Damascus University Journal of Agricultural Sciences
Vo 40 No.2 (2025): 271 - 286

مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية
المجلد 40 العدد 2 (2025): 271 -286

التباين الوراثي بين عزلات من أنواع الفطر .Sporisorium sp المسببة لأمراض التفحم على الذرة البيضاء.

ردينا غانم[1]*، جودة فضول[2]، محمد فواز العظمة[3]

[1]* عضو هيئة فنية– قسم وقاية النبات– كلية الزراعة– جامعة تشرين.

[2] أستاذ دكتور – قسم وقاية النبات– كلية الزراعة– جامعة دمشق.

[3] أستاذ دكتور – قسم وقاية النبات– كلية الزراعة– جامعة دمشق.

الملخص:

هدفت الدراسة لمعرفة التباينات الوراثية لعزلات الأنواع الفطرية للجنس .Sporisorium sp المسببة لتفحم الذرة البيضاء والتي جمعت خلال عام 2019 من نباتات ذرة بيضاء Sorghum مصابة في منطقتين لزراعتها من دمشق وريفها، استخدمت 12 مرئسة لتقنية مضاعفة المناطق بين التكرارات التتابعية البسيطة Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) على 7 عزلات فطرية وقد أظهرت النتائج أن جميعها تمكنت من الالتصاق في موقع واحد أو مواقع متعددة من مجين العزلات الفطرية المدروسة. بلغ العدد الكلي للحزم المتشكلة 99 بنسبة تعددية شكلية بلغت 95.25% وتراوحت قيمة معامل التعددية الشكلية Polymorphic Information Content (PIC) بين 0.25 مع المرئسة ISSR8 و 0.42 مع المرئستين ISSR1-ISSR3، وتراوحت قيمة التشابه الوراثي بين 0.495 و 0.73 حيث كانت القيمة الأدنى بين عزلة التفحم السائب **SS** وعزلة التفحم الرأسي A19 مما يشير إلى وجود تباين وراثي بينهما، بينما كانت القيمة الأعلى 0.73 مابين عزلتي التفحم الطويل LS-LM مما يدل على درجة القرابة الوراثية الكبيرة بينهما، كما أظهرت شجرة القرابة الوراثية أن العزلات انقسمت إلى مجموعتين رئيسيتين على درجة تشابه وراثي 0.286 حيث ضمت المجموعة الأولى عزلات النوعين S. reilianum و S. ehrenbergii بينما ضمت المجموعة الثانية عزلات النوعين S.sorghi و S.cruentum. تجمعت العزلات من نفس النوع معاً بالرغم من كونها أخذت من أنواع مختلفة من الذرة البيضاء.

تعد هذه أول دراسة في سورية تهدف لمعرفة التباين الوراثي لأنواع تفحمات الذرة البيضاء وتشير النتائج إلى إمكانية استخدام تقنية ISSR لدراسة القرابة الوراثية فيما بينها.

الكلمات المفتاحية: تباين وراثي، Sporisorium، ذرة بيضاء، تفحم، ISSR.

تاريخ الايداع: 2023/8/9
تاريخ القبول: 2023/10/23

حقوق النشر: جامعة دمشق –سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص CC BY-NC-SA 04

ISSN: 2789-7214 (online)
http://journal.damascusuniversity.edu.sy/index.php/agrj

Genetic variability Among Sorghum smut diseases Caused by Sporisorium spp.

Rudaina Ghanem[1]*, Joudeh Faddoul[2], Mouhamad Fawaz Al-Azmah[3]

[1*]Teaching Assistant, faculty of Agriculture, Tishreen University.

[2] Professor in the Department of Plant Protection,Faculty of Agriculture, Damascus University.

[3]Professor in the Department of Plant Protection,Faculty of Agriculture, Damascus University.

Received: 9/8/2023
Accepted: 23/10/2023

Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

Abstract:

This study aimed to investigate the genetic variability of Sorghum smut fungal species of Sporisorium, isolates collected from infected Sorghum plants during 2019 from two regions of Sorghum cultivation in Damascus and its countryside, 12 primers for ISSR marker were used on 7 fungal isolates, Results showed that all of them had the ability to amplify one or multi sites of the fungal genome. The total number of amplified fragments was 99, with a polymorphism rate of 95.25%. and the average polymorphic information content coefficient ranged between 0.25 with the primer ISSR8 and 0.42 with primers ISSR1 and ISSR3.and the genetic similarity ranged between 0.495 and 0,73. the lowest value was 0.495 between the two isolates of loose smut SS and head smut A19 which indicates that there is a large genetic variation between them While the highest value of genetic similarity was 0,73 between the two isolates of Long smut LS and LM, That indicates a large degree of genetic relationship, The phylogenetic tree showed that the isolates can be divided into two main groups at a genetic similarity level of 0.286. The first group included Sporisorium reilianum and S. ehrenbergii isolates and the second group included S. sorghi and S. cruentum isolates. The isolates from the same species grouped together although that they were from different Sorghum species This is the first study on genetic variability of Sorghum smut species in Syria and Our results indicate the possibility of using the ISSR technique to study genetic relationship among them.

Key words: Genetic Variability, Sporisorium, Sorghum, Smut, ISSR

المقدمة والدراسة المرجعية:

تعد الذرة البيضاء أو الذرة الرفيعة Sorghum bicolor (L.) moench (Sorghum) من محاصيل الحبوب الهامة في المناطق المدارية وشبه الجافة في إفريقيا وآسيا وأستراليا وأمريكا، فهي تنتج بشكل أساسي للاستهلاك البشري في إفريقيا وبعض الدول في آسيا مثل الهند، ومن أجل تغذية الحيوانات وتطبيقاتها الصناعية في الولايات المتحدة والصين وأستراليا (Reddy, 2017)، وبالرغم من أن المساحة المزروعة بالذرة البيضاء كبيرة في الكثير من البلدان إضافةً لتحسين الإجراءات لزيادة الإنتاج إلا أن إنتاجيتها منخفضة بسبب ما تتعرض له من مؤثرات حيوية وغير حيوية (Ashok, 2019)، وتعد أمراض التفحمات من بين أهم المؤثرات الحيوية التي تحد من إنتاجية الذرة البيضاء، لأنها تصيب الكثير من الأصناف التقليدية والمحسنة، حيث يتركز الضرر على عثاكيل الذرة مما يؤدي إلى خسائر في ناتج المحصول (الحبوب) وكذلك تنخفض قيمتها التسويقية (Louis *et al.*, 2007).

