الجمهـ ـورية الجزائـ ـرية الديمقـ ـراطية الشعـ ـبية
وزارة التعليـ ـم العـالي والبحـ ـث العلمـ ـي
جامعـ ـة فـ ـرحات عـ ـباس ـ سطيـ ـف

أطـروحـ ـة
مقدمة إلى كلية العلـ ـوم
قسم البيولـ ـ ـ ـوجيا
لنيـ ـ ـل شهـ ـ ـادة
دكـ ـتوراه الدولـ ـة
فرع: علم الأحياء الدقيقة

مـن طـ ـرف
السيد: **زروق محمد ميهوب**

الموضـ ـوع

البحـث عـ ـن دور سـم solanapyrone A كـعامل إمـراضية لفطـر (*Ascochyta rabiei* Pass. Labrousse) *Didymella rabiei* Kovachevski المسبب لمرض التبقع الأسكوكيتي علـى نبات الحمص (*Cicer arietinum* L.)

تمت المناقشة بتاريخ: 27 نوفمبر 2007
أمـام اللجنـ ـة:

الرئيـ ـ ـس:	السيد قشي عبد الهادي	أستاذ، جامعة فرحـات عباس، سطيف
المشـ ـ ـرف:	السيد بوزنـاد زواوي	أستاذ، معهـد العلوم الفلاحية، الحراش
مساعد المشرف:	السيد لعروس العـربي	أستاذ، جامعة فرحـات عباس، سطيف
الممتحنـ ـان:	السيد سباو نصر الدين	أستاذ، المدرسة الوطـنية للأساتذة، القبة
	السيد حـرز الله داود	أستاذ محاضر، جامعة فرحات عباس، سطيف
المدعـ ـ ـو:	السيد Strange, R. N.	أستـ ـاذ، جامـ ـعة لنـدن، لنـدن

المحتويات

قائمة الأشكال

الفصل الأول: دراسة مرجعية

الفصل الثاني: عزل وتشخيص فطر *Ascochyta rabiei* في الجزائر

الفصل الثالث: دور سم Solanapyrone A في سمية رشاحة الفطر *A.rabiei* ضد نباتات الحمص

الفصل الرابع: تحويل الفطر *A. rabiei* بوساطة البكتريا *Agrobacteirum tumefasciens*

الفصل الخامس: مناقشة عامة

فائمة الجداول

الفصل الأول: دراسة مرجعية

الفصل الرابع: تحويل الفطر *A. rabie*i بوساطة البكتريا *Agrobacteirum tumefasciens*

ملخص

تم عزل ثلاث مستعمرات للفطر *A. rabiei* سميت على التوالي Ag1 وAg2 وAg3 من بقايا نبات حمص في ثلاث مناطق بالجزائر، سطيف وقالمة وواد السمار على الترتيب. سمحت عملية العزل من النباتات المصابة بالحصول على مستعمرات فطرية شبيهة بالمستعمرات الأصلية. كما أدت عملية العدوى الاصطناعية لظهور نفس أعراض المرض في الطبيعة. وقد تم التأكد من هوية العزلتين Ag1 وAg2 بتحديد تتابع القواعد الآزوتية لحمض rDNA. كان تتابع القواعد الآزوتية للعزلتين Ag1، وAg2 مشا ا لتتابع هذه القواعد للعزلة المرجعية AR 738 من بنك الجينات (Genbank) في 448 قاعدة و454 قاعدة على الترتيب واعطت عملية التضاعف المتسلسل للحمض النووي (PCR) والهجرة الكهربائية لمورثات النمط الوراثي لهاتين العزلتين باستعمال بادئات مناسبة لقطع الحمض النووي ذات وزن جزيئي 700 bp مبينا أن كلتا العزلتين من النمط الوراثي رقم 1 (mating type 1). نمت عزلات الفطر الثلاثة بشكل جيد على وسط Czapek Dox المدعم بالكاتيونات (CDCLM)، مفرزة سم solanapyrone A واحيانا قليلا من سم solanapyrone C.تم التعرف على سم solanapyrone A بحسب زمن الاحتباس ومطياف الامتصاص في الكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي (HPLC)، حيث تشابه مطياف السم المتحصل عليه من العزلات الثلاث مع مطياف السم المعياري. يثبط السم solanapyrone A ورشاحة الفطر *A. rabei* إنبات بذور نبات الحمص وتنخفض نسبة التثبيط بزيادة تخفيف السم ورشاحة الفطر. Probit نسبة انخفاض الانبات كانت متناسبة مع تركيز السم أو معامل تخفيف الرشاحة. قدر تركيز السم المثبط لـ 50% من الإنبات بـ 6.93 ± 0.21 مكروغرام/مل كما بلغ تركيز الرشاحة المثبط لنفس النسبة 52.5% و55.0% و64.4% للعزلات Ag1 وAg2 وAg3 على الترتيب. إن سم solanapyrone A ورشاحة الفطر يثبطان كذلك نمو الجذير والسويقة، حيث بلغ تركيز السم المثبط لـ 50% من طول الجذير 4.72 ± 0.30 مكروغرام/مل بينما بلغ تركيز الرشاحة المثبط لنفس هذه النسبة 30% و47.5% و53.0% للعزلات Ag1 وAg2 وAg3 على الترتيب. اما تركيز السم المثبط لـ 50% من طول السويقة فبلغ 6.56 ± 0.33 مكروغرام/مل في حين كان تركيز رشاحة العزلات Ag1 وAg2 وAg3 المثبط لنفس هذه النسبة 45% و51% و59% على الترتيب. كان نمو الجذير اكثر حساسية لتاثير السم مقارنة مع إنبات البذور ونمو السويقة حيث بلغ تركيز السم في اختبار البذور 7.10 ± 0.21 مكروغرام/مل و4.72 ± 0.3 مكروغرام/مل في اختبار نمو الجذير و6.56 ± 0.33 مكروغرام/مل في اختبار نمو السويقة. سمح تحويل الفطر بوساطة البكتريا *Agrobacterium tumefaciens* باستعمال العزلتين LBA1126 وAGL1 بالحصول على 498 طافرا مقاوما للمضاد الحيوي hygromycin B مع نسبة نجاعة بلغت 46.8 و35.8 طافر لكل 10^5 بوغة على الترتيب. وتم اختبار 30 طافرات لإنتاج سم solanapyrone A بالاعتماد على الامتصاص في طول موجة 327 نانومتر وهو طول الموجة الأقصى (λmax) الذي يمتص فيه هذا السم، على اساس أن هذا السم هو المركب المتواجد أساسا في رشاحة العزلة الأصلية النامية على وسط CDCLM والذي يمتص في طول الموجة هذه. على اعتبار أن هذه الحالة تنطبق على الطافرات فقد سجل إفراز الطافرات لسم بتركيز تراوح بين 2.11 ± 0.10 مكروغرام/مل و4.32 ± 1.93 مكروغرام/مل بنسبة انخفاض تراوحت بين 74.11% و46.99% مقارنة مع تركيز السم الذي افرزته العزلة الأصلية (8.15 ± 2.99 مكروغرام/مل).

كلمات مفاتيح: *Ascochyta rabiei*، *Cicer arietinum*، phytotoxins، Solanapyrone A

Abstract

Cultures of *A. rabiei,* designated Ag1, Ag2 and Ag3, were isolated from chickpea debris left in fields near the Algerian towns of Sétif, Guelma and Oued Smar, respectively. Isolation from such plants gave rise to fungal colonies with he same morphology as the original isolates and symptoms identical to the naturally infected plants. Identity of isolates Ag1 and Ag2 was confirmed by sequencing rDNA. The sequence for Ag1 gave a perfect match for 448 bases of a reference sample AR 738 in Genbank and essentially the same result for 454 bases of Ag2. PCR of DNA from Ag1 and Ag2 with primers specific for the mating type genes of *A. rabiei* both gave amplicons of about 700 bp, demonstrating that they were both mating type 1. The three Algerian isolates grew well on Czapek Dox medium supplemented with cations (CDCLM). Only solanapyrone A and sometimes a trace of solanapyrone C were produced and were recognised by their retention times on HPLC and spectra. The major peak from all three Algerian isolates gave spectra that closely matched to that of authentic solanapyrone A. Solanapyrone A and culture filtrates of *A. rabei* inhibited the germination of chickpea seed, and this inhibition decreased with dilution. Probit % inhibition of germination was proportional to the concentration of solanapyrone A or the dilution factor of culture filtrates. The concentration of solanapyrone A that caused 50% inhibition of germination was 6.93 ± 0.21 µg/ml and the dilutions of culture filtrates of isolates Ag1, Ag2 and Ag3 required to give the same inhibition were 52.5%, 55.0% and 64.4%, respectively. The elongation of radicles and hypocotyls of chickpea seedlings was inhibited by solanapyrone A and culture filtrates of *A. rabiei.* The concentration of solanapyrone A that cause 50% inhibition of radicle elongation was 4.72 ± 0.30 µg/ml and the dilutions of culture filtrates of isolates Ag1, Ag2 and Ag3 required to give the same inhibition were 30%, 47.5% and 53.0%, respectively. The concentration of solanapyrone A that cause 50% inhibition of hypocotyl elongation was 6.56 ± 0.33 µg/ml and the dilutions of cultural filtrates of isolates Ag1, Ag2 and Ag3 required to give the same inhibition were 45%, 51% and 59%, respectively. Radicle elongation was the most sensitive of the three parameters to solanapyrone A, the respective values for the three tests being 7.10 ± 0.21 µg/ml for germination, 4.72 ± 0.3 µg/ml for radicle elongation and 6.56 ± 0.33 µg/ml for hypocotyl elongation. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *A. rabiei* with strains LBA1126 and AGL1 led to the production of 498 tranformants which were resistant to hygromycin B with an efficiency of 46.8 and 35.8 transformants per 10^5 spores, respectively.. A total of 30 transformants was screened for the production of solanapyrone A as determined by light absorption at 327 nm, the λmax of solanapyrone A as this is essentially the only compound in culture filtrates of wild type *A. rabiei* grown on CDCLM which absorbs at this wavelength. If it is assumed that this is also true for the transformants, then their production of solanapyrone A varied from 2.11 ± 0.10 µg/ml to 4.32 ± 1.93 µg/ml, representing a reduction of solanapyrone A of 74.11% to 46.99% in comparison with the wild type (8.15 ± 2.99 µg/ml).

Keyswords: *Ascochyta rabiei, Cicer arietinum*, phytotoxins, Solanapyrone A

مقدمة

يحتل نبات الحمص (*Cicer arietinum* L.) المرتبة الثالثة من بين البقوليات، ويتميز بكونه مصدرا للكالسيوم والمغنسيوم والبوتاسيوم والفوسفور والحديد والزنك بالإضافة إلى المنغنيز. كما يشكل مصدرا جيدا لـ β-carotene. ويشكل أيضا مصدرا للبروتينات وللطاقة في الدول النامية بالإضافة إلى كونه مصدرا هاما للغذاء للتجمعات البشرية التي تعاني من مشاكل صحية.

