالطرائق التقليدية ووجد أن نتائج الأولى كانت أفضل من نتائج الطرائق التقليدية. ونضيف إلى ما تقدم، أن البذور المعاملة بالمبيدات الفطرية قد تمنع كشف الممرض بطرائق الكشف التقليدية بينما وجد أن اختبارات الـ PCR كانت قادرة على كشف الممرض عند مستويات منخفضة من الإصابة (وجود 10 أبواغ من فطر الأسكوكيتا في البذور) (35).

يهدف البحث الحالي إلى تحديد تقنية تستطيع الكشف عن الفطر في البذور المصابة والتي يمكن استخدامها فيما بعد كاختبار روتينـي تشخيصي في اختبارات صحة البذور، وبخاصـة عنـدما لا تكـون إصابة البذور مترافقة بأعراض إصابة ظاهرية.

مواد البحث وطرائقه

تم تنفيذ التجارب في مختبر التقانات الحيوية في المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (ايكاردا)، الذي قدّم كافة مستلزمات البحث الخاصة بالتجارب المخبرية.

أجريت الاختبارات على بذور أربعة أصناف حمص مختلفة (غاب1، غاب 2، غاب 3 و غاب 4) معرّفة مسبقاً على أنها مصابة طبيعياً بلفحة الأسكوكيتا، جمعت من حقول إيكاردا في تل حديا، حلب، عام 2007 من قبل فنيي مختبر أمراض النبات في المركز.

استخلاص الـ DNA المجيني (Genomic DNA Extraction)

استنبتت بذرة واحدة، من كل من بذور أصناف الحمص الأربعة المصابة وغير المصابة، على ورق نشاف معقم ضمن طبق بتري

لمدة 24 ساعة، بعد ترطيب الورقة لدرجة مناسبة. وتم طحن البذرة في جفنة معقمة ونقلها لأنبوب Eppendorf سعة 2 مل.

اعتمدت طريقة CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) للاستخلاص الــسريع للحمض النووي DNA (19)، مع بعض التعديلات الطفيفة التي تتلاءم مع استخلاص الحمض النووي من البذور ذات المحتوى البروتيني المرتفع.

تقدير جودة الــ DNA وكميته

تم التأكد من جودة الــ DNA المستخلص وكميته باستخدام جهاز الرحلان الكهربائي الأفقي Electrophoresis (Pharmacia GNA 200 Horizontal) بتمرير العينات المستخلصة في هلامة من الأغاروز ذات تركيز 1%. تكونت كل عينة من ميكروليتر واحد من الــ DNA المستخلص و4 ميكروليترات من محلول منظم التحميل (Loading Buffer). وبالإضافة إلى العينات المختبرة، تم تحميل شواهد قياسية من DNA– λ معلوم التركيز (50 و100 نانوغرام/ ميكروليتر). تم تطبيق فرق كمون يعادل 95 فولت (يتناسب مع المسافة بين مسريي جهاز الرحلان) لمسافة 1–2 سم من الهلامة وتم التظهير ببروميد الإثيديوم (Ethidium Bromide) المنحل في الــ TBE بتركيز 0.5 ميكروغرام/مل لمدة 20–30 دقيقة ومن ثم عُرِّضت للأشعة فوق البنفسجية (UV) لإظهار الــ DNA.

تحديد التباين في مجتمعات الفطر باستخدام تقنية الكشف عن وجود التتاليات النكليوتيدية البسيطة المتكررة (SSR)

تم استخدام عدد من البادئات الموصوفة سابقاً (14) والمتوافرة في مختبر التقنيات الحيوية في إيكاردا، حيث استخدم زوج البادئات *Ar*Ho5T (*Ar*Ho5T-Reverse= TGG ATG GGA GGT TTT TGG TA؛ *Ar*Ho5T-Forward= CAT TGT GGC ATC TGA CAT CAC) على مجين 19 عزلة من الفطر *A. rabiei*، كانت قد جمعت من حقول إيكاردا، ونقيت بطريقة البوغ المفرد، واستخلص DNA الخاص بها بالطريقة ذاتها؛ كما طبقت على عينات DNA مستخلصة من أصناف الحمص الأربعة المستخدمة المصابة والسليمة، بدون إضافة البروتيناز، وبدون إجراء أي تنقيه لمستخلص الــDNA (شكل 2). كما تم إدخال تعديلات على طرائق استخلاص الــDNA وذلك بإضافة البروتيناز K^+ والتنقية بمحلول الاستخلاص لتتلاءم مع البذور ذات المحتوى العالي من المدخرات البروتينية، بغية الحصول على DNA نقي ومناسب من البذور. كما تم استخدام بادئات أخرى مثل *Ar*A03T-1 (GAA) 31 و*Ar*A06T (CAACAC)7(N)9(CAC)3 تعمل على *A. rabiei*، وتعطي تباينات واضحة بين العزلات. كما استخدمت عزلة نقية من الفطر *Fusarium oxysporum.* f. sp. *ciceris* معزولة من بذور حمص غاب 3 في مختبر أمراض البقوليات في إيكاردا، واستخدمت كشاهد لتأكيد تخصص زوج البادئات *Ar*Ho5T.

بلغ الحجم النهائي لمزيج تفاعل الــ PCR، باستخدام زوج البادئات *Ar*Ho5T، لكل عينة 25 ميكروليتراً احتوت على المحلول المنظم (1X PCR Buffer) و5 بيكومول من كل بادئة، و0.2 ميلي مولر من كل من النيكليوتيدات الأربعة dNTPs و 0.5 وحدة من أنزيم البوليميراز *Taq* polymerase و 10 نانو غرام من الــDNA المستخلص.

تم إجراء تفاعل PCR بوساطة جهاز التدوير الحراري (Applied Biosystems GeneAmp PCR system Thermocycler 9600/9700/2700). واستخدمت في التفاعل المذكور ظروف التضخيم التالية:

1) تحضين أولي (Initial incubation): مدته 3 دقائق عند 95° س؛ 2) فصل سلسلتي DNA (DNA Denaturation): مدته 20 ثانية عند 94° س؛ 3) التحام البادئة على إحدى السلسلتين (Annealing): مدة 25 ثانية عند 57° س؛ 4) الاستطالة (Extension): مدتها 23 ثانية عند 67° س؛ 5) إعادة المراحل 2، 3 و4، 35 مرة؛ 6) تحضين نهائي (Final incubation): مدته 4 دقائق عند 72° س (8).