تصاب الذرة البيضاء بأربعة أنماط من التفحمات، وهي منتشرة في معظم مناطق زراعة الذرة البيضاء في العالم (Das, 2017) تسببها أربعة أنواع فطرية من الجنس Sporisorium والفصيلة Ustilaginaceae من الرتبة Ustilaginales والصف Basidiomycetes من شعبة الفطريات الدعامية Basidiomycota (فضول ونفاع 2006؛ (Cai *et al.*, 2011; Toh and Perlin, 2016) وهي مسجلة في القطر العربي السوري بحسب التقرير الوطني عن التنوع البيولوجي للموارد الوراثية للأغذية والزراعة بدولة الجمهورية العربية السورية لعام 2016.

ينتج التفحم الحبي المغطى Covered Kernel Smut عن النوع (Sporisorium sorghi Ehrenb. ex Link, syn. Sphacelotheca sorghi (Ehrenb. ex Link))

إذ تحدث العدوى بصورة جهازية في مرحلة البادرة عن طريق الحبوب الملوثة بالأبواغ التيلية والتي تنبت عند توفر الظروف المناسبة بالتزامن مع إنبات حبوب الذرة البيضاء فتعطي دعامة أولية من 4 خلايا تتشكل عليها السبوريدات والتي تنبت بدورها وتتشكل المشيجة الثنائية التي تخترق البادرة النامية تحت سطح التربة، ثم تنمو مشيجة الفطر جهازياً داخل البادرة ملازمةً للقمة النامية حتى موعد خروج النورات الزهرية، عندها يهاجم الفطر الحبوب أثناء تشكلها، حيث تتحول كل حبة مصابة في العثكول إلى كيس بوغي له جدار سميك بلون أبيض رمادي أو بني يحوي الأبواغ التيلية ذات اللون البني الغامق (Thakur *et al.*, 2010; Das, 2017; Anitha *et al.*, 2020) وكذلك هناك التفحم السائب Loose kernel Smut الذي يسببه الفطر Sporisorium cruentum (J.G. Kühn) (synonym: Sphacelotheca cruenta) الذي يعتبر أيضاً أحد أمراض التفحم الهامة على الذرة البيضاء وتحدث العدوى عن طريق البذور الملوثة بالأبواغ التيلية بنفس آلية حدوث التفحم المغطى، إلا أنه أقل انتشاراً وتؤدي الإصابة إلى تحول كل الحبات المصابة في العثكول إلى أكياس بوغية ذات غشاء رقيق رمادي تحوي أبواغ تيلية بلون بني داكن يتمزق مباشرة وبسهولة بعد خروج العثكول من البرعم (Kutama *et al.*, 2011; Das, 2017; Anitha *et al.*, 2020)، وهناك التفحم الرأسي (Head Smut) الذي يسببه الفطر Sporisorium reilianum (J.G. Kühn) (synonym: Sphacelotheca reiliana (J.G. Kühn) Clinton) ويتضمن هذا النوع تحت نوعين شكليين (formae speciales) الأول يصيب الذرة الصفراء بشراسة لكن لا يؤدي لتفحم الرأس (العثاكيل) فيما لو أصاب الذرة البيضاء Sphacelotheca reiliana f.sp. Zeae والآخر يصيب الذرة البيضاء بشدة وبالمقابل لا ينتج أبواغ على نباتات الذرة الصفراء Sphacelotheca reiliana f. sp. reiliana وتكون العدوى

جهازية وبنفس آلية حدوث التفحم المغطى وهنا يتحول العثكول بالكامل إلى كيس بوغي متطاول أبيض ذو غشاء رقيق يتمزق بسهولة يحوي أبواغ الفطر التيلية وشبكة من الخيوط الرفيعة الداكنة من بقايا الأوعية الناقلة والتي تشبه المكنسة (Zuther *et al.*, 2012; Das, 2017; Anitha *et al.*, 2020).

وأخيراً التفحم الطويل Long smut الناتج عن الفطر Sporisorium ehrenbergii (J.G. Kühn) (synonym: Tolyposporium ehrenbergii (J.G. Kühn)) وخلافاً للتفحمات السابقة فهو منقول بالهواء إذ تحدث العدوى في مرحلة الاشطاء (booting stage) وحتى ظهور البراعم الزهرية (anthesis) وليس بعد ذلك حيث يدخل البوغ التيلي المنقول بالهواء إلى الإشطاء وينبت ليعطي سبوريدات والتي بدورها تصيب السنيبلات منفردة وتظهر الأعراض على قمة النبات بعد 11 – 14 يوم من العدوى بشكل أكياس بوغية اسطوانية متطاولة ومنحنية (Prom *et al.*, 2014; Das, 2017; Anitha *et al.*, 2020).

إن التعرف على التنوع الوراثي للدنا باستخدام تقنيات البصمة الوراثية (DAN molecular finger printing techniques) ذو أهمية كبيرة من أجل زيادة الفهم لبنية مجتمعات العامل الممرض pathogen population والتفاعلات المتبادلة ما بين العائل والممرض والبيئة، وهي الأساس لتطوير أصناف مقاومة حيث يعد استخدام الأصناف المقاومة إضافةً لمعاملة البذار قبل الزراعة من أكثر الطرائق فاعلية واقتصادية لمكافحة أمراض التفحم على الذرة البيضاء المنقولة بالبذار وبشكل خاص التفحم الرأسي (Oh *et al.*, 1994) وكذلك الأمر بالنسبة لأمراض التفحم الأخرى مثل تفحم قصب السكر (Shen *et al.*, 2014).

هناك مشكلة مستمرة في مكافحة أمراض التفحمات عن طريق معاملة البذور بالمبيدات الكيميائية بسبب وجود سلالات فيزيولوجية للفطر الممرض بالنسبة لأمراض التفحم المنقولة بالبذار مع وجود إمكانية التهجين فيما بينها وبالتالي هناك سؤال دائم عن إمكانية ظهور أي سلالات جديدة من خلال التهجين أو الطفرات قد تكون قادرة على إصابة الأصناف أو الهجن المقاومة أو أن تكون مقاومة للمبيدات المستخدمة (Vaheeduddin, 1942) هذا عدا عن مشكلة التلوث البيئي الناتجة عن استخدام المواد الكيميائية (Moharam *et al.*, 2018) لذلك فإن تحليل البنية الوراثية لمجتمعات الفطر الممرض في النظم الزراعية المختلفة له فائدة جمّة في فهم أي وقت أو مكان تقود القوى التطورية النشوئية إلى نشوء (توليد) تباين وراثي جديد بين أو ضمن المجتمعات (McDonald and Lind, 2002; Lumbsch *et al.*, 2008)، كما أن التعرف على التنوع الوراثي لمجتمعات الفطر الممرض وتوزعها يسمح لنا بتحديد درجات التشابه بينها، والكشف عن الآليلات النادرة المشتركة بين المجتمعات المنفصلة جغرافياً، وتحديد التدفق الجيني، وفي ما يتعلق بأشكال التكاثر فهي تساعد في تحديد إذا ما كان مجتمع الفطر الممرض ذو دورات نظامية للتكاثر الجنسي يعطي خلالها عدد أكبر من الأنماط الجينية و بالتالي فإن مستويات التنوع الوراثي ستكون عالية مقارنةً مع المجتمعات التي لا تتكاثر جنسياً وبالتالي سيزداد خطر ظهور أليلات متعلقة بالإمراضية (أو الشراسة) بحيث تصبح الأصناف المقاومة غير فعالة لمنع حدوث الإصابة (McDonald and Lind,2002) وجميع هذه المعلومات تفيد في تطوير استراتيجيات للمكافحة الحيوية والتي تعد أفضل من التقليدية المعتمدة على تطبيق المبيدات والممارسات الزراعية المختلفة.