يعتبر إنتاج الحمص العالمي حاليا منخفضا (حوالي 0.8 طن/هكتار؛ FAOSTAT، 2005). ويعود هذا الانخفاض إلى العديد من العوامل الحيوية وغير الحيوية التي تخفض من نسبة الإنتاج، وبصفة خاصة مرض التبقع الأسكوكيتي ومرض الذبول الفيوزاريومي (Millan وآخرون، 2006).

يسبب مرض التبقع الأسكوكيتي الفطر *Ascochyta rabiei* (الطور الناقص، anamorph)، *Didymella rabiei* (الطور الكامل، teleomorph)، والذي يعتبر من أخطر الأمراض التي تصيب نبات الحمص في العالم وفي الجزائر. وهو يتميز بتنوع قدرته الإمراضية، كما أن آليات إحداثه للمرض على النبات تبقى غير مفهومة لحد الآن بشكل جيد. فقد بينت الدراسات بأن الفطر يخترق النبات اختراقا مباشرا (Höhl وآخرون، 1990)، كما يفرز أيضا سموم solanapyrones التي تحدث نفس أعراض المرض عند معاملة الأوراق ا (Hamid وStrange، 2000). بالإضافة إلى ذلك يفرز الفطر إنزيمات cutinase والتي ثبت بأ ا أحد عوامل الإمراضية عند فطريات أخرى (Dickman وآخرون، 1989).

تحدث العديد من الفطريات المفرزة للسموم أمراضا للنبات في الظروف الطبيعية، لذلك كان من الطبيعي طرح التساؤل، هل لهذه السموم دورا في إحداث الإصابة كما هو الحال في أمراض الحيوان والإنسان. على هذا الأساس هناك شروط أساسية لتحديد دور السموم في المرض وهي: إثبات أن إفراز السموم يكون في النبات المصاب، وقدرة هده السموم على إحداث ولو جزء من أعراض الإصابة عند معاملة النباتات السليمة ا

(Aducci وآخرون، 1997). عادة يمكن أن تلعب السموم الفطرية دورا هاما في بعض الأمراض النباتية، كما أن استعمالها في انتقاء أو استنباط أصناف مقاومة من النبات العائل مخبريا يرتبط بملاحظتين - جميع عزلات الفطر التي تم الحصول عليها تفرز هذه السموم في الأوساط الاصطناعية، - إحداث هذه السموم لأعراض المرض (فقد اليخضور، البقع النكروزية وانكسار الأفرع وغيرها) (Hamid وStrange، 2000).

بناء على هذه الفرضية كان من بين أهداف هذا البحث اختبار دور السموم التي يفرزهـا *Ascochyta rabiei* كعامل إمراضية في التفاعل بين مرض التبقع الأسكوكيتي ونبات الحمص مخبريا، لكن قبل ذلك كان أيضا من المهم أولا تأكيد انتماء عزلات الفطر الجزائرية الثلاثة إلى النوع *A. rabiei* بدراسة الحمض النووي الريبوزومي وتحديد النمط الوراثي لهذه العزلات. بعد تحديد الانتماء الدقيق لهذه العزلات كان الهدف أيضا التأكد من إفرازها للسموم ثم ربط العلاقة بين كمية السم المفرزة وتأثير رشاحة الفطر على نبات الحمص بإجراء اختبارات حيوية على إنبات البذور ونمو الجذير والسويقة وأخيرا اختبار إنتاج طافرات للفطر غير قادرة على إنتاج السم تماما أو على الأقل تفرز السم بكميات ضئيلة بغية استعمال هذه الطافرات مستقبلا في اختبارات العدوى الاصطناعية لتأكيد دور السم في الآلية الإمراضية للفطر. على هذا الأساس، تم تقسيم هذا البحث إلى خمسة فصول، خصص الفصل الأول لاستعراض المراجع التي تناولت بالدراسة مرض التبقع الأسكوكيتي، بينما تم تخصيص الفصل الثاني لعزل وتشخيص عزلات الفطر *A. rabiei* التي تم الحصول عليها من ثلاثة مناطق بالجزائر، أما الفصل الثالث فتناول بالدراسة إفراز هذه العزلات الثلاث لسم solanapyrone A ودور هذا السم في التفاعل بين نبات الحمص ومرض التبقع الأسكوكيتي وذلك بدراسة سمية رشاحة عزلات الفطر على إنبات البذور ونمو الجذير والسويقة، في حين خصص الفصل الرابع لدراسة تحويل الفطر بوساطة البكتريا *Agrobacterium tumefasciences* (*Agrobacterium*-mediated transformation، ATMT) بدف الحصول على طافرات غير قادرة على إفراز السموم، وأفرد الفصل الخامس للمناقشة العامة.

الفصل الأول

دراسة مرجعية

1.1. نبات الحمص

نبات الحمص نبات سنوي ذاتي التلقيح ذو 16 كروموزما (n2 = x2)، التلقيح العكسي نادراجدا لا يتجاوز نسبة 1 % فقط (Smithson وآخرون، 1985؛ Singh، 1997). ينمو هذا النبات عادة في المناطق الدافئة أو الجافة وشبه الجافة. تتراوح درجة حرارة نموه المثلى بين 18-26° م نارا و21-29° م ليلا. مع معدل سنوي لتساقط الأمطار يتراوح بين 600 و1000 ملم (Smithson وآخرون، 1985؛ Tekeoglu وآخرون، 2000). يقسم نبات الحمص حسب لون وحجم البذور إلى الصنف كابولي (Kabuli) ذو البذور الكبيرة المصفرة، والذي يزرع في أغلب مناطق زراعة هذا النبات و الصنف ديزي (Desi) ذو البذور الصغيرة السوداء اللون والذي يزرع عادة في الهند وفي إفريقيا (Van Der Maesen، 1987؛ Ibrikci وآخرون، 2003).

نبات الحمص نبات حولي يتراوح علوه بين 30 و70 سم، لكن عددا قليلا من الأنواع يتجاوز طوله متر واحد. تغطى أوراق نبـات الحمـص بشعيرات محتوية على غدد تفرز عصارة ذات حامضيـة مرتفعـة، تحتوى أساسا على حمـض التفـاح (malic acid) وحمـض oxalic اللـذان يساهمـان فـي مقاومـة نبـات الحمـص للإصابـة بالحشـرات، كمـا هـو الحـال لثـاقب القـرون ((*Helicoverpa armigera* Hiibner (Lepidoptera: Noctuidae؛ Yoshida وآخرون، 1997). يحتوي نبات الحمص أوراقا مركبة متوضعة بشكل متناوب عادة مابين 11 و13 وريقة. تكون الأزهار على المحور المركزي، وحيدة أو في مجموعة زهرية متكونة من زهرتين إلى ثلاثة أزهار، ذات ألوان مختلفة من بيضاء إلى وردية أرجوانية. يتوفر النبات على جهاز جذري عميق، محتوي على عقد جذرية مميزة كبقية البقوليات. تمنح هذه العقد الجذرية فعالية كبيرة للنبات في تثبيت النتروجين الجوي عبر التثبيت البيولوجـي لهذا العنصر

(biological nitrogen fixation؛ BNF). كما يتميز نبات الحمص بفعالية كبيرة في تثبيت الفوسفور (P) في التربة المحتوية على نسب منخفضة من هذا العنصر (Cubero، 1987؛ Van Der Maesen، 1987).

2.1. الأهمية الاقتصادية والغذائية لنبات الحمص

يعتبر نبات الحمص (*Cicer arietinum* L.) ثالث محصول بقولي مزروع عالميا بعد نباتي اللوبياء (*Phaseolus vulgaris* L.) والفاصولياء (*Pisum sativum* L.)، حيث يزرع في العديد من المناطق انطلاقا من جنوب شرق آسيا عبر شبه الجزيرة الهندية والشرق الأدنى بالإضافة إلى أوروبا ومنطقة البلقان وبلدان حوض البحر المتوسط وانتهاء بأمريكا وأستراليا (Abbo وآخرون، 2000؛ Tekeoglu وآخرون، 2000؛ Ibrikci وآخرون، 2003). وفي حوض البحر المتوسط يعتبر نبات الحمص من أهم المحاصيل الفلاحية في دول المغرب العربي ومن ضمنها الجزائر. بلغ الإنتاج العالمي للحمص حوالي 9 مليون طن في العام 2005 (الجدول 1.1) (FAOSTAT، 2005).

3.1. القيمة الغذائية لنبات الحمص

يعتبر نبات الحمص مصدرا غذائيا هاما حيث يحتوي على 357 حريرة/100 بذرة (Williams وSingh، 1987؛ Abbo وآخرون، 2000). تحتوي بذرة الحمص على تركيز عالي من المواد الكربوهيدراتية والبروتينات كما أن محتواها من المواد المعدنية والفيتامنات هام جدا (الجدول 2.1). محتوى بذرة نبات الحمص من الكربوهيدرات والبروتنيات مماثل لمحتوى بذور بقية البقوليات، لكنها تحتوي تراكيز عالية من الزيوت الخام وتراكيز منخفضة من المواد المعدنية مقارنة مع هذه البقوليات (الجدول 3.1).

الجدول 1.1. الإنتاج العالمي من الحمص (FAOSTAT، 2005)

البلد	المساحة (هكتار)	الإنتاج (طن)	المردود (Hg/Ha))
الجزائر	20000	15.000	7.500
دول المغرب العربي	98815	64.150	28.626
العالم	10380.739	8572.356	8.258

الجدول 2.1. محتوى بذرة نبات الحمص من المواد المعدنية والفيتامينات (William وSingh، 1987).

المواد الكربوهيدراتية والمعدنية والبروتينات	التركيز (ملغ/100 غ)	الفيتامينات	التركيز (ملغ/100 غ)
المواد الكربوهيداتية الكلية	61-50	Thiamin	1.1-0.21
البروتينات	20-10	Riboflavin	0.33-0.12
الكربون	440-140	Niacin	2.9-1.3
الفوسفور	382-190	B6	0.55
الحديد	23.9-5.0	B1	0.29
الزنك	9.95	B2	0.2
المغ يم	141	A	0.19
النحاس	0.96	C	3.87

الجدول 3.1. محتوى بذور بعض البقوليات من المركبات الكيميائية مقدرة بالنسبة المئوية للوزن الجاف (William وSingh، 1988).

