التنوع الوراثي لفطر *Verticillium dahliae* Kleb المسبب لذبول القطن في بعض حقول القطن في سورية

جمعة لولة[1]، أحمد محمد مهنا[2]، محمد أبو شعر[3]، محمد نايف السلتي[3] وفواز العظمة[2]

(1) إدارة بحوث القطن، حلب، سورية؛ (2) كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية، البريد الإلكتروني: AhmadMouhanna@gmx.net؛
(3) كلية الزراعة، جامعة حلب، سورية.

الملخص

لولة، جمعة، أحمد محمد مهنا، محمد أبو شعر، محمد نايف السلتي وفواز العظمة. 2011. التنوع الوراثي لفطر *Verticillium dahliae* Kleb المسبب لذبول القطن في بعض حقول القطن في سورية. مجلة وقاية النبات العربية، 29: 95-102.

تم الحصول على 17 عزلة من الفطر *Verticillium dahlia* Kleb من نباتات قطن أبدت أعراض ظاهرية لمرض ذبول فرتيسليوم في 17 موقعاً في خمس محافظات في سورية (حماة، حلب، الرقة، دير الزور والحسكة). درست الاختلافات الشكلية بين العزلات على أوساط غذائية صناعية ضمن أطباق بتري (Potato- Dextrose- Agar PDA)، وأظهرت النتائج وجود اختلافات مورفولوجية بين هذه العزلات. أظهرت نتائج اختبار RAPD-PCR مدى القرابة والتباين الوراثي بين العزلات المختلفة لفطر *V. dahliae* إذ تم الحصول على 70 حزمة متعددة شكلياً باستخدام 10 بادئات من بين 12 بادئة مختبرة وبنتيجة التحليل الإحصائي العنقودي تبين أن نسبة التباين بين العزلات المختلفة لم تتجاوز 35%، كما انقسمت العزلات إلى ثلاث مجموعات RAPD ولم يكن هناك أي علاقة ما بين هذه المجموعات والموقع الجغرافي، في حين لوحظ أن هناك علاقة ما بين مجموعات RAPD الثلاث والخصائص المورفولوجية للعزلات المختبرة.

كلمات مفتاحية: فرتيسليوم، تباين وراثي، قطن، RAPD-PCR، سورية

المقدمة

يعد القطن من أهم محاصيل الألياف في العالم، ومن المحاصيل الاستراتيجية في سورية لدوره الكبير في الدخل القومي، إذ بلغت المساحة المزروعة به عام 2008 حوالي 176,449 هكتار أنتجت 697,461 طن (1). يصاب محصول القطن في سورية بعدد من الأمراض كالخناق المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani* Kühn وذبول فرتيسليوم الوعائي *Verticillium dahlia* Kleb واللفحة البكتيرية *Xanthomonas campestris* pv. *Malvacearum* (Smith) Dye. ينجم مرض ذبول القطن الوعائي في سورية عن الإصابة بالفطر *V. dahliae* الذي يعتبر من قاطنات التربة. وتتلخص أهم الأعراض الظاهرية لهذا المرض بظهور برقشة مع اصفرار بين العروق وعلى حواف الأوراق السفلية ثم تمتد الإصابة إلى الأوراق العلوية، لتصبح في نهاية الأمر بنية اللون ثم تتجعد الأوراق وتسقط (3). عند إجراء مقطع عرضي أو طولي في جذر أو ساق نبات مصاب يلاحظ تلون الأوعية الخشبية الناقلة باللون البني الغامق (10). يعد مرض ذبول فرتيسليوم الأكثر أهميةً لما يسببه من خسائر بمحصول القطن في الدول الثلاث الرئيسة المنتجة للقطن عالمياً (الولايات المتحدة والصين والإتحاد السوفيتي سابقاً) وفي دول أخرى مثل تركيا وأستراليا واليونان وسورية (6)، حيث بلغت الخسائر السنوية بالمحصول في الإتحاد السوفيتي حوالي 25-30%، وقد تراوحت الخسائر في الولايات المتحدة الأمريكية بين 1.64% و 3.48% بين الأعوام 1952 و 1990 (9). يمكن لفطر *V. dahlia* الانتقال والانتشار عن طريق بذور القطن على شكل جسيمات حجرية في الزغب البذري (19).

أشير إلى هذا المرض لأول مرة في سورية في إحدى منشورات وزارة الزراعة (2) ولم تجر بعد ذلك دراسات شاملة لتحديد سلالاته المنتشرة في الحقول المزروعة بالقطن في سورية. تعد تقانة الـــDNA Random Amplification of Polymorphic متعدد الأشكال والمضخم عشوائياًDNA (RAPD) من الأساليب المناسبة لتقدير مدى التباينات الوراثية بين الكائنات الحية ومنها الأنواع والسلالات التابعة لجنس فطر *Verticillium* (7). كما يمكن من خلال هذه التقانة الإجابة على عدة تساؤلات متعلقة بخصوصية العائل وبالمنشأ الجغرافي وبالقدرة الإمراضية لعزلات الفطر *V. dahliae* (14). ففي دراسة باستخدام تقانة الـــ RAPD لـــ 40 عزلة من فطر *V. dahliae* (36 عزلة من أشجار الزيتون واثنتان من البندورة/الطماطم وواحدة من الباذنجان، وواحدة من تربة بستان زيتون) ظهر وجود تباين شكلي واضح بين العزلات والتي انقسمت إلى أربع مجموعات بطريقة RAPD في حين لم يلاحظ وجود علاقة بين المجموعات الناتجة عن تحليل العناقيد والأصل الجغرافي أو العائل النباتي للعزلات المختبرة (13). كما أمكن تحديد التباينات الوراثية بين نمطي الفطر *V. dahliae* النمط المسبب لتساقط أوراق

