

## التباين الوراثي بين عزلات من فطور *Fusarium spp.* جمعت من نباتات الفصيلة الباذنجانية في سورية مع التركيز على النوع *F. oxysporum* على البندورة/الطماطم

أحمد محمد مهنا<sup>1</sup>، عمر ناجي حمودي<sup>2</sup>، ماجدة محمد مفلح<sup>2</sup> وهمام شعبان برهوم<sup>3</sup>

(1) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة دمشق، والجامعة السورية الخاصة (كلية الطب)، دمشق، سورية، البريد الإلكتروني: A.M.Mouhanna@gmail.com؛ (2) الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، دمشق، سورية؛ (3) مركز بحوث ودراسات مكافحة الحيوية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

### الملخص

مهنا، أحمد محمد، عمر ناجي حمودي، ماجدة محمد مفلح وهمام شعبان برهوم. 2019. التباين الوراثي بين عزلات من فطور *Fusarium spp.* جمعت من نباتات الفصيلة الباذنجانية في سورية مع التركيز على النوع *F. oxysporum* على البندورة/الطماطم. مجلة وقاية النبات العربية، 37(4): 293-302.

هدفت الدراسة لمعرفة التباينات الوراثية لعزلات من الفطور التابعة للجنس *Fusarium* على أنواع نباتية تتبع للعائلة الباذنجانية (البندورة/الطماطم، الفليفلة والباذنجان) في سورية. استخدمت 59 عزلة فطرية تتبع للجنس *Fusarium* و20 بادئة لتقنية التضخم العشوائي المتعدد الأشكال للحمض النووي الريبوزي المنزوع الأوكسجين (RAPD). أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي أن 14 بادئة تمكنت من الالتصاق في موقع واحد أو مواقع متعددة من مجين العزلات الفطرية المدروسة. بلغ العدد الكلي للحزم المتشكلة 123 حزمة، بنسبة تعددية شكلية بلغت 81.3%. بينت شجرة القرابة انقسام العزلات المدروسة إلى مجموعتين رئيسيتين (G1، G2) بنسبة تشابه 0.58؛ ضمت المجموعة G1 العزلات الفطرية من النوع *F. solani* والمجموعة G2 عزلات النوع *F. oxysporum*. أما بالنسبة لتقنية مكررات تتالي النيوكليوتيدات البينية البسيطة (ISSR) والتي طبقت على 11 عزلة تتبع للنوع *F. oxysporum* والمجموعة من نباتات البندورة وباستخدام 20 بادئة تمكن 12 منها من تضخيم 110 حزمة بنسبة تعددية شكلية بلغت 52.72%. أما شجرة القرابة الناتجة عن تقنية ISSR فبينت أن هذه العزلات قد تمايزت فيما بينها إلى ست مجموعات مترافقة نوعاً ما مع قدرتها الإراضية (0-68%). تعد هذه أول دراسة تهدف لمعرفة التباين الوراثي لعزلات الفطر *Fusarium spp.* على بعض نباتات العائلة الباذنجانية، وكمرحلة تمهيدية لتحديد السلالات المنتشرة من النوع *F. oxysporum* على البندورة في سورية.

كلمات مفتاحية: التباين الوراثي، *Fusarium*، ذبول، RAPD، ISSR، سورية.

### المقدمة

والولايات المتحدة وغيرها (Akbar Khan et al., 2018؛ Kumar et al., 1993؛ Zheng et al., 2018).

على الرغم من أن أنواع *Fusarium* يمكن التعرف عليها من خلال خصائصها المورفولوجية على الأوساط الغذائية الانتخابية، إلا أنه يصعب التعرف مورفولوجياً على الطرز الشرسة الممرضة، أو الأشكال النوعية Formae Speciales أو السلالات الخاصة للنوع *F. oxysporum*.

استخدم سابقاً نباتات اختبارية للكشف عن هذه الأنواع والسلالات (Garibaldi, 1975) وكانت هي الطريقة الأكثر شيوعاً لتحديد الأشكال النوعية في *F. oxysporum* إلا أنها كانت مكلفة وتستغرق الكثير من الوقت. في الأونة الأخيرة، أصبحت الواسمات الجزيئية شائعة في تحديد الأنواع أو تحت الأنواع في الفطور (Henson & French, 1993).

تضم العائلة الباذنجانية العديد من الأنواع النباتية الغذائية والصناعية والطبية إضافة لمجموعة من نباتات الزينة والأعشاب الضارة. تحتل بعض المحاصيل كالبندورة والفليفلة والباذنجان أهمية كبيرة من الناحية الاقتصادية والغذائية في سورية (المجموعة الإحصائية، 2017). وكغيرها من باقي المحاصيل تتعرض للعديد من الأمراض حيث يثير الذبول الوعائي الناتج عن فطر *Fusarium sp.* قلقاً متزايداً على المستوى العالمي والمحلي نتيجة انتشاره الواسع والمدمر من جهة، إضافة إلى عدم الفهم الجيد له كمسبب مرضي من جهة أخرى (Arif et al., 2009). سجل انتشار الفطر *Fusarium sp.* في عدد كبير من البلدان كالهند وباكستان ومصر وجنوب أفريقيا والبرازيل وأمريكا الوسطى والمكسيك

5= موت النبات. حسب شدة الإصابة بالاعتماد على Ahmad et al. (1987) وفق الآتي:

شدة الإصابة = [مجموع (عدد النباتات المصابة × درجة الإصابة)/عدد النباتات الكلي × أعلى درجة إصابة] × 100

ويوضح الجدول 1 رمز العزلات الفطرية وموقع جمعها والعوائل النباتية التي جمعت منها وقدرتها الإمراضية.

### استخلاص الحمض النووي DNA

جمع ميسيليوم الفطر لكل عزلة مباشرة من طبق الاستنبات ووضع في أنابيب 2 مل وخن عند -26°س لحين الاستخدام. اتبعت مراحل الاستخلاص الموصى بها من قبل Park et al. (2014).

