



التعريف الشكلي والجزيئي لفطر العفن الرمادي *Botrytis cinerea* المعزول محلياً من ثمار الفرايز

Morphological and Molecular Identification of *Botrytis cinerea* the Causal Agent of Gray Mold Isolated from Strawberry Fruits

ياسر عقيد⁽¹⁾ د. فائزة الأطرش⁽¹⁾ د. وليد نفاع⁽²⁾
Y. Akeed⁽¹⁾ F. Atrash⁽¹⁾ W. Naffaa⁽²⁾

(1) قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.
(1) Department of Plant Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.
(2) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.
(2) Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria.

walid1851966@yahoo.com

الملخص

يُعد فطر العفن الرمادي *Botrytis cinerea* واحداً من العوامل الممرضة للنباتات ذات الأهمية الاقتصادية، إذ يستطيع إصابة أكثر من 200 نوع في الحقل والزراعة المحمية والمخازن. تم جمع ثمار فرايز مصابة بالعفن الرمادي من السوق المحلية في دمشق (سورية) في شهر نيسان (أبريل) من عام 2015، بهدف عزل وتعريف الفطر *Botrytis cinerea*، ونفذت الدراسة في الفترة الممتدة من تاريخ جمع العينات في عام 2015 إلى شهر حزيران (يونيو) من عام 2016 في مخابر قسم علم الحياة النباتية في كلية العلوم بجامعة دمشق (سورية).
اعتمد التعريف الشكلي على صفات المزرعة الفطرية، وشكل الحوامل الكونيدية، وأبعاد الأبواغ الكونيدية، وتشكيل الأجسام الحجرية. أظهرت النتائج تباين عزلات الفطر في النمو على الوسط المغذي PDA، وكانت حوامل الأبواغ الكونيدية مستقيمة أو منحنية قليلاً، ومقسمة ومتفرعة عند القمة بشكل شجري، وتراوحت أبعاد الأبواغ الكونيدية بين 8.2 و 10 μm عرضاً و 9 إلى 15 μm طولاً، كما لوحظ تشكل الأجسام الحجرية بعد 30 يوماً من النمو على الوسط PDA بشكل حلقة على طول حافة طبق الزرع. تم تأكيد تصنيف الفطر بتقانة الـ PCR باستخدام زوج من البادئات C729+ و C729-، إذ أظهرت النتائج وجود حزمة بطول 700 bp، وهذا يتوافق مع التوصيف الجزيئي للفطر *Botrytis cinerea*. كما أظهرت بيانات السلسلة لشدة الدنا DNA المضخمة أن الشبيه الأقرب جينياً لعزلة الفطر النوع *Botrytis cinerea* بنسبة تشابه بلغت 99%.

الكلمات المفتاحية: *Botrytis cinerea*، العفن الرمادي، تعريف شكلي، تعريف جزيئي.

Abstract

Botrytis cinerea is an economically important plant pathogen that infects more than 200 plant species in the field, greenhouses and storage. Some strawberry fruits infected by gray mold were collected from local markets in Damascus in April 2015 for isolation and identification *Botrytis cinerea*. The study was carried out in the period from the date of sample collection in April 2015 to June 2016 in the laboratories of the department of plant biology in the Faculty of Science at the University of Damascus (syria). The pathogen was isolated on PDA, and morphologically identified basing on the colony morphology, conidiophore shape, conidia size and sclerotia formation. The results showed that

©2019 The Arab Center for the Studies of Arid Zones and Dry Lands, All rights reserved. ISSN:2305 - 5243 ; AIF-177 (p. 47 - 56)

the fungal growth on PDA was in many patterns. The conidiophores were more or less straight, septate and branched at the apex. Sizes of the conidia were 8.2 - 10 X 9 - 15 µm. The sclerotia were observed on 30 days old colonies as ring along the edge of the Petri dish. Pathogen taxonomy was further confirmed by PCR using two specific primers, C729+/C729-. Results indicated that the isolates were *Botrytis cinerea* as they produce bands of 700 bp. The closet phylogenetic neighbor according to this DNA fragment sequence data was *Botrytis cinerea* with 99% of similarity.

Keywords: *Botrytis cinerea*, Gray mold, Morphology, Molecular identification.