القطن (D) والنمط غير المسبب لتساقط أوراق القطن (ND) باستخدام تقانة الـــ RAPD (12). كما وجد وباستخدام تقانة الـــ RAPD أن 27 عزلة من الفطر *V. dahliae* عزلت من أشجار زيتون في الجزائر تنتمي للطراز المرضي غير المسقط للأوراق ND، وأظهرت نتائج التحليل العنقودي أن معظم العزلات الجزائرية قريبة من العزلات الفرنسية والسورية (7).

هدفت هذه الدراسة إلى معرفة مدى انتشار هذا الفطر وتشخيص عزلاته وتوصيفها مورفولوجياً ودراسة درجة القرابة فيما بينها بالتحليل الجزيئي بتقانة RAPD. وبذلك تمهد هذه الدراسة لأبحاث لاحقة.

مواد البحث وطرائقه

جمع العينات المصابة

أجري استقصاء حقلي في حقول القطن الموزعة في محافظات حماة، حلب، الرقة، دير الزور والحسكة، خلال الفترة الواقعة مابين منتصف أيلول/سبتمبر ومنتصف تشرين الثاني/نوفمبر من عام 2008 كون الإصابات وآثارها تكون أكثر وضوحاً في هذه الفترة، جمعت خلاله 85 عينة من 17 حقلاً من نباتات بدت عليها أعراض إصابة بالذبول الوعائي وذلك بمعدل 5 نباتات من كل حقل. حفظت العينات عند −20 °س إلى حين الاستخدام (جدول 1).

عزل الفطر *V. dahliae*

لعزل الفطر *V. dahlia* من نباتات القطن التي تظهر أعراض المرض، أخذت من كل عينة ثلاث قطع بطول 1سم من منطقة أسفل الساق الواقعة مباشرةً فوق وتحت سطح التربة وغسلت جيداً بالماء ثم نزعت عنها منطقة القشرة. عقمت القطع النباتية بنقعها بمحلول من هيبوكلوريت الصوديوم تركيز 0.5% لمدة دقيقتين، ثم غسلت جيداً بالماء المقطر المعقم ووضعت على ورق نشاف حتى جفت جيداً ثم نضدت على وسط زرع انتخابي خاص (5) ويتكون كل ليتر من هذا الوسط من: 7.5 غ سكروز، 5 مل إيثانول، 2 غ نترات صوديوم، 0.5 غ كبريتات مغنزيوم مائية ($MgSo_4.7H_2O$)، 1 غ فوسفات بوتاسيوم (K_2HPO_4)، 0.01 غ كبريتات حديد مائية ($FeSo_4.4H_2O$)، 1 غ كلورامفينيكول، 20 غ أغار.

حضنت الأطباق عند درجة حرارة 1±23 °س لمدة أسبوعين وبغياب كامل للإضاءة. تمت تنقية العزلات بزرع بوغة واحدة من جديد فوق وسط آغار البطاطا والدكستروز (PDA) لتكوين مستعمرة نقية من كل عزلة من أجل التوصيف المورفولوجي والاختبارات اللاحقة.

جدول 1. مواقع جمع العينات والعزلات المدروسة.
Table 1. Locations from which the studied isolates were collected.

رقم العينة Sample No.	Location	الموقع	المحافظة Province
V_1	Jezraya	جزرايا	حلب
V_2	Alzerbeh	الزربة	Aleppo
V_3	Albarkom	البرقوم	
V_4	Hwaiiralis	حويرالعيس	
V_5	Sokailibya	الصقيلبية	حماة
V_6	Ayn Alkrom	عين الكروم	Hama
V_7	Tiezyn	تيزين	
V_8	Ammorin	عمورين	
V_9	Kasret Afnan	كسرة عفنان	الرقة
V_{10}	Kasret Alshikh	كسرة الشيخ	Alrakka
V_{11}	Abo kobae	أبوقبيع شرقي	
V_{12}	Alokairshy	العكيرشي	
V_{13}	Alrawy	الراوي	دير الزور
V_{14}	Alsalheyah	الصالحية	Deir Ezzor
V_{15}	Hawaij	حوايج	
V_{16}	Khrab Askar	خراب عسكر	الحسكة
V_{17}	Tal-Hamis	تل حميس	Alhasakaa

استخلاص الحمض النووي DNA وتنقيته

تم استخلاص كامل DNA من الفطر بالإعتماد على طريقة Cetyltrimethyl Ammonium Bromide (CTAB) (16). جمعت المشيجة الهوائية للفطر من أطباق بتري المنمى عليها بكشطه جيداً ثم طحنه إلى مسحوق ناعم باستخدام الآزوت السائل. أخذ حوالي 150 مغ من مطحون مشيجة الفطر إلى أنبوب ابندورف سعة 2 مل، وأضيف لها 700 ميكرولتر من محلول الاستخلاص CTAB الدافئ. حضنت العينات في حمام مائي عند درجة حرارة 65 °س لمدة 30 دقيقة مع التحريك الخفيف. مزجت بعد ذلك جيداً بـــ 700 ميكرولتر من مزيج من الكلوروفورم وكحول ايزوميل بنسبة (1:24) وأخضعت للتثفيل لمدة 10 دقائق بسرعة دوران 10,000 دورة/دقيقة. أخذ 500 ميكرولتر من الرائق وغسل بحجم مماثل من مزيج كلوروفورم وكحول إيزوميل مع التثفيل كما ورد سابقاً. أخذ 500 ميكرولتر من الرائق ورسب DNA بضعفي الحجم من الإيثانول النقي والمبرد وترك لليوم التالي في المجمدة. بعد ذلك أخضعت الأنابيب للتثفيل لمدة 10 دقائق بسرعة 10,000 دورة/دقيقة. أخذ بعدها DNA الراسب وغسل جيدا مرتين بـــ 70% إيتانول. رسب DNA في كل مرة بالتثفيل ثم ترك في المرة الثانية تحت مفرغة الهواء حتى جف