استخدمت هلامة من الــ Polyacrylamide 6% لفصل نواتج الــ PCR المقرر فصلها بالرحلان الكهربائي العمودي، تم تحضيرها تبعاً لتعليمات الدليل التقني لشركة Promega (34). بعد انتهاء الرحلان، تمت عملية تلوين الهلامة لتظهير حزم الــ DNA المكاثر بطريقة التلوين بنترات الفضة (6).

تحديد وجود الممرض في بذور الحمص بالكشف عن النمطين التزاوجيين للفطر

تم تحديد وجود الممرض في بذور الحمص أيضاً بالكشف عن النمطين التزاوجيين للفطر، وذلك باستخدام تفاعل PCR، والبادئات الخاصة بالتتابع النكليوتيدي لمجين الفطر *A. rabiei*، بتطبيقها أولاً على 10 عزلات مرجعية من الفطر موجودة في المختبر، ثم على بذور مصابة من العينات المدروسة.

استخدمت في هذه التجربة البادئات التالية التي تسمح بالكشف عن النمطين التزاوجيين للأسكوكيتا (4):

Com1	GCA TGC CAT ATC GCC AGT
SP21	ACA GTG AGC CTG CAC AGT TC
Tail5	CGC TAT TTT ATC CAA GAC ACA CC

حيث أن الزوج Com1/SP21 متخصص في الكشف عن النمط التزاوجي الأول MAT1-1 الذي ينتج 400 زوج قاعدي؛ في

حين أن الزوج Com1/Tail5 متخصص في الكشف عن النمط التزاوجي الثاني MAT1-2 الذي ينتج 700 زوج قاعدي.

بلغ الحجم النهائي لمزيج الـ PCR لكل عينة 25 ميكروليتراً، احتوت على المحلول المنظم (1X PCR Buffer) و0.2 ميكرومولار من كل بادئة و0.2 ميلي مولار من مزيج النيكليوتيدات الأربعة dNTPs ووحدة واحدة من أنزيم البوليميراز *Taq* polymerase و10 نانو غرام من الـDNA المستخلص.

بعد ذلك تم إجراء تفاعل PCR بوساطة جهاز التدوير الحراري المذكور سابقاً. تم تمرير نواتج المكاثرة بتفاعل PCR على هلامة من الأغاروز بتركيز 1.2%، وتمت عملية تحضير وتحميل العينات ضمن الحفر مع وضع سلم بروميغا 100 bp DNA Ladder (Promega) بجوار نواتج المكاثرة. وبعد الرحلان، على فرق كمون يعادل 95 فولت لمدة 2−3 ساعات، صبغت نواتج المكاثرة كما ذكر سابقاً وحفظت للتحليل.

الكشف عن الفطر الممرض في البذور المصابة بغض النظر عن التباينات في مجتمع الفطر أو الأنماط التزاوجية

بما أن الهدف من الدراسة هو الكشف عن الفطر الممرض في البذور المصابة بتقنية الفاصل الداخلي المستنسخ، بغض النظر عن التباينات في مجتمع الفطر أو الأنماط التزاوجية وتراكيز DNA المستخلصة من الفطر، أو حجم الإصابة في البذرة، بغياب الأعراض الظاهرية المميزة للممرض، وعن صنف الحمص المصاب، فقد تم التركيز على تقنية الفاصل الداخلي المستنسخ.

تم إجراء تفاعل PCR باستخدام زوج البادئات التالية:

ITS-4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′)
ITS-5 (5′- GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3′)
ITS-1 (5′- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′)

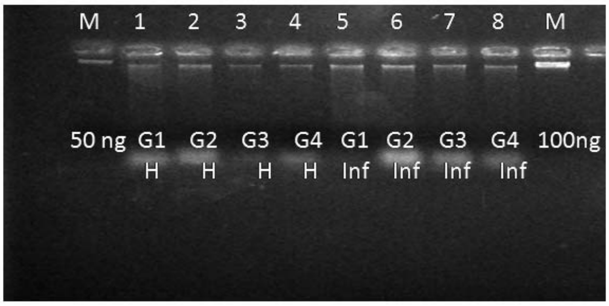
بلغ الحجم النهائي لمزيج الـ PCR لكل عينة 25 ميكروليتراً، احتوت على المحلول المنظم (1X PCR Buffer) وميكرومولار واحد من كل بادئة و0.2 ميللي مولار من كل من النيكليوتيدات الأربعة dNTPs و0.8 وحدة من أنزيم البوليميراز *Taq* polymerase و50 نانو غرام من الـDNA المستخلص وأكمل الحجم بالماء المقطر المعقم. أجري تفاعل PCR بوساطة جهاز التدوير الحراري المذكور سابقاً

بالنسبة لنواتج التضاعف بالتفاعل PCR، كان الحجم الكلي 25 ميكروليتر أضيف لها 15 ميكروليتراً من سائل التحميل بالرحلان الكهربائي الأفقي، واستخدمت هلامة من الأغاروز بتركيز 1.2%، وتمت عملية تحضير العينات وتحميل 12 ميكروليتر منها ضمن الحفر مع وضع سلم Promega (100 bp DNA) بجوار نواتج المكاثرة، ومن ثم جرت عملية التظهير وتصوير الهلامة بطريقة

تقدير جودة المستخلص وكميته نفسها، ولكن مع مراعاة أن يكون الزمن الذي تسغرقه العينات بعد تحميلها وتطبيق فرق كمون يعادل 95 فولت (بالتدريج) حوالي 2−3 ساعات حتى يظهر الفرق في أطوال قطع الـ DNA.

النتائج

شكلت العينة ذات النوعية الجيدة حزمة مضيئة ذات وزن جزيئي مرتفع في بداية هلامة الأغاروز. ويلاحظ من الشكل 1 أن نوعية الـ DNA المستخلصة من بذور الحمص السليمة والمصابة كانت جيدة وشكلت جميعها عصابة متجانسة، ولو أن تركيز الـ DNA اختلف من بذرة لآخرى، وهذا يتفق مع (36) .

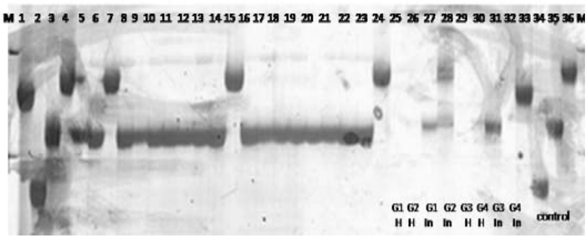


شكل 1. صورة هلامة الأغاروز بعد رحلان الـ دنا DNA، المستخلص من بذور الحمص السليمة والمصابة، لمدة ساعة. M = (λ –DNA) شاهد بتركيزين (50 و100 نانوغرام)؛ العينات من 1 إلى 4 هي بذور حمص سليمة ممثلة للأصناف الأربعة؛ العينات 5 إلى 8 هي بذور حمص مصابة ممثلة للأصناف الأربعة بتركيز 50 نانوغرام تقريباً لكل منها لكل ميكروليتر واحد مقارنة بالشاهد.