المقدمة

تعد الفطريات من الجنس *Botrytis* من أهم المسببات المرضية للكثير من النباتات والمحاصيل الاقتصادية المهمة مثل العنب والبندورة وأزهار النباتات البصلية، ونباتات الزينة (Jarvis، 1977؛ Edwards و Seddon، 2001؛ Ana و زملاؤه، 2015). تسبب فطريات الجنس *Botrytis* بشكل رئيس تعفنًا للأزهار والثمار والأبصال، وذلك في الحقل أو أثناء التخزين، ولكنها يمكن أن تسبب أيضاً تبغعات مختلفة على الأوراق. تتصف أنواع الجنس *Botrytis* بأنها متطفلة اختيارية، إذ تسهم في موت الخلايا مما يؤدي إلى تحلل تدريجي للنسيج النباتي المصاب. ينتج الفطر الممرض مشيجةً رماديةً متبوغةً بغزارة على النسيج المصاب، ويمكن للأبواغ الكونيدية الانتقال لمسافات بعيدة عن طريق الهواء، وتحافظ أنواع الجنس *Botrytis* على حياتها خلال فصل الشتاء في التربة على شكل مشيجة في بقايا النباتات المتحللة، أو على شكل أجسام حجرية Sclerotia (Staats و زملاؤه، 2005). يضم الجنس *Botrytis* والشكل الجنسي منه (*Botryotinia Whetzel*) 22 نوعاً وهجيناً واحداً (Hennebert، 1973؛ Yohalem و زملاؤه، 2003). يتم عادة تعريف الأنواع اعتماداً على الصفات الشكلية، وبشكل خاص على تشكيل الأبواغ الكونيدية الكبيرة (Macroconidia)، وقد سميت الأنواع اعتماداً على العائل النباتي. تملك معظم الأنواع انتشاراً واسعاً في العالم ويمكن أن تصادف حيثما زُرعت محاصيلها المضيئة (Jarvis، 1977). يضم الجنس *Botrytis* واحداً من أهم الأنواع وأكثرها انتشاراً وهو النوع *Botrytis cinerea*، الذي يعد واحداً من أهم المسببات المرضية للعديد من النباتات ذات الأهمية الاقتصادية، إذ يمكنه إصابة أكثر من 200 نوع من النباتات ثنائية الفلقة، ولاسيما النباتات المتقدمة في العمر أو الضعيفة، أو المتعرضة لجروح، وذلك في الحقل وفي الزراعة المحمية وفي غرف التخزين (MacFarlane، 1968؛ Jarvis، 1980؛ Holz و زملاؤه، 2004)، إذ يسبب أضراراً كبيرة وخسائر اقتصادية هائلة في الإنتاج، ولاسيما لخضروات الزراعة المحمية. يُعد الفطر *Botrytis cinerea* فطراً طفيلياً، والعائل الرئيس له هو نبات العنب، ويدعى عادة العفن الرمادي (Gray mold)، ويتصف هذا النوع بتشكيله أبواغاً كونيدية غزيرة تميل إلى اللون الرمادي وتكون حواملها متفرعة بشكل شجري، وينتج على الأوساط المغذية أجساماً حجرية تثبت عندما تصبح الظروف ملائمةً لتعطي مشيجةً تتشكل عليها أبواغ كونيدية جديدة. تنتشر الأبواغ الكونيدية بواسطة الهواء ومياه الأمطار لتحديث إصابات جديدة. يمكن لهذا الفطر إصابة النبات في أي مرحلة من مراحل تطوره، وعلى أي جزء منه الأوراق والثمار والأزهار ومعلق الأوراق (*Vasilica* و زملاؤه، 2012). ومن النباتات التي يصيبها هذا الفطر نبات الفريز (*Strawbery*)، إذ يمكن لمرض العفن الرمادي أن يسبب خسائر كبيرة واسعة الانتشار في ثمار الفريز قبل وبعد الحصاد، وقد قُدرت الخسائر التي يمكن أن يسببها هذا المرض بنحو 25% من الإنتاج إن لم تتخذ الإجراءات الوقائية الكافية لحمايته من الإصابة (Williamson و زملاؤه، 2007؛ Zhang و زملاؤه، 2007). كما يُعد العفن الرمادي المسبب الرئيس للخسائر التي تتبع عملية الحصاد لثمار الفريز أثناء النقل والتخزين، ويمكن للفطر *Botrytis cinerea* أيضاً إصابة أزهار الفريز وأوراقه (Peng و Sutton، 1993). يمكن أن تحدث الإصابة على الأزهار، وتبقى كامنةً حتى تتضج الثمار، وعندها تتطور سريعاً مسببةً تحلل الثمار مع تبوغ غزير للفطر (Kovach و زملاؤه، 2000). لذلك تعد الإصابة بالفطر *Botrytis cinerea* عاملاً محدداً مهماً لعمر ثمار الفريز ما بعد الحصاد. ونظراً للأهمية الكبيرة للجنس *Botrytis* فإنه كان موضوعاً لدراسات متعددة بما فيها دراسات تصنيفية وبيولوجية بيئية، وبيولوجية جزيئية، وأيضاً دراسات متعلقة بوقاية ومكافحة الأمراض التي تصادف في العديد من النباتات المضيئة (Elad و زملاؤه، 2007). بالرغم من أن تصنيف أنواع الجنس *Botrytis* يعتمد بشكل كبير على الصفات الشكلية (Hennebert، 1973)، إلا أن العديد من أنواع هذا الجنس متشابهة شكلياً وتتأثر بشكل كبير بظروف استنباتها (Domsch و زملاؤه، 2007). وقد أظهرت العديد من الدراسات وجود تنوع شكلي كبير بين عزلات الفطر *Botrytis cinerea* (Grindle، 1979؛ Kerssies و زملاؤه، 1997؛ Chardonnet و زملاؤه، 2000)، وبالتالي فإن طرائق التصنيف التي تعتمد على الخصائص الشكلية والحيوية فقط لها مساوئ عديدة، إذ يمكن أن يحدث تغير شكلي أو حيوي في النوع الواحد، كما أنها تستغرق وقتاً طويلاً وتتطلب مهارة وخبرة كبيرة. أما طرائق التعريف الجزيئية التي تعتمد على تحليل الـ DNA فإنها تُعد أكثر سرعةً ودقةً في التصنيف، لذلك استُعملت على نطاق واسع (Li و زملاؤه، 2007). وقد سجل عدد من الباحثين استخدام بادئات نوعية لتصنيف أنواع الجنس *Botrytis* (Rigotti و زملاؤه، 2002؛ Staats و زملاؤه، 2005؛ Khazaeli و زملاؤه، 2010). الهدف من الدراسة: عزل الفطر *Botrytis cinerea* من ثمار الفريز المصابة بالعفن الرمادي وتعيينه شكلياً وجزيئياً.

مواد البحث وطرائقه

عزل الفطر المسبب للعفن الرمادي على الفريز:

تم عزل الفطر من ثمار الفريز المجموعة من السوق المحلية في مدينة دمشق (سورية) والتي ظهرت عليها أعراض الإصابة بالعفن الرمادي، وذلك في شهر نيسان (أبريل) عام 2015، حيث أخذ جزء من مشيجة الفطر النامية على الثمار المصابة، ووضع على وسط آغار البطاطا PDA (Agar Dextrose Potato)، ثم حُضنت الأطباق عند درجة حرارة 25 °م، وبعد نمو المشيجة وتشكل الأبواغ الكونيدية، تمت التنقية بطريقة البوغ المفرد (Khazaeli وزملاؤه، 2010)، إذ جُمعت الأبواغ الكونيدية باستعمال الماء الببتوني (كلوريد الصوديوم NaCl 5 %، وبيتون Peptone 3 %، وتريتون Tritone_{x100} 0.1 %)، ووضعت في أنبوب معقم. جرى تحضير تخفيفات من المعلق البوغي، وزُرعت على أطباق بتري 9 سم تحتوي على وسط الآغار المائي Water agar (ماء مقطر مع آغار بنسبة 2 %)، وحُضنت عند درجة حرارة 25 °م لمدة 5 أيام للحصول على عزلة نقية للفطر مصدرها بوغ واحد. حُفظت عزلة الفطر بعد التنقية على وسط PDA مائل عند الدرجة 4 °م.

