دراسة التشابه بين الأنواع المختلفة من جنس *Alternaria* باستخدام مؤشرات التضاعف العشوائي للحامض النووي الريبي منقوص الأكسيجين

ورقاء سعيد قاسم الطائي، نديم أحمد رمضان ورياض خليل البرهاوي
قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة الموصل، الموصل، العراق، البريد الإلكتروني: **wsqassim2004@yahoo.com**

الملخص

الطائي، ورقاء سعيد قاسم، نديم أحمد رمضان ورياض خليل البرهاوي. 2010. دراسة التشابه بين الأنواع المختلفة من جنس *Alternaria* باستخدام مؤشرات التضاعف العشوائي للحامض النووي الريبي منقوص الأكسيجين. مجلة وقاية النبات العربية، 28: 127–133.

اعتمدت تقنية مؤشرات التضاعف العشوائي متعدد الأشكال (RAPD) لسلسلة الحامض النووي الريبي منقوص الأكسيجين (DNA) لتحديد بصمة DNA لأربع عشرة عزلة من الأنواع المختلفة لجنس *Alternaria* المعزولة من عينات أوراق نباتات مصابة بمرض تبقع الأوراق تعود إلى أنواع مختلفة من محاصيل الخضر في مدينة الموصل، العراق. جرى عزل DNA المجيني من الغزل الفطري لسلالات الفطر والمنقاة بطريقة البوغ الوحيد، وبعد ذلك تم تعريض DNA إلى تسع من بادئات التضاعف العشوائي والتي لم ينجح منها إلا ثلاثة في إحداث التضاعف وإعطاء حزم متباينة من DNA وهذه البادئات هي: OPA02، OPA05 و OPA06. تراوح الوزن الجزيئي التقريبي للحزم الناتجة بين 207 و1507 زوج قاعدي، وكان مجمل عدد الحزم المتولدة 281 حزمة. تم الحصول على عدد من الحزم المنفردة من قبل البادئات الثلاث وعدد كبير من الحزم متعددة الأشكال والتي يمكن اعتبارها حزما مفردة للتمييز بين العزلات الفطرية المختلفة، وبالتحليل العنقودي لمركبات التشابه بين أزواج الحزم، توزعت العزلات الفطرية العائدة للأنواع المختلفة في ثلاث مجاميع عنقودية متميزة مظهرة العلاقة بينها وموضحة أن تحليلات RAPD تعد طريقة مهمة وجيدة للكشف عن التباين الوراثي بين عزلات الأنواع المختلفة العائدة لجنس *Alternaria*.

كلمات مفتاحية: الامراضية، *Alternaria*، RAPD-PCR، بصمة الإصبع DNA.

المقدمة

تعد الفطور العائدة للجنس *Alternaria* من الفطور واسعة الإنتشار بصورة رمية أو ممرضة للنباتات مسببة مدى واسعاً من الأمراض ذات التأثير الاقتصادي في عديد من النباتات كمحاصيل الحبوب والمحاصيل الزيتية والخضراوات والحمضيات/الموالح وعديد من نباتات الزينة وعدد من الأعشاب (3، 13، 19). وتظهر أعراض الإصابة بفطر *Alternaria* على هيئة بقع أو لفحات أوراق أو تسبب تعفن قاعدة الساق والدرنات والثمار أو موت البادرات (1، 14). وتعد الصفات الشكلية الأساس الأول والرئيس للمفاتيح التصنيفية لأنواع جنس *Alternaria* والمعتمدة بصورة رئيسية في تشخيص أنواعه (16، 23، 27)، غير أن هذه الطرائق التشخيصية تتأثر بمكونات الوسط الزرعي والظروف البيئية مقارنة بالطرائق الجزيئية المعتمدة على البروتينات أو الحامض النووي الريبي منقوص الأكسيجين (DNA)، إذ تكون نتائجها أكثر دقة وأقل عرضة للتأثير بالتغيرات البيئية ولذا تكون أكثر ثباتية ومصداقية (6، 10).