المنتوج الزراعي	البروتينات	سكريات + (كربوهيدات كلية)	زيوت خام	ألياف خام	عناصر معدنية
فاصولياء	22.1	61.4	1.7	4.2	3.8
جلبانة جافة	22.5	62.1	1.8	5.5	2.6
حمص	20.1	61.5	4.5	4.9	2.9
فول	23.4	60.2	2.0	7.8	3.4
عدس	24.2	60.8	1.8	3.1	2.2
البسلة الهندية[1]	20.9	62.9	1.7	8.0	3.5
لوبياء[2]	23.4	60.3	1.8	4.3	3.5
لوبياء خضراء	23.9	60.4	1.3	4.2	3.4
فاصولياء Lima[4] bean	19.7	64.8	1.1	4.4	3.4

[1] pigeonpea (*cajanus cajan*)
[2] Cowpea (*Vigna unguiculata* L.)
[3] Green gram (*Phaseolus aureus*)
[4] Lima bean (*Phaseolus lunatus*)

4.1. أمراض نبات الحمص

يصاب نبات الحمص بالعديد من الأمراض الفطرية وأهم الفطريات التي تصيب هذا النبات فطر المسبب *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo and K. Sato للذبول وفطر *Ascochyta rabiei*, (Pass.) Labrousse, (anamorph), *Didymella rabiei* Kovacheski v. Arx. Syn. *Mycosphaerella rabiei* Kovacheski (teleomorph) المسبب لمرض التبقع الأسكوكيتي. بالإضافة إلى هذين الفطرين، هناك العديد من الفطريات الأخرى التي تصيب نبـات الحمـص منها *Alternaria* sp. المسبب لتبقع الأوراق (leaf spot)، و*Uromyces ciceris-arietinum* المسبب للصدأ (rust)، و*Botrytis cinerea* المسبب للعفن الطري (gray mould).و*Leviellula taurica* المسبب للبياض الدقيقي (powdery mildew)، و*Rhizoctonia bataticola* و*R. solani* المسببين لعفـن الجـذور الجاف (dry root rot)، و*Sclerotium rolfsii* و*Sclerotinia sclerotiorum* المسببين لعفن الساق (foot rot). وفطر *Verticillium albo-atrum* المسبب للذبول (wilt). كما يتعـرض نبات الحمص للإصابة بالفطريات البيضية (Oomycetes) *Pythium debaryanum* و*P. ultimum*. بالإضافة إلى ذلك تم عزل العديد من الفيروسات من نبات الحمص كفيروس تبقع الحلفاء (alfalfa mosaic) وفيروس التفاف أوراق الجلبانة (pea leaf roll) وفيروس التبرقش الأصفر على نبات الفاصولياء (bean yellow mosaic) وفيروس تبرقش الخيار(cucumber mosaic viruses) (Smithson وآخرون، 1985؛ Van Emden وآخرون، 1988).

1.4.1. مرض التبقع الأسكوكيتي

يعتبر مرض التبقع الأسكوكيتي من أخطر الأمراض التي تصيب نبات الحمص في شمال الهند والباكستان والولايات المتحدة مع نسبة خسائر مسجلة قد تصل إلى 100% (Nene وReddy، 1987؛ Jiménez-Díaz وآخرون، 1993؛ Acikoz وآخرون، 1994؛ Tekeoglu وآخرون، 2000). كما أن هذا المرض منتشر بشكل واسع في دول حوض البحر المتوسط كالجزائر و قبرص ومصر وفرنسا واليونان والأردن وإيطاليا ولبنان والمغرب وإسبانيا وسوريا وتونس وتركيا بالإضافة إلى بلغاريا (Porta-Puglia، 1990). وفي الجزائر تختلف نسبة الخسائر الناتجة عن الإصابة بهذا المرض من منطقة إلى أخرى وقد تصل أحيانا إلى 100% (Bouznad وآخرون، 1996).

1.1.4.1. المسبب المرضي

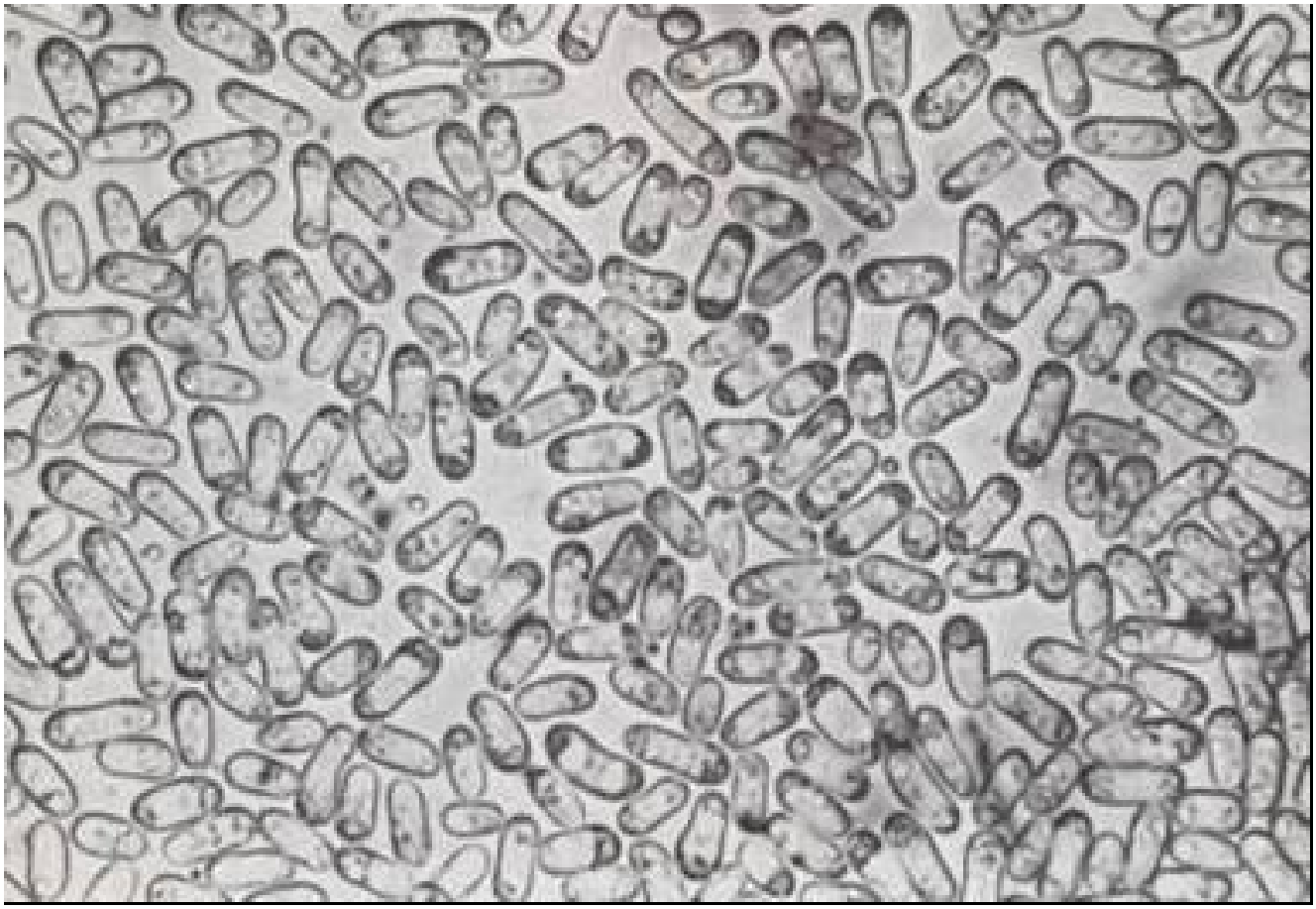
يسبب مرض التبقع الأسكوكيتي على نبات الحمص الفطر *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labrousse (anamorph): *Didymella rabiei* (Kovacheski) v. Arx. Syn. *Mycosphaerella rabiei* (Kovacheski; teleomorph). عَرف Passerini عام 1876 هذا الفطر في البداية بـ *Zythia rabiei* (Kapoor وkhune، 1980)، لكن بعد ذلك اقترح بعض الباحثين اسم *Phyllosticta rabiei* (Pass.). أكدوا Singh وآخرون (1997) أن بنية الأبواغ البكنيدية للفطر والتي تفتقد إلى الزوائد القمية (apical appendage) والمحاطة بغلاف جيلاتيني هي أبواغ نوعية لـ *Phyllosticta* spp. وفي عام 1930 عرفه Labrousse بكونه *Phyllosticta rabiei* إلا أنه عاد وغير التسمية إلى *Ascochyta rabiei* على أساس تكوين الفطر لأبواغ مقسمة بنسبة 2-4% عند تنميته على وسط اصطناعي. وقد تم الاحتفاظ بالتسمية الأخيرة والتي أصبحت شائعة الاستعمال (Nene، 1982).

أما بالنسبة للطور الكامل للفطر *Didymella rabiei* فقد تم تغيير تسميته من *Mycosphaerella* إلى *Didymella* وذلك على أساس تواجد ascomata واسعة نوعية لأفراد هذا النوع والتموضع المتوازي للأكياس

الزقية غير المنقسمة وتواجد خيوط عقيمة كاذبة (pseudoparaphyses) وخلايا الأبواغ الزقية غير المتساوية والتي تكون ضيقة منطقة الانقسام بالإضافة إلى اختلاف الطور الناقص (*Ascochyta*) عن تلك الأطور الناقصة المرتبطة بـ *Mycosphaerella* (Wilson وKaiser، 1995).

2.1.4.1. الطور الناقص

البكنيدات المحتوية على الكونيديات والمتواجدة على أجزاء نبات الحمص الحية أو الميتة هي أهم مميزات الطور الناقص لفطر *A. rabiei* ويمكن مشاهدتا في شكل بقع صغيرة (dots) منغرسة في نسيج العائل. تكون هذه البكنيديـات بنيـة أو رمـاديـة، دائريـة أو شبـه دائريـة ذات فتحـة وذات أبعـاد متغيـرة 60-215 x 80-240 مكرومتر. تحتوي هذه البكنيدات على كونيدات أو أبواغ هيولية اللون بيضوية الشكل أو متطاولة أحيانا ثنائية الخلية ذات أبعاد 3.9-4.0 x 8.2-10.4 مكرومتر (Sattar، 1934؛ Luthra وآخرون، 1935). إلا أن هذه الأبعـاد بالنسبة لـ Kovashevski (1936) كانت 5.5-3.4 x 16.0-6.0 مكـرومتـر علـى العائـل و5.2-3.2 x 14.0-4.8 مكرومترعلى أوساط الزرع الإصطناعية (الشكل 1.1). حديثا وبالاعتماد على دراسة نسيجية أكد Bruns و Barz (2001) بأن الأبواغ البكنيدية أحادية أو ثنائية الخلية مع سيادة وانتشار الأبواغ الأحادية الخلية. هذه الأبواغ الأحادية الخلية تحتوي على نواة أو نواتين أو أربعة أنوية، في حين تحتوي الأبواغ الثنائية الخلية على نواتين فقط بكل خلية.



الشكل 1.1. الأبواغ البكنيدية للفطر *Ascochyta rabiei* (Haware **وآخرون**، 1986).