Figure 1. Agarose gel after electrophoresis for one hour of DNA extracted from healthy and infected seeds**.** M= (λ –DNA) Molecular weight marker, samples from 1 to 4 are seeds of four healthy chickpea varieties (Ghab 1, Ghab 2, Ghab 3, and Ghab 4)*;* samples from 5 to 8 are seeds of four chickpea varieties (Ghab 1, Ghab 2, Ghab 3 and Ghab 4) infected with *A. rabiei* **:** approximately with same quantities of DNA (50 ng/µl).

يلاحظ من صورة الهلام (شكل 2) أن بذور الحمص السليمة لم تتفاعل مع *Ar*Ho5T، في حين تفاعلت العزلات المختلفة من فطر *A. rabiei*، على نحو متجانس باستثناء العزلات 7، 15 و 24. كما تفاعلت عينات الحمص المصابة بالبادئة ذاتها، مما يشير إلى تخصص واضح في استهداف هذه البادئة لمجين الفطر دون العائل.

تم التأكد من تخصصية البادئات *Ar*AO6T, *Ar*HO5T *Ar*AO3T, على عزلات من الفطر *Fusarium oxysporum.* f. sp. *ciceris*، ولم تظهر النتائج أي تفاعل، الأمر الذي يشير مبدئياً إلى تخصص هذه البادئات على مجين الفطر *A. rabiei* (شكل 3).



شكل 2. استخدام تقنية SSR باستعمال زوج البادئات *Ar*Ho5T على عزلات من الفطر *A. rabiei* وعلى DNA العينات المدروسة، مستخلصة بدون إضافة البروتيناز، من بذور الحمص (غاب 1، غاب 2، غاب 3 وغاب 4) المصابة والسليمة. M = سلم جزيئي قياسي PGEM، العينات من 1 إلى 4 ومن 33 إلى 36 هي عزلات من الفطر *A. rabiei* تمثل التنوع الوراثي للفطر في سورية (4 أنماط مرضية محددة في تجارب سابقة) استخدمت كشاهد؛ العينات من 5 إلى 24 تمثل 19 عزلة مختلفة من الفطر *A. rabiei* مجموعة من سورية؛ العينات 25، 26، 29 و 30 هي عينات حمص سليمة ممثلة للأصناف الأربعة المختبرة، والعينات 27، 28، 31 و 32 عينات حمص مصابة ممثلة للأصناف الأربعة.

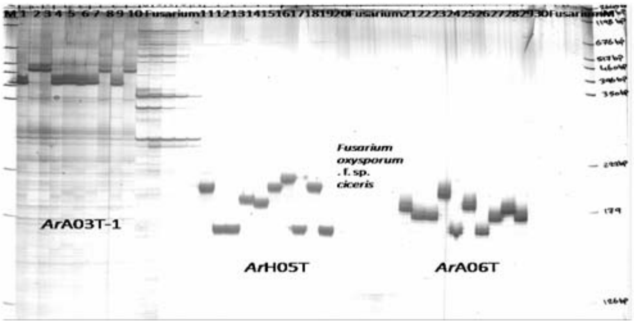
Figure 2. Application of *Ar*Ho5T primer pairs in a PCR test on *A. rabiei* isolates and on the DNA of samples extracted without addition of proteinase, from infected and healthy seeds of cvs Ghab 1, Ghab 2, Ghab 3 and Ghab 4. M= Molecular size marker (PGEM); samples 1 to 4 and 33 to 36 are *A. rabiei* isolates representing fungus genetic diversity in Syria used as a control; samples 5 to 24 are *A. rabiei* isolates collected from Syria; samples 27, 28, 31, 32 are seeds of four chickpea varieties (Ghab 1, Ghab 2, Ghab 3, and Ghab 4) infected with *A. rabiei*.

مكنت تقنية SSR باستخدام زوج البادئات *Ar*Ho5T من الكشف عن التباين في مجتمع الفطر *A. rabiei* في الأصناف الأربعة المصابة المختبرة (شكل 4)، وبوجود عينات شاهد متنوعة للمقارنة في حين لم يميز زوج البادئات ذاتها بين الأصناف الأربعة للحمص كونها لا تستهدف مجين العائل وإنما مجين الفطر.

استخدمت البادئات Com1، SP21 و Tail5 للكشف عن التباينات في عشر عزلات من الفطر *A. rabiei* وتبين أن ثلاث منها تتبع النمط التزاوجي الأول لفطر *A. rabiei* ، في حين أبدى 7 منها تفاعلاً للنمط الثاني من الفطر (شكل5).

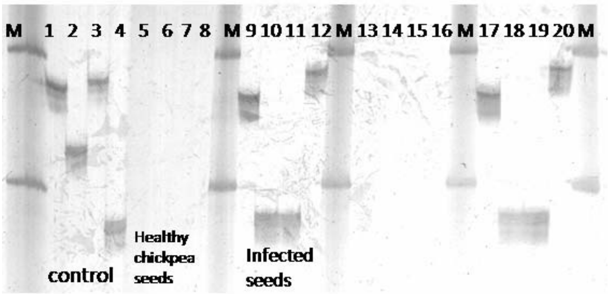
كما استخدمت التقنية ذاتها على بذور حمص مصابة بالمرض. ومكّن استخدام البادئات الثلاث السابقة من الكشف عن النمطين التزاوجيين في العينات المدروسة: وتبين أن العينة 8 هي النمط التزاوجي الثاني لشاهد *A. rabiei*؛ العينة 11 هي النمط التزاوجي الأول لشاهد *A. rabiei* ، العينات 2، 3، 5 و6 بذور مصابة بالأسكوكيتا ممثلة لأصناف الحمص الأربعة ؛ العينات 4، 7، 9 و10 بذور حمص سليمة ممثلة للأصناف الأربعة؛ العينات 1 و14 شاهد 100 زوج قاعدي، مع ملاحظة أن عينة الحمص رقم 6 الممثلة لصنف الحمص غاب 4 تحوي النمطين التزاوجيين.