التعريف الشكلي:

تمت دراسة صفات المزرعة الفطرية على الوسط المغذي PDA من حيث شكل ولون المزرعة الفطرية، وتتبع نمو وتطور مستعمرة الفطر على وسط انتقائي للفطر *Botrytis cinerea* (BSM) حسب Seddon و Edwards (2001) مع بعض التعديل، ويتكون هذا الوسط بعد التعديل من (غ/ل): غلوكوز 2 غ، NaNO₃ 0.1 غ، K₂HPO₄ 0.1 غ، MgSO₄.7H₂O 0.2 غ، KCl 0.1 غ، كلورامفينيكول (Chloramphenicol) 0.2 غ، ملون Rose Bengal 0.05 غ، حمض التانيك Tannic acid 5 غ، آغار 20 غ. وضبط الرقم الهيدروجيني pH على الدرجة 4.5 باستعمال محلول NaOH 1 نظامي، وجرى التعقيم بوساطة الأتوغلاف. جرى قياس أبعاد الأبواغ الكونيدية المنتجة من الفطر من خلال أخذ طول وعرض 30 بوغاً كونيدياً باستعمال المجهر الضوئي. كما تمت دراسة بنية الحوامل والأبواغ الكونيدية باستعمال المجهر الإلكتروني الماسح بعد تحضير العينات على سطح حامل من الألمنيوم، وذلك من مزارع فطرية بعمر يتراوح بين 20 و30 يوماً. كما تمت دراسة الأجسام الحجرية على الوسط PDA، وذلك من حيث لون وشكل وطريقة انتشار الأجسام الحجرية.

التعريف الجزيئي:

الحصول على مشيجة الفطر:

تمت زراعة الفطر على وسط البطاطا السائل PDB (Potato Dextrose Broth) في دوارق مخروطية حجمها 250 مل تحتوي على 50 مل من الوسط، حيث لقع الوسط بحجم 200 µل من المعلق البوغي للفطر، وحضنت دون تحريك عند الدرجة 22 °م بشروط إضاءة متناوبة (12 ساعة إضاءة، و12 ساعة ظلام) لمدة 12 يوماً (Khazaeli وزملاؤه، 2010)، ثم نُقلت مشيجة الفطر النامية على سطح الوسط إلى أنبوب 50 مل وأجري التنشيل (10000 دورة/الدقيقة لمدة 10 دقائق)، ثم تم التخلص من الطائفي، وغُسلت المشيجة بالماء المقطر للتخلص من بقايا وسط الزرع، وحُفظت بالأزوت السائل لحين الاستخدام.

استخلاص الدنا DNA الجينومي للفطر:

سُحقت مشيجة الفطر المحفوظة في الأزوت السائل، ثم تم استخلاص الـ DNA الجينومي من 200 ملغ من مسحوق المشيجة، وذلك باستعمال طقم عزل الـ DNA من شركة Qiagen (DNeasy Plant Mini Kit) المخصص لعزل الـ DNA من خلايا الفطور وفق التعليمات المرفقة بالطقم.

التفاعل التسلسلي البوليميرازي PCR:

تم التضخيم في مزيج تفاعل حجمه 25 µل مكون من: 10 µل من المزيج Hotstar Taq Master Mix المصنع من شركة Qiagen، والحاوي على Hotstar Taq بوليميراز والنكليوتيدات الأربعة ثلاثية الفوسفات منزوعة الأكسجين dNTPs، والمحلل الموقى الخاص بتفاعل التضخيم PCR مع 3M من MgCl₂، و 2 µل من الـ DNA الجينومي (100 ng/µل)، و 11 µل من الماء المقطر المعقم و 1 µل من كل بادئة 10 µM. ويوضح الجدول 1 تسلسل البادئات المستعملة C729+ و C729- (من شركة Vivantis).

الجدول 1. التسلسل النكليوتيدي للبادئات المستخدمة في الدراسة.

البادئة	التسلسل
C729+	5'-AGCTCGAGAGAGATCTCTGA-3'
C729-	5'-CTGCAATGTTCTGCGTGGAA-3'

تم تفاعل التضخيم PCR باستعمال جهاز التضخيم PCR من شركة Techne (Techne TC-412) وفق البرنامج التالي: دورة واحدة لمدة 2 دقيقة عند درجة حرارة 94 °م، و 35 دورة كل منها 45 ثانية عند درجة حرارة 94 °م لفصل سلاسل الـ DNA، و 50 ثانية عند درجة حرارة 50 °م لتشفيع البادئات، ثم 50 ثانية عند درجة حرارة 72 °م، وأخيراً دورة واحدة لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة 72 °م لاستطالة السلاسل. تم ترحيل منتجات تفاعل الـ PCR على هلامة الأغاروز 1.5 %.

الرحلان الكهربائي:

تم تحضير هلامة من الأغاروز بتركيز 1.5 % في محلول موقفي من TAE 1X (المكون من: mM 40 Tris pH7.6، وحمض الخل 20 mM، و EDTA 1 mM)، وأضيف إليها محلول بروم الإيثيديوم برومايد Ethidium bromide تركيز 5 µg/ml، ثم وضعت برفق في قالب الرحلان الكهربائي المخصص، ثم وضع المشط المناسب وتُركت حتى تتجمد، ثم سُحِب المشط ووضعت الهلامة داخل حوض الترحيل وُعمرت بدارئة من TAE 1X. وضعت نواتج تفاعل PCR حجم 15 µl ضمن آبار الهلامة (دون مزجها مع دارئة التحميل 6X loading buffer لوجود صبغة مع مزيج التفاعل Hotstar Taq Master Mix)، كما وضع 5 µl من معلم جزيئي معياري (سلم دنا) من شركة Fermentas (1Kb plus) DNA Ladder) لتحديد حجم حزم الـ DNA على الهلامة والتصوير بجهاز الإظهار بالأشعة فوق البنفسجية (Gel Documentation EQ System) من شركة Bio-Rad.