إن تطور التقانات الحيوية وفرت طرائقً حديثة للكشف عن التباين الوراثي الذي يسود الكائنات الحية ومن أبرزها تلك التي تعتمد على التفاعل المتسلسل للبوليميراز (PCR)، وقد بينت عديد من طرائق الكشف اعتماداً على PCR ومن أبرزها وأكثرها شيوعاً مؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد (RAPD) للتمييز بين عديد من مسببات أمراض النبات (11). وتركزت مؤشرات RAPD على أستخدام بادئات مفردة عشوائية مؤلفة من حوالي عشر قواعد تقترن مع مكملاتها على المجين بوجود بوليميراز DNA لتقوم بمضاعفة DNA في تلك المناطق لتظهر التباين بين الأفراد من خلال وجود أو عدم وجود هذه المنطقة على المجين أو عدد نسخها وأطوالها (5، 32). ويكشف عن ذلك بترحيل الناتج كهربائياً على هلام الأجاروز ومن ثم صبغ الهلام ببروميد الإثيديوم لاظهارها تحت الأشعة فوق البنفسجية. وتمتاز هذه المؤشرات بعدم الحاجة إلى معرفة تتابع القواعد المحيطة بالمنطقة التي سوف تتضاعف وكذلك بعدم احتياجها للنظائر المشعة مما يسهل استخدامها (30). لذا أصبحت هذه المؤشرات ذات تطبيقات واسعة في دراسات التنوع الوراثي وأثبتت أنها أداة جيدة يمكن استعمالها لدراسة التشابه والإختلاف والتصنيف للكائنات الحية الدقيقة (29). وقد طبقت تقنية RAPD لتحديد بصمة الأصبع DNA لعديد من الأنواع أو المجاميع المتقاربة للفطر *Alternaria* لتوصيف العلاقة بينها والتباين بين هذه الأنواع (9، 18، 28).

مواد البحث وطرائقه

العزلات الفطرية

استخدم في هذا البحث 14 عزلة فطرية تنتمي إلى 11 نوعاً من الأنواع المختلفة لجنس *Alternaria* وهي: أربع عزلات عائدة للنوع *A. alternata* (نظراً لأهمية هذا النوع من حيث انتشاره وإمراضيته) وعزلة واحدة لكل من الأنواع: *A. brassicae*، *A. brassicicola*، *A. cheiranthi*، *A. dianthi*، *A. dianthicola*، *A. longipes*، *A. radicina*، *A. infectoria* و *A. tenuissima*. تم الحصول على هذه العزلات من عينات أوراق محاصيل الخضراوات الشتوية والصيفية المصابة بمرض تبقع الأوراق وهي: السلق واللهانة/الملفوف والباقلاء/الفول والبازلاء والشلغم/اللفت والشوندر والفجل والبطاطا/البطاطس والقرع والباذنجان والفلفل/الفليفلة واللوبياء، والتي جمعت من عدة مناطق زراعية حول مدينة الموصل. تمت تنقية العزلات باستخدام طريقة البوغ الوحيد (18)، وجرى تشخيصها حسب المفاتيح التصنيفية المعتمدة (8، 16، 17، 26). ثم جرى حفظها على شكل موائل (جدول 1).

عزل DNA

نميت العزلات الفطرية في 50 مل من مرق البطاطا/البطاطس المحضر من 250 غ من البطاطا/ليتر من الماء لمدة 7 أيام عند درجة 25±1 °س في حاضنة هزازة بمعدل اهتزاز قدره 120 دورة/دقيقة. جمع الغزل الفطري باستخدام الترشيح ثم سحق في هاون خزفي باستخدام النتروجين السائل، تمت عمليات عزل DNA من المستخلص وفقاً لطريقة Weigand وآخرون (30). حفظت عينات DNA عند درجة −20°س لحين إستعمالها.

تحضير تفاعلات RAPD

تم تحضير هذه التفاعلات بالإعتماد على طريقة Williams وآخرون (32)، واستخدمت في الدراسة البادئات العشوائية التالية المجهزة من شركة Operon Technologies، أمريكا: OPA02 (5'TGCCGAGCTG'3)، OPA05 (5'AGGGGTCTTG'3)، OPA06 (5'GGTCCCTGAC'3).

رحلت العينات على هلام الأجاروز بتركيز 1.2% مع الدليل الحجمي المتكون من DNA لامدا المقطع بانزيم Hind III ولمدة 4–5 ساعات، ثم فحص الهلام بعد صبغه بصبغة بروميد الاثيديوم وتحت الأشعة فوق البنفسجية، وصُوّر باستخدام جهاز تصوير وأفلام من نوع Polaroid Black and White film Type 667.

تحليل نتائج RAPD

أجري تحليل النتائج التي ظهرت من نماذج الـ RAPD لعينات العزلات الفطرية المختلفة لكل نماذج الحزم التي حصل عليها من عملية الرحلان الكهربائي على هلام الأجاروز بعد أن تم توصيفها بالطريقة المقترحة من قبل Halmschlager وآخرون (12)، تم تحويل النتائج إلى جدول ثنائي الخصائص وذلك بوضع الرقم 1 عند وجود الحزمة و0 عند غياب الحزمة. وبعد تدوين البيانات لجميع البادئات، أُجري التحليل العنقودي وحصل على مصفوفة التشابه باستخدام معامل جاكارد للتشابه (JSC)، وتم التعنقد وحصل على مخطط الرسم الشجري باستخدام طريقة المعادلات غير الموزونة للمجاميع الرياضية UPGMA (25)، وتم التحليل باستخدام النظام الإحصائي الجاهز (SPSS).