تسمح طرائق البصمة الوراثية بالتقصي عن مناطق عشوائية من الجينوم الفطري وذلك من أجل تعريف تسلسل متخصص بالنوع الفطري عندما تكون المورثات المحفوظة غير متباينة كفاية من أجل تعريف وتوصيف الأنواع بشكل ناجح (McCartney et al., 2003)، وتستخدم بشكل عام لدراسة آلية نشوء وتطور المجتمعات المدروسة وتركيبها الوراثي وقد كانت هذه التقنيات نافعة من

أجل تحديد تسلسل مستخدم للكشف عن الفطور على مستوى تصنيفي منخفض ، واستخدمت أيضاً في تحديد الاختلافات بين السلالات من نفس النوع مع اختلاف المدى العائلي والشراسة ونمط الالتقاء أو التزاوج (Capote et al., 2012).

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 و الطريقة و الهدف من تطبيقها، وتعتبر تقنية مضاعفة المناطق ما بين التكررات التتابعية البسيطة Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) إحدى أهم الواسمات الجزيئية لدراسة المجتمعات وراثياً وتحديد درجة القرابة فيما بينها (Zietkiewicz *et al*., 1994) ولهذه التقنية العديد من المزايا مقارنةً مع الواسمات الجزيئية الأخرى (مثل AFLP-RAPD-RFLP) فهي ذات كفاءة وحساسية وموثوقية عالية وسهلة التطبيق لأن مستلزمات وتكاليف تطبيقها منخفضة وتحتاج لكمية DNA قليلة وحتى لو كان بجودة منخفضة (Oliveira and Azevedo, 2022) لذلك أصبحت تستخدم على نطاق واسع لتحليل التنوع الوراثي للمجتمعات المدروسة وتحديد هوية السلالات وبناء الخريطة الوراثية ودراسات أخرى في مختلف الكائنات الحية بما في ذلك النباتات (Idrees and Irshad, 2014) والحيوانات والكائنات الحية الدقيقة ومنذ عام 2012 أصبحت تستخدم بشكل أساسي لدراسة مسببات الأمراض النباتية بنسبة 42.2% والتنوع الوراثي الفطري 25% وللتعرف على منتجات الأطعمة والمشروبات 17.2% (Oliveira and Azevedo, 2022)، وقد أثبتت فاعليتها لدراسة التباينات الوراثية بين عزلات لفطور التفحم متباينة في شراستها أو في بيئاتها الجغرافية (Karwasara *et al*., 2002; Zhang *et al*., 2010; Shen *et al*., 2012; Parveen *et al*., 2013; Xu *et al*., 2014; Xu *et al*., 2017; Li *et al*., 2021) كما استخدمت كخطوة أولية للحصول على تسلسل مميز يستخدم في عملية تشخيص المرض بطريقة جزيئية (Gao *et al*., 2014; Yao *et al*., 2019).

وفي نفس السياق واستكمالاً لأبحاث سابقة في الهيئة العامة للتقانة الحيوية فيما يتعلق بمحصول الذرة البيضاء والأمراض التي تصاب بها ولأن الدراسات حول بنية مجتمعات فطريات التفحم على الذرة البيضاء وتباينها الوراثي قليلة جداً، تم في هذا البحث تطبيق تقنية ISSR على عزلات من عدة أنواع لفطريات التفحم معزولة من عدة أنواع نباتية تتبع الجنس Sorghum لتحديد درجة القرابة الوراثية ما بينها.

المواد والطرائق:

1- عينات الفطر الممرض:

استخدمت 7 عزلات من الأبواغ التيلية لأنواع الجنس Sporisorium المسببة للتفحم من أنواع نباتية مختلفة من الذرة البيضاء (الجنس Sorghum) كما هو موضح في الجدول (1) حيث جمعت الأبواغ التيلية لفطريات التفحم السائب والرأسي من نباتات الرزين المصابة بصورة طبيعية من مزرعة أبي جرش، وبالنسبة للتفحم المغطى وجدت عينة من ذرة المكانس مصابة بالتفحم المغطى في منطقة جيرود كما أخذت عينة من الذرة البيضاء الحبية صنف رزينية من مزرعة أبي جرش، أما التفحم الطويل فقد ظهرت الإصابة بصورة تلقائية على عثاكيل الذرة البيضاء الحبية والسكرية التي كانت تزرع سنوياً في مزرعة أبي جرش بهدف انتخاب أفضل الأصناف واعتمادها للزراعة ويشار إلى أن هذه العزلات سبق وأن تم تعريفها وتوصيفها شكلياً بحسب المفتاح التصنيفي الذي استخدمه Vánky وAbbasi (2013) في دراسة سابقة (غانم وآخرون، قيد النشر).

الجدول (1): العزلات الفطرية من الجنس Sporisorium المستخدمة في هذه الدراسة.

رمز العزلة	الاسم العلمي	العائل
MS	Sporisorium sorghi	Sorghum bicolor ذرة بيضاء حبية صنف: رزينية
BM	Sporisorium sorghi	Sorghum vulgare var. technicum ذرة المكانس
SS	Sporisorium cruentum	Sorghum halepense الرزين
A19	Sporisorium reilianum	Sorghum halepense الرزين
A20	Sporisorium reilianum	Sorghum halepense الرزين
LS	Sporisorium ehrenbergii	Sorghum bicolor ذرة بيضاء سكرية
LM	Sporisorium ehrenbergii	Sorghum bicolor ذرة بيضاء حبية صنف: رزينية

2- مكان وتاريخ تنفيذ البحث:

نفذ البحث في مخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية في دمشق خلال الفترة 2021/2019.