السلسلة Sequencing

تم تحديد تسلسل النكليوتيدات لشدة الـ DNA الناتجة عن تفاعل التضخيم PCR باستعمال المرئستين C729+ و C729- والتي يبلغ طولها 700 نكليوتيداً. إذ تمت ترقية منتج PCR باستعمال الطقم الخاص من شركة Qiagen (Qiagen، Cat. No. 28704)، ثم تم تفاعل السلسلة باستعمال جهاز السلسلة الخاص بالتحليل الجيني من طراز ABI 310 (من شركة Applied Biosystem)، ومن ثم تمت قراءة نتيجة السلسلة باستعمال برنامج Victor NTI 11.5 ومقارنتها باستعمال برنامج BLASTn مع قاعدة البيانات الموجودة في البنك الجيني EMBL\GenBank المتاحة على شبكة الإنترنت في موقع المركز الدولي لمعلومات التقانة الحيوية على الرابط www.ncbi.nlm.nih.gov.

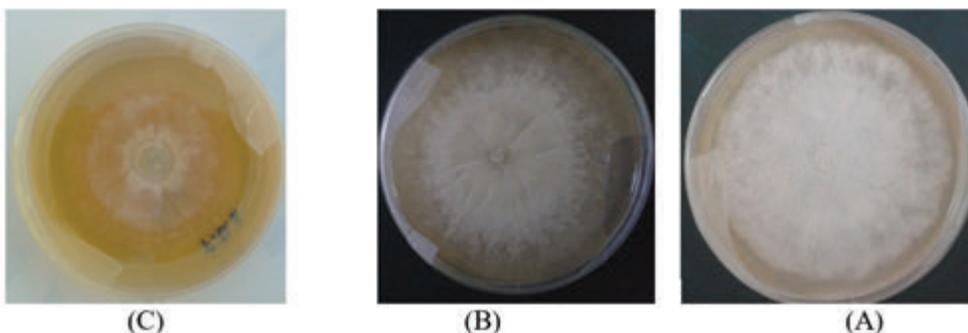
النتائج والمناقشة

عزل فطر العفن الرمادي:

تم الحصول على عزلات نقية من الفطر المسبب للعفن الرمادي على الفريز بعد زراعات متتالية (Subculture) على وسط PDA، وبعد نشر العلق البوغي المخفف على وسط الأغار. ظهرت مزارع فطرية منفصلة عن بعضها بعضاً، إذ جرى تفريدها وعزلها على أطباق زرع PDA جديدة، وبذلك تم الحصول على مزارع للفطر مصدرها بوغ واحد بطريقة فعالة وبسيطة وغير مكلفة (Choi وزملاؤه، 1999).

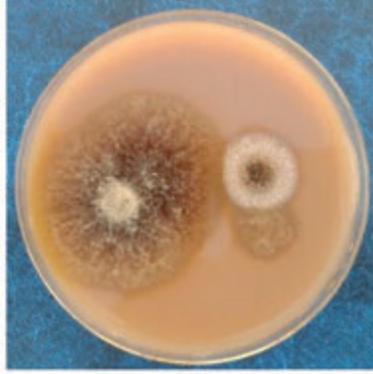
الصفات الشكلية للمزارع الفطرية:

لوحظ وجود أنماط مختلفة من النمو على الوسط المغذي PDA بعد التحضين عند الدرجة 25 °م، إذ كان مظهر المزارع الفطرية قطنياً أو شعاعياً أو متلبداً أو ناعماً رقيقاً (الشكل 1). وعند استنبات الفطر المعزول على الوسط النوعي المعدل (BSM) لوحظ تلون الوجه الخلفي للمزرعة الفطرية باللون البني مع وجود هالة بنية أيضاً تحيط بها وذلك مقارنة باللون الوردى للوسط (الشكل 2)، وهذا يتوافق مع ما ذكره Edwards و Seddon (2001) من أن هذا الوسط عالي الانتقائية للفطر *Botrytis cinerea*، مع ملاحظة نمو الفطر *Aspergillus sp.* (الذي تم عزله أثناء الدراسة وتعريفه على أساس الصفات الشكلية المميزة له) المزروع على الطبق نفسه بجوار الفطر المعزول بسبب تعديل الوسط BSM مع عدم تشكيله هالة بنية اللون.

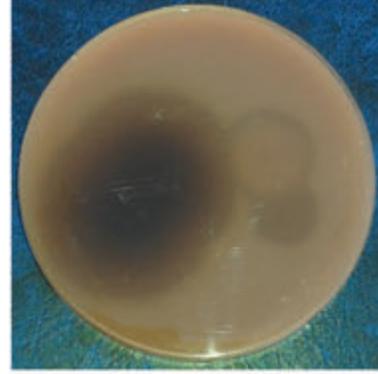


الشكل 1. أشكال نمو الفطر *Botrytis cinerea* على وسط PDA.

A: نمط قطني Cottony، B: نمط ناعم رقيق Powdery، C: نمط شعاعي Radial.



(B)



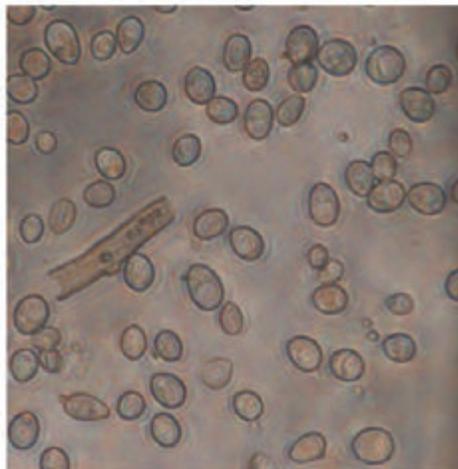
(A)

الشكل 2. نمو الفطر *Botrytis cinerea* على الوسط النوعي BSM.
A: صورة للجهة الخلفية من الطبق، B: صورة للجهة الأمامية من الطبق.