النتائج والمناقشة

نجحت ثلاث بادئات فقط في إحداث عملية التضخم والتضاعف لتوليد القطع القابلة للإنتاج، وهذه البادئات هي: OPA02، OPA05 و OPA06. وقد سجلت نتائج تحليل RAPD بالنسبة لهذه البادئات الثلاث كما موضح في شكل 1 ومصفوفة التشابه في جدول 2.

يعتمد تحليل نتائج مؤشرات RAPD على وجود الحزم أو غيابها وكذلك على أعداد الحزم وأوزانها الجزيئية بالإضافة إلى شدة تألّق الحزم الناتجة (2، 24). لذا فمن نتائج تحليل الحزم، تراوح الحجم الجزيئي التقريبي للنواتج المتولدة عن البادئات المستخدمة بين 207 و 1507 زوج قاعدي، وكان مجمل عدد الحزم المتولدة 281 حزمة. وحصل توليد عدد قليل من الحزم المفردة باستخدام كل من البادئات الثلاث اذ أعطت البادئة OPA02 حزماً عامة تراوحت أوزانها الجزيئية التقريبية بين 207، 753، 855، 1268 و 1507 زوج قاعدي، وكونت البادئة OPA05 ثلاث حزم عامة كانت أوزانها الجزيئية التقريبية 252، 785 و 850 زوجاً قاعدياً. أما البادئة OPA06 فقد أظهرت حزمتين عامتين تراوحت أوزانهما الجزيئية التقريبية بين 521 و 755 زوجاً قاعدياً.

جدول 1. الفطور المعزولة وعوائلها النباتية قيد الدراسة.

Table 1. Fungal isolates investigated and their hosts.

رقم العزلة Isolate No.	النوع الفطري Fungal species	الاسم العلمي Scientific name	العائل Host الاسم الشائع Common name		العائلة Family
1	*A. cherianthi*	*Beta vulgaris* var.*vulgaris*	الشوندر	Red beet	الرمرامية	Chenopodiaceae
2	*A. tenuissima*	*Vigna sinensis*	اللوبياء	Cowpea	الشفوية/الفولية	Fabaceae
3	*A. brassicola*	*Brassica oleracea*	اللهانة/الملفوف	Cabbage	الصليبية	Cruciferae
4	*A. dianthicola*	*Brassica repa*	الشلغم/اللفت	Turnip	الصليبية	Cruciferae
5	*A. brassicae*	*Raphanus sativus*	الفجل	Raddish	الصليبية	Cruciferae
6	*A. alternata*	*Beta vulgaris* var. *cilca*	السلق	Chart	الرمرامية	Chenopodiaceae
7	*A. dianthi*	*Capsicum annuum*	الفلفل/الفليفلة	Pepper	الباذنجانية	Solanaceae
8	*A. infectoria*	*B. oleracea*	اللهانة/الملفوف	Cabbage	الصليبية	Cruciferae
9	*A. radicina*	*Vicia faba*	الباقلاء/الفول	Broad bean	الشفوية	Fabaceae
10	*A. longipes*	*B. oleracea*	اللهانة/الملفوف	Cabbage	الصليبية	Cruciferae
11	*A. alternata*	*Cucurbita pepo*	القرع	Squash	القرعية	Cucurbitaceae
12	*A. raphani*	*Solanum tuberosum*	البطاطا/البطاطس	Potato	الباذنجانية	Solanaceae
13	*A. alternata*	*S. melongena*	الباذنجان	Egg plant	الباذنجانية	Solanaceae
14	*A. alternata*	*Pisum sativum*	البازلاء	Pea	الشفوية/الفولية	Fabaceae

جدول 2. مصفوفة التشابهات بين عزلات أنواع جنس *Alternaria* بالاعتماد على تحليلات RAPD – PCR.

Table 2. Similarity matrix among *Alternaria* isolates based on their RAPD-PCR analysis**.**

رقم العزلة Isolate NO.	التباين الجيني بين عزلات *Alternaria* Genetic variation among *Alternaria* isolates												
	2	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**
1	0.95	0.82	0.90	0.72	0.83	0.83	0.76	0.64	0.61	0.82	0.77	0.81	0.81
2		0.86	0.86	0.75	0.86	0.86	0.80	0.59	0.57	0.86	0.81	0.85	0.85
3			0.82	0.79	0.83	0.75	0.76	0.57	0.61	0.90	0.77	0.81	0.81
4				0.79	0.83	0.75	0.68	0.64	0.61	0.74	0.77	0.73	0.73
5					0.80	0.80	0.67	0.56	0.60	0.72	0.68	0.64	0.64
6						0.91	0.70	0.52	0.50	0.75	0.78	0.74	0.74
7							0.77	0.58	0.56	0.75	0.78	0.74	0.74
8								0.57	0.55	0.76	0.71	0.75	0.75
9									0.94	0.57	0.59	0.55	0.55
10										0.61	0.57	0.52	0.52
11											0.86	0.90	0.90
12												0.85	0.85
13													1.00
14													