جيداً للتخلص من بقايا الإيثانول. أخيراً، تم حل DNA الراسب في 100 ميكرولتر ماء مقطر معقم. قدرت كمية DNA باستخدام جهاز مقياس الطيف/السبكتروفوتومتر عند طولي الموجة 260 و280 نانومتر، تم ضبط تركيز DNA بمعدل 10 نانوغرام/ميكرولتر وحفظت العينات عند −20 °س لحين الاستخدام.

التسلسل النيكليوتيدي للبادئات

استخدمت في تحديد التباين الوراثي بين العزلات الفطرية 12 بادئة عشوائية يتألف كل منها من 10 قواعد آزوتية مصدرها هيئة الطاقة الذرية بدمشق (جدول 2).

جدول 2. التسلسل النيكليوتيدي ورمز البادئات المستخدمة في تقانة RAPD-PCR.

Table 2. Code and Sequences of the primers used in RAPD-PCR.

البادئ Primer	التسلسل النيكليوتيدي Sequence 5' to 3'
P_1 (OPC-6)	5'- GAACGGACTC-3'
P_2 (OPC-7)	5'- TGGACCGGTG-3'
P_3 (OPC-8)	5'- TGCGTGCTTG-3'
P_4 (OPC-14)	5'- GACGGATCAG-3'
P_5 (OPC-15)	5'- GTCGCCGTCA-3'
P_6 (OPD-3)	5'- CAAACGTCGG-3'
P_7 (OPA-19)	5'- CCACAGCAGT-3'
P_8 (OPA-3)	5'- AGTCAGCCAC-3'
P_9 (UBC-83)	5'- GGGCTCGTGG-3'
P_{10} (UBC-2)	5'- CCTGGGCTTG-3'
P_{11} (OPC-7)	5'- GTCCCGACGA-3'
P_{12} (OPC-5)	5'- GATGACCGCC-3'

طريقة العمل لتقانة التضخيم العشوائي لـــ DNA المتعدد شكلياً (RAPD-PCR)

أنجز تفاعل التضخيم العشوائي لـــ DNA المتعدد شكلياً (RAPD-PCR) بـــ 25 نانوغرام من DNA كقالب و2 ميكرولتر من البادئة (10 بيكومول/ميكرولتر)، وباستخدام كيت DNA (DNA-Kit) الذي يضم باقي مكونات تفاعل الـــ PCR من شركة Promega، الولايات المتحدة الأمريكية، وكان الحجم الكلي لمواد التفاعل 25 ميكرولتر. وضعت أنابيب التفاعل في جهاز المدور الحراري (Apollo, ATC 401, USA) وفق البرنامج التالي: 94 °س لمدة دقيقتين ثم بـــ 40 دورة تحت الشروط التالية: 94 °س لمدة 30 ثانية مسخ، و 36 °س لمدة دقيقة واحدة لالتحام البادئة و72°س لمدة دقيقة واحدة إطالة. وأنهي التفاعل عند درجة حرارة 72°س لمدة دقيقتين.

تم ترحيل نواتج الـــ PCR على هلامة آغاروز 1.2% تحتوي على صبغة بروميد الإيثيديوم (8 ميكرولتر/100 مل محلول TBE) في جهاز الرحلان الكهربائي على شدة تيار كهربائي 100 فولت ولمدة ساعة ونصف، ووثقت النتائج بتصوير هلامة الآغاروز باستخدام الأشعة فوق البنفسجية.

جمعت نتائج عمليات التضخيم في جداول خاصة اعتماداً على وجود أو غياب الحزمة (Band) في العينات المختلفة، حيث أعطي لوجود الحزمة الرقم 1، ولغيابها الرقم 0.

لتحديد مدى التشابه الوراثي تم التحليل العنقودي الذي اعتمد على مصفوفة التشابه وفق معامل جاكارد باستخدام طريقة UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Analysis) وباستخدام برنامج NTSYS-pc, (Numerical Taxonomy System) نسخة 2.01 لرسم مخطط التحليل العنقودي اعتماداً على نسبة التشابه (17).