3.1.4.1. الطور الكامل

اكتشف الطور الجنسي (teleomorph stage) لفطر *A. rabiei* أولا من قبل Kovashevski (1936) على بقايا نبات الحمص الذي قضت فصل الصيف في الحقل في بلغاريا. لاحقا تم اكتشاف هذا الطور في العديد من الدول، روسيا (Gorlenko وBushkova، 1958)، اليونان (Zachos وآخرون، 1963)، الر (Kövics وآخرون، 1986)، إسبانيا (Jiménez-Díaz وآخرون، 1987)، سوريا (Haware، 1987) والولايات المتحدة (Kaiser وHannan، 1987).تكون الأجسام الثمرية (Pseudothesia) بنية داكنة إلى سوداء ويتروح قطرها بين 120 و270 مكرومتر، أسطوانية الشكل وتحتوي ثمانية أبواغ زقية تخرج من الجسم الثمري عبر الفتحة (Trapero-Casas وKaiser، 1992). تكون الأبواغ الزقية هيولية ثنائية الخلية ضيقة عند الحاجز (septum) أبعادها 16 (22-12.5) x 6 (7-5) مكرومتر (Galloway وMac Leod، 2003a).

4.1.4.1. تنوع الفطر *A. rabiei*

أوحى تنوع التفاعل بين الفطر ونبات الحمص وفقدان بعض أصناف الحمص للمقاومة ضد الاصابة بالفطر *A. rabiei* بتواجد سلالات وأنماط ممرضة لهذا الفطر. إن تواجد الطور الكامل (*D. rabiei*) في دورة حياة الفطر في العديد من مناطق العالم يشير إلى الانقسام الاختزالي للفطر، والذي قد يكون السبب في تنوع أجيال المسبب المرضي مؤديا إلى تركيبة معينة (combinations) لموروثات الإمراضية وبالتالي إلى ظهور أنماط ممرضة (pathotypes) جديـدة، مع أن الفطر *A. rabiei* غيـر متجانـس الطـور (heterothallic) والنـوعيـن الوراثييـن (two mating types) غير متواجدين في جميع مناطق زراعة الحمص (Khan وآخرون، 1999a). لقد تم استعمال العديد من المصطلحات في تصنيف تنوع إمراضية الفطر *A. rabiei*، كالموعات الإمراضية (pathogenic groups)، والسلالات الفيزيولوجية (races)، والأشكال الممرضة

(virulence forms)، والأنماط الممرضة (pathotypes) (Chen وآخرون، 2004). اعتمادا على تنوع القدرة الإمراضية للفطر على العديد من أنواع وأصناف نبات الحمص فقد تم اقترح العديد من الباحثين أكثر من سلالة فسيولوجية للفطر أو نمط ممرض أو مجموعة ممرضة: 13 مجموعة إمراضية في الهند (Vir وGrewal، 1974) و6 سلالات في سوريا ولبنان (Reddy وKabbabeh، 1985) و5 أنماط ممرضة في الباكستان (Qureshi وAlam، 1984) و11 شكلا ممرضا في الولايات المتحدة (Jan وWeise، 1991) و10 أنماط ممرضة في الهند (Ambardar وSingh، 1996) بالإضافة إلى 11 نمطا ممرضا من الباكستان وإسبانيا والولايات المتحدة (Navas-Cortés وآخرون، 1998). حديثا تعرف كل من Bayaa وآخرون (2004) وChongo وآخرون (2004) على نمط ممرض في لبنان و14 نمطا ممرضا في كندا على الترتيب. قد يرجع هذا التنوع الكبير إلى اختلاف عزلات الفطر *A. rabiei* على مستوى التضاعف الكروموزومي (ploidy). سمح استعمال تقنية بصمات نواتج القطع بالإنزيمات الشرطية (Oligonucleotide fingerprinting) من التوصل إلى أن عزلات الفطر المجموعة من حقل وحيد كانت ذات تنوع كبير في العدة الوراثية (Morjane وآخرون، 1994). في نفس الوقت توصل Fisher وآخرون (1995) إلى نفس النتائج باستعمال تقنية التضاعف العام لجزيئات DNA مختلفة التسلسل (random amplified polymorphic DNA، RAPD)، حيث تمكنوا من الكشف عن تنوع كبير في العديد من العزلات المجموعة من حقول مختلفة مع تمييز العديد من عزلات الفطر المجموعة من العديد من الحقول. لذلك اقترح كل من Bruns وBarz (2001)، على ضوء هذه النتائج فرضية كون العدة الوراثية للفطر متعددة الأنوية وباستعمال تقنية قياس الومضان (microfluorometry) أكدا تواجد مستويات متعددة من الأنوية للفطر.

حديثا استنتج Chen وآخرون (2004) أن هذا العدد الكبير من تصنيف السلالات والأنواع الممرضة للفطر ناتج أساسا عن سببين رئيسيين، الأول استعمال مجموعات مختلفة من أصناف الحمص التفريقية

ومجموعات مختلفة من عزلات الفطر، أما السبب الثاني فهو افتقاد الباحثين إلى طريقة موحدة مرجعية لتقدير شدة الإصابة بالإضافة إلى افتقاد شروط أو خصائص تحدد المقاومة والحساسية تجاه الإصابة بالمرض. لذلك قاموا باستعمال 48 صنفا نباتيا و6 عزلات فطرية للفطر والتي صنفت سابقا إلى سلالات فطرية . أجريت التجربة في البيوت الزجاجية أو البلاستيكية وعلى العكس من النتائج السابقة سمحت لهم هذه التجربة بخفض عدد الأنماط الممرضة إلى نمطين pathotype I وpathotype II. أعطت العدوى الإصطناعة لـ 40 نوعا نباتيا بالنمط الممرض الثاني (pathotype II) سلسلة ثابتة من الأعراض تراوحت درجة حدتا ما بين 2 و9 على سلم تقدير لتقدير الإصابة مكون من 9 درجات (1 – 9)، في حين أعطت العدوى بالنمط الممرض الأول (pathotype I) توزيعا نمطيا ثنائيا، ثلاثة أنماط أعطت شدة إصابة تراوحت ما بين 7 و9 والبقية أعطت شدة إصابة كانت كلها أعلى من 4.

5.1.4.1. أعراض المرض

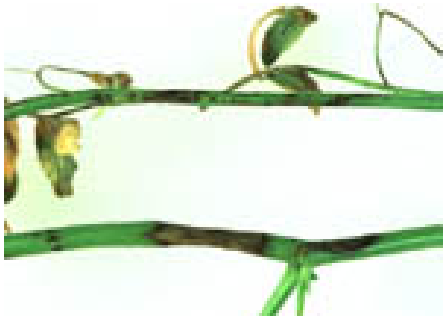
يهاجم الفطر *A. rabiei* جميع الأجزاء الهوائية للنبات. تؤدي الإصابة المبكرة الناتجة عن بذور مصابة إلى موت البادرات. ببنما تظهر على البادرات التي لم تمت بقع سوداء صغيرة سرعان ما تكبر في الحجم مسببة ذبول الساق ثم انكسارها وبعد ذلك موت البادرة. تتشكل العديد من البكنيديات في موقع الإصابة في البقع النكروزية. في الحقل تظهر أعراض المرض في البداية على شكل بقع صغيرة على بعض النباتات لكنها سرعان ما تنتشر بتوفر الظروف الملائمة من درجة الحرارة والرطوبة (Haware وآخرون، 1986؛ Alam وآخرون، 1989؛ Porta-Puglia، 1990؛ Hamid وStrange، 2000؛ Pande وآخرون، 2005).

تصاب نباتات الحمص في جميع مراحل النمو ويكثر احتمال إصابتها في فترة الإزهار حتى بداية تكوين القرون. تصيب الأبواغ البكنيدية والأبواغ الزقية المنتقلة عن طريق الهواء الأوراق الحديثة التكون لتكون بقعا

مائية صغيرة نكروزية سرعان ما تكبر في الحجم. كما يمكن أن تنتقل الأبواغ البكنيدية عن طريق الماء لتنتشر على النبات على شكل بقع متفرقة مؤدية إلى انتقال العدوى إلى بقية الأنسجة على نفس النبات أو على النباتات المجاورة. بالموازاة مع ذلك تنتشر الأعراض على كل الأجزاء الهوائية للنبات من أوراق وأزهار وقرون وأفرع وأغصان، مسببة ذبول وموت الأنسجة النباتية. يعتبر تكون البكنيديا في حلقات متعاقبة على الأوراق والقرون من أهم مميزات أعراض مرض التبقع الأسكوكيتي على نبات الحمص. تظهر الأعراض على الأوراق والقرون دائرية مع حواف بنية ومركز رمادي يحتوي البكنيدات أما على السيقان والأفرع فتكون متطاولة (Haware وآخرون، 1986؛ Alam وآخرون، 1989؛ Porta-Puglia، 1990؛ Hamid وStrange، 2000؛ Pande وآخرون، 2005). (شكل 2.1).

تذبل المناطق أعلى الإصابة وتموت، أما القرون المصابة في طور النمو ذات الأعراض الظاهرة فلا تعطي بذورا. وتؤدي أحيانا إصابة القرون غير شديدة الحدة إلى إصابة البذور بالفطر عن طريق الغلاف الخارجي والجنين. يتغير لون هذه البذور وتظهر عليها بقع عميقة سوداء دائرية أو غير منتظمة. أحيانا يمكن ملاحظة تكون البكنيدات عليها بالعين المجردة. تعطي القرون المصابة في طور النضج بذورا ملوثة بالفطر (Haware وآخرون، 1986؛ Alam وآخرون، 1989؛ Porta-Puglia، 1990؛ Hamid وStrange، 2000؛ Pande وآخرون، 2006).

ينتشر الفطر تحت البشرة (subepidermally) في (apoplast) الأوراق والسيقان مسببا انكماشا وا يارا سريعا للأنسجة مؤديا إلى تكون بقع نكروزية مع تكون البكنيديات على هذه الأنسجة (Pandey وآخرون، 1987؛ Höhl وآخرون، 1990؛ Köhler وآخرون، 1995؛ Ilarslan وDolar، 2002). بالإضافة إلى ذلك وجد Gaur (2000) بأن نسـبة إنتـاج اليخضور a و اليخضور b قد انخفضت بشكل محسوس في الأوراق ذات الإصابة الشديدة أو المعتدلة نتيجة تثبيط الفطر *A. rabiei* لنشاطية إنزيم chlorophyllase.



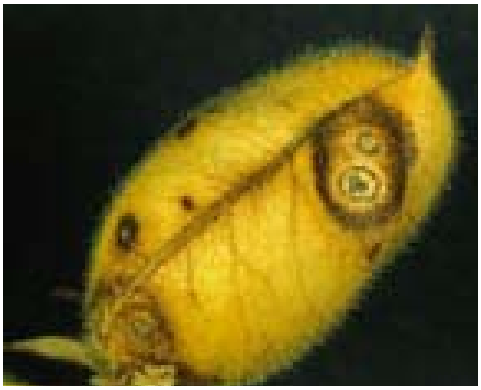
أ

ب

ج

د

هـ



و

الشكل 2.1. أعراض مرض التبقع الأسكوكيتي على السيقان (أ، ب)، والأوراق (ج، د) والقرون (هـ، و) (Anonymous، 2006).

6.1.4.1. حيوية الفطر *A. rabiei*

يبقى الفطر حيا على البقايا النباتية على سطح الأرض وعلى البذور على شكل ميسليوم وبكنيديات وكونيديات وعلى طوره الجنسي (Kaiser، 1977)، تسمح هذه الخاصية للفطر بالبقاء حيا من موسم زراعي سابق إلى موسم لاحق (Pande وآخرون، 2005).