3- استخلاص الحمض النووي للفطر الممرض:

عزل الدنا من الأبواغ التيلية من كل عينة باستخدام طاقم عزل معتمد (Genomic DNA Isolation Reagent) من شركة (GeneDireX, Taiwan)، ونفذت الخطوات حسب تعليمات الشركة الصانعة ثم تم قياس كمية الدنا على طول الموجة 260 نانومتر واعتمدت نسبة الامتصاص 260/280 لتعيين جودة الدنا (أقل من 1.8) كما تم تقدير نوعية الأحماض النووية DNA بواسطة جهاز الرحلان الكهربائي باستخدام هلامة الأغاروز Agarose 1% مع صبغة خاصة بالأحماض النووية (RedSafe™ Biotechnology Nucleic Acid Staining Solution, Intron) والتي ترتبط معها فتشكل معقد يتألق إثر تعرضه للأشعة فوق البنفسجية وتكون عينات DNA ذات نوعية جيدة عندما تظهر كجزء واحد (Sambrook *et al.*, 1989).

4- تقنية مضاعفة المناطق ما بين التكررات التتابعية البسيطة ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat):

استخدمت 12 مرئسة من نوع ISSR (الجدول 2) وتم إجراء تفاعل البلمرة المتسلسل للبوليميراز PCR (Polymerase Chain Reaction) لكل منها حسب Xu وآخرون 2017، حيث كان الحجم النهائي للتفاعل 25 µl والذي تضمن المكونات التالية: 2 µl دنا الفطر (30ng)، 3 µl المرئسة (5µM)، 12.5 µl طاقم كيميائي (Dream Taq green PCR 2x master mix, Thermo Scientific)، و7.5µl ماء نقي (Nuclease-Free Water)، ونفذ تفاعل PCR في جهاز التدوير الحراري باتباع برنامج عمل بالشروط التالية:

1- 5 دقائق على حرارة 95°س لفصل سلاسل الدنا (Denaturation).

2- يليها 35 دورة متتالية من:

- (Denaturation) فصل السلاسل الدنا على حرارة 95°س لمدة 45 ثانية.
- (annealing) مرحلة ارتباط البادئ على حرارة تتناسب مع المرئسة المستخدمة لمدة S45 ثانية
- (extension) مرحلة تكملة السلاسل على حرارة 72°س لدقيقتين.

3- (final extension) الاستكمال النهائي للسلاسل على حرارة 72°س لمدة 8 دقائق.

وفي النهاية تم ترحيل منتجات PCR على هلامة الأغاروز 1.8% أضيف لها 0.05 (حجم/حجم) من (RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution, Intron Biotechnology) في جهاز الرحلان الكهربائي تحت جهد كهربائي 100 فولط لمدة ساعة ونصف، كما تم تحميل سلم جزيئي أو مؤشر (Marker) ذو وزن جزيئي 100bp-3000bp (Thermo Scientific GeneRuler 100bp Plus Ladder) إضافة لعينات دنا الفطر، ومن ثم عرضت للأشعة فوق البنفسجية وصورت باستخدام جهاز توثيق الجيل Gel doc.

5-التحليل الإحصائي:

جمعت نتائج عملية التضخيم في جداول اعتماداً على مقارنة وجود أو غياب حزم الحمض النووي DNA وأعطي الرقم (1) عند وجود حزمة DNA ذات وزن جزيئي محدد عند أي عزلة بينما يعطى الرقم (0) عند عدم وجودها، وقد نظمت الجداول لكل مرئسة على حدا في برنامج Microsoft Excel ثم حللت النتائج باستخدام برنامج PopGene (Yeh et al., 1997) وتم التحليل العنقودي بالاعتماد على مصفوفة التشابه (Similarity Matrix) لمعاملNie's coefficient (Nei, 1973) ورسمت شجرة القرابة الوراثية بتطبيق طريقة متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة Un Weighted Pair Group Method with Arithmetic Averaging (UPGMA) لبيان توزع الأنواع إلى مجاميع أو عناقيد رئيسية وثانوية اعتماداً على البعد الوراثي فيما بينها، كما تم تقدير مؤشرات التنوع الوراثي التالية بين المجتمعات المدروسة جدول (2):

1- عدد الحزم الكلية المنتجة لكل مرئسة

2- عدد الحزم المتماثلة في كل العينات Monomorphic bands

3- عدد الحزم ذات التعدد الشكلي Polymorphic bands

4- عدد الحزم المتفردة Unique bands

5- النسبة المئوية للتباين أو النسبة المئوية للتعدد الشكلي وحسبت من المعادلة التالية:

$$\textbf{النسبة المئوية للتعدد الشكلي} = \frac{\text{عدد الحزم المتعددة شكلياً لكل مرئسة}}{\text{عدد الحزم الكلية المنتجة من المرئسة}} \times \mathbf{100}$$

6- محتوى التعددية الشكلية Polymorphism Information Content (PIC) لكل مرئسة بتطبيق المعادلة التالية:

$PIC = 2f\ (1- f)$ (Roldan-Ruiz, et al., 2000)

حيث أن: f = تكرار الحزم الموجودة.

الجدول (2): المرئسات المستخدمة وتسلسلها وعدد القطع (الحزم) المضخمة الناتجة عنها.

رمز المرئسة	التتابع النوكليوتيدي	عدد الحزم	عدد الحزم المتباينة شكلياً	عدد الحزم المتفردة	عدد الحزم المتماثلة	النسبة المئوية للتعددية الشكلية	محتوى التعددية الشكلية
ISSR1	(AG)8G	12	12	3	0	100	0.42
ISSR2	(AG)8T	5	5	2	0	100	0.39
ISSR3	(AG)8YA	5	5	1	0	100	0.42
ISSR4	(GA)8A	5	4	1	0	80	0.32
ISSR5	(GA)8YT	6	6	4	0	100	0.32
ISSR6	(GA)8YC	10	10	6	0	100	0.33
ISSR7	VHV(GT)	15	15	7	0	100	0.40
ISSR8	(GGAGA)3	4	4	4	0	100	0.25
ISSR9	(AC)8G	20	20	7	0	100	0.37
ISSR10	(TG)8RC	6	5	3	0	83.3	0.29
ISSR18	(AC)8YG	5	4	3	0	80	0.29
ISSR19	(GT)9T	6	6	3	0	100	0.36
Total		99	96				
Mean						95.25	