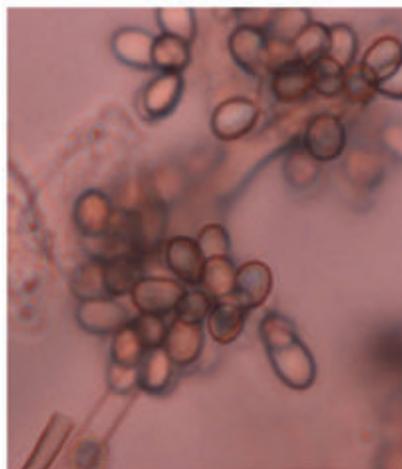
ظهرت المشيعة بشكل متفرع وبلون أبيض أو أبيض ضارب للرمادي. وتشكلت الحوامل الكونيدية من خيوط المشيعة، وكانت مستقيمة نوعاً ما إلى منحنية، ومتفرعة عند القمة بشكل شجيري (الشكل 3). وظهرت الأبواغ الكونيدية بشكل إهليلجي أو كروي ناعمة الحواف، ولها على الأغلب حافة محدبة قليلاً ومكونة من خلية واحدة، ومتوسط طولها $13.15 \mu\text{m}$ (تراوحت بين 9 و $15 \mu\text{m}$)، ومتوسط عرضها $8.95 \mu\text{m}$ (تراوحت بين 8.2 و $10 \mu\text{m}$)، وقد سجل عدد من الباحثين أرقاماً متقاربة لأبعاد الأبواغ الكونيدية للفطر *Botrytis cinerea*، فقد أشار Khazaeli وزملاؤه (2010) إلى أن طول الأبواغ الكونيدية يتراوح بين 8 و $13 \mu\text{m}$ ، وعرضها من 4 إلى $7 \mu\text{m}$ ، بينما أشار Vasilica وزملاؤه (2012) إلى أن أبعاد الأبواغ تراوحت بين 11.9 و $14.2 \mu\text{m}$ طولاً و 8.1 إلى $12.5 \mu\text{m}$ عرضاً. كما يظهر الشكل 4 صوراً مجسمة للحوامل والأبواغ الكونيدية مأخوذة بالمجهر الإلكتروني الماسح (Scanning Electron Microscope) SEM.

تشكلت الأجسام الحجرية سوداء اللون على مزارع فطرية بعمر 30 يوماً على الوسط PDA، إذ بلغ عددها 70 جسماً حجرياً تقريباً، وكانت متوضعة بشكل حلقة بالقرب من حافة الطبق، ومرتبطة بشكل محكم على سطح الآغار أو مغروسة فيه بشكل عميق وملتصقة بقاع الطبق (الشكل 5).

كانت الصفات الشكلية لعزلات الفطر التي تم الحصول عليها من ثمار الفريز المصابة بالعضن الرمادي متوافقة مع الصفات المميزة للنوع *Botrytis cinerea* وفق ما ذكره عدد من الباحثين (Hennebert، 1973؛ Muñoz وزملاؤه، 2016).



(C) تكبير $400\times$

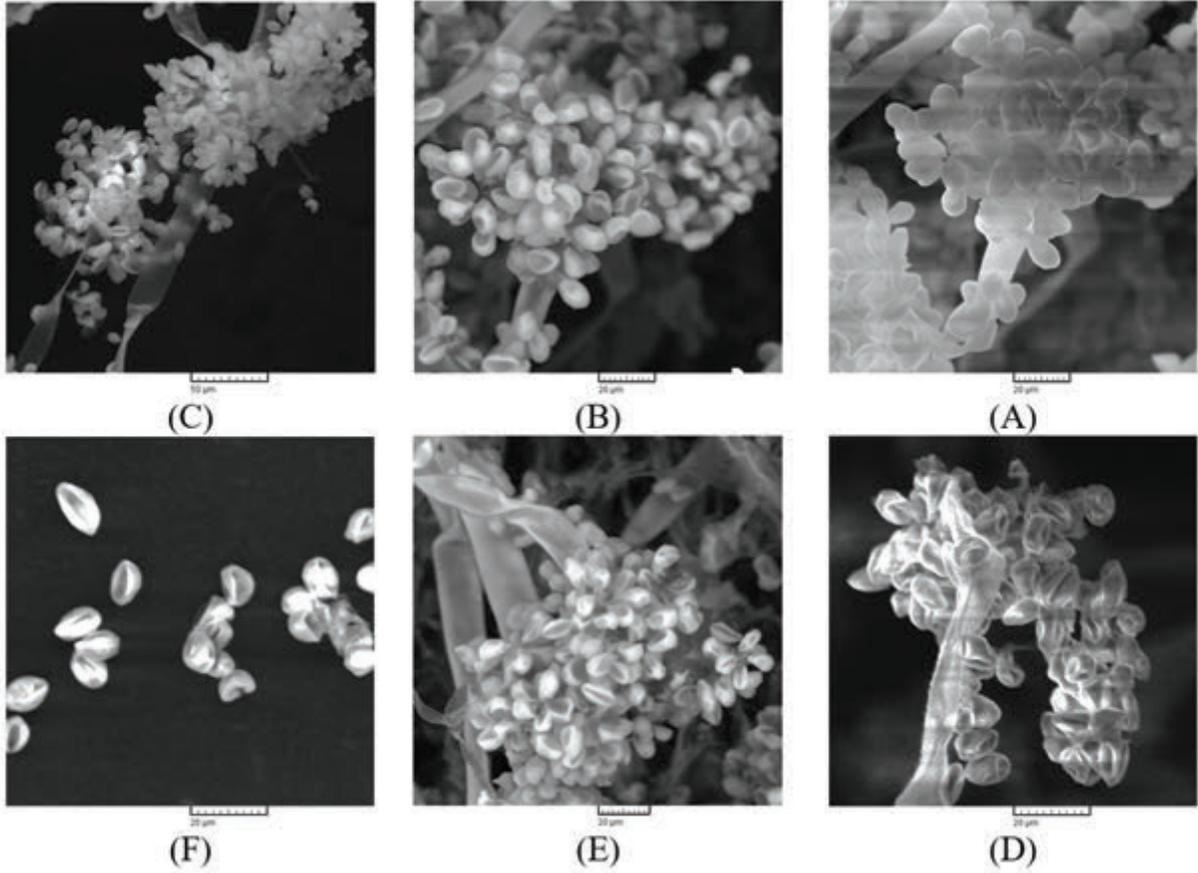


(B) تكبير $400\times$



(A) تكبير $400\times$

الشكل 3. صور بالمجهر الضوئي للحوامل والأبواغ الكونيدية (A و B) والأبواغ الكونيدية (C).