تعتبر البذور أهم مصدر للعدوى بلقاح الفطر وربما أفضل وسيلة يحافظ ا الفطر على حيويته وانتشاره (Haware وآخرون، 1986؛ Porta-Puglia، 1990). فقد كانت البذور المصدر الأساسي لانتشار المرض في دول أو مناطق كانت خالية من مرض التبقع الأسكوكيتي (Kaiser، 1972؛ Maden وآخرون، 1975؛ Cother، 1977). وفي مناطق زرع ا نبات الحمص حديثا (Morrall وMckenzie، 1974) مثل كندا والولايات المتحدة (Wilson وKaiser، 1995) وأستراليا (Galloway وMcLeod، 2003b).

يمكن للفطر أن يتواجد على سطح أو داخل البذرة (Maden وآخرون، 1975؛ Dey وSingh، 1994) وترتبط حيويته بالظروف المحيطة. يمكن أن يبقى حيا لمدة 14 إلى 15 شهرا في البذور المصابة والمحفوظة في درجة حرارة 5 م° و10 م° على الترتيب، تنخفض هذه المدة إلى 12 و10 أشهر بالنسبة للبذور المحفوظة في درجة حرارة 20° م و30° م على الترتيب (Tripathi وآخرون، 1987). كما بلغت نسبة الأبواغ النابتة المتحصل عليها من بذور حفظت في درجة حرارة 3 ± 2° م لمدة 14 إلى 15 شهرا 33%. ويؤدي حفظ البذور المصابة بالفطر في درجات حرارة 55 و60 و65° م لمدة 12 ساعة إلى القضاء تماما على الفطر، إلا أن هذا يؤدي إلى خفض نسبة إنبات البذور بـ 50% (Maden وآخرون، 1975). يذكر Kaiser (1995) بأن الأجسام الثمرية (pseudothecia) للطور الكامل للفطر (*D. rabiei*) تتكون على البقايا النباتية المصابة طبيعيا. كما تتشكل أيضا الأبواغ الزقية على البقايا النباتية في الحقـل خـلال فصل الربيع على سطح التربة

(Trapero-Casas وKaiser، 1992؛ Navs-Cortes وآخرون، 1995). وتعتبر مصدر العدوى الأولي للقاح الفطر لمحصول السنة القادمة (Trapero-Casas وآخرون، 1996).

بالإضافة إلى بقاء الفطر حيا على البذور المصابة لفترات مختلفة، فإنه بإمكانه البقاء حيا لمدة عامين على البقايا النباتية المصابة في الحقل (Zachos وآخرون، 1963؛ Navas-Cortés وآخرون،1995). وقد يبقى حيا لأكثر من عامين على الأنسجة النباتية المصابة على سطح التربة في درجة ما بين 10 و35° م وفي رطوبة نسبية من 0% إلى 30% (Kaiser، 1973). ينمو الفطر بشكل رمي على البقايا النباتية المصابة من سيقان وقرون وبذورفي الحقل ويكون بكنيديات وأجسام ثمرية (pseudothecia) (Nene، 1982؛ Navas-Cortés وآخرون، 1995؛ Trapero-Casas وآخرون، 1996؛ Kaiser، 1997).

7.1.4.1. انتشار الفطر

يشكل الفطر في الظروف المناخية الملائمة البكنيدات بكثرة في مناطق الإصابة، حيث تظهر على شكل بقع حلقية ذات مركز واحد سوداء. تساهم الأمطار والرياح في انتشار الأبواغ التي تخرج من البكينديات عبر الفتحات (Porta-Puglia، 1990). تمثل درجات الحرارة من 19° م إلى 24° م والمتزامنة مع فترة رطبة لمدة 10 ساعات في اليوم أو أكثر أفضل الظروف المناسبة للانتشار الوبائي للفطر (Weltzien وKaack، 1984)، وتتوفر هذه الظروف بنسبة كبيرة في مناطق زراعة نبات الحمص في حوض البحر المتوسط (Porta-Puglia، 1990). يساهم الطور الكامل (*D. rabiei*) للفطر في انتشار المرض بشكل كبير، حيث يعتبر أحد أهم وسائل انتشار الفطر إلى جانب البذور، بحيث يسمح بانتشاره لمسافات بعيدة عن المركز الأولي للمرض (Galloway وMacLeod ، 2003b). ويذكر Kaiser (1997) بأن الأبواغ الزقية للطور الكامل تسمح بانتشاره لعدة كيلومترات عن مركز الإصابة (شكل 3.1).

الشكل 3.1. دورة مرض التبقع الأسكوكيتي (Anonymous، 2005).

8.1.4.1. تطور المرض

تساهم الظروف المناخية من حرارة ورطوبة وتساقط الأمطار بشكل كبيرة في تطور وانتشار مرض التبقع الأسكوكيتي (Weltzien وKaack، 1984؛ Trapero-Casas وKaiser، 1992).

تعتمد الإصابة الأولية على مدى نجاح الفطر في اختراق النبات العائل. تنبت أبواغ الفطر وتنمو في البداية على الأجزاء الهوائية للنبات ويرتبط ذلك بنسبة الرطوبة وبدرجة الحرارة، حيث تمثل درجة حرارة 20° م ورطوبة نسبية من 90 إلى 100% الظروف المثلي للإصابة بالفطر وظهور الأعرض وتطور المرض (Höhl وآخرون، 1990؛ Trapero-Casas وKaiser، 1992؛ Jhorar وآخرون، 1998). يذكر Höhl وآخرون (1990) بأن درجات الحرارة أقل من 18° م وأكبر من 28° م تثبط تطور المرض، ولم تسجل أعراض الإصابة في درجات حرارة 10 م° و30 م° (Chauhan وSinha، 1973).

توفر رطوبة نسبية (RH) من 90 إلى 100% ضروري لتطور أعراض المرض ولتبوغ الفطر. كما سجل ظهور أعراض طفيفة على الأوراق في غياب الندى على الأوراق حتى وإن بلغت الرطوبة النسبية 98%، مع غياب تام للإصابة في رطوبة نسبية أقل من 95% (Höhl وآخرون، 1990؛ Trapero-Casas وKaiser، 1992؛ Jhorar وآخرون، 1998).

يشكل توفر الندى لمدة 17 ساعة عاملا مهما في انتشار حاد للإصابة وأحيانا تساهم فترة جفاف من 6 ساعات إلى 48 ساعة مباشرة بعد العدوى في انتشار شديد للمرض، كما أن توفر فترة جافة >12ساعة بعد فترة رطوبة أولية (wetting period) لمدة 6 ساعات تؤثر سلبا على تطور المرض (Trapero-Casas وKaiser، 1992). ويذكر كذلك Jhorar وآخرون (1998) بأن توفر فترة جفاف مباشرة بعد العدوى والمتبوعة بفترة رطوبة تخفض من شدة الإصابة، حيث سجل ارتباط كبير بين شدة الإصابة وفترة الجفاف.

يساهم الظلام بشكل كبير في تطور المرض خاصة إذا توفر بعد الإصابة (Jhorar وآخرون، 1998). تبين كذلك بأن الحفاظ على الرطوبة لمدة 8 أيام تساهم في رفع عدد البكنيدات وإنتاج الأبواغ على الأوراق المصابة (Jhorar وآخرون، 1998). ينتشر المرض ويتطور بسرعة على النبات الناضج في الجو الرطب الدافئ مع فترة حضن قصيرة لا تتجاوز 6 أيام (Pandey وآخرون، 1987).

9.1.4.1. المدى العوائلي للفطر

يعتبر نبات الحمص العائل الأساسي للفطر *A. rabiei*، إلا أنه تم تسجيل إصابة العديد من النباتات في تجارب عدوى اصطناعية مثل العدس والباسلاء (*Pisum sativum* L.) والبيقيـــة (vetch) واللوبيـاء (*Vigna sinensis* Endl.) والفاصولياء (*Phaseolus vulgaris* L.) (Zachos وآخرون، 1963؛ Nene وReddy، 1987؛ Kaiser، 1991؛ Khan وآخرون، 1999b). بالإضافـة إلـى ذلـك سجلـت إصابة النباتات التالية *Lactuca serriola* و*Lamum amplexicaule* و*Medicage sativa* و*Melilotus alba* و*Thlapsi arvese* بفطر *A. rabiei* (Kaiser، 1991).

أظهرت تجارب عدوى اصطناعية على 13 نوعا متحصل عليها من 7 أصناف من نبات الحمص هذه اختلافا في التفاعل مع الفطر (Singh وآخرون، 1981). وفي تجارب أخرى بين Porta-Puglia (1990) أن النوع *Cicer reticulantum* Ladizinsky المنحدر من أصل نبات بري هو الصنف الوحيد الذي أظهر حساسية تجاه الفطر.

10.1.4.1. إنتاج السموم

تنتج الفطريات الممرضة للنباتات العديد من المستقلبات السامة، ما يسمى بالسموم الفطرية والتي تتداخل مع أيض النبات متسببة في ظهور العديد من الأعراض كالذبول والاصفرار والتبقع على الأصناف الحساسة. وقد صنفت هذه السموم إلى سموم نوعية (Host specific) وسموم غير نوعية (non- host specific) (Strange، 2003). يفرز السم النوعي جنس معين من الفطريات ويكون مرتبطا به وبنباته العائل فقط ونجده بصفة خاصة عند الجنسين *Alternaria* و*Helminthosporium* (الجدول 4.1) (Wolpert وآخرون، 2002؛ Strange، 2003)، أما السم غير النوعي فيفرزه العديد من الفطريات كما هو الحال لجنسي *Ascochyta* و*Fusarium* (الجدول 5.1) (Strange، 2003).