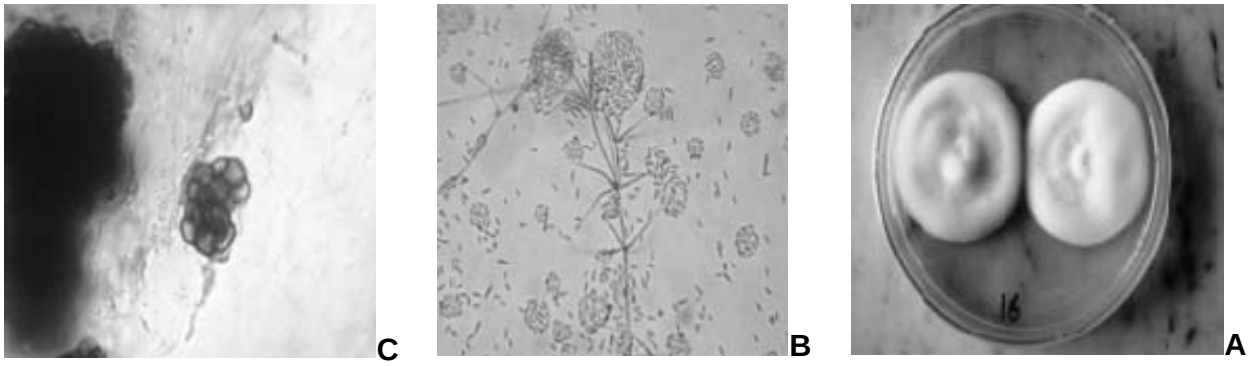
النتائج والمناقشة

تحديد الفطر الممرض وعزله

نظراً لتشابه الصفات المورفولوجية للمستعمرات الفطرية على طبق بتري من حيث اللون والشكل العام للمستعمرة وأبعادها الناتجة من العينات المجموعة من الحقل الواحد، تم الإبقاء على عينة واحدة ممثلة للعينات الخمس أي لكامل الحقل. اختيرت مستعمرة نقية من كل عينة من أجل التوصيف المورفولوجي والاختبارات اللاحقة بأخذ بوغة واحدة وإعادة زرعها على وسط PDA في طبق بتري.

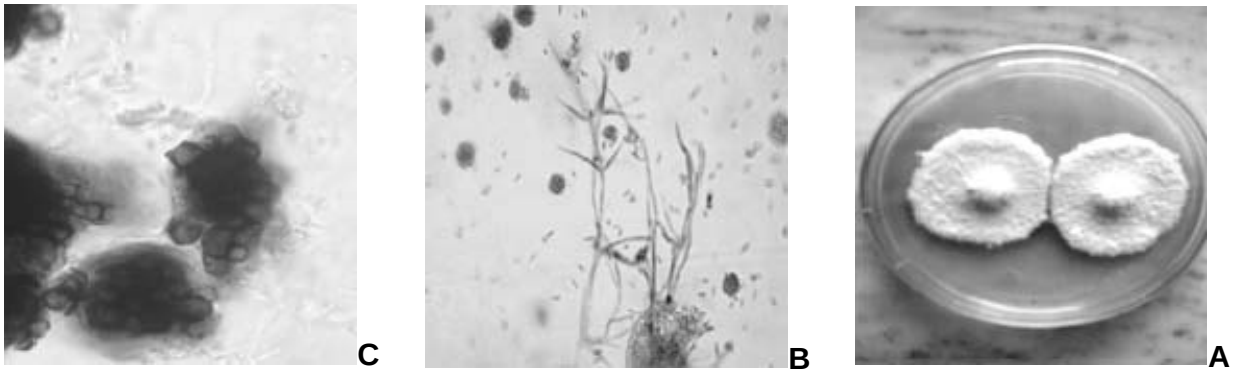
كذلك الأمر واعتماداً على الصفات المورفولوجية للمستعمرات الفطرية النقية، تبين احتمال وجود نمطين من الفطر مختلفين مورفولوجياً اعتماداً على ثلاث صفات شكلية: شكل المستعمرة ولونها وقدرتها على تشكيل الجسيمات الحجرية.

النمط الأول: كانت مستعمراته دائرية بيضاء اللون، ذات حواف منتظمة، يظهر في مركزها نمو رأسي كثيف (شكل A−1). مع تقدم عمر المستعمرة أي بعد 20 يوماً من الزراعة بدأ لونها بالتحول إلى اللون الأسود ابتداءً من مركز المستعمرة وذلك نتيجة لتشكل الجسيمات الحجرية (شكل C−1). أما بالنسبة لمشيجة الفطر فتبدو شفافة غير ملونة، ذات مظهر ناعم (شكل B−2)، يشمل هذا النمط العينات المجموعة من حقول القطن من عدة مواقع في كل من محافظة حلب (V_1، V_2، V_3) ومحافظة حماة (V_5، V_6، V_7) ومحافظة الحسكة (V_{16}، V_{17}).



شكل 1. النمط الشكلي الأول من الفطر *V. dahlia* النامي على وسط PDA: (A) مستعمرة الفطر، (B) الحوامل والأبواغ الكونيدية، (C) الجسيمات الحجرية.

Figure 1. Morphology of the first pathotype of *V. dahliae* on PDA medium: (A) Colony of the fungus, (B) Conidiophores and conidia, (C) Microsclerotia



شكل 2. النمط الشكلي الثاني من الفطر *V. dahlia* النامي على وسط PDA: (A) مستعمرة الفطر، (B) الحوامل والأبواغ الكونيدية، (C) الجسيمات الحجرية.