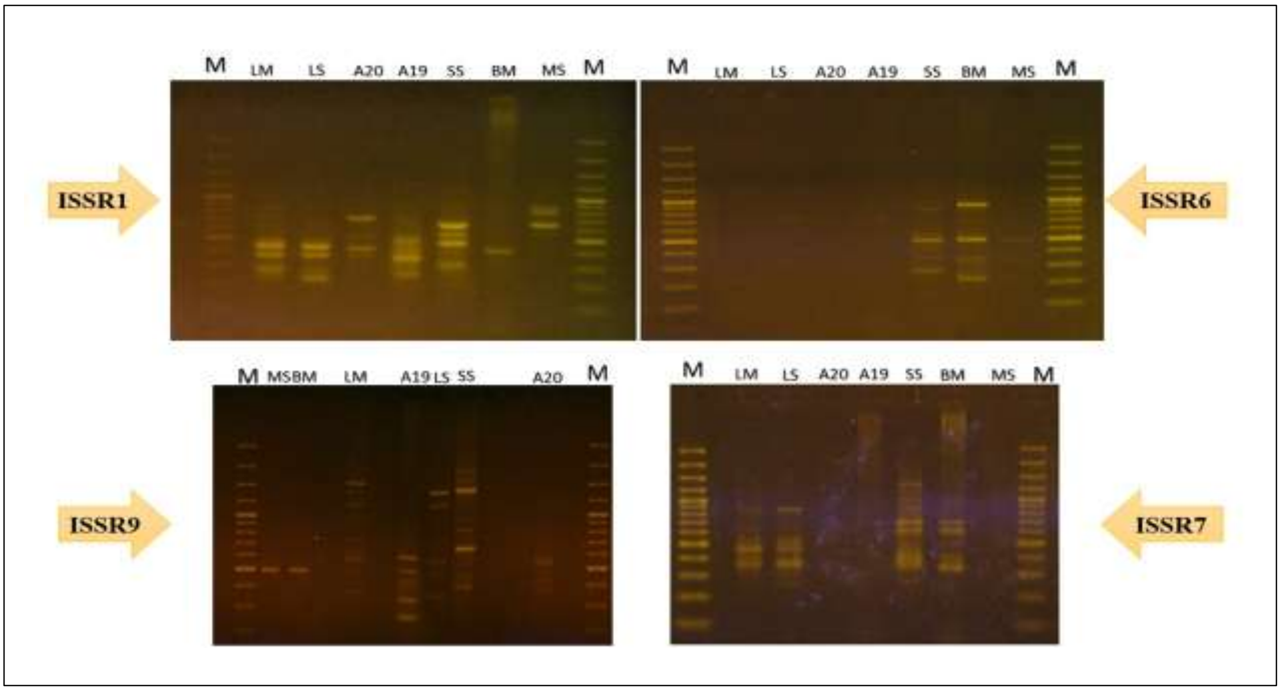
النتائج والمناقشة:

1- التعددية الشكلية:

طبقت تقنية **(ISSR)** في هذه الدراسة للتعرف على التباينات الوراثية بين عزلات لأنواع من الفطريات التي تتبع الجنس **Sporisorium** المسببة لأمراض التفحم على الذرة البيضاء، والتي أخذت من أنواع مختلفة من نباتات مصابة من الجنس **Sorghum** حيث تم اختبار 12 مرئسة وأثبتت جميعها فعّالية في إظهار التباينات الوراثية بين العزلات الفطرية المدروسة، فقد

أعطت كلاً منها حزم واضحة ذات تعددية شكلية، حيث نجم عن هذه المرئسات 99 حزمة وتراوح عدد الحزم من 4 حزم كأقل عدد مع المرئسة (ISSR8) وعشرون حزمة كأعلى عدد مع المرئسة (ISSR 9)، بمتوسط قدره 8.25 حزمة لكل مرئسة والشكل (1) يبين نماذج التحام المرئسات ISSR1-ISSR6-ISSR7-ISSR9 مع الدنا الفطري لعينات التفحم المدروسة.

إن المرئسات التي تعطي أعلى عدد من الحزم ذات دلالة أكبر على التنوع الوراثي مقارنة مع المرئسات التي أعطت أقل عدد من الحزم وكانت النسبة المئوية للتعددية الشكلية الأقل 80% مع المرئسات (ISSR4, ISSR18)، تلتها النسبة المئوية للتعددية الشكلية مع المرئسة (ISSR 10) بمقدار 83.3% وكانت النسبة الأكبر مع بقية المرئسات حيث كانت 100 % وبلغ متوسط النسبة المئوية للتعددية الشكلية 95.25 % حيث تدل النسبة العالية للتعددية الشكلية على فعالية تقنية ISSR في كشف التباينات الشكلية بين الأنواع المدروسة، وتراوحت قيمة PIC ما بين 0.25 و0.42 حيث أن قيمتها تعبر عن قدرة الواسم (Marker) على كشف التعددية الشكلية وبالتالي له أهمية في انتقاء الواسمات الجزيئية المناسبة للدراسات الجزيئية ولأن تقنية ISSR تعتبر من الواسمات الجزيئية ذات السيادة (Dominant Molecular Marker) فإن قيمته تتراوح بين 0 و 0.50 وتعتبر قيمته عالية إذا كانت بين 0.30 و0.40 وعالية جداً إذا كانت بين 0.40 و 0.50 (Lemos *et al.*, 2019).



الشكل (1): نتائج التحام المرئسات ISSR1-ISSR6-ISSR9-ISSR7 مع المادة الوراثية لعزلات الفطر Sporisorium من أنواع نباتية من الجنس Sorghum تم فصلها كهربائياً على هلامة أغاروز 1.8%. M= سلم معياري جزيئي لـ DNA (100-3000 bp).

وقد حصل **Li** وآخرون عام (2021) على نسبة عالية من التعددية الشكلية وقدرها 97.83 % وذلك عند تطبيق 9 مرئسات من نوع **ISSR** على 39 عزلة من الفطر المسبب للتفحم الرأسي على نباتات الذرة الصفراء **Sporisorium reilianum f. sp. zeae** من أربعة مواقع مختلفة وأساسية لزراعة الذرة الصفراء في مقاطعة شانشي في الصين، بينما حصل **Zhang** وآخرون عام (2010) على نسبة أقل من التعددية الشكلية وكانت 84.7% باستخدام تقنية **ISSR** لكشف التباينات الوراثية بين عزلات نفس النوع الفطري من عدة مناطق لزراعة الذرة الصفراء في الصين، وفي عام 2014 حصل **Xu** وآخرون على نتائج مقاربة عند دراسة التنوع الوراثي لعزلات من الفطر المسبب لتفحم قصب السكر **Sporisorium scitamineum** باستخدام تقنية **ISSR** حيث كانت النسبة المئوية للتعددية الشكلية 86.8%، وعند تكرار الدراسة عام (2017) على عزلات وحيدة البوغ من السبوريدات للفطر نفسه وباستخدام نفس التقنية **ISSR** كانت النسبة التي حصل عليها **Xu** وآخرون أقل وقدرها 71% وقد عزى ذلك إلى استخدامه لعزلات من سبوريدات الفطر المنفردة التي تتميز بكونها نصفية الصيغة الصبغية **haploid** أما في الدراسة التي سبقتها أخذت عزلات الفطر من الأبواغ التيلية ثنائية الصيغة الصبغية (**diploid spores**).