أظهرت نتائج المكاثرة بتفاعل PCR باستخدام البادئتين ITS4 و ITS5 وجود حزمتين واضحتين في كل عينة من العينات المصابة، الأولى: خاصة وناتجة عن مكاثرة المنطقة المستهدفة من مجين الحمص وذات وزن جزيئي 750 زوج قاعدي، والحزمة الثانية: نوعية وذات وزن جزيئي 565 زوج قاعدي ويدل ظهورها على وجود مجين الفطر *A. rabiei* ضمن العينة وبالتالي الإصابة. في حين أظهر شاهد البذور السليمة الحزمة الناتجة عن مكاثرة المنطقة المستهدفة من مجين الحمص فقط. وأظهر شاهد الـ *A. rabiei* الحزمة الناتجة عن مكاثرة المنطقة المستهدفة من مجين الفطر *A. rabiei* فقط (شكل 7).



شكل 3. استخدام بادئات *Ar*AO3T،*Ar*AO6T،*Ar*HO5T في اختبار التفاعل المتسلسل للبوليميراز لاستهداف مجين الفطر *A. rabiei* و الفطر *Fusarium oxysporum.* f. sp. *ciceris* من مزرعة نقية أحادية البوغ استخدمت كشاهد. M= السلم الجزيئي القياسي PGEM؛ العينات من 1 إلى 10 هي عزلات مختلفة من الفطر *A. rabiei* مضخمة باستخدام البادئة *Ar*AO3T-1؛ العينات من 11 إلى 20 هي عزلات مختلفة من الفطر *A. rabiei* مضخمة باستخدام البادئة *Ar*HO5T؛ العينات من 21 إلى 30 تمثل عزلات مختلفة من الفطر *A. rabiei* مضخمة باستخدام البادئة *Ar*AO6T؛ Fusarium عينات من فطر *Fusarium oxysporum.* f. sp. *ciceris* استخدمت كشاهد.

Figure 3. Use of different primers in a PCR test targeting *A. rabiei* and *Fusarium oxysporum.* f. sp. *ciceris* genomes. M :Molecular size marker (PGEM); samples 1 to 10 are PCR amplification using *Ar*AO3T-1 primer pair on 10 isolates of *A. rabiei*; samples 11 to 20 are PCR amplification using *Ar*HO5T primer pair on 10 isolates of *A. rabiei*; samples 21 to 30 represent PCR amplification using *Ar*AO6T primer pair on 10 isolates of *A. rabiei,* Fusarium: isolates from *Fusarium oxysporum.* f. sp. *ciceris* were used as a control.



شكل 4. استخدام زوج البادئات *Ar*Ho5T لتضخيم قطعة DNA من مجين العينات المدروسة باختبار PCR، مستخلصة من بذور الحمص (غاب 1، غاب 2، غاب 3 وغاب 4) المصابة بفطر *A. rabiei* والسليمة وبوجود شاهد من الأنماط المرضية المعروفة للفطر. M = السلم الجزيئي القياسي PGEM؛ العينات من 1 إلى 4 هي شاهد يمثل عزلات مختلفة متباينة من الفطر *A. rabiei*؛ العينات من 5 إلى 8 ومن 13 إلى 16 هي عينات من بذور حمص سليمة ممثلة للأصناف الاربعة؛ العينات من 9 إلى 12 و من 17 إلى 20 هي عينات من بذور حمص مصابة ممثلة للأصناف الاربعة.

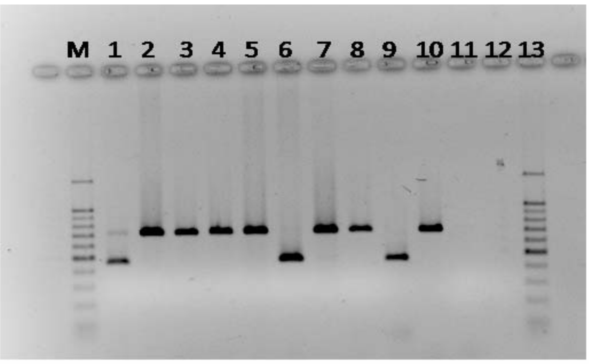
Figure 4. The use of the primer pair *Ar*Ho5T to amplify specific fragment in the genomic DNA of *A. rabiei*, extracted from infected (*A. rabiei*) compared with healthy seeds of cultivars Ghab 1, Ghab 2, Ghab 3 and Ghab 4 representing different pathotypes collected from Syria. M :Molecular size marker (PGEM); samples from 1 to 4 are PCR amplification using *Ar*HO5T primer pair on different isolates of *A. rabiei* used as control; samples from 5 to 8 and from 13 to 16 are PCR amplification using *Ar* HO5T primer pair from seeds of four healthy chickpea varieties; samples from 9 to 12 and from 17 to 20 are PCR amplification using *Ar*HO5T primer pair from seeds of four chickpea varieties infected with *A. rabiei*

كما أظهرت نتائج المكاثرة بتفاعل PCR باستخدام البادئتين ITS4 و ITS1 وجود حزمتين واضحتين من كل عينة من العينات المصابة، حيث أعطت نتائج مماثلة مع اختلافات في الدقة وتركيز الحزمة، الأولى: ناتجة عن مكاثرة المنطقة المستهدفة من مجين الحمص وذات وزن جزيئي 750 زوج قاعدي، والحزمة الثانية: ذات وزن جزيئي 565 زوج قاعدي ويدل ظهورها على وجود مجين الفطر *A. rabiei* ضمن العينة (شكل 8).

المناقشة

يعد التشخيص الدقيق لكائن حي على غاية من الأهمية في كافة نواحي تشخيص الفطور وعلم الوبائيات، سواء في مجال الأمراض النباتية أو في العلوم الطبيعية والدراسات البيئية أو المكافحة الحيوية. كما يعد التحديد المبكر للكائن المسبب لمرض ما أمراً مهماً لتحديد هوية الممرض وتطبيق لوائح تشمل المكافحة والحجر الزراعي.

تعتمد الطرائق التقليدية في تعريفها للفطور على تحديد أعراض المرض، عزل وزراعة الكائنات، والتعريف المخبري بالاعتماد على اختبارات شكلية وبيوكيميائية. ورغم أن هذه الطرائق لا تزال أساسية، إلا أن هناك تحركاً متزايدا باتجاه المشخصات الجزيئية للفطور في كافة المجالات. ذلك أن الطرائق التقليدية تعتمد على أشخاص ماهرين، ومقدرة على زراعة الممرض، والتي تأخذ وقتاً، كما أنها غير كمية، ومعرضة للتلوث والخطأ. كما أن صعوبة تعريف الفطور والخمائر غير المتبوغة المرافقة للإنتانات الجلدية العميقة يجعل من الطرائق الجزيئية في تحديد الهوية الطريقة الفضلى (3، 8).