### التضخيم العشوائي للـ DNA المتعدد شكلياً (RAPD)

استخدمت في هذا الإختبار 20 بادئة (جدول 2). أجري تفاعل البلمرة المتسلسل PCR في حجم قدره 25 ميكرو لتر، والذي تكون من 9.5 ميكرو لتر من الماء الخالي من أنزيمات Nuclease مع 2 ميكرو لتر من البادئ (10 بيكومول/ميكرو لتر) وكذلك واحد ميكرو لتر من المادة الوراثية DNA-Template بتركيز 15 نانوغرام/ميكرو لتر وأضيف 12.5 ميكرو لتر من Master Mix (Promega). استخدم المدور الحراري peqSTAR 96 Universal Gradient بعد أن تمت برمجته وفق ما يلي: دورة واحدة 94°س لمدة خمس دقائق تلتها 40 دورة تحت الشروط التالية: 94°س لمدة دقيقة واحدة للفصل Denaturation و 40°س لمدة 90 ثانية للالتحام Annealing و 72°س لمدة دقيقتين للاستطالة Extension. أنهى التفاعل عند 72°س لمدة خمس دقائق (Datta & Lal, 2013).

### مكررات تتالي النيوكليوتيدات البينية البسيطة (ISSR)

أجري تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وفق الخطوات السابقة ولكن باستخدام 20 بادئة (جدول 2)، وتمت برمجة جهاز المدور الحراري وفق ما يلي: دورة واحدة عند درجة حرارة 94°س لمدة خمس دقائق، اتبعت بـ 35 دورة تتكون كل منها من ثلاثة مراحل: الفصل عند درجة 95°س لمدة دقيقة واحدة، ثم الالتحام عند درجة 50°س لمدة دقيقة ونصف، ثم الاستطالة عند 72°س لمدة دقيقتين. أنهى التفاعل بدورة واحدة عند 72°س لمدة خمس دقائق. حفظت العينات عند 4°س لحين الاستعمال (Das et al., 2012).

### فصل نواتج تفاعل البلمرة التسلسلي PCR والتوثيق

فصلت نواتج تفاعل البلمرة التسلسلي على هلامه الأغاروز 1.5% والتي تحوي بروميد الإيثيديوم في محلول رحلان TBE IX ووثقت النتائج بتصوير الهلام باستخدام الأشعة فوق البنفسجية.

يعد استخدام الواسمات الجزيئية للكشف عن التباينات الوراثية إحدى أهم التطورات في مجال أمراض النبات، حيث يوجد العديد من التقنيات المستخدمة والتي تختلف فيما بينها من حيث المبدأ والطريقة والهدف من تطبيقها. استخدمت تقنية التضخيم العشوائي المتعدد الأشكال للحمض النووي الرببي المنزوع الأوكسجين Random amplification polymorphism DNA (RAPD) وتقنية مكررات تتالي النيوكليوتيدات البينية البسيطة Inter simple sequence repeat (ISSR) على نطاق واسع لدراسة التباينات الوراثية لعزلات الفطر *Fusarium sp.* (Arif et al., 2009؛ Baysal et al., 2010, 2013). أمكن تحديد التباينات الوراثية بين عزلات مختلفة تتبع للجنس *Fusarium* باستخدام RAPD و ISSR (Alves-Santos et al., 2002؛ Bogale et al., 2006؛ Prasad et al., 2007). وفرت هذه التقنية كفاءة لا بأس بها إلا أنها تعاني من قلة تطابق الحزم المضخمة الناتجة (Karp et al., 1997؛ Williams et al., 1990؛ Welsh & McClelland, 1990). أما تقنية ISSR فهي أكثر كفاءة وتعتمد على تضخيم مناطق معينة محصورة بين مواقع الميكروساتلايت وتجمع بين تقنيتي AFLP و RAPD، إضافة إلى أن إمكانية تطابق الحزم المضخمة أعلى مقارنة بتقنية RAPD (Chandra & Thoyajaksha, 2018؛ Goulão & Oliveira, 2001؛ Tonk et al., 2014؛ Moulin et al., 2012).

تأتي هذه الدراسة كجزء ضمن مشروع يهدف لدراسة التباينات الوراثية لعزلات لأنواع الـ *Fusarium* على عوائل البندورة/البندورة، الفليفلة والبانجان في سورية، وتحديد مدى ارتباط هذه التباينات مع العائل أو القدرة الإمراضية للفطر المسبب للمرض. ويشار إلى أن العزلات المدروسة سبق وأن وصفت مورفولوجياً وحددت قدرتها الإمراضية في دراسة سابقة (مهنأ وآخرون، قيد النشر).

## مواد البحث وطرقه

### العزلات الفطرية

استخدمت 59 عزلة من الفطر التابعة للجنس *Fusarium* منها 32 عزلة تنتمي للنوع *F. solani* و 27 عزلة تنتمي للنوع *F. oxysporum*. درست هذه العزلات مورفولوجياً سابقاً (مهنأ وآخرون، قيد النشر) وحددت قدرتها الإمراضية بإجراء العدوى الصناعية لشتلات البندورة من الصنف الهجين ميريل والذي يعد قابلاً للإصابة بالذبول الفيوزاريومي. أعيد عزل الفطر مرة أخرى من الشتلات المعدة والتي أظهرت أعراض إصابة للتأكد من العدوى، وقورنت بالفطر الأول التي أعديت به. حسبت درجة الإصابة اعتماداً على سلم سداسي حيث أن الدرجة = 0 لا توجد إصابة، الدرجة = 1 ذبول ورقة واحدة، الدرجة = 2 ذبول ورقتين أو أكثر، الدرجة = 3 ذبول جميع الأوراق ما عدا القمة، الدرجة = 4 ذبول جميع الأوراق، الدرجة

**جدول 1.** العزلات الفطرية التابعة للجنس *Fusarium* التي استخدمت في هذه الدراسة. **Table 1.** *Fusarium* fungal isolates used in this study.