وكان للبادئات الثلاث تأثير مهم في توليد مستويات عالية من الحزم متعددة الأشكال والتي يمكن اعتبارها حزماً مفردة للتمييز بين العزلات الأربع عشر المدروسة، وكما يلي: ولّدت البادئة OPA02 أربع حزم عامة كانت أوزانها الجزيئية التقريبية بين 404، 575، 981 و 1353 زوج قاعدي في كل العزلات المختبرة، ما عدا عزلتين فقد كانت أوزانهما الجزيئية مابين109 و 111 زوجاً قاعدياً. أما البادئة OPA05 فقد ولدت حزمة وزنها الجزيئي التقريبي 607 زوج قاعدي في خمس عزلات من *Alternaria* ذوات الأرقام 5، 7، 8، 9 و 10 والتي تمثل الأنواع *A. brassicae*، *A. dianthi*، *A. infectoria*، *A. radicina* و *A. longipes*، بينما ولدت حزمة أخرى كان وزنها الجزيئي التقريبي 507 زوج قاعدي في ست عزلات أخرى هي 1، 2، 4، 5، 6 و7 والتي تمثل العزلات الفطرية للأنواع *A. cherianthi*، *A. tenuissima*، *A. dianthicola*، *A. brassicae*، *A. alternata* و *A. dianthi*، وكما ولدت هذه البادئة

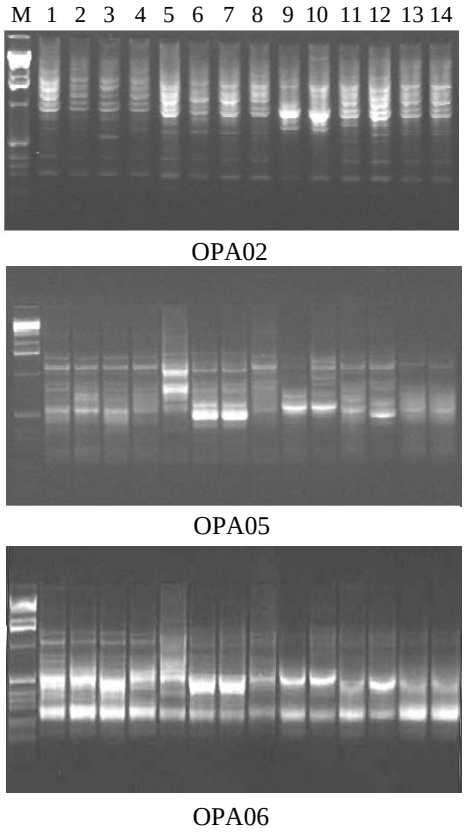
حزمة أخرى كان وزنها الجزيئي التقريبي 455 زوج قاعدي في العزلات ذوات الأرقام 4، 5، 6 و7 وهي عزلات الأنواع *A. dianthicola*، *A. brassicae*، *A. alternata* و *A. dianthi*. أما البادئة OPA06 فقد ولدت حزمة مفردة واحدة كان وزنها الجزيئي التقريبي 650 زوج قاعدي في العزلة رقم 5 العائدة للنوع *A. brassicae*، كذلك ولدت حزمتين عامتين كان وزنهما الجزيئي التقريبي 553 و 633 زوج قاعدي في كل عزلات أنواع جنس *Alternaria* الأخرى، ماعدا العزلة رقم 8 الممثلة للنوع *A. infectoria*.

تحليل المخطط الشجري لأنماط الحزم

من ملاحظتنا لنتائج جدول 2 اتضحت مؤشرات التشابه بين أزواج الحزم للعزلات الفطرية الأربع عشرة المدروسة وذلك حسب تحاليل نماذج الحزم التي حصل عليها من عملية الرحلان الكهربائي على هلام الآجاروز، إذ أعطت المعالجة العددية للقيم بمساعدة الحاسوب وباستخدام التحليل العنقودي لأنماط الحزم مخططاً شجرياً مؤلفاً من عدة مجاميع للتشابه يعكس العلاقة بين العزلات (شكل 2). إذ توزعت هذه العزلات الفطرية في ثلاثة عناقيد رئيسة هي A، B وC التي ضمت عناقيد ثانوية بالنسبة لأنماط الحزم ذات التشابه الأعلى، ضم العنقود الرئيس A عنقودين ثانويين هما A_1 و A_2. ضم العنقود الثانوي A_1 العزلات ذوات الأرقام 13، 14، 11 و 12 ومثلت الأرقام الثلاث الأولى عزلات تعود للنوع *A. alternata* أما الرقم الأخير فقد مثل عزلة واحدة عائدة للنوع *A. raphani*.