الشكل 4. صور بالمجهر الإلكتروني الماسح لحوامل الأبواغ الكونيدية والأبواغ الكونيدية.

A: تكبير 1100 مرة، سرعة المسح 7؛ B: تكبير 1100 مرة، سرعة المسح 7؛ C: تكبير 600 مرة، سرعة مسح 6؛
D: تكبير 1500 مرة، سرعة مسح 4؛ E: تكبير 1000 مرة، سرعة مسح 7؛ F: تكبير 1500 مرة، سرعة مسح 6.

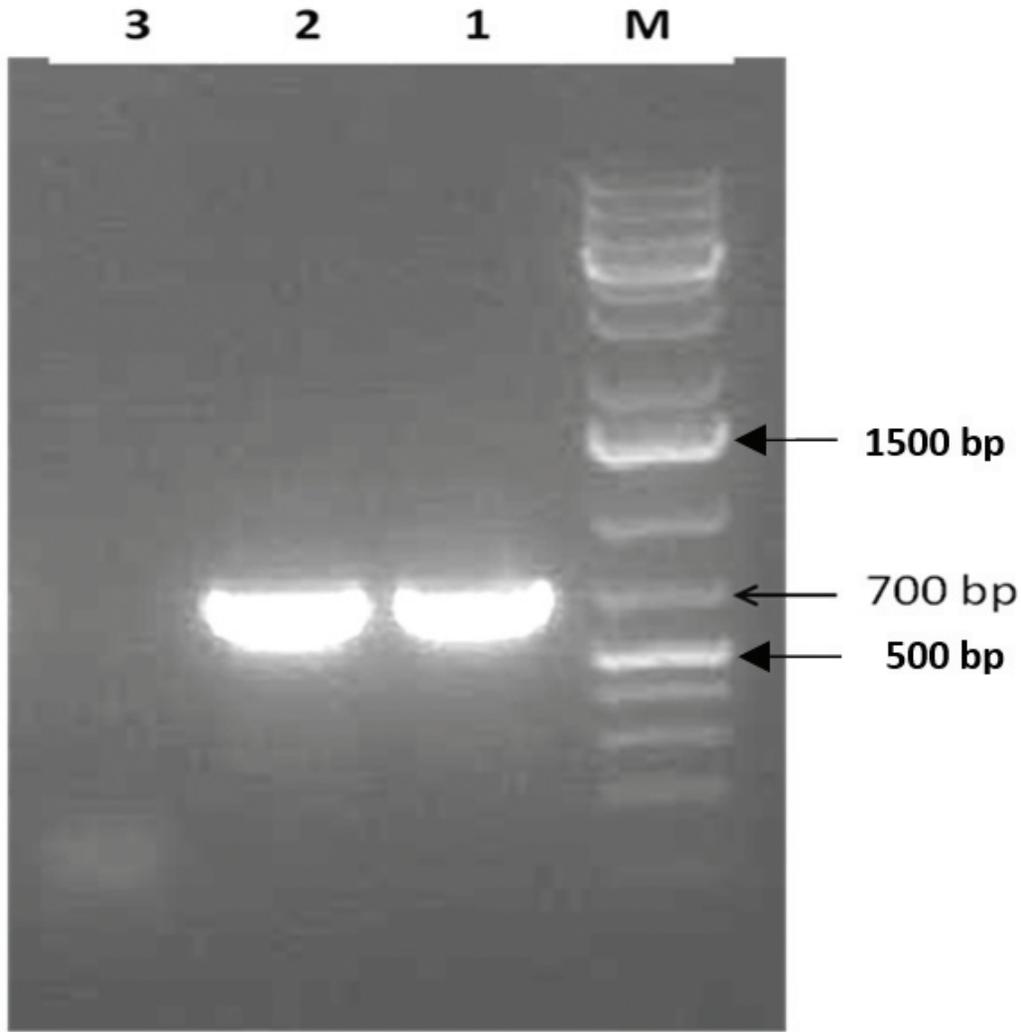


الشكل 5. صورة لنمو الفطر على وسط PDA وتشكيله للأجسام الحجرية.

التعريف الجزيئي لعزلات الفطر *Botrytis cinerea*

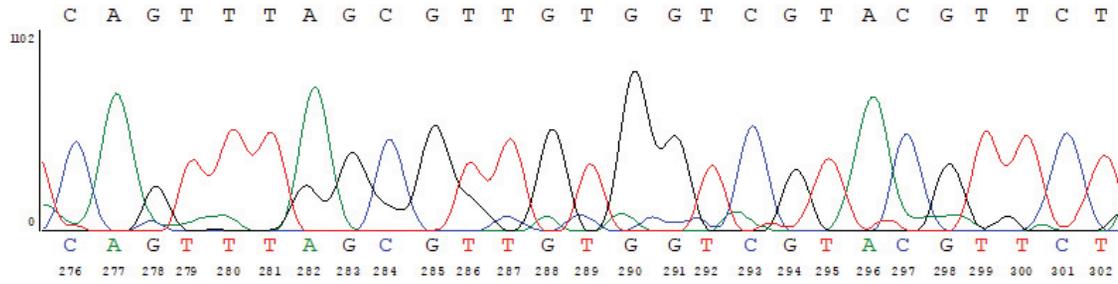
تم تأكيد التعريف الشكلي للعزلات الفطرية المعزولة من ثمار الفريز المصابة بالعضن الرمادي على المستوى الجزيئي، إذ تم استخلاص الـ DNA الجينومي للفطر، وأجري تفاعل البلمرة التسلسلي PCR باستخدام بادئتين نوعيتين بالكشف عن الفطر *Botrytis cinerea* (Rigotti وزملاؤه، 2002).