النوع Type	القدرة الإمراضية % Pathogenicity %	العائل النباتي Host plant	الموقع Location	رمز العزلة Isolate Code
<i>F. solani</i>	0	Pepper	السويداء As-Suwayda	SS9
<i>F. solani</i>	16	Pepper	السويداء As-Suwayda	SR7-1
<i>F. solani</i>	24	Pepper	السويداء As-Suwayda	SR7
<i>F. solani</i>	8	Pepper	السويداء As-Suwayda	SR6
<i>F. solani</i>	20	Pepper	السويداء As-Suwayda	SR1
<i>F. solani</i>	8	Pepper	السويداء As-Suwayda	SS7
<i>F. solani</i>	0	Pepper	السويداء As-Suwayda	SS9-1
<i>F. solani</i>	8	Pepper	السويداء As-Suwayda	SS5
<i>F. solani</i>	8	Pepper	اللاذقية Lattakia	LR1-1
<i>F. solani</i>	72	Pepper	اللاذقية Lattakia	LR1
<i>F. solani</i>	24	Pepper	اللاذقية Lattakia	LR3
<i>F. solani</i>	24	Pepper	اللاذقية Lattakia	LR3-1
<i>F. solani</i>	20	Pepper	اللاذقية Lattakia	LR2
<i>F. solani</i>	0	Tomato	بانياس Banias	OH13-1
<i>F. solani</i>	28	Tomato	جبلة Jablah	OH3-1
<i>F. solani</i>	16	Tomato	جبلة Jablah	OH2
<i>F. solani</i>	8	Tomato	جبلة Jablah	OH6-1
<i>F. solani</i>	8	Tomato	جبلة Jablah	OH6
<i>F. solani</i>	24	Tomato	جبلة Jablah	OH4-1
<i>F. solani</i>	20	Pepper	حماء الغاب Hama-AlGhab	HS7
<i>F. solani</i>	12	Pepper	حماء الغاب Hama-AlGhab	HR9
<i>F. solani</i>	0	Pepper	حماء الغاب Hama-AlGhab	HR1-1-2
<i>F. solani</i>	24	Pepper	حماء الغاب Hama-AlGhab	HR1
<i>F. solani</i>	44	Pepper	دمشق Damascus	RS2-1
<i>F. solani</i>	32	Pepper	ريف دمشق Rif Dimashq	XR2
<i>F. solani</i>	32	Pepper	ريف دمشق Rif Dimashq	XR
<i>F. solani</i>	16	Pepper	ريف دمشق Rif Dimashq	XR1
<i>F. solani</i>	20	Pepper	ريف دمشق Rif Dimashq	XS3
<i>F. solani</i>	48	Pepper	طرطوس Tartous	TS13
<i>F. solani</i>	16	Pepper	طرطوس Tartous	TR5
<i>F. solani</i>	0	Pepper	طرطوس Tartous	TR10
<i>F. solani</i>	32	Eggplant	باننجان Tartous	OH9
<i>F. oxysporum</i>	8	Tomato	بندورة/طماطم Lattakia	LR13
<i>F. oxysporum</i>	40	Pepper	بندورة/طماطم Lattakia	LR14
<i>F. oxysporum</i>	32	Tomato	بندورة/طماطم Jablah	Fus
<i>F. oxysporum</i>	48	Tomato	بندورة/طماطم Jablah	OH1
<i>F. oxysporum</i>	12	Tomato	بندورة/طماطم Jablah	OH7-1-1
<i>F. oxysporum</i>	40	Tomato	بندورة/طماطم Jablah	Fus4
<i>F. oxysporum</i>	8	Tomato	بندورة/طماطم Jablah	OH7-1
<i>F. oxysporum</i>	40	Tomato	بندورة/طماطم Jablah	Fus1
<i>F. oxysporum</i>	68	Tomato	بندورة/طماطم Jablah	OH1-1-2
<i>F. oxysporum</i>	12	Tomato	بندورة/طماطم Jablah	OH1-1
<i>F. oxysporum</i>	0	Tomato	بندورة/طماطم Hama-AlGhab	HR1-2
<i>F. oxysporum</i>	16	Tomato	بندورة/طماطم Hama-AlGhab	HR2
<i>F. oxysporum</i>	0	Pepper	بندورة/طماطم Hama-AlGhab	HS1
<i>F. oxysporum</i>	28	Pepper	بندورة/طماطم Hama-AlGhab	HR4
<i>F. oxysporum</i>	8	Pepper	بندورة/طماطم Hama-AlGhab	HR7
<i>F. oxysporum</i>	8	Pepper	بندورة/طماطم Hama-AlGhab	HR1-1
<i>F. oxysporum</i>	0	Pepper	بندورة/طماطم Damascus	RS2
<i>F. oxysporum</i>	0	Pepper	بندورة/طماطم Rif Dimashq	RR4
<i>F. oxysporum</i>	0	Pepper	بندورة/طماطم Tartous	TR8
<i>F. oxysporum</i>	8	Tomato	بندورة/طماطم Tartous	TR6
<i>F. oxysporum</i>	8	Tomato	بندورة/طماطم Tartous	TR11
<i>F. oxysporum</i>	0	Pepper	بندورة/طماطم Tartous	TR15
<i>F. oxysporum</i>	8	Tomato	بندورة/طماطم Tartous	TS11
<i>F. oxysporum</i>	8	Tomato	بندورة/طماطم Tartous	TS9
<i>F. oxysporum</i>	20	Tomato	بندورة/طماطم Tartous	OH11-1
<i>F. oxysporum</i>	28	Tomato	بندورة/طماطم Tartous	OH13
<i>F. oxysporum</i>	48	Tomato	بندورة/طماطم Tartous	OH11