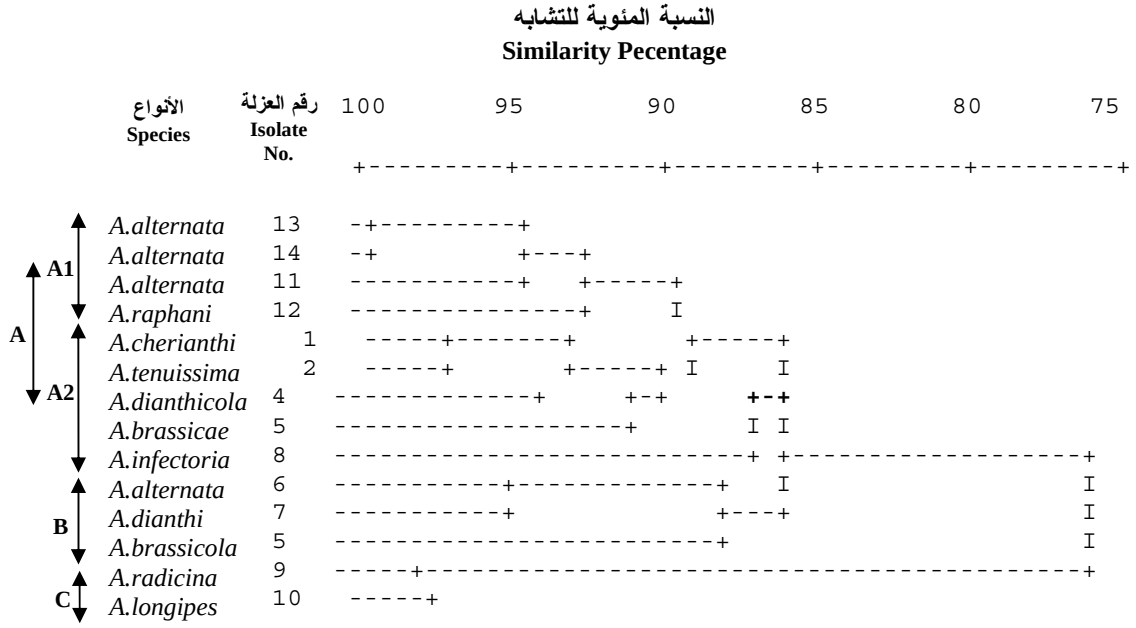
أما العنقود الثانوي A_2 فقد ضم العزلات ذوات الأرقام 1، 2، 4، 5 و 8 العائدة للأنواع *A. cherianthi*، *A. tenuissima*، *A. dianthicola*، *A. brassicae* و*A. infectoria*، على التوالي. بينما ضم العنقود الرئيس B العزلات 6، 7 و 5 وهي عزلات الأنواع *A. alternata*، *A. dianthi* و *A. brassicae*، على التوالي. أما العنقود الرئيس C فقد ضم العزلتين 9 و 10 الممثلتين بالنوعين *A. radicina* و *A. longipes*، على التوالي.

من نتائج جدول 2، والمخطط الشجري لأنماط الحزم (شكل 2)، نلاحظ تباين حجم التوسع لقطع DNA الناتجة من قبل البادئات المستخدمة باختلاف هذه البادئات، إذ أظهرت نماذج الحزم لكل بادئة وبشكل واضح مدى التشابه أو الإختلاف بين عزلات الأنواع المختبرة. حيث كانت بعض الحزم موجودة في كل العزلات مما أعطى دلالة على العلاقة بينها ومن جهة أخرى فإن غياب بعض الحزم وظهور الحزم المفردة أوالحزم متعددة الأشكال أعطى التخصص لبعض منها وهذا ما ظهر واضحاً من خلال المخطط الشجري وحالات التعنقد فيه.إذ تعنقدت ثلاث عزلات تعود للنوع *A. alternata* وعزلة تعود للنوع *A. raphani* عند نسبة تشابه 89%، مع وجود حالة التماثل 100% بين العزلتين 13 و 14 العائدتين للنوع *A. alternata* ضمن العنقود. وتعنقدت العزلات *A. cherianthi*، *A. tenuissima*، *A. dianthicola*، *A. brassicae* و *A. infectoria* ضمن العنقود الثانوي A_2 عند نسبة تشابه 87%. ومن ثم تعنقدت هذه الأنواع جميعاً عند نسبة تشابه 86% ضمن العنقود الرئيس A، دلالة على العلاقة الوثيقة بين هذه الأنواع العائدة للجنس *Alternaria*.