كذلك أثبتت تقنية **ISSR** فعاليتها مقارنةً مع تقنية **RAPD** حتى عند استخدامها لكشف التباينات الوراثية لأنواع فطرية أخرى تسبب التفحم حيث كانت النسبة المئوية للتعددية الشكلية التي أعطتها مرئسات **ISSR** عالية وأكبر مقارنة مع مرئسات **RAPD** وقدرها 98.4% وذلك في الدراسة التي أجراها **Parveen** وآخرون عام (2013) والتي هدفت لدراسة التباينات الوراثية لعزلات الفطر **T.indica** المسبب للتفحم المغطى النتن على القمح، كذلك عند استخدامها لدراسة التباينات الوراثية لأنواع فطرية أخرى مثل **Fusarium** فقد أعطت تعددية شكلية قدرها 88.7% وكانت أعلى مقارنةً مع **RAPD** (**Baysal *et al*., 2013**).

الجدول (3): مصفوفة التشابه لمعامل Nie's coefficient بتطبيق طريقة متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة (UPGMA)

	MS	BM	SS	A19	A20	LS	LM
MS	****	0.6364	0.5657	0.5859	0.3737	0.4646	0.5152
BM		****	0.5859	0.5859	0.6162	0.5051	0.5354
SS			****	0.4949	0.5051	0.4343	0.3434
A19				****	0.6667	0.5758	0.5657
A20					****	0.6263	0.6162
LS						****	0.7273
LM							****

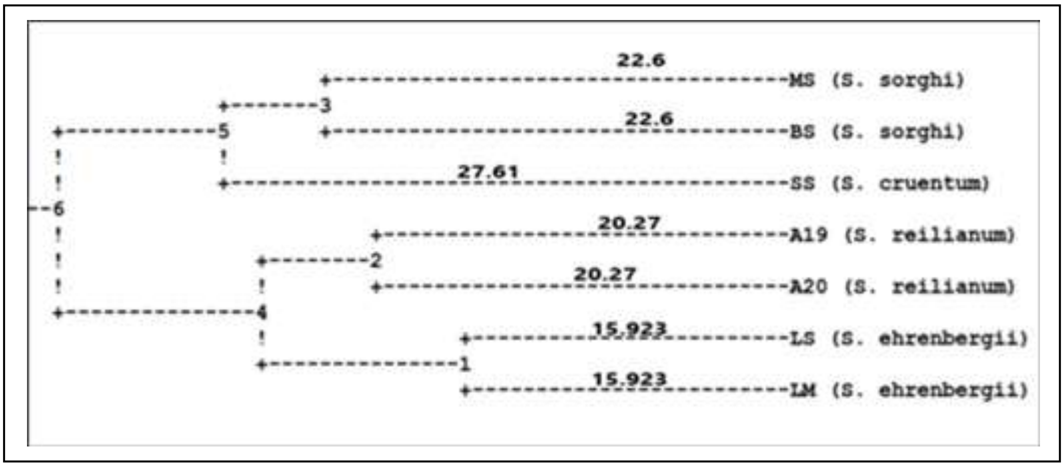
2- تحديد درجة القرابة الوراثية بين أنواع تفحمات الذرة البيضاء المدروسة:

تم دراسة العلاقة الوراثية بين أنواع تفحمات الذرة البيضاء في هذه الدراسة بتطبيق مصفوفة التشابه **Similarity Matrix** لمعامل **Nies Coefficient** (**Nei,1973**)، ويبين الجدول (3) أن أعلى قيمة للتشابه بلغت (0.73) بين عينتي التفحم الطويل (**LS, LM**) وهذا يدل على أنهما على درجة كبيرة من القرابة الوراثية تلاهما عينتي التفحم الرأسي (**A19, A20**) بنسبة تشابه (0.67) ومن ثم

العينتين (**MS, BM**) للتفحم المغطى بنسبة (0.64) وكانت أقل نسبة تشابه بين العينتين (**SS, A19**) بمقدار (0.495) مما يدل على وجود تباين وراثي بينهما.

لقد أشار **Stoll** وآخرون عام (2003) أن النوعين **S.cruentum** و **S.sorghi** على وجه الخصوص متشابهين فيما يتعلق بالخصائص الشكلية والتفضيل العائلي وعلى درجة قرابة وراثية كبيرة حسب التحليل المعتمد على تسلسل منطقة الفواصل الداخلية المنسوخة **Internal Transcribed Space** (**ITS**)، وكذلك عند تحليل القرابة الوراثية بحسب تسلسل منطقة (**LSU-rDNA**) **Nuclear Large Subunit ribosomal DNA** (**Piepenbring *et al*., 2002**).

بينما كان الاختلاف الوراثي بين النوع **S. reilianum** وكل من النوعين **S.cruentum** و **S.sorghi** واضحاً حسب التحليل المعتمد على تسلسل **ITS** (**Stoll et al., 2003**).



الشكل (2): مخطط شجرة القرابة الوراثية للتحليل العنقودي للأنواع الفطرية المدروسة باستخدام تقنية ISSR.

3- التحليل العنقودي:

انقسمت شجرة القرابة الوراثية الناتجة عن تقنية **ISSR** إلى مجموعتين رئيسيتين على درجة قرابة وراثية (0،286) حيث باعدت بين المجموعة الأولى المتضمنة عينات نوعي التفحم الطويل والرأسي، والمجموعة الثانية المتضمنة عينات التفحم المغطى والسائب، وبدورها انقسمت المجموعة الأولى إلى تحت مجموعتين الأولى فيها عينتي التفحم الطويل بمسافة وراثية بلغت (15،932) والثانية تضم عينتي التفحم الرأسي بمسافة وراثية بلغت (27،61) وكذلك انقسمت المجموعة الثانية إلى تحت مجموعتين الأولى تضم عينتي التفحم المغطى بمسافة وراثية بلغت (22،6) بينما انفردت عينة التفحم السائب لوحدها ضمن المجموعة الثانية بمسافة وراثية مقدارها (27،61).