**Table 2.** Primers used in RAPD and ISSR markers and their code and sequence.

المرجع Reference	التتابع من '5 إلى '3 Sequence 5' → 3	التقنية والبادئات Assay and primers code
		<b>RAPD</b>
Mahinpoo <i>et al.</i> , 2013	GGTCCCTGAC	OPA 06
Mohammadi <i>et al.</i> , 2011	TGTCTGGGTG	OPC-10
Dariva <i>et al.</i> , 2015	TGCGTGCTTG	OPC-14
Dariva <i>et al.</i> , 2015	CTTCCGCACT	OPH-11
Dariva <i>et al.</i> , 2015	GAATCGGCCA	OPH-18
Dariva <i>et al.</i> , 2015	TCGCCGAAA	OPN-11
Dariva <i>et al.</i> , 2015	ACCGGCTTGT	OPV-17
Dariva <i>et al.</i> , 2015	ACCCCGCCAA	OPW-02
Dariva <i>et al.</i> , 2015	AGCCGTGGAA	OPY-20
Mohammadi <i>et al.</i> , 2011	TGCCGAGCTG	OPA-02
Mohammadi <i>et al.</i> , 2011	CTGTCCAGCA	238
Mohammadi <i>et al.</i> , 2011	GCCCGACGCG	241
Mohammadi <i>et al.</i> , 2011	CAGCACCCAC	OPA-13
Mohammadi <i>et al.</i> , 2011	GATAACGCAC	RCO-09
Mahinpoo <i>et al.</i> , 2013	AATCGGGCTG	OPA-04
Mohammadi <i>et al.</i> , 2011	GTTGCGATCC	ROTH-20
Mohammadi <i>et al.</i> , 2011	CGTCGCCCAT	230
Assigbetse <i>et al.</i> , 1994	ACGGATCCTG	OPF-01
Assigbetse <i>et al.</i> , 1994	GGTGATCAGG	OPF-04
Assigbetse <i>et al.</i> , 1994	GGCTGCAGAA	OPF-13
		<b>ISSR</b>
Dariva <i>et al.</i> , 2015	AGAGAGAGAGGAGAGT	UBC-807
Dariva <i>et al.</i> , 2015	GAGAGAGAGAGAGAGAT	UBC-810
Dariva <i>et al.</i> , 2015	GAGAGAGAGAGAGAGAA	UBC-812
Dariva <i>et al.</i> , 2015	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	UBC-834
Mohammadi <i>et al.</i> , 2011	CAGCAGCAGCAGCAG	(CAG) <sub>5</sub>
Mohammadi <i>et al.</i> , 2011	GACGACGACGACGAC	(GAC) <sub>5</sub>
Mohammadi <i>et al.</i> , 2011	GTGGTGGTGGTG	(GTG) <sub>5</sub>
Mohammadi <i>et al.</i> , 2011	GTCGTCGTCGTCGTCGTCGTC	PCMS
Mohammadi <i>et al.</i> , 2011	ACTGACTGACTGACTG	ISSR-02
Mohammadi <i>et al.</i> , 2011	CACCACCACCACCAC	ISSR-10
Dariva <i>et al.</i> , 2015	ACCACCACCACCACCACC	UBC-861
Dariva <i>et al.</i> , 2015	GACAGACAGACAGACA	UBC-873
Dariva <i>et al.</i> , 2015	GGAGAGGAGAGGAGA	UBC-880
Dariva <i>et al.</i> , 2015	DBDACACACACACAC	UBC-889
Dariva <i>et al.</i> , 2015	HVHTGTGTGTGTGTGTG	UBC-891
Thangavelu <i>et al.</i> , 2012	AGGAGGAGGAGGAGG	(AGG) <sub>5</sub>
Thangavelu <i>et al.</i> , 2012	CACACACACACAAC	(CA) <sub>6</sub> AC
Das <i>et al.</i> , 2012	CACCACCACGC	(CAC) <sub>3</sub> GC
Das <i>et al.</i> , 2012	GAGAGAGAGAGAGAGAGAC	(GA) <sub>9</sub> C
Mohammadi <i>et al.</i> , 2011	ACTGACTGACTGACTG	(ACTG) <sub>4</sub>

لمعامل Nie's coefficient (Nei, 1973). استخدم برنامج XLSTAT

إصدار 2015 لحساب مدى التباين بين مجموعات التحليل العنقودي ومدى تأثير العائل النباتي في التباينات الوراثية (Addinsoft, 2015).

التحليل الإحصائي

حللت النتائج باستخدام برنامج PopGene (Yeh *et al.*, 1997) حيث أشير لوجود الحزمة 1 وغيابها 0 وإجراء التحليل العنقودي ورسم مخطط التحليل العنقودي أعتمد على مصفوفة التشابه (Similarity Matrix)

## النتائج

حللت نواتج التضخيم العشوائي لقطع الـ DNA المختلفة من العزلات الفطرية المدروسة عنقودياً اعتماداً على مصفوفة التشابه (Similarity Matrix) لمعامل Nie's coefficient فانقسمت العزلات المدروسة إلى مجموعتين رئيسيتين (G1, G2) عند نسبة تشابه 58 % عكست درجة القرابة الوراثية فيما بينها (شكل 2).

ضمت المجموعة الأولى 32 عزلة مشكلة ما نسبته 54.24% من العزلات المدروسة، في حين ضمت المجموعة الثانية 27 عزلة بنسبة بلغت 45.76%، ولم يكن هناك تأثير واضح للعائل النباتي (بندورة/طماطم و فليفلة وباذنجان)، أو حتى للتوزيع الجغرافي حيث ضمت كلتا المجموعتين G1 و G2 عينات من مناطق وعوائل مختلفة (شكل 2). ولم يكن للقدرة الإمراضية دور في توزيع العزلات المدروسة ضمن شجرة القرابة. وقد تبين عند مقارنة شجرة القرابة بالتوصيف المورفولوجي بأن المجموعة الأولى G1 قد ضمت فقط عزلات النوع *F. solani*، في حين ضمت المجموعة الثانية G2 عزلات الفطر *F. oxysporum*.

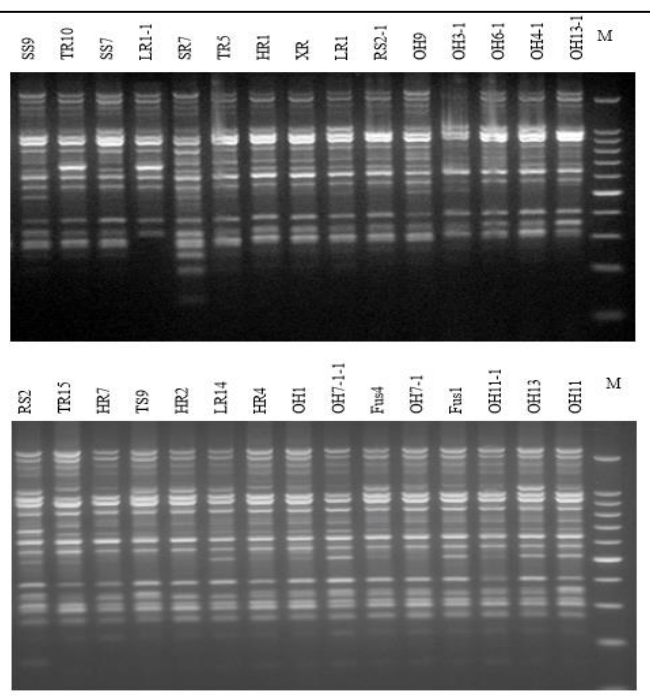
## التضخيم العشوائي المتعدد الأشكال للحمض النووي الريبوزي المنزوع الأوكسجين

أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل الـ PCR على الحمض النووي للعزلات الفطرية المدروسة (59 عزلة) أن 14 من البادئات المستخدمة تمكنت من الالتصاق في موقع واحد على الأقل أو عدة مواقع متعددة من مجين العزلات الفطرية المدروسة. بلغ العدد الكلي للحزم المشكلة 123 حزمة منها 100 حزمة متعددة شكلياً (Polymorphic) و 23 حزمة متشابهة (Monomorphic) بنسبة تعددية شكلية بلغت 81.3%. كان متوسط عدد الحزم بالنسبة للبادئات الفعالة حوالي 7.14 حزمة لكل بادئة. تراوح عدد الحزم المشكلة من التحام كل بادئة من خمسة حزم بالنسبة للبادئتين OPY-20 و RCO-09 و 18 حزمة بالنسبة للبادئة OPA-02. أعطت البادئتان OPN-11 و OPY-20 أعلى نسبة تعددية شكلية 100%، في حين أعطت البادئة RCO-09 أقل نسبة تعددية شكلية 50% (جدول 3).