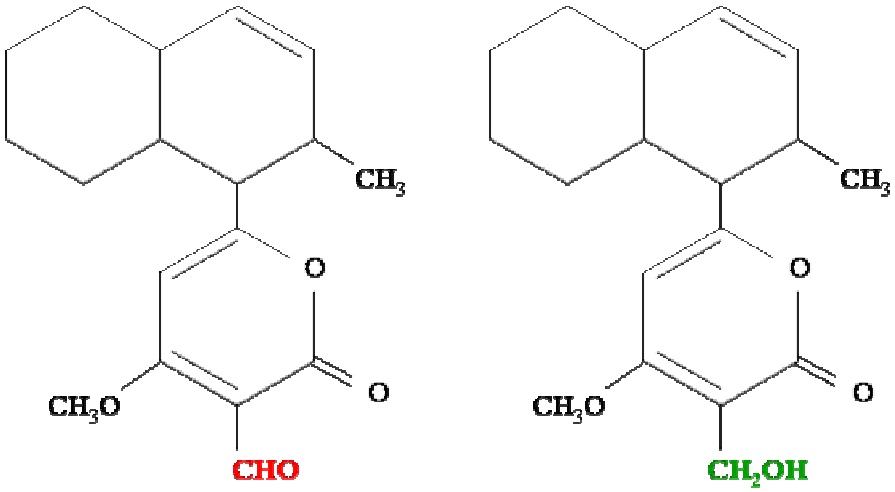
تم التعرف وعزل سموم Solanapyrone A وB وC في البداية من رشاحة الفطر *Alternaria solani* المسبب لمرض اللفحة المبكرة على نباتي الطماطم والبطاطس (Ichihara وآخرون، 1983). لاحقا تم عزل السموم A وC من رشاحة الفطر *A. rabiei* (Alam وآخرون، 1989؛ Latif وآخرون، 1993). وعند تنميته على وسط محدد متمثل في وسط Czapek-Dox nutrients المضاف إليه الكاتيونات Zn وMn وCa وCu وCo يفرز *A. rabiei* الأنواع الثلاثة من سموم Solanapyrones (شكل، 4.1) (Alam و آخرون، 1989؛ Chen وآخرون، 1991؛ Höhl وآخرون، 1991؛ Latif وآخرون، 1993؛ Hamid وStrange، 2000). يعتبر النوع A هو أكثر الأنواع سمية مقارنة مع السمين B وC (Strange وAlam، 1992؛ Kaur، 1995؛ Hamid وStrange، 2000). كما يفرز الفطر *A. rabiei* عند تنميته على وسط يحتوي مستخلص نبات الحمص مركبا ساما غير ثابت حراريا بوزن جزيئي 7.6 kDa وهو غليكوزيد عديد الببتيد بعد 4 أيام من الحضن (Chen وStrange، 1994).

الجدول 4.1. بعض السموم النوعية (Host specific).

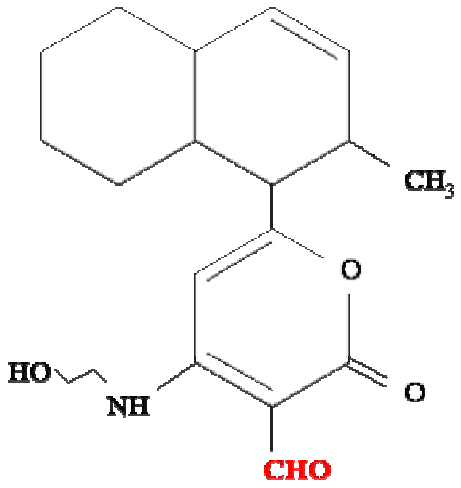
المسبب المرضي	العائل	السم	المرجع
Alternaria alternata	الإجاص الياباني	AK-toxin	Tanaka وآخرون (1999)
	الفراولة	AF-toxin	Nakashima وآخرون (1985)
	التفاح	ACT-toxin	Johnson وآخرون (2000)
	الطماطم	AAL-toxin	Caldas وآخرون (1994)
	الليمون الخشن	ACR (L)-toxin	Kohmoto وآخرون (1985)
Bipolaris sacchari	قصب السكر	HS-toxin	Yoder وآخرون (1997)
Cochliobolus carboniumhetero	الذرة	HC-toxin	Meeley وWalton (1991)
Helminthosporium maydis	الذرة	Tox1A toxin	Kono وDaly (1979)
	الذرة	Tox1B toxin	Kono وDaly (1979)
Helminthosporium victoriae	الخرطال	Victorin	Meehan وMurphy (1947)
Pyrenophora tritici repentis	القمح	Ptr Tox A	Zhang وآخرون (1997)
		Ptr ToxB	Strelkov وآخرون (1999)

الجدول 5.1. بعض السموم غيرالنوعية (Non Host- specific).

المسبب المرضي	العائل	السم	المرجع
Pseudomonas syringae pv, tabaci	التبغ	Tabtoxin	Owens (1969)
Pseudomonas syringae pv, phaseolicola	الفاصولياء	Phaeolotoxin	Mitchell (1978)
Fusarium graminium	القمح	Trichothecene	Mirocha وآخرون (1994)
Fusarium moliniform	الذرة	Fumonisins	Arino وآخرون (2007)
Fusarium solani	الليمون	Naphthazarin	Van Rensburg وآخرون (2001)
Ascochyta rabiei	الحمص	Solanapyrones	Alam وآخرون (1989)



Solanapyrone A **Solanapyrone B**



Solanapyrone C

الشكل 4.1. بنية سموم solanapyrones A وB وC (Alam وآخرون، 1989).

11.1.4.1. اختبارات السموم

إن الاهتمام بدراسة المركبات التي تفرزها الكائنات الممرضة والتي تؤثر سلبا على النبات العائل يمكن أن يساهم في فهم على الأقل جزء من ظهور أعراض المرض. يمكن اللجوء في مثل هذه الدراسات إلى زرع الكائن الممرض على وسط سائل ومن ثم اختبار تأثير رشاحته أو تنميته على وسط صلب ثم استخلاص المادة المفرزة ودراسة تأثيرها. إذا تستعمل هذه الاختبارات الحيوية لغرض تنقية هذه المواد السامة (phytotoxic compounds) والتي يمكن التعرف عليها بالعديد من الطرق الفيزيائية مثل طيف الكتلة، الأشعة فوق البنفسجية والأشعة تحت الحمراء والرنين المغناطيسي النووي (nuclear magnetic resonance، (NMR)) والتي يمكن أن نظيف إليها تحليل البلورات بأشعة X إن كانت هناك بلورات. سمحت مثل هذه الطرق بالكشف عن أن هذه المواد ذات تركيب كيميائي شديد التنوع. عادة، يفرز الكائن الممرض مجموعة أو عائلة من المركبات عوض إفراز مادة سامة وحيدة، ويختلف كل عضو من هذه المجموعة أو العائلة عن بقية المركبات بنشاطيته البيولوجية (Strange، 2007).

إن تحديد دور هذه المركبات في الآلية الإمراضية (القابلية على إحداث المرض، pathogenesis) أو في شدة الإصابة (virulence) في غاية الأهمية، ويمكن تحقيق هذه العملية عبر اختبارات حيوية تكون متميزة بالسرعة والحساسية مما يسمح بالحصول على نتائج كمية (Strange، 2007).

من الصعب الكشف عن السموم الفطرية في النباتات المصابة وذلك لأنه أحيانا تكون مرتبطة مع موقع نشاطيتها أو تكون قد تحولت إلى مركب آخر يشكل المادة السامة النهائية. فعلى سبيل المثال تاجم إنزيمات البيتيداز سم phaseolotoxin (Cuppels وAinsworth، 1995)، الذي تفرزه البكتريا *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* لتحوله إلى *N*6-(*N*1-sulfo-diaminophospinyl)-L-ornithine (Psorn) (Bender وآخرون، 1996). في حين تم

الكشف عن سم destruxin B وسم homodestruxin B اللذين يفرزهما الفطر *Alternaria brassicae* في أوراق نبات *Brassica napus* المصاب بهذا الفطر (Buchwaldt وJensen، 1991).

لقد تم استعمال العديد من الاختبارات لكشف وتقدير السموم، كاستعمال البذور والشتلات وحتى النبات الكامل، في حين الكثير منها يستعمل أجزاء نباتية كالخلايا المعزولة ومعلق الخلايا والمزارع الخلوية والبروتوبلاست (Strange، 2007).

1.11.1.4.1. اختبار إنبات البذور

لغرض استعمال البذور في اختبار السموم، تعقم أولا بمحلول ماء جافيل لمدة 15 دقيقة ثم تغسل بالماء المقطر المعقم مرتين ثم تزرع على ورق ترشيح (S and S filter أو Whatman paper N°1) المبلل برشاحة الفطر في أطباق بتري التي تحضن لمدة 6 أيام (Tschen وآخرون، 1997؛ Mesbah وآخرون، 2000). أما Haider وآخرون (1986) فيضع البذور المعقمة في 20 مل من رشاحة الفطر أولا ثم بعد ذلك يزرعها على ورق الترشيح المبلل بنفس الرشاحة في أطباق بتري.

2.11.1.4.1. اختبار الشتلات (النبتات، Seedling)

تغمر البذور المعدة لتحضير الشتلات أو النبتات في الماء لمدة كافية من 8 ساعات إلى 24 ساعة في 24° م، ثم توضع على ورق مبلل في أطباق بتري بحيث يكون الجنين نحو الأسفل وتترك لتنبت. إثر ذلك تنتقى البذور ذات الجذير البالغ من الطول 5 ملم لإجراء الاختبار (Scheible وآخرون، 2003). لقد استعملت الشتلات المفصولة في الاختبارات الحيوية، كما كان الحال عند دراسة سمية رشاحة الفطر *Fusarium solani* f. sp. *glycines* المسبب للموت المبكر عند نبات اللوبياء (Hartman وآخرون، 2004). كما تم أيضا اختبار المسقلبات السامة لفطر

Phytopththora citrophthora Hartman على شتلات نباتات عائلة مثل الليمون ونباتات غير عائلة مثل الطماطم (Breiman وBarash، 1981)، بالإضافة إلى ذلك تم استعمال شتلات نبات الطماطم في الاختبارات الحيوية لسموم الفطر *Phytopththora cactorum* (Plight وRudinckiا، 1979).

3.11.1.4.1. اختبار الأوراق

يمكن كذلك استعمال الأوراق في الاختبارات الحيوية سواء كانت على النبات أو كأوراق منفصلة. فقد استعمل Cuppels وAinsworth (1995) الأوراق في الاختبارات الحيوية بتطبيق مستخلص لرشاحة بكتيرية (*Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* أو *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) بعد عملية طرد مركزي ثم تخفيف الراسب في الماء المقطر المعقم على سطح أوراق نبات الطماطم، على أساس أنه في حالة احتواء المعلق على سم الكورونا تين فإن الأنسجة المحيطة بمنطقة حقن الرشاحة تفقد اللون الأخضر وتصبح صفراء اللون وفي حالة عدم احتواء االمعلق على السم فإن هذه الأنسجة تحتفظ باللون الأخضر وذلك بعد مرور 5 أيام. أما Csinos وHendrix (1977) فقد استعملا أوراق نبات التبغ المفصولة في اختبار السموم التي يفرزها الفطر *Phytopththora cryptogea*. كما قامت Dolar وآخرون (1994) في إطار انتقاء أصناف حمص مقاومة للفطر *A. rabiei* باستعمال أوراق الحمص المفصولة عن النبات. فقد قاموا بانتقاء الأوراق الحديثة التشكل والأوراق المسنة من نباتات حمص بعمر 15 يوما. تغمر الأوراق في الماء في أطباق بتري زجاجية (قطر 9 سم)، بحيث يكون سطح الورق السفلي تجاه الماء، ثم يحقن السطح العلوي بـ 5 مكرولتر من معلق الفطر *A. rabiei* لتحضن بعدها الأوراق لمدة 14 يوما في درجة حرارة 20 ± 2° م مع 12 ساعة ضوء.