شكل 1. أنماط التحزيم الناتجة من تضاعف DNA العشوائي في أنواع *Alternaria* بفعل البادئات OPA02، OPA05 و OPA06 والمرحلة على هلام من 1.2% اجاروز حيث يمثل المسار M الدليل الحجمي المكون من λ DNA المقطع بأنزيم Hind III بينما تمثل الأرقام من 1–14 أنواع الفطر المدروسة.

Figure 1. Banding patterns of RAPD-PCR from *Alternaria* using the primers OPA02, OPA05 and OPA06 on 1.2% agarose gel. M represents size ladder provide by λ DNA digested with Hind III while the numbers 1-14 stand for the *Alternaria* species.



شكل 2. شجرة القرابة الوراثية لأنواع جنس *Alternaria* بالاعتماد على تحليلات أنماط الحزم بتقنية RAPD-PCR.

Figuer 2. Dendrogram showing relationships among *Alternaria* species based on their RAPD-PCR analysis.

ومن ناحية أخرى توزعت العزلات في العنقود الرئيس A مع عزلات العنقود الرئيس B عند نسبة تشابه 86% مما يؤكد العلاقة بين هذه الأنواع علماً أن العنقود الرئيس B يحوي على عزلة تعود للنوع *A. alternata* مما يؤكد أهمية هذا النوع وإمكانية انفصال عزلاته في مجاميع مختلفة لكنها تكون ذات صلة وثيقة فيما بينها. وهذا ما أشار إليه Pryor و Michailides (18) عند استخدامهما التقنيات الجزيئية والتحليلات المتعددة الوراثية إلى أن أنواع جنس *Alternaria* ذات الأبواغ الصغيرة المتسلسلة للمضيف الخاص والنوع *A. alternata* تتعنقد وترتبط فيما بينها مما يجعلنا نتوقع بأن هذه الأنواع تبقى ذات علاقة وثيقة ببعضها البعض. أما العنقود الرئيس C والذي يضم عزلتين تعودان للنوعين *A. radicina* و *A. longipes* فتوزعت مع العنقودين الرئيسين A و B عند نسبة تشابه 75% مظهران حالة الارتباط بين هذه الأنواع بالرغم من وجود الاختلاف بينها والذي يعود إلى تباينها في صفاتها الشكلية والفيسيولوجية والتي تعد انعكاساً لصفاتها الوراثية (4، 27).

وكذلك من التدقيق في المخطط الشجري وتوزيع أنواع الفطر على العوائل النباتية لبيان العلاقة بين الإمراضية للعزلات وتعنقدها في مجموعة معينة، نلاحظ أن العنقود الثانوي A_1 ضم ثلاث عزلات للـ *A. alternata* لكنها تتطفل على ثلاث نباتات مختلفة تعود لعدة عوائل نباتية كما هو موضح في الجدول 1. أما العزلة الرابعة ضمن العنقود الثانوي وهي *A. raphani* بالرغم أنها تعود لنوع مختلف عن العزلات ضمن العنقود الثانوي، غير أنها تتطفل على نبات البطاطا/البطاطس العائدة للعائلة الباذنجانية كما هو بالنسبة لأحد عزلات النوع *A. alternata* ضمن العنقود. بينما نلاحظ في العنقود الثانوي A_2 مثالاً آخر عن عزلتين هما *A. dianthicola* و *A. brassicae* والمعزولتين من نباتي الفجل واللهانة/الملفوف على التوالي العائدتين للعائلة الصليبية أما العزلتين الباقيتين ضمن العنقود الثانوي فتعودان لنباتين مختلفين يعودان لعائلتين مختلفتين، وهذا المثال ينطبق على عزلات الفطر ضمن العنقود الرئيس B. ولكن هذا لا يعني أن حالة التعنقد ضمن المخطط الشجري للعزلات العائدة للأنواع المختلفة للجنس *Alternaria* يعود إلى ربط الإمراضية للعزلات بعائل معين إذ أن معظم أنواع جنس *Alternaria* الممرضة تكون إما ممرضة لنوع واحد أو عدة أنواع من النباتات فهي تختلف عادة حسب عائلها (3). وهذا ما يوضحه العنقود الرئيس C الذي يضم عزلتين الأولى للفطر *A. radicina* المعزول من نبات الباقلاء/الفول العائد للعائلة الشفوية/الفولية والثانية للفطر *A. longipes* المعزول من نبات اللهانة/الملفوف العائد للعائلة الصليبية. لذا يمكن القول بأنه لا توجد علاقة بين حالة التعنقد للعزلات حسب RAPD والإمراضية ووجودها على عائل معين، إذ تعنقدت معاً أفراد ممرضة لعوائل مختلفة من النباتات. وهذا ما ذكره Gherbawy (9) عند دراسته التغاير الجيني بين عدة أنواع من جنس *Alternaria* المعزولة من محاصيل خضار مختلفة حيث ذكر أنه