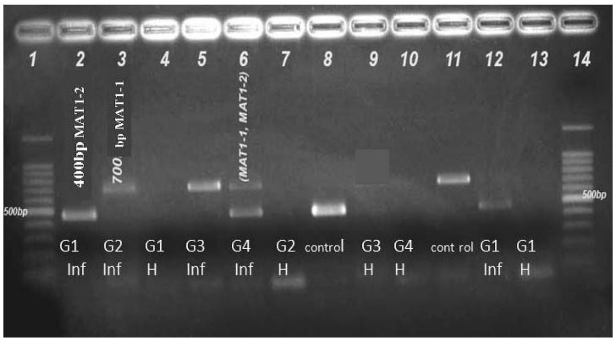


شكل 5. استخدام زوج البادئات Tail5, SP21,Com1 بالتفاعل المتسلسل للبوليميراز لكشف النمطين التزاوجيين للفطر *A. rabiei* عند عزلات مختلفة من الفطر. M= سلم جزيئي قياسي 100 زوج قاعدي؛ العينات 1، 6 و 9 هي عزلات من الفطر تمثل النمط التزاوجي الثاني MAT1-2 الذي يظهر عند 400 زوج قاعدي؛ العينات 2، 3، 4، 5، 7، 8 و 10 هي عزلات من الفطر تمثل النمط التزاوجي الأول MAT1-1 الذي يظهر عند 700 زوج قاعدي

Figure 5. The use of primer pairs SP21, Com1, Tail5 in a PCR test to detect *A. rabiei* mating types in different isolates. M :Molecular size marker 100 bp (PGEM); samples 1, 6 and 9 are amplification of MAT1-2 specific PCR products of isolates of *A. rabiei* (MAT1- 2amplicons are approximately 700 bp); samples 2, 3, 4, 5, 7, 8 and 10 are amplification of MAT1-1 specific PCR products of *A. rabiei* isolates (MAT1-1 amplicons are approximately 400 bp).

تم تطوير طرائق عديدة للتشخيص بالإعتماد على التفاعل المتسلسل للبوليميراز (24) وفي هذه الطريقة يتم فحص العينات مباشرة دونما حاجة إلى عزل أو زراعة. وهي طرائق سريعة ومتخصصة ويمكن استخدامها للكشف عن كميات متناهية في الصغر من الـــ DNA الفطري (3). ويمكن القيام باختبار الـــPCR على نحو روتيني ولا يتطلب ذلك خبرة عالية المستوى لتفسير النتائج.

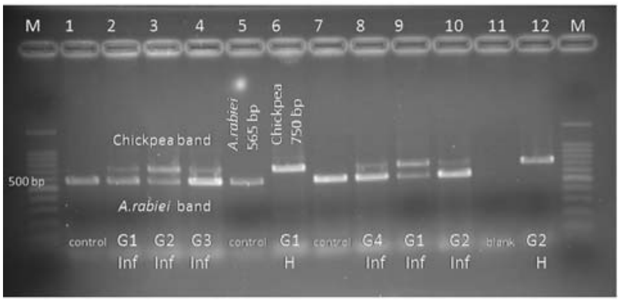
على أن هذه التقنيات مازالت مخبرية، ويؤمل تطويرها لتقدير: الأمراض الفطرية، إمكانية التربة في تثبيط آفة معينة بوساطة فطور طبيعية موجودة فيها، أو لرصد وتقدير السلالات الفطرية. هناك طرائق أخرى في الكشف عن الفطور كدراسة مورث الـــ B- Tubulin الذي استخدم للكشف عن التبقع السبتوري في القمح (13) ومورث الأنماط التزاوجية في *Tapesia* sp و *Didymella* sp (11، 12).



شكل 6. الكشف عن النمطين التزاوجيين في العينات المدروسة باستخدام البادئات Com1، SP21 و Tail5؛ العينات 1 و14 هي سلم جزيئي قياسي 100 زوج قاعدي؛ العينة رقم 8 هي النمط التزاوجي الثاني لشاهد *A. rabiei*؛ العينة رقم 11 هي النمط التزاوجي الأول لشاهد *A. rabiei*؛ العينات 2، 3، 5 و 6 هي بذور مصابة بالاسكوكيتا ممثلة للأصناف الأربعة للحمص؛ العينات 7، 9 و 10 بذور حمص سليمة ممثلة للأصناف الأربعة.

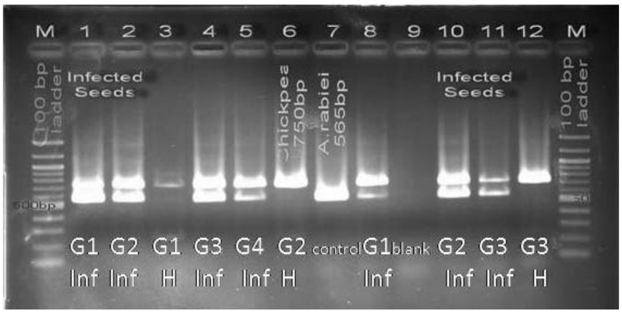
Figure 6. The mating types of the fungus (*A. rabiei*) was detected in the tested samples by using primers SP21, Com1 and Tail5 ; samples 1 and 14 are Molecular size marker 100 bp (PGEM); sample 8 is amplification of MAT1-2 specific PCR products from *A. rabiei* used as a control (MAT1-2 amplicons are approximately 700 bp); sample 11 is amplification of MAT1-1 specific PCR products from *A. rabiei* used as a control (MAT1-1 amplicons are approximately 400 bp); samples 2, 3, 5 and 6) are PCR amplifications using primers SP21, Com1 and Tail5 on DNA extracted from seeds of four chickpea varieties infected with *A. rabiei;* samples 7, 9 and 10 are PCR amplifications using primers SP21, Com1 and Tail5 on DNA extracted from healthy chickpea seeds.