**جدول 3.** التعددية الشكلية الناتجة عن تقنية RAPD لجميع العزلات الفطرية المدروسة.

**Table 3.** Polymorphism obtained from using RAPD markers for all tested fungal isolates.

البادئ Primer	عدد الحزم المضخمة No. of amplified fragments	عدد الحزم المتعددة شكلياً No. of polymorphic fragments	التعددية الشكلية % Polymorphism %
OPH-11	11	9	81.81
OPH-18	9	8	88.90
OPN-11	7	7	100.00
OPV-17	10	6	60.00
OPW-02	6	4	66.70
OPY-20	4	4	100.00
OPA-02	18	10	55.50
OPA-13	10	8	80.00
OPA-04	8	7	87.50
OPF-01	14	12	85.71
OPF-04	9	7	77.80
OPF-13	13	11	84.60
RCO-09	4	2	50.00
ROTH-20	7	5	71.40
<b>المجموع Mean</b>	<b>123</b>	<b>100</b>	<b>81.30</b>
			<b>7.14</b>



**شكل 1.** نتائج التحام البادئة OPA-02 مع المادة الوراثية لبعض العزلات الفطرية والتي فصلت بالرحلان الكهربائي على هلامية آغاروز 1.5%. M= سلم (100 زوج قاعدي) معياري جزئي للـ DNA.

**Figure 1.** Amplification results of using the OPA-02 primer with DNA of some fungal isolates separated by electrophoresis on 1.5% agarose gel. M= DNA molecular ladder (100 bp).

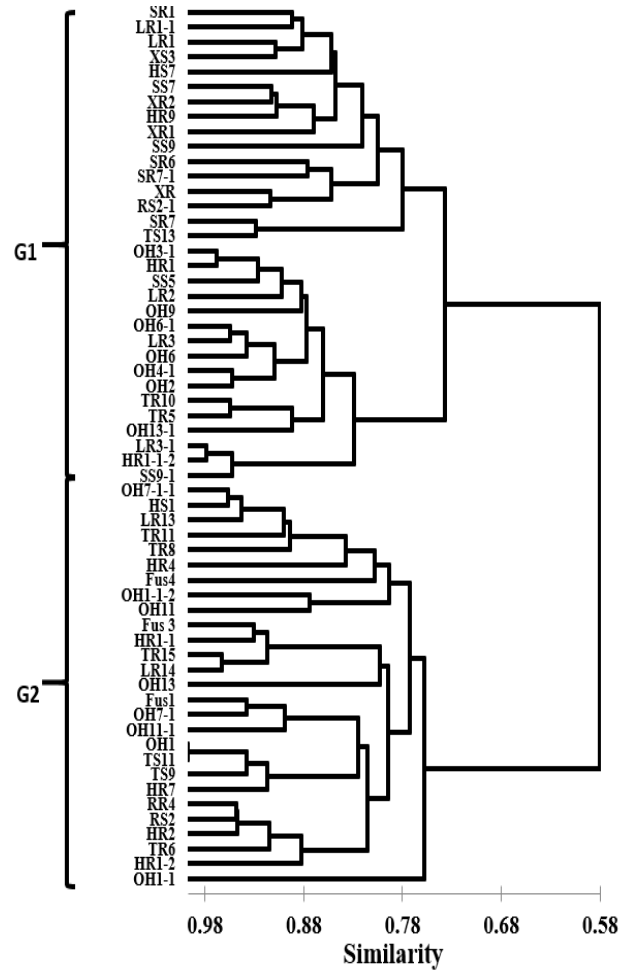
يظهر الشكل 1 عدد الحزم المضخمة الناتجة عن التحام البادئ OPA-02 بأكثر من موقع على مجين بعض عزلات الفطر والذي أعطى 18 حزمة بنسبة تعددية شكلية 55.5%.

انقسمت شجرة القرابة لعزلات الفطر *F. oxysporum* المعزولة من البندورة إلى ست مجموعات وذلك عند نسبة تشابه 72% (شكل 4) وقد تبين أن هذه العزلات قد تمايزت فيما بينها مترافقة نوعاً ما مع قدرتها الإمرضية.

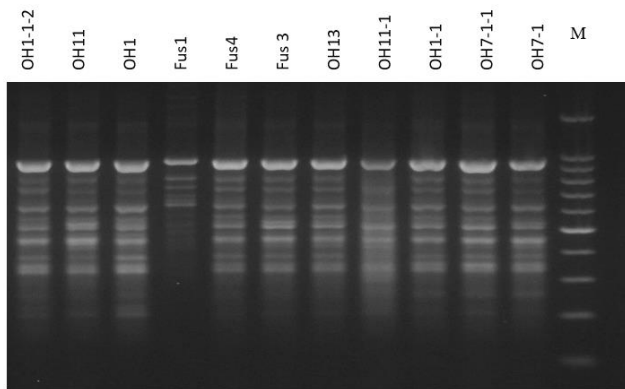
جدول 3. التعددية الشكلية الناتجة عن تقنية ISSR لعزلات الفطر *F. oxysporum* المعزولة من نباتات البندورة/الطماطم.

**Table 3.** Polymorphism resulting from using ISSR markers for *F. oxysporum* isolates, collected from tomato plants.

التعددية الشكلية % Polymorphism %	عدد الحزم المتعددة شكلياً No. of polymorphic fragments	عدد الحزم المضخمة No. of amplified fragments	البادئ Primer
62.50	5	8	UBC-807
53.85	7	13	UBC-810
57.14	4	7	UBC-812
55.60	5	9	UBC-834
60.00	6	10	(AGG) <sub>5</sub>
33.30	4	12	(CA) <sub>6</sub> AC
36.40	4	11	(CAC) <sub>3</sub> GC
50.00	5	10	(GA) <sub>9</sub> C
75.00	6	8	(ACTG) <sub>4</sub>
83.30	5	6	PCMS
42.86	3	7	ISSR-02
44.40	4	9	ISSR-10
<b>52.72</b>	<b>58</b>	<b>110</b>	<b>Total المجموع</b>
	<b>4.8</b>		<b>Mean المتوسط</b>



شكل 2. التحليل العنقودي لـ 59 عزلة من الفطر *Fusarium* sp. **Figure 2.** Cluster analysis for 59 *Fusarium* spp. isolates.