يلاحظ من الشكل 6 ظهور حزمة واحدة فقط بحجم bp700، وهذا ما يؤكد أن العزلات تنتمي للنوع *Botrytis cinerea*، بينما لم تظهر أي حزمة في المسار الخاص بالشاهد السلبي وهو الفطر العائد للفطر *Aspergillus* sp..



الشكل 6. تفاعل البلمرة المتسلسل PCR باستعمال البادنتين C729+ و -C729 النوعيتين بالنوع *Botrytis cinerea*.
M: سلم الدنا، 1 و 2: عزلات الفطر *Botrytis cinerea*، 3: شاهد سلبي *Aspergillus sp.*

كما تم إجراء سلسلة لقطعة الـ DNA الناتجة عن تفاعل التضخيم PCR باستعمال البادنتين C729+ و -C729 لمعرفة تتالي النكليوتيدات فيها. ويوضح الشكل 7 نتيجة السلسلة بعد إجراء تطابق بين نتيجتي السلسلة لكلا البادنتين باستعمال برنامج Victor NTI 11.5، إذ أمكن الحصول على تسلسل بطول 301 bp، وتبين لدى مقارنتها بقاعدة البيانات في البنك الوراثي أن عزلة الفطر التي تم الحصول عليها أقرب جينياً للنوع *Botrytis cinerea* بنسبة تشابه بلغت 99%، إذ يلاحظ وجود فارق بنكليوتيد واحد من بين 309 نكليوتيدات (الشكل 7-D). يتم تعريف النوع *Botrytis cinerea* عادةً اعتماداً على الخصائص الشكلية للفطر، ولكن أشار عدد من الباحثين إلى التأثير الكبير لهذه الخصائص بالظروف البيئية التي ينمو فيها الفطر مما يؤثر في تصنيفه بشكل صحيح (Khazaeli وزملاؤه، 2010). لذلك تم في السنوات الأخيرة استعمال معلمات جزيئية لتعريف أنواع الجنس *Botrytis*، وقد ثبت في هذه الدراسة كما في دراسات أخرى مشابهة التخصصية العالية للبادنتين C729+ و -C729 المصممتين من قبل Rigotti وزملائه (2002) في التحديد الدقيق للنوع *Botrytis cinerea*، وهذا ما يدعم ويثبت بيانات التشخيص الشكلي للفطر *Botrytis cinerea* المستعملة تقليدياً في تعريفه (Staats وزملاؤه، 2005؛ Khazaeli وزملاؤه، 2010).



A

1	GGGTA TGGAT ACAA AATGG CGACT GGGAT CACCC GCACC TAATT CGTCA
51	ACGAC ATTAG GGAGG AGCCT TCTCC CTTGG TTACT CAGCG ACCCT ATATC
101	TTCAA TCATA TTGCA CAATA GCCTC GGGTC TTTGA TTGT TTGGA TATAA
151	GCTGT GGICA TCGAT GGTT ACATT CAATA TACGT TTATC TCGTA TTTAT
201	GTTAG CCCAA AAGAA TTCTT CTAAG GTTGT CTCGC TGTCT TCGCG ATTAT
251	CACCT GGGTT GTTGC TATCC TTTAT CAGTT TAGCG TTGTG GTCGT ACGTT
301	CTAGG AGCT

B

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Botrytis cinerea</i> B05.10 chromosome 13, complete sequence	564	564	100%	4e-157	99%	CP003817.1
<i>Botrytis cinerea</i> strain KBC-11 C729+IC729- marker genomic sequence	558	558	100%	2e-155	99%	KP141800.1

C

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
564 bits(305)	4e-157	308/309(99%)	1/309(0%)	Plus/Plus
Query 1	GGGTATGGATACAAAAA	GGT GACTGGGATCACCCGCACCTAATTCGTCAACGACATTAG		60
Sbjct 788985	GGGTATGGATACAAAAA	G GACTGGGATCACCCGCACCTAATTCGTCAACGACATTAG		789043
Query 61	GGAGGAGCCTTCTCCCTTGGTTACTCAGCGACCTATATCTTCAATCATATTGCACAATA			120
Sbjct 789044	GGAGGAGCCTTCTCCCTTGGTTACTCAGCGACCTATATCTTCAATCATATTGCACAATA			789103
Query 121	GCCTCGGGTCTTTGATTGTTTTGGATATAAGCTGTGGTCATCGATGGTTCACATTCAATA			180
Sbjct 789104	GCCTCGGGTCTTTGATTGTTTTGGATATAAGCTGTGGTCATCGATGGTTCACATTCAATA			789163
Query 181	TACGTTTATCTCGTATTTATGTTAGCCCAAAAAGAAATCTTCTAAAAGTTGTCTCGCTGCT			240
Sbjct 789164	TACGTTTATCTCGTATTTATGTTAGCCCAAAAAGAAATCTTCTAAAAGTTGTCTCGCTGCT			789223
Query 241	TCGCGATTATCACCTGGGTTGTTGCTATCCTTTATCAGTTTAGCGTTGTGGTCGTACGTT			300
Sbjct 789224	TCGCGATTATCACCTGGGTTGTTGCTATCCTTTATCAGTTTAGCGTTGTGGTCGTACGTT			789283
Query 301	CTAGGAGCT			309
Sbjct 789284	CTAGGAGCT			789292

D

الشكل 7. نتيجة السلسلة لجزء من الدنا المضخم باستعمال البادنتين C729+ و -C729 لعزلة الفطر *Botrytis cinerea*.
 A: جزء من المخطط الكروماتوغرافي لتسلسل النكليوتيدات، B: تسلسل 301 نكليوتيداً من قطعة الـ DNA المضخمة باستعمال البادنتين C729+ و -C729،
 C: جزء من نتيجة مقارنة تسلسل النكليوتيدات بقاعدة البيانات على موقع ncbi باستعمال تحليل نسبة التشابه للأسس الأزوتية Blastn،
 D: مقارنة بين تسلسل النكليوتيدات في قطعة الـ DNA التي حصل عليها (Query) بتسلسل النكليوتيدات للفطر *Botrytis cinerea* في البنك الوراثي.