Figure 2. Morphology of the second pathotype of *V. dahliae* on PDA medium: (A) Colony of the fungus, (B) Conidiophores and conidia, (C) Microsclerotia

النمط الثاني: مستعمراته دائرية لونها أبيض إلى قشدي، حوافها متعرجة غير منتظمة (شكل 2–A). مع تقدم عمر المستعمرة أي بعد 15 يوماً من الزراعة يبدأ لونها بالتحول إلى اللون الأسود ابتداءً من مركز المستعمرة وذلك نتيجة لتشكل الجسيمات الحجرية (شكل 2–C). أما بالنسبة لمشيجة الفطر فتبدو شفافة غير ملونة، ذات مظهر خشن (شكل 2–B)، يشمل هذا النمط العينات المجموعة من حقول القطن من محافظات حلب (V_4) وحماة (V_8) والرقة (V_9، V_{10}، V_{11}، V_{12}) ودير الزور (V_{13}، V_{14}، V_{15}).

أما من حيث الصفات المجهرية، فلم نستطع تمييز أنماط مختلفة من الحوامل والأبواغ الكونيدية في كافة العزلات المدروسة حيث كانت الحوامل الكونيدية سوارية وانتهت أفرعها بخلايا قارورية خصبة مولدة للأبواغ (فياليدات)، الأبواغ الكونيدية صغيرة إهليلجية، شفافة، أحادية الخلية، تتوضع في نهاية الفياليدات (شكل 1–B).

تحليل التضخيم العشوائي لـــ DNA المتعدد شكلياً RAPD

أظهرت نتائج التحليل الجزيئي لـــ DNA العزلات الفطرية المدروسة باستخدام 12 بادئة وتقانة الـــ RAPD أن 10 منها تمكنت من الالتحام في عدة مواقع من مجين العزلات المدروسة وكانت هناك اختلافات واضحة بين هذه العزلات من خلال عدد المواقع التي التحمت بها كل بادئة والتي تجلت بوضوح على هلامة الأغاروز من حيث عدد وحجم الحزم الناتجة عن العزلات المختلفة. إذ بلغ العدد الكلي للحزم المتشكلة من التحام 10 بادئات 70 حزمة، بينما لم تلتحم البادئتان P_{11} و P_{12} بأي من مواقع المادة الوراثية للعزلات المختبرة بالرغم من إعادة اختبارها لأكثر من مرة وعند درجات حرارة مختلفة.

وأعطت بقية البادئات أعلى نسبة تباين بين الحزم والتي بلغت 35%، ويعد استخدام مثل هذا العدد من البادئات كافياً لمعرفة مدى التشابه الوراثي وبالتالي معدل التباين بين عزلات الفطر *V. dahliae* (4، 8، 11).

تمكنت البادئة P_5 من الالتحام في أكثر من موقع على مجين/جينوم العزلات الفطرية المستخدمة وبلغ عدد المواقع التي التحمت بها 12 موقعاً مختلفاً، وبالتالي كان حجم الحزم الناتجة مختلفاً بشكل كبير، إذ بلغ حجم أكبرها 2200 زوج قاعدي وأصغرها 125 زوج قاعدي. وكانت البادئتين P_6 و P_7 أقل البادئات المستخدمة من حيث عدد المواقع التي تمكنت بها من الالتحام على مجين/جينوم العزلات الفطرية المستخدمة إذ لم يتجاوز عددها ثلاثة مواقع كان أكبرها بحجم 1100 زوج قاعدي وأصغرها 250 زوج قاعدي (جدول 3). وبشكل عام تمكنت البادئات المستخدمة من الالتحام في 70 موقعاً مختلفاً استناداً إلى حجم القطع المتشكلة.

جدول 3. عدد الحزم المضخمة وعدد الحزم المتعددة شكلياً الناتجة عن 10 بادئات مستخدمة في تقانة RAPD.

Table 3. Number of amplified and polymorphic DNA fragments obtained with 10 primers in RAPD.

البادئ Primer	عدد الحزم المضخمة No. of amplified fragments	عدد الحزم المتعددة شكلياً No. of Polymorphic fragments
P_1	5	5
P_2	12	12
P_3	4	4
P_4	9	9
P_5	7	7
P_6	3	3
P_7	3	3
P_8	10	10
P_9	10	10
P_{10}	7	7

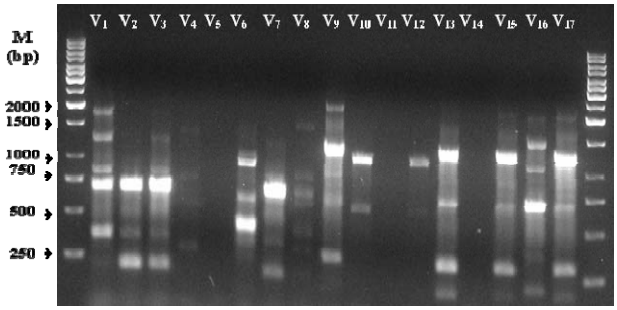
أعطت البادئات المستخدمة 70 حزمة ناتجة عن تضاعف أجزاء القطع المضخمة في العزلات كافة، وكانت جميعها متعددة شكلياً بنسبة 100%.

اختلفت الأوزان الجزيئية للـــحزم الناتجة وكان أكبر وزن جزيئي 2200 زوج قاعدي في البادئة P_2 وأصغر وزن جزيئي 125 زوج قاعدي في البادئة P_5 وهذا يعكس طول الاختلافات بين مواقع تسلسل البادئات على جينوم العزلات المدروسة.

تمكنت البادئة P_5 فقط من الالتحام في عدة مواقع من جينوم العزلة الفطرية V_4 واستطاعت أن تميزها بخمس واسمات وراثية وهي 1000، 750، 620، 450 و 290 زوج قاعدي. وتمكنت البادئات من الكشف عن التباينات الوراثية بين عزلات الفطر *V. dahliae* المختبرة.