إن التحليل العنقودي يسمح بتقسيم العينات المدروسة ضمن مجموعات تعكس درجة القرابة الوراثية فيما بينها، فقد تتجمع العينات ضمن مجموعة واحدة بناءً على موطنها الأصلي أو بناءً على أصلها ونسبها، وقد أظهرت شجرة القرابة الوراثية في هذه الدراسة أن عينات النوع نفسه تجمعت معاً حتى لو أُخذت من أنواع عوائل نباتية مختلفة كما وجد Xu وآخرون (2014، 2017) عند دراسة التنوع الوراثي لعينات من الفطر S. scitamineum المسببة لتفحم قصب السكر باستخدام تقنية ISSR أن الارتباط بين توزع

العينات ضمن مجموعات شجرة القرابة الوراثية ومناطقها الجغرافية أو البيئية كان معنوياً، بينما لم يكن هذا الارتباط واضحاً مع البيئة أو حتى النمط الممرض عند تطبيق تقنية ISSR على عزلات من الفطر S. reilianum من نباتات الذرة الصفراء المصابة بالتفحم الرأسي (Zhang et al., 2010; Li et al., 2021) وقد يعود هذا الاختلاف في النتائج كما عزاه الباحثون إلى أنه ربما قد تم إنتاج أنماط مرضية مختلفة من الفطر الممرض متميزة عن بقية الأنماط الموجودة في المنطقة المدروسة (Li et al., 2021).

الاستنتاجات:

أظهرت هذه الدراسة كفاءة تقنية ISSR في إظهار التباينات الوراثية ما بين عزلات أنواع فطريات التفحم المدروسة والتي عزلت من نباتات الذرة البيضاء المصابة حيث أعطت نسبة عالية من التعددية الشكلية قدرها 95.25% وقد تجمعت عزلات النوع نفسه حتى لو أُخذت من عوائل نباتية مختلفة حيث باعدت شجرة القرابة الوراثية بين مجموعتين أساسيتين الأولى ضمت عينات نوعي التفحم المغطى والسائب بينما ضمت الثانية عينات التفحم الطويل والرأسي، تدخل المعلومات التي قدمتها هذه الدراسة ضمن سياق دراسة مسببات التفحم على الذرة البيضاء على المستوى الجزيئي كخطوة هامة للتعرف على سلالات الأنواع الموجودة في المنطقة وفيما لو وجدت أنماط ممرضة ذات شراسة أكبر أو أي أصناف نباتية تملك صفات مقاومة للإصابة وبالتالي اتخاذ اجراءات وقائية مناسبة لمنع حدوث الإصابة، مع العمل لاحقاً على عزلات من مناطق مختلفة والتركيز على التفحم المغطى بسبب قلة الدراسات الجزئية عن هذا الفطر.

References:

1. التقرير الوطني عن التنوع البيولوجي للموارد الوراثية للأغذية والزراعة بدولة الجمهورية العربية السورية. (2016). الهيئة العامة للبحوث الزراعية، وزارة الزراعة، وزارة البيئة والإدارة المحلية، وزارة التعليم العالي، المركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة، وهيئة الطاقة الذرية. سورية. 209.
2. غانم، ردينا أحمد؛ جودة، توفيق فضول؛ ومحمد، فواز العظمة. (قيد النشر). عزل وتوصيف الفطريات المسببة لأمراض التفحم على الذرة البيضاء وتقييم قابلية بعض الطرز الوراثية المدخلة والمزروعة للإصابة. مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية. (قيد النشر).
3. فضول، جودة توفيق، ونفاع، وليد غازي. (2006). المرجع في علم الفطريات (**Mycology**). منشورات جامعة دمشق، كلية الهندسة الزراعية. 1044.
4. Anitha, K., Das, I.K., Holajjer, P., Sivaraj, N., Reddy, C.R., and Balijepalli, S.B. (2020). Sorghum Diseases: Diagnosis and Management. In: Tonapi, V.A., Talwar, H.S., Are, A.K., Bhat, B.V., Reddy, C.R., Dalton, T.J. (eds) Sorghum in the 21st Century: Food – Fodder – Feed – Fuel for a Rapidly Changing World. Springer, Singapore. pp 565–619.
5. Ashok, K. A., (2019). Sorghum hybrids development for important traits: progress and way forward. In L. A. clampitti and P. V. Varaprasad, (Eds.) Sorghum: state of the art and future perspectives. (pp. 97-117). ASA, CSSA, SSSA.
6. Baysal, Ö., Karaaslanb, C., Siragusac, M., Alessandrod, R., Carimic, F., De Pasqualec, F., and da Silvae, J. A. T. (2013). Molecular markers reflect differentiation of Fusarium oxysporum forma speciales on tomato and forma on eggplant. Biochemical Systematics and Ecology, 47: 139-147.
7. Cai, L., Giraud, T., Zhang, N., Begerow, D., Cai, D., Shivas, R.G. (2011). The evolution of species concepts and species recognition criteria in plant pathogenic fungi. Fungal Diversity 50: 12.
8. Capote, N., Pastrana, A. M., Aguado, A., and Sánchez-Torres, P. (2012). Molecular Tools for Detection of Plant Pathogenic Fungi and Fungicide Resistance. Dr. Christian Joseph Cumagun (Ed.). Plant Pathology, ISBN: 978-953-51-0489-6, InTech, 362:151-202.
9. Das, L. K. (2017). Millet diseases: Current status and their management. In J. V. Patil. Millets and Sorghum: Biology and genetic improvement first edition. Published 2017 by John Wiley & Sone Ltd. Pp. 291-322.
10. Gao, L., Yu, H., Han, W., Gao, F., Liu, T. G., Liu, B., Kang, X., Gao, J., and Chen, W. (2014). Development of a SCAR marker for molecular detection and diagnosis of Tilletia controversa Kuhn, the causal fungus of wheat dwarf bunt. World journal of microbiology & biotechnology. 30:3185–3195.
11. Idrees, M., and Irshad, M. (2014). Molecular Markers in Plant for Genetic Diversity: A Review. European Academic Research. 2(1):1513-1540.
12. Karwasara, S. S., Mukherjee, A. K., Swain, S. C., Mohapatra, T., and Sharma, R. P. (2002). Evaluation of RAPD, ISSR and AFLP Markers for Characterization of the Loose Smut Fungus Ustilago tritici. J. Plant Biochemistry & Biotechnology. 11:99-103.