تعد منطقة الفاصل المستنسخ الداخلي ذات أهمية خاصة في تشخيص الفطور، إذ تمتلك مناطق عالية الثباتية ومناطق تنوع، وتمكّن من تطوير بادئات PCR نوعية متخصصة لتعريف النوع الفطري. تستطيع تقانات الوراثة الجزيئية المعتمدة على التفاعل المتسلسل للبوليميراز الكشف عن ممرض ما في البذور حتى عندما تكون كمية الـــ DNA قليلة، وبخاصة عندما تكون الطاقة اللقاحية المنقولة مع البذور منخفضة (14). وقد أجريت دراسات سابقة للكشف عن الفطر *A. rabiei* وتطوير بادئات متخصصة بمواقع من الـــDNA الريبوزومي للفطر (31، 35). إن عدم تفاعل بذور الحمص السليمة مع زوج البادئات *Ar*Ho5T، في الوقت الذي تفاعلت فيه العزلات المختلفة من فطر *A. rabiei* معها على نحو متجانس باستثناء العزلات 7، 15 و 24 تشير إلى أنها قد تكون منتمية لنمطين وراثيين على الأقل (شكل 2). كما أن تفاعل عينات الحمص المصابة بزوج البادئات نفسه يشير إلى تخصص واضح في استهداف هذه البادئات لمجين الفطر دون العائل. ويعتبر هذا التطبيق الأول لاستخدام تقنية الـــ SSR باستخدام زوج البادئات *Ar*Ho5T على البذور (أصناف الحمص المدروسة). وعليه، يمكن أن تعطي هذه التقنية إخصائيي الحجر الزراعي فكرة عن إصابة البذور بالمرض ومدى التنوع في مجتمع الفطر في العينات الداخلة أو الخارجة من البلد. والنتيجة التي حصلنا عليها في هذا البحث تتفق مع دراسة سابقة أقيمت في أستراليا وأشارت إلى أن استخدام زوج البادئات *Ar*Ho5T كان الأفضل في إظهار اختلافات واضحة في مجتمع الفطر (مستوى عالٍ من التباينات الوراثية فيما بين العزلات الوارده مقارنة بالعزلات المحليه) (31).



شكل 7. صورة هلامة الأغاروز للدنا DNA بعد عملية التضاعف للبادئتين ITS4 وITS5 . M = سلم جزيئي قياسي 100 زوج قاعدي؛ العينات 1، 5 و 7 هي عينات ممثلة للفطر *A. rabiei* استخدمت كشاهد؛ العينات 2، 3، 4 و 8 هي عينات بذور حمص مصابة ممثلة للأصناف الأربعة؛ العينات 6 و 12 هي عينتا بذور حمص غاب 1 وغاب 2 سليمتان، على التوالي؛ العينة 11 هي ناتج PCR بدون DNA.

Figure 7. Agarose gel DNA after amplification of pairs of ITS4 and ITS5 primers. M= Molecular size marker 100 bp; samples 1, 5 and 7 are PCR amplifications using ITS4 and ITS5 on DNA extracted from *A. rabiei* samples used as a control*;* samples 2, 3, 4 and 8 are PCR amplifications using ITS4 and ITS5 on DNA extracted from Seeds of four chickpea varieties infected with *A. rabiei*, samples 6 and 12 are PCR amplifications using ITS4 and ITS5 on DNA extracted from Ghab 1 and Ghab 2 healthy chickpea seeds; sample 11 is a PCR product without DNA



شكل 8. صورة هلامة الأغاروز للـــ DNA بعد عملية التضاعف للبادئتين ITS4 وITS1 والرحلان لمدة 2–3 ساعات. M= سلم جزيئي قياسي 100 زوج قاعدي؛ عينة 7 ممثلة للفطر *A.rabiei* مستخدمة كشاهد؛ العينات 1، 2، 4 و 5 هي عينات بذور حمص مصابة ممثلة للأصناف الأربعة؛ العينات 3، 6 و 12 هي عينات بذور حمص سليمة.

Figure 8. Agarose gel DNA after the amplification of pairs ITS 1 and ITS 4 primers after 2-3 hours migration. M : Molecular size marker 100 bp; sample 7 is PCR amplifications using ITS 1 and ITS 4 on DNA extracted from *A. rabiei* samples were used as a control; samples 1, 2, 4 and 5 are PCR amplifications using ITS 1 and ITS 4 on DNA extracted from seeds of four chickpea varieties infected with *A. rabiei*, Samples 3, 6, 12 are PCR amplifications using ITS 1 and ITS 4 on DNA extracted from healthy chickpea seeds

إن نتائج المكاثرة بالتفاعل التسلسلي البوليمرازي باستخدام البادئتين ITS4 و ITS5 اللتين أظهرتا وجود حزمتين واضحتين من كل عينة من العينات المصابة تتفق مع ماتوصل إليه (30) الذي طور التشخيص المعتمد على التفاعل المتسلسل للبوليميراز المتبوع بتقنية الـــ RFLP للكشف عن *A. rabiei* في أوراق وبذور الحمص المصابة. ونشير إلى أن تقانة الفاصل الداخلي المستنسخ (ITS: Internal Transcribed Spacers) لـــ RNA الريبوزومي استخدمت بشكل واسع مع تقنية التفاعل المتسلسل للبوليميراز بغية تمييز الأنواع الفطرية والكشف عن علاقات القربى بينها. فقد كانت الاختلافات في مناطق الفاصل الداخلي المستنسخ ITS في فطور الذبول *Verticillium dahliae* و*Verticillium albo – atrum* كافية لتصميم بادئة خاصة لتضخيم مناطق متخصصة بالحمض النووي الخاص في كل نوع (27). كما استخدمت تقنية ITS لتطوير اختبارات التفاعل المتسلسل للبوليميراز لكشف وتمييز الـــ *Stagonospora nodorum* و *Septoria tritici* اللذان يسببان مرض التبقع السبتوري في القمح، وذلك بإنتاج قطع fragments خاصة بكل نوع (5)؛ ولتحديد أنواع الجنس *Aspergillus* على مستوى النوع وتمييزها عن غيرها من فطور العفن الممرضة والانتهازية باستخدام المورثين 18S و 28S من RNA الريبوزومي (40)؛ كما استخدمت التقنية وبخاصة ITS4-8 و ITS1-F بنجاح للتفريق بين الفطور الدعامية والزقية والنباتات العائلة لها، واستخدمتا في تحليل مكوّن الفطور الدعامية في الميكوريزا الخارجية (32) وفي النسج المصابة بالصدأ (15، 20)؛ ولتحديد الفطور المسببة لتحلل/تعفن الأخشاب (25، 33) والخمائر الطبية (7، 10). كما استخدم التباين في الـــ DNA الريبوزومي لدراسة علاقات القرابة التطورية عند خمسة أنواع تتبع جنس *Phytophthora* ومكّن تحليل التباين لمنطقة الفاصل الداخلي المستنسخ من دعم علاقة القربى القوية ما بين عزلات الكاكاو من *Phytophthora capsici* و *P. citrophthora* ونَسَباً عاماً لـــ *P. palmivora* و *P. megakarva*. كما تم تقدير قيم مسافات عالية ما بين *P. cinnamoni* والأنواع المختبرة الأخرى (22)، واستخدمت أيضاً لدراسة العلاقات التطورية على مستوى تحت الأنواع وتحت الأجناس في مملكة الفطور (28).