الاستنتاجات والمقترحات

تشير النتائج إلى أن الطريقتين الشكلية والجزيئية في تعريف الفطر *Botrytis cinerea* يتماثلان بعضهما من أجل التعريف الدقيق والصحيح للفطر، وقد يمكن الاكتفاء بالطريقة الجزيئية التي تتميز بالدقة واختصار الوقت وعدم تأثرها بالظروف البيئية التي ينمو فيها الفطر. لذلك يمكن الاعتماد على تقانة الـ PCR باستعمال البادئتين النوعيتين C729+ و C729- في تحديد هوية الفطر المسبب للعفن في حال كونه يعود للنوع *Botrytis cinerea*.

المراجع

- Ana, E.A., P. Enrique, and L. Aurelio. 2015. Antifungal activity of essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*) and/or mustard (*Brassica nigra*) in vapor phase against gray mold (*Botrytis cinerea*) in strawberries, Innovative Food Science and Emerging Technologies. 32: 181 - 185.
- Chardonnet, C.O., C.E. Sams, R.N. Trigiano and W.S. Conway. 2000. Variability of three isolates of *Botrytis cinerea* affects the inhibitory effects of calcium on this fungus. Phytopathol. 90: 769 - 774.
- Choi, Y.W., K.D. Hyde and W.H. Ho. 1999. Single spore isolation of fungi. Fungal Diversity 3: 29 - 38.
- Domsch, K.H., W. Gams and T.H. Anderson. 2007. Compendium of soil fungi. 2nd edn. taxonomically revised by Walter Gams. IHW-Verlag, Eching: 1- 672.
- Edwards, S.G., and B. Seddon. 2001. Mode of antagonism of *Brevibacillus brevis* against *Botrytis cinerea* in vitro. J. Appl. Microbiol. 91: 652 - 659.
- Elad, Y., B. Williamson, P. Tudzynski, and N. Delen. 2007. Botrytis: Biology, Pathology and Control, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 1 - 8.
- Grindle, M. 1979. Phenotypic Differences Between Natural and Induced Variants of *Botrytis cinerea*, Journal of General Microbiology. 111: 109 - 120.
- Hennebert, G.L. 1973. Botrytis and botrytis-like genera. Persoonia, 7: 183 - 204.
- Holz, G., S. Coertze and B. Williamson. 2004. The ecology of Botrytis on plant surfaces, Springer, In: Elad et al. (eds.), Botrytis: Biology, Pathology and Control: 9 - 27.
- Jarvis, W.R. 1977. Botryotinia and *Botrytis* species; taxonomy, physiology and pathogenicity. Monograph No. 15, Canadian Department of Agriculture, Ottawa. Pages 206.
- Jarvis, W.R. 1980. Epidemiology, In: The Biology of *Botrytis*, Eds. J. R. Coley-Smith, K. Verhoeff, and W. R. Jarvis. London: Academic Press: 219 - 250.
- Kerssies, A., A.I. Bosker-Van Zessen, C. Wagemakers and J. Van Kan. 1997. Variation in pathogenicity and DNA polymorphism among *Botrytis cinerea* isolates sampled inside and outside a glasshouse, Plant Dis. 81: 781 - 786.
- Khazaeli, P., H. Zamanizadeh, B. Mrid and H. Bayat. 2010. Morphological and Molecular Identification of *Botrytis cinerea* Causal Agent of Gray Mold in Rose Greenhouses in Central Regions of Iran. International Journal of Agricultural Science and Research. 1: 19 - 24.
- Kovach, J., R. Petzoldt and G. E. Harman. 2000. Use of honey bees and bumble bees to disseminate *Trichoderma harzianum* 1295 - 22 to strawberries for botrytis control. Biological Control. 18: 235 - 242.
- Li, Y., Z. Liu, F. Cui, Y. Xu and H. Zhao. 2007. Production of xylanase from a newly isolated *Penicillium* sp. ZH-30. World j. Microbiol. Biotechnol. 23: 837 - 843.
- MacFarlane, H.H. 1968. Review of Applied Mycology. plant host-pathogen index to volumes :1 - 40 (1922 - 1961).
- Muñoz, G., F. Campos, D. Salgado, R. Galdames, L. Gilchrist, G. Chahin and O. Andrade. 2016. Molecular identification of *Botrytis cinerea*, *Botrytis paeoniae* and *Botrytis pseudocinerea* associated with gray mould disease in peonies (*Paeonia lactiflora* Pall.) in Southern Chile, Revista Iberoamericana de Micología, 33: 43 - 47.

- Rigotti, S., K. Gindro, H. Richter and O. Viret. 2002. Characterization of molecular markers for specific and sensitive detection of *Botrytis cinerea* Pers. Fr. in strawberry (*Fragaria uananassa* Duch.) Using PCR. FEMS Microbiology Letters, 9;209(2): 169 - 174.
- Staats, M., P.V. Baarlen and J. A. L. Kan. 2005. Molecular Phylogeny of the Plant Pathogenic Genus *Botrytis* and the Evolution of Host Specificity. Mol. Biol. Evol. 22(2): 333 - 346.
- Sutton, J.C., and G. Peng. 1993. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. Phytopathology. 83: 615 - 621.
- Vasilica, M.R., L.A. Suciu and C.E. Puia. 2012. *In Vitro* Studies Regarding the Morphology of *Botrytis Cinerea* Pers. Isolated from Geranium Plants. ProEnvironment 5: 60 - 66.
- Williamson, B., B. Tudzynski, P. Tudzynski, and J. A. L. van Kan. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. Molecular Plant Pathology 8: 561 - 580.
- Yohalem, D.S., K. Nielsen and M. Nicolaisen. 2003. Taxonomic and nomenclatural clarification of the onion neck rotting *Botrytis* species. Mycotaxon 85:175 - 182.
- Zhang, H., L. Wang, Y. Dong, S. Jiang, J. Cao and R. Meng. 2007. Postharvest biological control of gray mold decay of strawberry with *Rhodotorula glutinis*. Biological Control. 40: 287 - 292.

N° Ref: 721