شكل 3. نتائج التحام البادئ UBC-810 مع المادة الوراثية لعزلات الفطر *F. oxysporum* المعزولة من نباتات البندورة/الطماطم التي تم فصلها كهربائياً لى هلامة أغاروز 1.5%. M = سلم معياري جزيئي للـ DNA (100 bp).

**Figure 3.** Results of the UBC-810 primer with DNA of *F. oxysporum* isolates, collected from tomato plants and separated by electrophoresis on 1.5% agarose gel. M= DNA molecular ladder (100 bp).

#### مكررات تتالي النيوكليوتيدات البينية البسيطة (ISSR)

اخترت عزلات الفطر *F. oxysporum* المعزولة من نباتات البندورة حصراً لإجراء اختبار تقنية ISSR حيث تميزت هذه العزلات بكونها أكثر العزلات شدة في الإصابة مقارنة مع العزلات المعزولة من نباتات الفليفلة. بلغ عدد العزلات 11 عزلة ونجحت 12 بادئة في كشف التباينات الوراثية فيما بينها، حيث أعطت 110 حزمة مضخمة منها 58 حزمة متعددة شكلياً بنسبة تعددية شكلية بلغت 52.72%. أعطى البادئ UBC-810 أعلى عدد من الحزم (13 حزمة)، في حين كان أقل عدد من الحزم عند استخدام البادئ PCMS. كانت أعلى نسبة للتعددية الشكلية عند استخدام البادئ PCMS (83.3%)، وأقل نسبة (33.3%) عند استخدام البادئ (CA)<sub>6</sub>AC (جدول 3).

يظهر الشكل 3 عدد الحزم المضخمة الناتجة عن التحام البادئ UBC-810 بأكثر من موقع على مجين عزلات الفطر المعزولة من نباتات البندورة والذي أعطى 13 حزمة بنسبة تعددية شكلية 53.85%.

*F. solani*، في حين ضمت المجموعة الثانية G2 عزلات الفطر *F. oxysporum*. بالمقابل انقسمت شجرة القرابة لعزلات الفطر *F. oxysporum* الناتجة عن تقنية ISSR إلى ست مجموعات بنسبة تشابه 72% (شكل 4)، وتبين أن هذه العزلات قد توزعت مترافقة نوعاً ما مع قدرتها الإراضية التي تراوحت بين 0-68%.

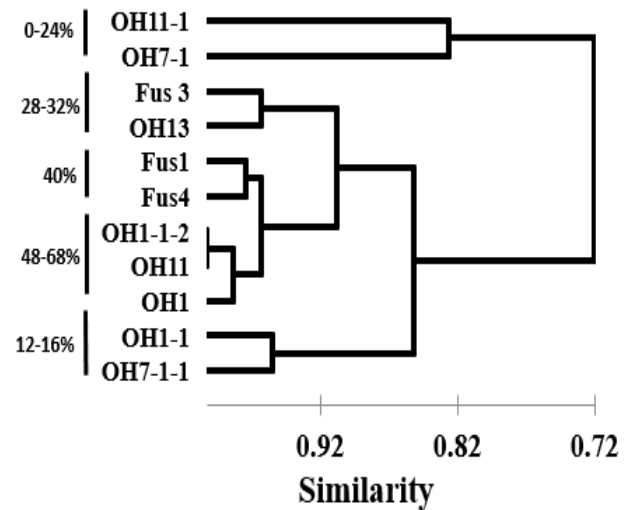
أظهرت النتائج أن نسبة التعددية الشكلية بلغت 81.3% عند تطبيق تقنية RAPD على 59 عزلة فطرية تتبع للجنس *Fusarium*، وهذه النتيجة تتقارب مع دراسات سابقة (Arif et al., 2009؛ Bonde et al., 2013)، حيث بلغت نسبة التعددية الشكلية 79.7% عند استخدام تقنية RAPD على 30 عزلة فطرية تتبع أيضاً للجنس *Fusarium*.

كما بينت النتائج انخفاض نسبة التعددية الشكلية إلى 52.72% عند استخدام تقنية ISSR على 11 عزلة تتبع للنوع *F. oxysporum*، وهذا يشير إلى انخفاض كفاءة تقنية ISSR في الكشف عن التباينات الوراثية ضمن العزلات المدروسة. وقد أشار Arif et al. (2009) انخفاض نسبة التعددية الشكلية عند استخدام تقنية ISSR مقارنة مع استخدام تقنية RAPD. وسبق وأن بينت العديد من الدراسات إلى أن استخدام تقنية ISSR تعطي نسب أعلى في التعددية الشكلية مقارنة بتقنية RAPD (Baysal et al., 2013).

قد يعود الاختلاف في توزع العزلات ضمن شجرة القرابة إلى اختلاف المواقع ضمن المجين التي تستهدفها كل من تقنيتي RAPD وISSR (Souframanien & Gopalakrishna, 2004) اعتمد مؤخراً لتحديد وتعريف أنواع الجنس *Fusarium* بشكل دقيق على مستوى السلالة على استخدام بادئات متخصصة في مضاعفة منطقة ITS Internal transcribed spacer (Chang et al., 2013)؛ حيث تمتاز منطقة ITS بتباينها الوراثي العالي ضمن أنواع الجنس *Fusarium* (Mirete et al., 2013). وهذا ما سيتم العمل عليه في المرحلة الثانية من هذا البحث بهدف تحديد السلالات المنتشرة من النوع *F. oxysporum* في مناطق الدراسة.

### شكر وتقدير

نود أن نشكر صندوق البحث العلمي والتطوير التقني في وزارة التعليم العالي لتوفيرهم الدعم المادي للقيام بهذا البحث.



شكل 4. التحليل العنقودي لعزلات الفطر *F. oxysporum* المعزولة من نباتات البندورة/الطماطم.

Figure 4. Cluster analysis for *F. oxysporum* isolates, collected from tomato.

### المناقشة

هناك ثلاثة سلالات فسيولوجية معروفة من *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici*، هي السلالات (Races) 1، 2 و 3 التي تتميز فيما بينها بقدراتها الأمراض المتباينة على أصناف محددة من البندورة تحمل مورثات مقاومة سائدة لبعض السلالات المرضية (Grattidge & O'Brien 1982؛ Masunaga et al., 1998).