بالإضافة إلى استعمال الأوراق المنفصلة كاملة، يمكن استعمالها في التجارب الحيوية بعد تقطيعها إلى أجزاء صغيرة، كما كان الحال عند Vidhyasekaran وآخرون (1997)، الذين قاموا باختبار إنتاج الفطر

Rhizoctonia solani للسم على أوراق نبات الأرز بعد تقطيعها إلى أجزاء صغيرة (4 سم). توضع أجزاء الورقة على شريحة زجاجية وبعد ذلك تحدث خدوش في أجزاء الورقة، توضع الشرائح الزجاجية داخل أطباق بتري فوق ورق ترشيح مبلل. أما Mesbah وآخرون (2000) فبعد وضع الأوراق داخل أطباق بتري على ورق ترشيح مبلل بـ 3 مل من سم AAL بتركيز 0.2 أو 0.05 مكرومولار (µM) منقى من رشاحة الفطر الخالية من خلايا الفطر (Cell-free culture filtrate، CFCF)، بينما يستعمل الماء المقطر كشاهد. تحضن الأطباق في غرف حضن في شدة إضاءة 3000 lux ودرجة حرارة 25° م لمدة 72 ساعة قبل مراقبة ظهور الأعراض.

4.11.1.4.1. زراعة الأنسجة

استعمل بعض الباحثين زراعة الأنسجة في الاختبارات الحيوية، كما كان الحال في اختبار أنسجة أوراق التفاح انطلاقا من خلايا الأنسجة القمية (meristem)، والتي كانت أكثر حساسية من بقية أنسجة النبات تجاه سم AM-toxin، السم النوعي للنمط الممرض للفطر *Alternaria alternata* (Miyashita وآخرون، 2001؛ Zhao وآخرون، 2002). يعطي هذا الاختبار نتائج أفضل من استعمال أوراق أشجار التفاح. بالإضافة إلى ذلك يمكن مزاوجة استعمال زراعة الأنسجة في الاختبارات الحيوية للسموم النوعية أو مكافئاتا مع قياس تركيز الأكسجين في عملية التمثيل الضوئي باستعمال مسبار قياس الأكسجين. كان النتائج ذات ارتباط وثيق مع قدرة هذه السموم على إحداث البقع النكروزية (Miyashita وآخرون، 2003). كما يمكن أيضا مزاوجة هذا الاختبار مع استعمال طريقة الومضان (Fluorescence imaging) والتي تسمح بالمقارنة بين الأنسجة المتضررة بفعل السم مع تلك الأنسجة السليمة على نفس الورقة (Bowyer وآخرون، 1998). وقد استعملت هذه التقنية في اختبار رد فعل نبات الكولزا (*Brassica napus*) ونبات الخردل الأبيض (*Sinapis alba*) تجاه سم destruxins A (Jensen وBuchwaldt ، 1991) وسم destruxins B وقد كان تركيز السم الأدنى الذي يمكن الكشف عنه 50 نانوغرام/مل و10 نانوغرام/مل على الترتيب (Soukupova وآخرون، 2003).

5.11.1.4.1. اختبار الخلايا المنفردة والبروتوبلاست

قد ينتج عن استعمال النباتات أو أجزاء من النباتات تغيرات أو عدم تطابق في النتائج ناتج عن انتشار السم ، ولتجنب هذه الحالة يمكن اللجوء إلى استعمال الخلايا المنفردة أو المفصولة عن النسيج والبروتوبلاست. على سبيل المثال فقد تم اختبار سمية رشاحة الفطر *A. rabiei* على خلايا متحصل عليها من أوراق نبات الحمص بتقدير نسبة الخلايا الحية باستعمال مادة fluorescein diacetate الوامضة وتسمح هذه الطريقة بتقدير سمية الرشاحة، وقد تم استعمال هذه الطريقة في عزل السموم التي تم التعرف عليها لاحقا بكو ا سم A solanapyrone وC (Alam وآخرون، 1989؛ Chen وStrange، 1994).

تقنية أخرى، يمكن استعمالها مخبريا تتمثل في حضن خلايا منفصلة فردية أو بروتوبلاست، متحصل عليها في نفس يوم التجربة، مع السم ثم بعد ذلك إضافة مادة fluorescein diacetate. تدخل هذه المادة إلى داخل الخلية وحينئذ تنفصل مجموعة acetate عن المادة بفعل إنزيمات الإستيراز (esterases) غير النوعية، مادة fluorescein الناتجة عن هذا الانفصال لا يمكنها اختراق الغشاء السيتوبلازمي السليم للخلايا الحية، بينما باستطاعتها الخروج من الخلايا الميتة والتي فقد غشائها السيتوبلازمي خصائصه. عند الملاحظة الهرية باستعمال الهر ذي الومضان (fluorescence microscope) تلاحظ الخلايا الحية وامضة، بينما تلاحظ الخلايا الميتة والتي لم تحتفظ بمادة fluorescein سوداء اللون. يمكن إجراء هذا الاختبار في صفائح المعايرة الدقيقة (microtitre plate) باستعمال 50 مكرولتر من السم ومن معلق الخلايا أو البروتوبلاست. تقدر النتائج بحساب التركيز المميت لـ 50% من الخلايا (LD_{50}) وتحويلها إلى probits مع استعمال سلسلة من التخافيف الثنائية (two-fold dilution) للسم (Strange وآخرون، 1982). ويقترح Shohet وStrange (1989) عند استعمال الخلايا المعزولة من أوراق نبات البسلة الهندية (*Cajanus cajan*) المزاوجة بين إنزيمات الهضم (enzyme digestion) والرج الميكانيكي ورشاحة الفطر *Phytophthora drechsleri* f.sp. *cajani*.

بالإضافة إلى التقنيات السابق ذكرها، يمكن اللجوء إلى قياس التسرب الكهربائي (electrolyte leakage) الناتج عن أنسجة النباتات لتحديد سمية المركبات المفرزة، فمثلا يسبب phomalactone تسربا كهربائيا سريعا في جذير نبات الخيار بتركيز أقل من 50 جزء من المليون (Lydon وPatterson، 2001).

6.11.1.4.1. معلق المزارع

طريقة أخرى يمكن استعمالها لتجنب مشاكل الانتشار في الأنسجة المتعددة الخلايا هو استعمال معلق المزارع. فقد تمكن Dubery وآخرون (1994) من تحديد التركيز المثبط بـ 50% لخلايا نبات التبغ والتركيز المميت للسم البروتيني cactorein الذي يفرزه *Phytophthora cactorum* لهذه الخلايا بـ 38 nM وأقل من 100 nM على الترتيب. كما استعمل أيضا معلق خلايا أنواع *Brassica* وبنفس هذه الطريقة لدراسة سمية كل من destruxin B وhomodestruxin B ومستقلباتهما وhydroxydestruxin B (Moyroud وآخرون، 1996) وكذلك hydroxyhomodestruxin B (Pedras وBiesenthal، 2000؛ Pedras وآخرون، 2000؛ Schuler وآخرون، 2001).

12.1.4.1. آلية العدوى

تبدأ الأبواغ في الإنبات فوق الأوراق والسيقان بعد 12-48 ساعة من الحضن (Pandey وآخرون، 1987؛ Hohl وآخرون، 1990؛ Ilarslan وDolar، 2002) وذلك حسب درجة الرطوبة وتعرض الأوراق للضوء. تبدأ الكونيديات في الانتفاخ قبل وأثناء تشكل أنبوب الإنبات (Hohl وآخرون، 1990؛ Ilarslan وDolar، 2002).

وجد كل من Höhl وآخرون (1990) وKöhler وآخرون (1995) بأن الفطر يخترق النبات العائل بطريقة مباشرة عبر البشرة مع/أو عبر الثغـور المائية بعد تشكيل أعضاء لاصقة شبيهـة ببنيـات العـدوى

(appressorium-like infection structures)، إلا أن Ilarslan وDolar (2002) سجلا حدوث الإصابة عن طريق الثغور. بينما اعتبر باحثون آخرون بأن بنيات العدوى المشكلة ما هي إلا أعضاء لاصقة (appressoria)، إلا أ ا لا تحتوي على الميلانين (not melanized)، مما أوحى بصعوبة امتلاك الفطر لقوة كافية تسمح له بالاختراق الميكانيكي المباشر لأنسجة النبات وبالتالي فإنه يحتاج لعملية الاختراق إفراز إنزيمات محللة للجدر (Tenhaken، 1992). يذكر Tenhaken وBarz (1990) بأن فطر *A. rabiei* عندما ينمى على وسط Richard المحور والمحتوي على البكتين (pectin) كمصدر وحيد للكربون، يفرز إنزمي polygalacturonase وpectin methyl esterase. كما تم فصل وتنقية إنزيمات أخرى والتي يمكن أن تلعب دورا في الإمراضية أو في حدة الإصابة (pathogenicity or virulence) (Tenhaken وآخرون، 1997) من رشاحة الفطر كإنزيم cutinase وإنزيم polygalaturonase والتي تعمل على هدم حمض polygalaturonic (Tenhaken وBarz، 1991).

بعد عملية الاختراق، تنمو الهيفات في الأوراق بين طبقة البشرة وخلايا البارنشيما الدعامية، مشكلة كتلا من الميسليوم، حيث تتشكل كونيديات تنتشر منها أبواغ بكنيدية عبر الفتحة (Pandey وآخرون، 1987؛ Höhl وآخرون، 1990). في غضون ذلك تتحطم خلايا البشرة وخلايا الواجهة، بينما تفقد خلايا البارنشيما الإسفنجية شكلها وتنظيمها. في السيقان وبعد اليوم الخامس من العدوى، تنهار خلايا القشرة تماما مع ا يار أجزاء من اللب. بعد اليوم السابع تنهار تماما الأنسجة التي لا تحتوي على الفليـن (non-lignified tissues) مع ظهور اللون النيكروزي. تبقى الأنسجة المحتوية على الفلين (lignified tissues) سليمة (Pandey وآخرون، 1987).

يذكر كل من Hohl وآخرون (1990) وIlarslan وDolar (2000) بأن تطور الإصابة يكون متماثلا في الصنف الحساس وفي الصنف المقاوم، من حيث زمن إنبات الأبواغ وتطور الجسم القطبي وإفراز المادة الصمغية وتشكل الأعضاء اللاصقة، إلا أن الفرق الملاحظ بين الصنفين أنه في الصنف المقاوم تتكون خلال المرحلة المبكرة من الإصابة بقع نكروزية عند مناطق الاختراق عبارة عن استجابة حالة فرط حساسية ضـد الإصابـة

(hypersensitive response). أعطت هذه البقع ومضانا عند الملاحظة الهرية كان متناسبا مع تراكم الفيتوألكسينات (phytoalexins) والتي يعزى إليها الحد من انتشار واختراق الفطر لأنسجة النباتات المقاومة (Dolar وGurcan، 1993؛ Dolar، 1994). تمثل maackiain وmedicarping أهم فيتوألكسينات نبات الحمص (Weltring وآخرون، 1995). تكون هذه الفيتوأكسينات عرضة للأكسدة والإرجاع بفعل إنزيمي reductase وhydroxylase اللذان يفرزها الفطر *A. rabiei* واللذان يمكن أن يساهما في في حدة المرض (Tenhaken وآخرون، 1997).