13. Kutama, A.S., Aliyu, B.S., and A.M., Emechebe. (2011). Screening of sorghum genotypes for resistance to loose smut in Nigeria. BAJOPAS. 4(2):199-203.
14. Lemos, S. C. M., Lia Rejane Silveira, R., Karol Buuron, S., Silvia Machado dos Santos, R., and Charlene Moro, S. (2019). Determining the Polymorphism Information Content of a Molecular Marker, Gene. doi: https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.144175.
15. Li, X. F., Jiang, X. d., Feng, Z., Wang, W. Z., Yu, T. C., and Wang, J. M. (2021). Analysis of genetic diversity of Sporisorium reilianum f. sp. Zeae ISSR in Sganxi province. Journal of Agricultureal Biotechnology. 29(5):973-984.
16. Louis, K.P., Ndiaga, C., and Ndoye, O. (2007). Assessing the vulnerability of selected sorghum line from the united states of America to long smut (Soroposporium ehrenberghii Vanky). Crop Protection, 26:1771-1776.
17. Lumbsch, H. T., Buchanan, P. K., May, T. W., and Mueller, G. M. (2008). Phylogeography and biogeography of fungi. Mycol. Res. 112: 423–424.
18. McCartney, H. A., Foster, S. J., Fraaije, B. A., and Ward, E. (2003). Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. Pest Management Science. 59(2):129-142.
19. McDonald, B. A., and Linde, C. (2002). Pathogen population genetics, evolutionary potential and durable resistance. Annu. Rev. Phytopathol. 40:349-379.
20. Moharam, M. H. A., Stephan, D., and Koch, E. (2018). Evaluation of plant-derived preparations and microorganisms as seed treatments for control of covered kernel smut of sorghum (Sporisorium sorghi). J. Plant Dis. Prot. 125: 159–166.
21. Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 70: 3321–3323.
22. Oh, B. J., Frederiksen, R. A., and Magill, C. W. (1994). Identification of molecular markers linked to head smut resistance gene (shn) in sorghum by RFLP and RAPD analyses. Phytopathology. 84:830-833.
23. Oliveira, M., and Azevedo, L. (2022). Molecular Markers: An Overview of Data Published for Fungi Over the last Ten Years. J. Fungi. 8,803: pp. 12.
24. Parveen, S., Saharan, M. S., Verma, A., and Sharma, I. (2013). Comparative analysis of RAPD and ISSR marker assays for detecting genetic polymorphism in Tilletia indica. European Journal of Experimental Biology. 3(1):380-387.
25. Piepenbring, M., Stoll, M., and Oberwinkler, F. (2002). The genetic position of Ustilago maydis, Ustilago scitaminea, and Ustilago esculenta (Ustilaginales). Mycological progress.1:71-80.
26. Prom, L.K., R. Perumal, N. Cisse and Little, C. (2014). Evaluation of selected sorghum lines and hybrids for resistance to grain mold and long smut fungi in Senegal, West Africa. Plant Health Progr., 15: 74-77.

27. Reddy, P. S. (2017). Sorghum, Sorghum bicolor (L.) Moench. In J. V. Patil. Millets and Sorghum: Biology and Genetic Improvement, first edition. Published 2017 by John Wiley & Sone Ltd. pP:1-48.
28. Roldan-Ruiz, I., Dendauw, J., Van Bockstaele, E., Depicker, A., and De Loose, M. (2000). AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (Lolium spp.). Molecular Breeding. 6: 125-134.
29. Sambrook, J., Fritschi E. F., and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
30. Shen, W. K., Xi, P. G., Li, M. H., Liu, R., Sun, L. H., Jiang, Z.D., and Zhang, L.H. (2012). Genetic diversity of Sporisorium scitamineum in Southern China revealed by combined ISSR and RAPD analysis. Afr. J. Biotechnol. 11:11693-11703
31. Shen, W. K., Deng, H. H., Li, Q. W., Yang, Z. D., Jiang, Z. D. (2014). Evaluation of BC1 and BC2 from the crossing Erianthus arundinaceus with Saccharum for resistance to sugarcane smut caused by Sporisorium scitamineum. Trop. Plant Pathol. 39:368-373.
32. Stoll, M., Piepenbring, M., Begerow, D., Oberwinkler, F. (2003). Molecular phylogeny of Ustilago and Sporisorium species (Basidiomycota, Ustilaginales) based on Internal Transcribed Spacer (ITS) sequences. Canadian Journal of Botany. 81(9):976-984.
33. Thakur, R.P., Gunjotikar, G.A., and Rao, V.P. (2010). Safe Movement of ICRISAT's Seed Crops Germplasm. Information Bulletin no. 81. Patancheru 502 324, Andhra Pradesh, India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. 244 pp.
34. Toh, S.S., Perlin, M.H. (2016). Resurgence of Less-Studied Smut Fungi as Models of Phytopathogenesis in the Omics Age. Phytopathology. 106(11):1244-1254.
35. Vaheeduddin, S. (1942). The Pathogenicity and genetics of some sorghum smuts. University of Minnesota. Minnesota Agricultural Experiment station. Retrieved from the University of Minnesota Digital Conservancy.
36. Vánky, K. and M., Abbasi. (2013). Smut fungi of Iran. Mycosphere .4(3): 363–454.
37. Xu, L. P., Lu, Y.H., You, Q., Liu, X. L., Grisham, M. P., Pan, Y. B., and Que, Y. X. (2014). Biogeographical variation and population genetic structure of Sporisorium scitamineum in Mainland China: insights from ISSR and SP-SRAP markers. Sci. World J. Article. ID 296020, pP.13.
38. Xu, G. H., Deng, Q. G., Shen, W. K., Chen, S., and Wu, X. M. (2017). Assessment of genetic diversity and structure of Sporisorium scitamineum from China using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. African Journal of Biotechnology. 16(14):727-737.
39. Yao, Z., Qin, D., Chen, D., Liu, C., Chen, W., Liu, T., Liu, B., Gao, L. (2019). Development of ISSR-derived SCAR Marker and SYBR Green I Real-time PCR Method for Detection of Teliospores of Tilletia laevis Kühn. Sci Rep. 9(1):17651.
40. Yeh, F. C., Yang, R.C., Boyle, T., Ye, Z. H., and Mao, J. X. (1997). PopGene, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.

41. Zhang, X., Gao, Z. G., Zhuang, J. H., Zhao, H., Zhao, B., and Sui, H. (2010). Genetic diversity of Sporisorium reilianum by UP-PCR, ISSR and AFLP analysis. Acta Phytophylacica Sinica. 37(3):241-248.
42. Zietkiewicz, E., Rafalski, A., and Labuda, D. (1994). Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)- anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics. 20:176-183.
43. Zuther, K., Kahnt, J., Utermark, J., Imkampe, J., Uhse, S., and Schirawski, J. (2012). Host Specificity of Sporisorium reilianum Is Tightly Linked to Generation of the Phytoalexin Luteolinidin by Sorghum bicolor. MPMI. 25(9): 1230–1237.