إن الكشف عن النمطين التزاوجيين لفطر *A. rabiei* يؤكد إمكانية حدوث التكاثر الجنسي للفطر في سورية، وربما تكون هذه هي الإشارة الأولى لوجود كلا النمطين التزاوجيين للفطر على بذرة حمص واحدة.

جرت مقارنة النتائج المتحصل عليها بالطرائق الجزيئية مع تلك المتحصل عليها بالطرائق التقليدية (نتائج غير منشورة) ووجد أن نتائج الأولى (الجزيئية) كانت أفضل من الثانية (التقليدية)؛ ونضيف إلى ما تقدم أن البذور المعاملة بمبيدات الفطور تمنع ظهور الممرض بطرائق الكشف التقليدية بينما وجد أن اختبارات الـــ PCR كانت قادرة على كشف الممرض حتى عند مستويات متدنية من الإصابة (35).

تشير النتائج المتحصل عليها في هذا البحث إلى أنه يمكن لتقنية الـــ SSR أن تعطي إخصائيي الحجر الزراعي فكرة عن مدى التنوع بين مجتمع الفطر في العينات الداخلة أو الخارجة من البلد؛ كما تشيرالنتائج المستوحاة من الاختبارات الجزيئية إلى إمكانية الاعتماد على هذه الاختبارات لاتخاذ قرار بوجود فطر الأسكوكيتا من عدمه؛ كما يعد اختبار ITS طريقة سريعة، موثوقة، قليلة التكلفة وتساعد في ضمان دخول بذور سليمة ونظيفة إلى البلدان عبر مراكز الحجر الزراعي؛ وأخيراً، يمكن للطرائق الجزيئية المختلفة المستخدمة في هذا البحث أن تساعد الفنيين في اختبارات صحة البذور لإرشاد الزراع إلى مصادر موثوقة لبذار سليم

Abstract

Hassan, N., S. Murad, B. Bayaa, S. Asaad and M. Baum. 2011. Molecular Detection of *Ascochyta rabiei* in Infected Chickpea Seeds Using ITS Markers and other Molecular Tools. Arab Journal of Plant Protection, 29: 108-117.

Ascochyta blight is considered to be one of the most damaging diseases of chickpea. The disease can cause total yield loss in years of severe epidemic. The pathogen is dispersed by water splash, infected debris and infected seeds. Therefore, widespread commercial distribution of plant material or seeds can rapidly facilitate its spread. Development of an effective crop disease management depends on rapid detection and precise identification of the pathogen. The objective of this study was to use PCR markers based technologies to indentify *A. rabiei* from symptomless infected seeds. Seeds of four chickpea varieties (Ghab 1, Ghab 2, Ghab 3, and Ghab 4) infected with *A. rabiei* were collected from ICARDA′ s research fields in Tel Hadya, Aleppo, in 2007. Four DNA samples of *A. rabiei* infected (2) and healthy chickpea seeds (2) were used as positive controls for *A. rabiei* and negative controls for chickpea. PCR amplification of Internal Transcribed Spacers, ITS 4 & ITS 5 primers showed two clear bands of different sizes in each of the infected seeds. The first band was the chickpea ITS fragment of ~ 750bp and the second the *A. rabiei* specific ITS fragment of 565bp. Other molecular techniques (SSR and Mating types) confirmed the results obtained by ITS markers. These tests could be used by regulatory and quarantine authorities to ensure safe and clean seed introduction to all countries.

Keywords: Chickpea, Ascochyta rabiei, ITS markers

Corresponding author: ***Bassam Bayaa, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Aleppo University, Aleppo, Syria, Email: B.bayaa@cgiar.org***

References المراجع

1. **بياعة، بسام،** 1981. الوجيز في أمراض النبات. مديرية الكتب والمطبوعات الجامعية، جامعة حلب، 319 صفحة.
2. **وزارة الزراعة والاصلاح الزراعي،** 2009. مديرية وقاية المزروعات، قانون الحجر الزراعي.
3. **Atkins, S.D. and J.M. Clark.** 2004. Fungal diagnostics: a mini review. Journal of Applied Genetics, 45: 3-15
4. Barve**, M.P., T. Arie, S. Salimath, F.J. Muehlbauer and T.L. Peever.** 2003. Cloning and characterization of the mating type (MAT) locus from *Ascochyta rabiei* (teleomorph: *Didymella rabiei*) and a MAT phylogeny of legume-associated *Ascochyta* spp. Fungal Genetics and Biology, 39: 151-167
5. **Beck, J.J. and J.M. Ligon.** 1995. Polymerase chain reaction assays for the detection of *Stagnospora nodorum* and *Septoria tritici* in wheat. Phytopathology, 85: 319-324.
6. **Bassam, B.J., G. Caetano-Anolles and P.M. Gresshoff.** 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry, 196: 80-83.
7. **Boyanton, B.L., Jr. Luna Ruth Ann, L.R. Fasciano**. 2008. DNA Pyrosequencing–Based Identification of Pathogenic *Candida* Species by Using the Internal Transcribed Spacer 2 Region. Archive of Pathology and Laboratory Medicine, 132: 667–674.
8. **Borman, A.M, C.J. Linton, S.J. Miles and E.M. Johnson**. 2008. Molecular identification of pathogenic fungi. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 61 (Supplement 1): i7-i12
9. **Brown, J.K.M.** 1996. The choice of molecular marker methods for population genetic studies of plant pathogens. New Phytologist, 133: 183-195.
10. **Ciardo, D.E., G. Schär, E.C. Böttger, M. Altwegg, and P.P. Bosshard.** 2006. Internal Transcribed Spacer Sequencing versus Biochemical Profiling for Identification of Medically Important Yeasts. Journal of Clinical Microbiology, 44: 77–84.
11. **Dyer, P.S., P.A. Fumeaux, G. Douhan and T.D. Murray**. 2001. A multiplex PCR test for determination of mating type applied to the plant pathogens *Tapesia yallundae* and *Tapesia acuformis.* Fungal Genetic Biology, 33: 173-180
12. **Foster, S.J., A.M. Ashby and B.D.L. Fitt.** 2002. Improved PCR-based assays for presymptomatic diagnosis of light leaf spot and determination of mating type of *Pyrenopeziza brassicae* on winter oilseed rape. European Journal of Plant Pathology, 108: 374-383.
13. **Fraaije, B., D.J. Lovll, E.A. Rohel and D.W. Hollomon.** 1999. Rapid detection and diagnosis of *Septoria tritci* epidemics in wheat using a polymerase chain reaction/Pico green assay. Journal of Applied Microbiology, 86: 701-708.
14. **Geistlinger, J., K. Weising, P. Winter and G Kahl**. 2000. Locus-specific microsatellite markers for the fungal chickpea pathogen *Didymella rabiei* (anamorph) *Ascochyta rabiei*. Molecular Ecology, 9: 1919-1952.
15. **Grandes, M. and T.D. Bruns.** 2008. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes- application to the identification of mycorrhizae and rust. Molecular Ecology, 2: 113-118.
16. **Kaiser, W.J.** 1973. Factors Affecting Growth, Sporulation, Pathogenicity and Survival of *Ascochyta rabiei*. Mycologia, 65: 444-457.
17. **Kaiser, W.J.** 1984. Control of Ascochyta Blight of Chickpea through Clean Seed. In: Ascochyta Blight and Winter Sowing of Chickpeas. M.C. Saxena and K.B. Singh. The Hague, The Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers, 288 pp.
18. **Kaiser, W.J.** 1995. World Distribution of *Didymella rabiei*, on Chickpea (Abstract). Phytopathology, 95: 1040.
19. **Kang, H.W., Y.G. Cho, U.H. Yoon and M.Y Eun**. 1998. A rapid DNA extraction method for RFLP and PCR analysis in a single dry seed. Plant Molecular Biology Reporter, 16: 1-9.