لا يوجد ربط بين تحليلات مجاميع RAPD والإمراضية للعزلات المدروسة إنما كان التوزيع على أساس نماذج الحزم. هنا يمكننا القول أن حالة التعنقد في المخطط الشجري ربما تعد انعكاساً للصفات الشكلية للأنواع المدروسة ولكن هذا لا يعطي إسناداً قاطعاً ولكن التعنقد والعلاقة بين العزلات عكسا العلاقة الواضحة بينها إذ أن بعض الحزم كانت موجودة في كل العزلات مما ساعد على ايجاد العلاقة بينها ومن جهة أخرى أن غياب أو فقدان بعض الحزم التي أعطت التخصص لبعض العزلات، لذا يمكن القول أن تحاليل RAPD–PCR نجحت كأداة وطريقة كفوءة في إظهار العلاقة الكلية المميزة بين عزلات الأنواع المختلفة لجنس *Alternaria*، مما يوضح علاقاتها العرقية. وهذا ماأشار إليه Tigano وآخرون (28) عند دراستهم التغاير الجيني باستخدام تقنية تحليلات RAPD بين عزلات مختلفة تعود للنوعين *A. alternata* و *A. cassiae* المعزولتين من نبات السنامكي *Senna obtusifolia* في البرازيل، إذ ذكر أن تحليلات RAPD أعطت نتائج واضحة عن التغاير الجيني بين العزلات المدروسة وأنها تحليلات يمكن أن تستعمل للتمييز بين الأنواع الأخرى للـ *Alternaria*.

لقد استعمل التضخيم العشوائي المتعدد الأشكال لبلمرة DNA في دراسة التباين الوراثي في جنس *Alternaria* (7، 20) وبين عزلات *A. solani* و *A. alternata* المعزولة من البطاطا/البطاطس والطماطم/البندورة (31، 15). وبين أنواع *Alternaria* الممرضة للنباتات القرعية (22)، وكذلك بالنسبة للنوع *A. brassicae* (21).

Abstract

Al-Taee, W.S.Q., N.A. Ramadan and R.K. Al-Barhawi. 2010. Determination of the Similarities Between Various Species of the Genus *Alternaria* by Using Random Amplified Polymorphic DNA. Arab Journal of Plant Protection, 28: 127-133.

Random amplified polymorphic DNA technique (RAPD) was used to determine the finger print of 14 isolates related to different species of the genus *Alternaria* isolated from vegetable plants infected with leaf spot disease in Mosul, Iraq. DNA was isolated from the fungal hyphae of the isolates which were formerly purified by the single spore method. Three out of nine primers were able to produce clear DNA bands. Those primers were OPA02, OPA05 and OPA06. Molecular weight of the bands varied between 207 and 1507 base pair. The total bands obtained were 281. At the same time single bands were obtained by the three primers and large numbers of polymorphic bands which could be considered as single when used for comparison between different isolates. Cluster analysis of similarity between band pairs showed that the fungal isolates were clustered in three distinctive groups. RAPD was found to be an important tool to identify genetic dissimilarities between different species of the genus *Alternaria*.

Keywords: Pathogenicity, *Alternaria*, RAPD-PCR, DNA finger printing.

Corresponding author: ***Warka S.Q. Al-Taee, Department of Biology, College of Science, University of Mosul, Mosul, Iraq, E-mail: wsqassim2004@yahoo.com***

References

المراجع

1. **Agrios, G.N**. 2005. Plant Pathology, 5th ed. Academic Press. 922 pp.
2. **Botestein, D., R.L. White, M. Skolnick and R.W. Davis.** 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics, 32: 341-331.
3. **Bottalico, A. and A. Logrieco.** 1998. Toxigenic *Alternaria* species of Economic Importance. Pages 65-108. In: Mycotoxins in Agriculture and Food Safety. H.K. Sinha and D. Bhatnagar (eds.). Marcel Dekker, Inc. New York.
4. **Bridge, P.D.** 1989. An evaluation of some physiological and biochemical methods as an aid to the characterization of species of *Penicillium* subsection Fasciculata. Journal of General Microbiology, 131: 1887-1895.
5. **Caetano-Anolles, G., B.J. Bassam and P.M. Gresshoff.** 1994. DNA amplification fingerprinting with very short primers. Plant Molecular Biology Reporter, 19: 18-25.
6. **Carlile, M.J., S.C. Watkinson and G.W. Gooday.** 2001. The Fungi. Elsevier, Amsterdam. 588 pp.
7. **Cooke, D.E.L., J.W. Forster, P.D. Jenkins, D.G. Jones and D.M. Lewis.** 1998. Analysis of intraspecific and interspecific variation in the genus *Alternaria* by the use of RAPD-PCR. Annals of Applied Biology, 132: 197-209.
8. **Ellis, M.B.** 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 608 pp.
9. **Gherbawy, Y.A.M.H.** 2005. Genetic variation among isolates of *Alternaria* spp. from selected Egyptian crops. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 38: 77-89.
10. **Guarro, J., J. Gene and A.M. Stchigel.** 1999. Developments in fungal taxonomy. Clin. Microbiol. Rev., 12: 454-500.
11. **Hadidi, A., L. Levy and E.V. Podleckis.** 1995. Polymerase Chain Reaction Technology in Plant Pathology. Pages 167-187. In: Molecular Methods in Plant Pathology. R.P. Singh and U.S. Singh (eds.). CRC Press, London.
12. **Halmschlager, E., R. Messner, T. Kowalski and H. Prillinger.** 1994. Differentiation of *Ophiostoma piceae* and *Ophiostoma quercus* by morphology and RAPD-analysis. Systematic and Applied Microbiology, 17: 554-562.