كمثال عن النتائج التي تم الحصول عليها من البادئات البادئة P_2 إذ تمكنت هذه البادئة من الالتحام في أكثر من موقع على جينوم العزلات الفطرية المختبرة باستثناء العزلات V_4، V_5، V_8، V_{11}،V_{14}، وبلغ العدد الكلي للأجزاء الناتجة عن تضاعف الأجزاء المضخمة 12 حزمة (شكل 3)، وتشابهت العزلات V_{15}، V_{10}، V_7، V_3، V_2 من حيث عدد الحزم والتي بلغت 2، أما العزلة V_{12} فأعطت حزمة واحدة، و تشابهت العزلات V_{17}، V_9، V_6 من حيث عدد الحزم والتي بلغت 3، وتشابهت العزلتان V_{16}، V_{13} من حيث عدد الحزم والتي بلغت 4، فيما سجلت العزلة V_1 أعلى عدد من الحزم والتي بلغت خمسة.

أما بالنسبة للعزلات المدروسة، أعطت العزلة V_1 المعزولة من محافظة حلب منطقة جزرايا وباستخدام جميع البادئات المختبرة أعلى عدد من الحزم بلغ 27 حزمة ، إذ تمكنت من الالتحام مع جميع البادئات باستثناء البادئة P_1 في حين أعطت العزلة V_4 أقل عدد من الحزم والتي بلغت 5 إذ تمكنت من الالتحام مع البادئة P_5 فقط.

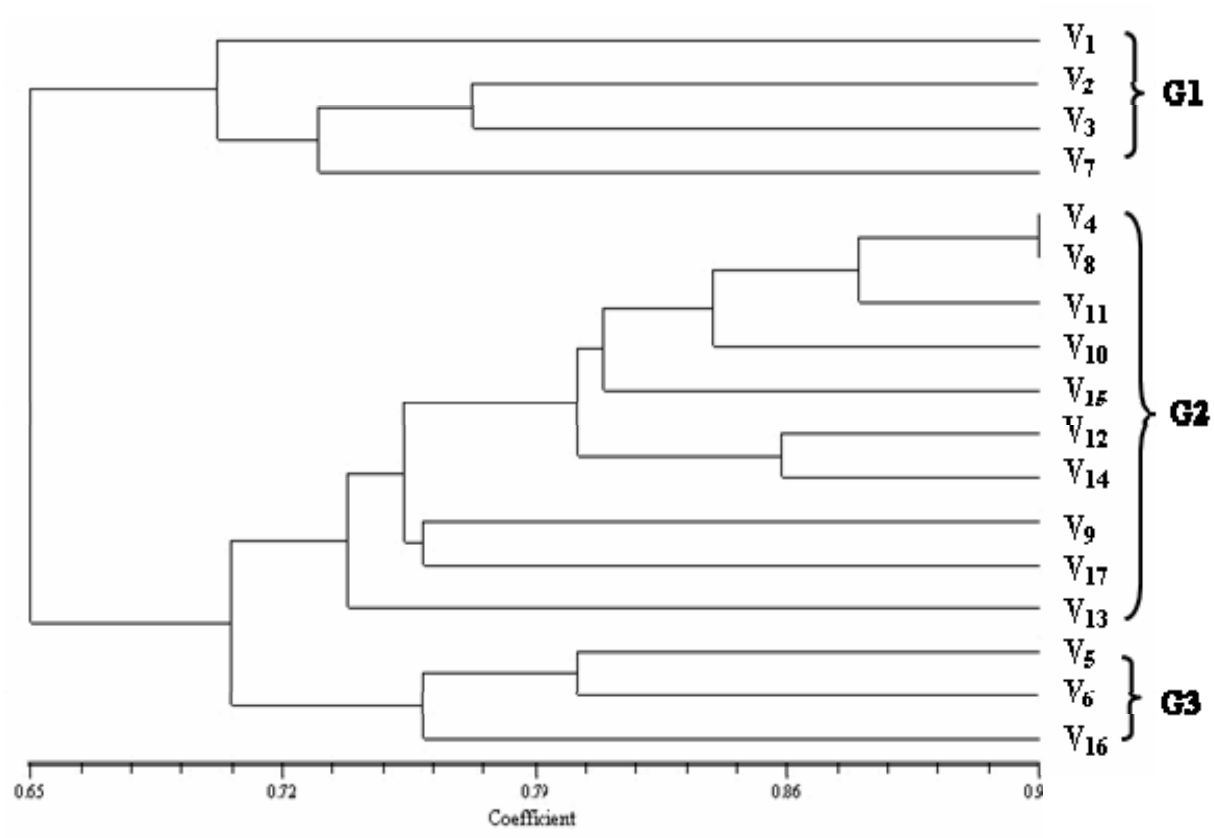


شكل 3. مثال نتائج التحام البادئة P_2 مع المادة الوراثية للعزلات17 المختبرة من الفطر *V. dahliae* على هلامة آغاروز 1.2%. M= مؤشر جزيئي مصنع معروف الوزن الجزيئي مؤلف من 14 قطعة.

Figure 3. Example of random amplified polymorphic patterns of genomic DNA amplified with primer P_2 from 17 *V. dahliae* isolates. M: DNA ladder with 14 fragments.