هناك العديد من التقنيات التي تعتمد على DNA للكشف عن الأنواع المختلفة من جنس *Fusarium* sp.، وإلى تحديد سلالاته ومدى ارتباطها بعوائل نباتية محددة (Jiménez-Gasco & Jiménez-Díaz, 2003؛ Wang et al., 2001؛ Thangavelu et al., 2012). استخدمت تقنية RAPD وتقنية ISSR على نطاق واسع للكشف عن التباينات الوراثية لأنواع الجنس *Fusarium* sp. (Das et al., 2015؛ Dariva et al., 2015؛ Mohammadi et al., 2011؛ Mahinpoor et al., 2013؛ al., 2012).

انقسمت شجرة القرابة الناتجة عن تقنية RAPD مجموعتين رئيسيتين (G1، G2) بنسبة تشابه 58% (شكل 2)، ولم يكن هناك تأثير واضح للعائل النباتي (بندورة و فليفلة وبانجان) أو حتى للتوزع الجغرافي في توزع العزلات، حيث لوحظ تقارب عزلات من عوائل ومناطق مختلفة. في حين لوحظ بأن المجموعة الأولى G1 قد ضمت فقط عزلات النوع

## Abstract

Mouhanna, A.M., O.N. Hamoudi, M.M. Mofleh and H.S. Barhoum. 2019. Genetic variability between *Fusarium* spp. isolates collected from Solanaceous plants in Syria with emphasis on *F. oxysporum* infecting tomato. Arab Journal of Plant Protection, 37(4): 293-302.

This study aimed to investigate the genetic variability of *Fusarium* spp. isolates collected from Solanaceous plants (tomato, pepper and eggplant) in Syria. 20 primers for RAPD marker were used on 59 fungal isolates. Results showed that 14 primers had the ability to amplify one or multi sites of the fungal genome. The total number of amplified fragments was 123, with a polymorphism rate of 81.3%. The phylogenetic tree showed that the isolates can be divided into two main groups (G1, G2) at a genetic similarity level of 0.58. The G1 group included *F. solani* isolates and the G2 group included *F. oxysporum* isolates. When the ISSR technique was applied on 11 *F. oxysporum* isolates collected from a tomato plant, 12 out of 20 primers were able to amplify 110 fragments with a polymorphism rate of 52.72%. The ISSR phylogenetic tree showed that these isolates can be divided into six groups, more or less associated with their pathogenicity (0-68%). This is the first study on genetic variability of *Fusarium* spp. on Solanaceous plants with emphasis on *F. oxysporum* isolates from tomato throughout Syria.

**Keywords:** Genetic variability, *Fusarium*, wilt, RAPD, ISSR, Syria.

**Corresponding author:** Ahmad Mouhanna, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Damascus University, Damascus, Syria, email: A.M.Mouhanna@gmail.com

## References

- Baysal, Ö., M. Siragusa, E. Gumrukcu, A. Jaime and T. da Silva. 2010. Molecular Characterization of *Fusarium oxysporum* f. *melongenae* by ISSR and RAPD Markers on Eggplant. Biochemical Genetics 48: 524-37.  
<https://doi.org/10.1007/s10528-010-9336-1>
- Baysal, Ö, C. Karaaslanb, M. Siragusac, R. Alessandrod, F. Carimic, F. De Pasqualec and J.A.T. da Silva. 2013. Molecular markers reflect differentiation of *Fusarium oxysporum* forma speciales on tomato and forma on eggplant. Biochemical Systematics and Ecology, 47: 139-147.  
<https://doi.org/10.1016/j.bse.2012.10.005>
- Bogale, M., B.D. Wingfield, M.J. Wingfield and E.T. Steenkamp. 2006. Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates from Ethiopia using AFLP, SSR and DNA sequence analyses. Fungal Diversity, 23: 51-56.
- Bonde S.R., A.K. Gade and M.K. Rai. 2013. Genetic diversity among fourteen different *Fusarium* species using RAPD marker. Biodiversitas, 14: 55-60.  
<https://doi.org/10.13057/biodiv/d140201>
- Chandra, D.R. and S. Thoyajaksha. 2018. Evaluation of genetic similarity of micropropogated plants of *Ventilago maderaspatana* Geartn using RAPD and ISSR Markers. European Journal of Experimental Biology, 8, 5:33.  
<https://doi.org/10.21767/2248-9215.100074>
- Chang, S.C., D.P. Macêdo, C.M. Souza-Motta and N.T. Oliveira. 2013. Use of molecular markers to compare *Fusarium verticillioides* pathogenic strains isolated from plants and humans. Genetics and Molecular Research, 12: 2863–2875.  
<https://doi.org/10.4238/2013>
- Dariva, J.M., A.A. Xavier, M.R. Costa, R.C.F. Ribeiro and T.V. Sousa. 2015. Genetic variability of *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* f.s.p. *passiflorae* isolated associated with passion fruit. Revista Brasileira de Fruticultura, 37: 377-386.  
<https://doi.org/10.1590/0100-2945-119/14>
- المجموعة الإحصائية. 2017. وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، سورية.  
مهنا، أحمد محمد، عمر ناجي حمودي، ماجدة محمد مفلح وهمام شعيبان برهوم. (قيد النشر). الاختلافات المورفولوجية والقدرة الإمراضية لعزلات الجنس *Fusarium* sp. والمسببة لمرض الذبول الوعائي في سورية. مجلة جامعة دمشق، سلسلة العلوم الزراعية (قيد النشر).
- Addinsoft. 2015. XLSTAT 2015: Data analysis and statistics software for Microsoft Excel. Addinsoft, Paris, France.
- Ahmad, B.Y., F.M. sharif and A.R.T. sarhan. 1987. Effect of certain micronutrients on *Fusarium* wilt of tomato. Agriculture and water resources journal, 6:13-28.
- Akbar Khan, A., S. Hussain, K. Ullah and G.S. Ali. 2018. Detection, virulence and genetic diversity of *Fusarium* species infecting tomato in Northern Pakistan. PLoS ONE 13(9).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203613>
- Alves-Santos, F.M., L. Cordeiro-Rodrigues, J.M. Sayagues, R. Martin-Dominguez, P. Garcia-Benavides, M.C. Crespo, M. Diaz-Minguez and A.P. Eslava. 2002. Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates from Spain and Greece. Plant Pathology, 51: 605-611.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2002.00745.x>
- Arif, M., N.W. Zaidi, Q.M.R. Haq, S. Khan, A.M. Husaini and U.S. Singh. 2009. Nuclear rDNA Sequence-based Identification and Relative Efficiency of ISSR and RAPD Markers for Genetic Diversity of *Fusarium* sp. Associated with Mango Malformation in India. International Journal of Plant Breeding, 3: 65-70.
- Assigbetse, K.B., D. Fernandez, M.P. Dubois and J.P. Geige. 1994. Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Phytopathology, 84: 622-626.  
<https://doi.org/10.1094/phyto-84-622>