13. **Hasan, H.A.H.** 1995. *Alternaria* mycotoxins in black rot lesion of tomato fruit: conditions and regulation of their production. Mycopathologia, 130: 171-177.
14. **Laemmlen, F.** 2001. *Alternaria* Diseases. University of California. Agriculture and Natural Resources. http://anrcatalog.ucdavis.edu.
15. **Morris, P.F., M.S. Connoly and D.A. St Clair.** 2000. Genetic diversity of *Alternaria alternata* isolated from tomato in California assessed using RAPDs. Mycological Research, 104: 286-292.
16. **Moubasher, A.H.** 1993. Soil fungi in Qatar and other Arab Countries. The Center of Scientific and Applied Research. University of Qatar, Doha, Qatar. 566 pp.
17. **Pitt, J.I. and A.D. Hocking.** 1997. Fungi and Food Spoilage, 2nd ed. Gaithersburg, Maryland. 593 pp.
18. **Pryor, B.M. and T.J. Michailides.** 2002. Morphological, pathogenic and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with *Alternaria* late blight of Pistachio. Phytopathology, 92: 406-416.
19. **Pryor, B.M. and R.L. Gilbertson.** 2000. Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNAsequences. Mycological Research,104:1312-1321.
20. **Roberts, R.G., S.T. Reymond and B. Andersen.** 2000. RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of small-spored *Alternaria* species and species groups. Mycological Research, 104: 151-160.
21. **Sharma, T.R. and J.P. Tewari.** 1995. Detection of genetic variation in *Alternaria brassicae* by RAPD fingerprints. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 4:105-107.
22. **Sharma, T.R. and J.P. Tewari.** 1998. RAPD analysis of three *Alternaria* species pathogenic to *Curcifers*. Mycological Research, 102: 807-814.
23. **Simmons, E.G.** 1992. *Alternaria* taxonomy: Current Status, Viewpoint, Challenge. Pages 1-35. In: *Alternaria* Biology, Plant Diseases and Metabolites. J. Chelkowski and A. Visconti (eds.). Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
24. **Smith, J.S.C. and O.S. Smith.** 1992. Fingerprint Crop Varieties. In: Advanced in Agronomy. D.L. Sparks (ed.). 47: 98-107.
25. **Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal.** 1973. Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Classification. W.H. Freeman and Company, San Francisco, USA. 573 pp.
26. **Streets, R.B.** 1975. The Diagnosis of Plant Diseases. The University of Arizona Press. Pages 7-21.
27. **Thomma, B.P.H.J.** 2003. Pathogen profile, *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. Molecular Plant Pathology, 4: 225-236.
28. **Tigano, M.S., S. Aljanabi and S.C.M. de Mello.** 2003. Genetic variability of Brazilian *Alternaria* spp. Isolates as revealed by RAPD analysis. Brazilian Journal of Microbiology, 34: 117-119.
29. **Vaneecoutte, M.** 1996. DNA fingerprinting techniques for microorganisms. Molecular Biotechnology, 6: 115-142.
30. **Weigand, F., M. Baum and S. Udupa.** 1993. DNA molecular markers techniques, technical manual. No. 20. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA), Aleppo, Syria. Pages 12-14.
31. **Weir, T.L., D.R. Huff, B.J. Christ and C.P. Romaine.** 1998. RAPD-PCR analysis of genetic variation among isolates of *Alternaria solani* and *Alternaria alternata* from potato and tomato. Mycologia, 90:813-821.
32. **Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Lavak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey.** 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 18: 6531-6535.

Received: November 30, 2009; Accepted: May 6, 2010

تاريخ الاستلام: 2009/11/30؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2010/5/6