التحليل العنقودي الناتج عن استخدام تقانة الـــ RAPD

أظهر التحليل العنقودي الناتج عن استخدام تقانة الـــ RAPD وجود تباين وراثي واضح بين العزلات المختلفة للفطر *V. dahliae* إذ وصلت نسبة التباين إلى 35%. وقد توزعت مجموعات التحليل العنقودي للـــ RAPD إلى ثلاث مجموعات (شكل 4).



شكل 4. مخطط التحليل العنقودي للعزلات المدروسة من الفطر *V. dahliae* باستخدام تقانة RAPD باستخدام نسبة التشابه (Similarity Matrix) من خلال برنامج NTSYS-pc، نسخة 2.02.

Figure 4. Dendrogram of the studied isolates of *V. dahliae* drawn on the basis of the similarity matrix using the NTSYS-pc Program, version 2.02.

ضمت المجموعة الأولى عزلات حلب (V_1، V_2، V_3) وحماة (V_7) وهي تشكل ما نسبته 23.5% من مجموع العزلات في حين ضمت الثانية عزلات حماة (V_5،V_6) والحسكة (V_{16}) وهي تشكل ما نسبته 17.65% من مجموع العزلات، في حين ضمت الثالثة عزلات حماة (V_8) والرقة (V_9، V_{10}،V_{11}، V_{12}) ودير الزور (V_{13}، V_{14}، V_{15}) والحسكة (V_{17}) وهي تشكل ما نسبته 59.85% من مجموع العزلات (جدول 4).

ويمكن أن يعود هذا التباين الوراثي إلى عدة أسباب منها إمكانية امتلاك عزلات فطر *V. dahliae* التي تصيب القطن في سورية أصلاً شائعاً واحداً تعرض لتطور وراثي أو لطفرات تبعاً للعلاقة مابين الطراز الوراثي للفطر فيرتيسيليوم والنبات العائل. وبسبب أن التكاثر اللاجنسي هو الوسيلة الوحيدة المعروفة لتكاثر الفطر*V. dahliae* فإن الطفرات الذاتية يمكن أن تكون مصدراً للتغير الوراثي. فلقد وجد الباحثان Mc Geary و Hastie (15) وجود التشكل الجيني الطبيعي شبه اللاجنسي عند الجنس *Verticillium* والذي يمكن أن يؤدي إلى التغير الوراثي. إذ تشير الأبحاث إلى أن بعض مورثات العائل يحدث لها طفرة وراثيةً تمنحها المقاومة، وبالمقابل قد يحدث طفرات وراثية في مورثات الكائن الممرض تساعده على التأقلم مع الظروف المحيطة من أجل الاستمرار، وبذلك قد يتم التغلب على المقاومة الموجودة في النباتات العائلة (20). إضافة لمساهمة الأعشاب ضمن حقول القطن والتي تتضمن عوائل أخرى لفطر *V. dahliae* بشكل غير مباشر في نشوء أنماط وراثية جديدة للفطر والتي تتكيف مع القطن. إذ أن مرور الطفيل عبر عائل غير أساسي ربما يزيد من القدرة الإمراضية لذلك الطفيل (18).

لم يكن هناك أي ارتباط بين المجموعات الثلاث والتوزع الجغرافي إذ ضمت المجموعة الأولى عزلات من محافظتي حلب

وحماة. أما المجموعة الثانية فقد ضمت عزلات من محافظتي حماة والحسكة، وضمت المجموعة الثالثة عزلات من محافظات الرقة ودير الزور وحلب وحماة والحسكة. وقد يعود السبب إلى احتمال التشابه في التركيب الوراثي بين عينات هذه المحافظات نظراً إلى إمكانية انتقال الممرض من منطقة لأخرى عن طريق البذار الحامل للممرض أو نقل أحطاب القطن المصابة من مكان لآخر.

جدول 4. مجموعات التحليل العنقودي والنسبة المئوية لكل مجموعة.
Table 4. Cluster analysis groups and percentage of each.

مجموعة التحليل العنقودي Cluster	العزلة Isolate	النسبة المئوية %
G1	V_1, V_2, V_3, V_7	23.5
G2	V_5, V_6, V_{16}	17.65
G3	$V_8, V_9, V_{10}, V_{11}, V_{12}, V_{13}, V_{14}, V_{15}, V_{17}$	59.85
Total	17	100

خلافاً لذلك ظهر بالتحليل العنقودي أن هناك ارتباط واضح بين التركيب الجزيئي للعزلات الفطرية والصفات المورفولوجية لمستعمراتها فالمجموعتان الأولى والثانية شكلت مستعمرات ذات لون أبيض وأعطت مشيجة ذات مظهر ناعم، أما المجموعة الثالثة فقد ضمت عزلات الفطر التي شكلت مستعمرات ذات لون أبيض قشدي ومشيجة خشنة المظهر. وشذت عن ذلك العزلة V_{17} ذات اللون الأبيض إذ وقعت مع العزلات ذات المشيجة القشدية. إن تجمع عزلات الفطر التي تشكل مستعمرات ذات لون أبيض مع بعضها في مجموعتين وراثيتين يشير إلى أن عزلات كل من هاتين المجموعتين قريبة من بعضها على الرغم من ابتعاد كل من المجموعتين عن الأخرى، كما أن تجمع عزلات الفطر التي تشكل مستعمرات ذات لون أبيض قشدي مع بعضها في مجموعة واحدة يشير إلى أن هذه العزلات قريبة وراثياً فيما بينها.

Abstract

Louleh, J., A.M. Mouhanna, M. Aboushaar, M. N. Al-Salti and M. F. Azmeh. 2011. Genetic Diversity of *Verticillium dahliae* Kleb., the Causal Agent of Cotton Wilt Disease in some fields in Syria. Arab Journal of Plant Protection, 29: 95-102.