30. **Phan, H.T.T., R. Ford, T. Bretag and P.W.J. Taylor.** 2002. A rapid and sensitive polymerase chain reaction (PCR) assay for detection of *Ascochyta rabiei*, the cause of ascochyta blight. Australian Plant Pathology, 31: 31-39.
31. **Phan, H.T.T., R. Ford and P.W.J. Taylor.** 2003. Population structure of *Ascochyta rabiei* in Australia based on STMS fingerprints. Fungal Diversity, 13: 111-129.
32. **Polhill, R.M. and P.H. Raven (eds.)**. 1981. Advances in Legume Systematics, Part 1. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. pp 1- 26.
33. **Prewitt, M.L., S.V. Diehl, T.C. McElroy and W.J. Diehl**. 2008. Comparison of general fungal and basidiomycete-specific ITS primers for identification of wood decay fungi. Forest Products Journal, 58: 66-71
34. **Promega Technical Manual.** 2004. Silver sequence DNA sequencing system. Promega Corporation, USA, 24 p.
35. **Ramsey, M., S. Khan and E. Scott**. 1999. Ascochyta blight of chickpeas– a lesson in plant disease. Australasian Plant Pathology Society News, 12: 9.
36. **Sambrook, J., E.F Fritsch and J. Maniatis.** 1989. Molecular Cloning, a Laboratory Manual. 2^{nd} edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2.60-2.80.
37. **Saxena, M.C. and K.B Singh (eds.).** 1987. The Chickpea CAB International, Oxon, UK.
38. **Singh, K.B. and M.V. Reddy.** 1993. Resistance to Six Races of *Ascochyta rabiei* in the World Germplasm Collection of Chickpea. Crop Science, 33: 186-189.
39. **Singh, K.B., S. Kumar, M.P. Hawar and S. Lateef.** 1990. Disease and Pest Resistance Breeding: Which Way to go in the nineties?. Pages 233-238. In: Chickpea in the Nineties. Proceedings of the Second International Workshop on Chickpea Improvement, 4-8 December 1989, ICRISAT Center, Patancheru, India.
40. **Tarvis, H., C. Iwen and S.H. Hinrichs**. 2000. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer region 1 and 2. Journal of Clinical Microbiology, 28: 1515-1515
41. **Tisserat, N.A., S.H. Hulbert and K.M. Sauer.** 1994. Selective amplification of rDN9A internal transcribed spacer regions to detect *Ophiosphaerella korrae* and *O. herpotricha*. Phytopathology, 84: 478-482.
41. **White, M.B., M. Carvalho, D. Derse, S.J. O'Brienand M. Dean.** 1992. Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms. Genomics, 12: 301-306.

20. **Kõljalg, U., K.H. Larsson, K. Abarenkov, R.H. Nilsson, I. J Alexander, U. Eberhardt, S. Erland, K. Høiland, R. Kjøller and E. Larsson**. 2005. UNITE: a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. New Phytologist, 166: 1063–1068
21. **Kovachevski, I.C.** 1936. [The blight of chickpea, *Mycosphaerella rabiei* n.sp.]. (In Bulgaria). Issued by Ministry of Agriculture Domains, Sofia, 80 pp
22. **Lee, S.B. and J.W. Taylor**. 1992. Phylogeny of five fungus-like protoctistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. Molecular Biology and Evolution, 9: 636-653.
23. **Maden, S., D. Singh, S.B. Mathur and P. Neergaard**. 1975. Detection and Location of Seed-borne Inoculum of *Ascochyta rabiei* and its Transmission in Chickpea (*Cicer arietinum*). Seed Science and Technology, 3: 667-681
24. **Mc Cartney, H.A., S.J. Foster, B.A. Fraaje and E. Ward.** 2003. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. Pesticide Management Science, 59: 129-142.
25. **Nauman, A., M. Navarro-González, O. Sánchez-Hernández, P.J. Hoegger, U. Kües.** 2007. Correct identification of wood-inhabiting fungi by ITS analysis. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy, 1: 41–61.
26. **Navas-cortes, J.A., A. Trapero-Casas and R.M Jimenez-Diaz.** 1995. Survival of *Didymella rabiei* in Chickpea Straw Debris in Spain. Plant Pathology, 44: 332-339.
27. **Nazar, R.N., X. Hu, J. Schmidt, D. Culham and J. Robb.** 1991. Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogens. Physiology and Molecular Plant Pathology, 39: 1-11.
28. **Nilsson, R.H., E. Kristiansson, M. Ryberg, N. Hallenberg and K.H. Larsson.** 2008. Intraspecific ITS variability in the kingdom *Fungi* as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. Evolutionary Bioinformatics, 4: 193–201.
29. **Nene, Y.L.** 1980. A world list of Pigeon-pea (*Cajanus cajan* L.) Millsp. and chickpea (*Cicer arietinum* L.) pathogens. ICRISAT Pulse Pathology Report, 8: 1-14.
30. **Pande, S., K.H.M. Siddique, G.K. Kishore, B. Bayaa, P.M. Gaur, C.L.L Gowda, T.W. Bretag and J.H. Crouch.** 2005. Ascochyta blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.): A review of biology, pathogenicity, and disease management. Australian Journal of Agricultural Research, 56: 317-332.

Received: February 27, 2010; Accepted: August 11, 2010

تاريخ الاستلام: 2010/2/27؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2010/8/11