## المراجع



- Mirete, S., B. Patiño, M. Jurado, C. Vázquez, M.T. González-Jaén and M. Puertas** 2013. Structural variation and dynamics of the nuclear ribosomal intergenic spacer region in key members of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Genome*, 56: 205–213.  
<https://doi.org/10.1139/gen-2013-0008>
- Mohammadi, N., E.M. Goltapeh, H.K. Dolatabadi, A.B. Ahari and H. Pouralibaba** 2011. The genetic diversity of Iranian isolates causing fusarium wilt of lentil. *Journal of Agricultural Technology*, 7: 1809-1822.
- Moulin, M.M., R. Rodrigues, L.S.A. Gonçalves, C.P. Sudré and M.G. Pereira**. 2012: A comparison of RAPD and ISSR markers reveals genetic diversity among sweet potato landraces (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). *Acta Scientiarum. Agronomy*, 34: 139-147.  
<https://doi.org/10.4025/actasciagron.v34i2.12616>
- Nei, M.** 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 70: 3321–3323.
- Park, S.Y., S.H. Jang, S.O. Oh, J.A. Kim and J.S. Hur**. 2014. An easy, rapid, and cost-effective method for DNA extraction from various lichen taxa and specimens suitable for analysis of fungal and algal strains. *Mycobiology*, 42: 311-316.  
<https://doi.org/10.5941/myco.2014.42.4.311>
- Prasad, R.D., T.R. Sharma, T.P. Devi**. 2007. Molecular variability and detection of *Fusarium* species by PCR based RAPD, ISSR and ITS-RFLP analysis. *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 37: 311-318.  
<https://doi.org/10.5053/ejobios.2010.4.0.10>
- Souframanien, J. and T. Gopalakrishna**. 2004. A comparative analysis of genetic diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 109: 1687-1693.  
<https://doi.org/10.1007/s00122-004-1797-3>
- Thangavelu, R., K.M. Kumar, P.G. Devi and M. Mustafa**. 2012. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* isolates (Foc) of India by inter simple sequence repeats (ISSR) analysis. *Molecular biotechnology*, 51: 203–211.  
<https://doi.org/10.1007/s12033-011-9457-8>
- Tonk, F.A., M. Tosun, E. Ilker, D. Istipliler and O. Tatar**. 2014. Evaluation and comparison of ISSR and RAPD markers for assessment of genetic diversity in triticale genotypes. *Bulgarian Journal of Agricultural Sciences*, 20: 1413-1420.
- Wang, P.H., H.S. Lo and Y. Yeh**. 2001. Identification of *F. o. f. sp. cucumerium* and *F. o. f. sp. luffae* by RAPD-generated DNA probe. *Letters in Applied Microbiology*, 33: 397-401.  
<https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2001.01019.x>
- Welsh, J. and M. McClelland**. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18: 7213-7218.  
<https://doi.org/10.1093/nar/18.24.7213>
- Das, A., M. Venkataramana, S. Chandranayaka, H.S. Murali and H.V. Batra**. 2012. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* isolates from banana. *Pest Management in Horticultural Ecosystems*, 18: 171-178.
- Datta, J. and N. Lal**. 2013. Genetic diversity of *Fusarium* wilt races of pigeonpea in major regions of India. *African Crop Science Journal*, 21: 201-211.
- Dubey, S.C., K. Priyanka and V. Singh**. 2014. Phylogenetic relationship between different race representative populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in respect of translation elongation factor-1 $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin, and internal transcribed spacer region genes. *Archives of Microbiology*. 196: 445–452.  
<https://doi.org/10.1007/s00203-014-0976-0>
- Garibaldi, A.** 1975. Race differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi* (Prill. et Del.) Snyd. et. Hans. *Meded Fac Landbouwwet Rijksuniv Gent*, 40: 531-537.
- Goulão, L. and C.M. Oliveira**. 2001. Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. *Euphytica*, 122: 81-89
- Grattidge, R. and R.G. O'Brien**. 1982. Occurrence of a third race of *Fusarium* wilt of tomatoes in Queensland *Plant Disease*, 66:165-166.  
<https://doi.org/10.1094/PD-66-165>
- Henson, J.M. and R. French**. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology*, 31: 81-109.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.py.31.090193.000501>
- Jiménez-Gasco, M.M. and R.M. Jiménez-Díaz**. 2003. Development of a specific polymerase chain reaction-based assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and its pathogenic races 0, 1A, 5 and 6. *Phytopathology*, 93: 200-209.  
<https://doi.org/10.1094/phyto.2003.93.2.200>
- Karp, A., S. Kresovich, K.V. Bhat, W.G. Ayad and T. Hodgkin**. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. *IPGRI Technical Bulletin*, 2. 134 pp.
- Kumar, J., U.S. Singh and S.P.S. Beniwal**. 1993. Mango malformation: one hundred years of research. *Annual Review of Phytopathology*, 31: 217-222.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.py.31.090193.001245>
- Mahinpoo, V., R.F. Nejad, H.R. Memari, A. Cheraghi and Z. Bahmani**. 2013. Investigation on genetic diversity of *Fusarium oxysporum* Schlecht Isolated from tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) based on RAPD Analysis and VCG Groups. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 4: 158.  
<https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000158>
- Masunaga, T., H. Shiomi and H. Komada**. 1998: Identification of race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* isolated from tomato in Fukuoka Prefecture. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 64: 435.

Zheng S-J, F.A. García-Bastidas, X. Li, L. Zeng, T. Bai, S. Xu, K. Yin, H. Li, G. Fu, Y. Yu, L. Yang, H.C. Nguyen, B. Douangboupha, A.A. Khaing, A. Drenth, M.F. Seidl, H.J.G. Meijer and G.H.J. Kema. 2018. New geographical insights of the latest expansion of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* tropical race 4 into the greater Mekong subregion. Front Plant Science, 9: 457.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00457>

Williams, J.G.K., A.R. Kubelic, K.J. Livak, 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.  
<https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6531>  
Yeh, F.C., R.C. Yang, T. Boyle, Z.H. Ye and J.X. Mao. 1997. PopGene, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.

Received: May 20, 2019; Accepted: October 7, 2019

تاريخ الاستلام: 2019/5/20؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2019/10/7