Seventeen isolates of *V. dahliae* from cotton plants showing *Verticillium* wilt symptoms were collected from 17 cotton fields from 5 different geographical areas of Syria (Hama, Aleppo, Alrakka, Dier ezzor and Alhasakaa). The isolates exhibited morphological variation *in vitro* when grown on potato dextrose agar. Genetic variation among different isolates of *V.dahliae* was assessed by using RAPD-PCR analyses. A total of 70 polymorphic RAPD bands were obtained with ten primers selected among the 12 tested. The results revealed a clear polymorphism between the isolates, which were assigned to 3 RAPD groups. No correlation was found between RAPD markers and the geographic origin. However, there was a relation between RAPD markers and the morphological characters of the isolates.

Keywords: *Verticillium*, genetic diversity, cotton, RAPD-PCR, Syria

Corresponding author: Ahmad Mouhanna, Faculty of Agriuclture, Damascus University, Syria, Email: AhmadMouhanna@gmx.net

المراجع

1. **إدارة بحوث القطن،** 2009. مؤتمر القطن السابع والثلاثون، الهيئة العامة للبحوث الزراعية، وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي. الجمهورية العربية السورية. 43 صفحة.
2. **خوري، فريد.** 1970. مرض ذبول القطن في سورية أسبابه انتشاره الخسائر المترتبة– مديرية مكتب القطن، دراسة منشورة، سورية. 17 صفحة.
3. **نيفال، روبرت.** 1991. أمراض المحاصيل الحقلية – معهد الإنماء العربي والهيئة القومية للبحث العربي. 119 صفحة.
4. **Alshalchi, S.A.H., L. Ismail and H. Hmidan.** 2008. Assessment of genetic variation of some *Verticillium dahliae* isolates by RAPD analysis. American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences, 6: 677-681.
5. **Ausher, R., J. Katan and S. Ovadia.** 1975. An improved selective medium for the isolation of *Verticillium dahliae*. Phytoparasitica, 3:133-137.

References

6. **Bell, A.A.** 1992. Verticillium wilt. Pages 87-122. In: Cotton Diseases. R.J. Hillocks (ed.). CAB International, Wallingford, UK.
7. **Bellahcene M., Z. Fortas, A. Matallah, J.P. Geiger, M. Nicole and K. Assigbetse.** 2002. Divérsité génétique de quelques populations de *Verticillium dahliae* issues de trois régions du bassin Méditerranéen. Page 27. In: Proceedings of VIII e Journées Scientifiques du Réseau "Biotechnologies des Plantes et Sécurité Alimentaire"-AUF. Biotechnologie Végétales: Valorisations pour une Agriculture Durable, 7–9 October, Marrakesh, Morocco.
8. **Brummer, E.C., J.H. Bouton and G. Kochert.** 1995. Analysis of annual Medicago species using RAPD markers. Genome, 38: 362-367.
9. **CAB International.** 2005. Crop Protection Compendium. CAB International, Wallingford, UK.

10. **David, W.A., J.A. Warther and M.R. Milam.** 2005. Cotton disease and Nematodes Management. University of Missouri-Delta Center. Colombia, 5 pp.
11. **Dervis, S., S. Kurt and M. Bicici.** 2005. Molecular characterization of *Verticilliuim dahliae* isolates in southern Turkey. Pakistan Journal of Biological Sciences, 8: 1233-1236.
12. **Encarnacion, Perez-Artes., Maria, D. Garcia-Pedrajas, Jose Bejarano-Alcazar, and Rafael M. Jimenez-Diaz.** 2000. Differentiation of Cotton-defoliating and Non-defoliating Pathotypes of *Verticillium dahliae* by RAPD and Specific PCR Analyses. European Journal of Plant Pathology, 106: 507-517.
13. **Lachouer, K. and H. Sedra.** 2002. Characterisation of *Verticillium dahliae* Kleb. isolates from *Olea europea* using RAPD markers. Phytopathologia Mediterranea, 41: 170-178.
14. **Li, K.N., D.I. Rouse and T.L. German.** 1994. PCR Primers that allow intergeneric differentiation of Ascomycetes and their application to *Verticillium* spp. Applied and Environmental Microbiology, 60: 4324–4331.
15. **McGeary F.M. and A.C. Hastie.** 1982. Hybridization of *Verticillium albo-atrum* strains from tomato and lucerne. Physiology and Plant Pathology, 21: 437–444.
16. **Murray, M.G. and W.F. Thompson.** 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research, 8:4321-4325.
17. **McGeary F.M. and A.C. Hastie,** 1982. Hybridization of *Verticillium albo atrum* strains from tomato and lucerne. Physiology and Plant Pathology, 21: 437–444
18. **Rohlf, F.J.** 1993. NTSYS-pc, numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.80. Applied Biostatistics, Setauket, New York, 191 pp.
19. **Rufty, R.C., T.T. Herbert and C.F. Murphy.** 1981. Evaluation of resistance to *Septoria nodorum* in wheat. Plant Disease, 65: 406–409.
20. **Sackston, W.E.** 1983. Epidemiology and control of seed-borne *Verticillium* spp. causing vascular wilt. Seed Science and Technology. 11:731-747.

تاريخ الاستلام: 2010/6/29؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2011/1/23

Received: June 29, 2010; Accepted: January 23, 2011