يشير ظهور البقع النكروزية على الأنسجة البارنشيمية والقشرة وأنسجة اللب قبل غزو هيفات الفطر لأنسجة العائل إلى دور السموم في تطور أعراض المرض (Pandey وآخرون، 1987؛ Höhl وآخرون، 1990). يمكن أن تلعب سموم solanapyrone A وB وC دورا في الإمراضية أو في حدة المرض لفطر *A. rabiei*، حيث تؤدي معاملة أوراق الحمص بسموم solanapyrones إلى ظهور نفس أعراض المرض التي ظهرت على النبات المصاب طبيعيا. في تجارب عديدة ومختلفة يؤدي السماح لأغصان أو براعم نبات الحمص بامتصاص سم solanapyrone A بتركيز 45.3 مكروغرام ثم الحضن في الماء لمدة ساعة 96 إلى انكسارها مباشرة تحت أول ورقة متكونة وهي أعراض نوعية لمرض التبقع الأسكوكيتي. كما يؤدي حضن هذه الأغصان أو البراعم في محلول سم solanapyrone B بتركيز 450 مكرومولار (µM) لمدة 72 ساعة إلى ظهور أعراض الذبول وفقدان الوريقات لليخضور (Hamid وStrange، 2000). كما سجل Kaur (1995) ارتباطا وثيقا بين قدرة عزلات الفطر *A. rabiei* على إحداث الإصابة وإنتاجها لسموم solanapyrones عند تنميتها على وسط نمو اصطناعي (*in vitro*).

5.1- مقاومة النباتات للإصابة بالفطريات

تتفاعل النباتات ضد الإصابة بالفطريات الممرضة بتنشيط نظام دفاعي متعدد المركبات يشمل نفس عناصر الاستجابة الدفاعية سواء كان هذا التفاعل نوعيا أو غير نوعي. يتطلب تنشيط تفاعلات الدفاع تعرف خلايا النبات المهاجَم أولا على المسبب المرضي ومن ثَم ارسال نوعي لإشارات الإستجابة لكل موقع تنشيط. تنشط الاستجابة الدفاعية عبر العديد من الآليات حسب تنظيم مسبق يحترم فيه التوقيت والموقع المناسب. أساسا تتضمن الاستجابة الدفاعية الناجعة الحد السريع من نمو المسبب المرضي وذلك في شكل بقع نكروزية صغيرة على مستوى الأنسجة، تكون متبوعة بدفاع مبني على أساس مركبات كيميائية مدعومة بحواجز فيزيائية. في نفس الوقت تظهر مركبات أيضية أخرى يبدوا أ ا تساهم في استمرارية النشاطية الدفاعية للنبات المهاجم. بالإضافة إلى ذلك تؤدي الإصابة الموضعية إلى ارتفاع مقاومة النبات ككتلة موحدة ضد أي إصابة جديدة (Glazebrook، 2005). يلعب تحور خلايا الجدر دورا هاما ومحوريا في مقاومة النبات للإصابة المرضية وبصفة خاصة عملية التفلن الخشبي (lignosuberisation) لخلايا الجدار. تتم عملية التفلن الخشبي تحت تحفيز إنزيم peroxidase ويبدو أ ا تساهم في الحد من انتشار المسب المرضي وأيضا تثبيط انتشار السموم (Rea وآخرون، 1998).

1.5.1. مقاومة نبات الحمص للإصابة بالفطر

1.1.5.1. الخصائص المرفولوجية

تمثل الخصائص المرفولوجية للنبات كسمك بشرة خلايا الأوراق، والخلايا الدعامية، حواجز ميكانيكية ضد اختراق المسبب المرضي لأنسجة النبات (Pande وآخرون، 2005). فقد تبين أن عدد عناصر الأوعية الناقلة (xylem) وعدد خلاياها البارنشيمية أكبر في الأصناف المقاومة منها في الأصناف الحساسة كما أن سمك خلايا بشرة السيقان يكون أكبر في أصناف النباتات المقاومة منه في الأصناف الحساسة (Agelini وآخرون،

1993؛ Venora وPorta-Puglia، 1993). تحتوي الأصناف الحساسة طبقة رقيقة من الخلايا الخارجية للجدر (outer cell)، بالإضافة إلى احتوائها على طبقة خلوية ثانية (تحت البشرة) ذات مساحة أصغر من تلك الخاصة بالصنف المقاوم (Venora وPorta-Puglia، 1993).

كما كانت عملية تفلن وتشخب جدر بارنشيما اللحاء أكثر وضوحا في الصنف المقاوم منها في الصنف الحساس والتي تزامنت مع ارتفاع نشاطية إنزيم البروكسيداز (peroxidase) و ثنائي أمين الأكسيداز (diamine oxidase) (Agelini وآخرون، 1993).

2.1.5.1. المقاومة الإنزيمية (الإنزيمات المرتبطة بالمقاومة)

تبين من خلال دراسات تجريبية أن تنشيط إنزيمات إماهة تسمح بدم خلايا جدر الكائن الممرض كعامل مقاومة بالإضافة إلى تحفيز مسار phenylpropanoid الداخلة في عملية تفلن جدار خلايا النبات يعتبران كآلية من آليات مقاومة نبات الحمص للإصابة بفطر *A. rabiei*.

يعتبر الـ Peroxidase عاملا أساسيا في عملية التفلن الخشبي التي تحدث في خلايا الجدار كعامل استجابة ضد دخول الممرض النباتي. يساهم إنزيما Peroxidase (POD) وdiamine oxidase (DAO) اللذين يفرزها نبات الحمص في دفاع النبات ضد الإصابة الفطرية (Vir وGrewal، 1974). يتدخل إنزيم DAO في هدم عديد الأمين (polyamine)، والذي يعتقد بأنه مصدر الماء الأكسيجيني (H_2O_2) الضروري لنشاطية إنزيم POD في مسار التفلن الخشبي الذي يحدث على مستوى الجدر في منطقة الإصابة (Agelini وآخرون، 1993). كما يحفز إنزيم POD أيضا إنتاج hydroxyproline-rich glycoproteins التي يتم تخليقها وإفرازها بتراكيز مرتفعة كنتيجة لهجوم المسبب المرضي حول موقع الإصابة (Scheel، 1992). وقد بينت الدراسة البيوكيميائية لأنسجة النباتات زيادة وارتفاع نشاطية هذين الإنزيمين في أنسجة الأصناف المقاومة مقارنة مع الأصناف الحساسة (Agelini وآخرون، 1993). سجل أيضا Vogelsang وBarz (1993) ارتفاعا في نسبة تراكم إنزيم POD وإنزيم β-1,3-glucanase المحلل لجدران الخلايا

الفطرية في الأصناف المقاومة أكبر منه في الأصناف الحساسة عند تنميتها بوجود رشاحة الفطر. سجلوا كذلك بوجود رشاحة الفطر ارتفاعا في نشاطية phenylalanine ammonia lyase (PAL) في مزارع خلايا صنـف الحمـص ILC 3279 المقاوم بعشرين مرة أكبر منه في صنف الحمص ILC 1929 الحساس.

بالإضافـة إلى ذلك تم تسجيل ارتفاع في نشاطية إنزيم copper amine oxidase المحفز لإنتاج بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) عند إصابة نبات الحمص بالفطر، مما يوحي بدور لهذا الإنزيم في مقاومة الإصابة بالفطر *A. rabiei* (Rea وآخرون، 2002).

3.1.5.1. تراكم الفيتوألكسينات

الفيتوألكسينات مركبات ذات وزن جزيئي منخفض ونشاطية مضادة للمكروبات، تخلق وتتراكم في النبات كجزء من مركبات الاستجابة الدفاعية (Scheel، 1992). يعتقد أن الفيتوألكسينين medicarpin وmaackiain يلعبان دورا في دفاع نبات الحمص ضد الإصابة بالفطر ، حيث سجل تراكمهما بشكل أسرع وبكمية أكبر في أصناف الحمص المقاومة منها في أصناف الحمص الحساسة (Weigand وآخرون، 1986؛ Dolar وGurcan، 1993). على سبيل المثال يبدأ تراكم الفيتوألكسينات في الصنف ILC 3279 المقاوم بعد 12 ساعة من العدوى بأبواغ الفطر *A. rabiei* على عكس الصنف الحساس ILC 1929 أين يبدأ تراكم الفيتوألكسينات بعد 24 ساعة من العدوى كما أن كميات Medicarpin وmaackiain كانت غير كافية في الأنسجة المصابة (Weigand وآخرون، 1986؛ Dolar وGurcan، 1993). يثبط كل من medicarpin وmaackiain إنبات أبواغ الفطر *A. rabiei* مخبريا بنسبة 50.6% و52% على الترتيب عند اختبارها بتركيز 60 مكروغرام/غ وزن رطب (22 fr.w/µg). كما سجل Dolar وGurcan (1993) أن تركيز 22 مكروغرام/غ وزن رطب من medicarpin و17.0 مكروغرام/غ وزن رطب من maackiain على مستوى أورق نبات الحمص كانا كافيين لتثبيط تطور وانتشار الفطر.

4.1.5.1. البروتينات المرتبطة بالإمراضية (Pathogenesis-related proteins، PR-proteins)

تتراكم البروتينات المرتبطة بالإمراضية (PR-proteins) في العديد من أنواع النباتات كنتيجة للإصابة بالممرضات (Hanselle وBarz، 2001). تتميز هذه البروتينات بكو ا جزيئات تحفز طيلة إصابة النبات بالممرضات وذات وزن جزيئي منخفض ثابتة في الأوساط المنخفضة الحموضة ومقاومة للإزيمات المحللة للبروتينات (Hanselle وBarz، 2001). صنفت هذه البروتينات إلى 14 عائلة على أساس تسلسل أحماضها الأمينية مع/أو نشاطيتها الإنزيمية أو البيولوجية. تركزت الدراسة بشكل أساسي على إنزيمات الإماهة chitinases (EC 3.2.1.14) وβ-1,3-glucanases (EC 3.2.1.29). فقد تمت دراسة مجموعتين منها بشكل مفصل، حيث تمت تنقية وفصل إنزيم PR-2a (إنـزيـم يتواجـد في الفجوات الغذائيـة مـن الموءـة (β-1,3-glucanase) من خلايا أوراق نبات الحمص المصابة وdiamine oxidase من مزارع خلايا نبات الحمص (Vogelsang وBarz، 1993؛ Hanselle وBarz، 2001).

سجل Hanselle وBarz (2001) ارتفاعا في التراكم الداخل خلوي (intracellular) والخارج خلوي لنشاطية إنزيم β-1,3-glucanase بعد فترة 6 أيام من العدوى. تبدأ نشاطية β-1,3-glucanase الخارج خلوية بعد يومين من العدوى قبل يوم واحد من بداية النشاطية الداخل خلوية. أما البروتين PR-2b فيتراكم في apoplast الأوراق بيوم قبل اختراق الفطر للمساحات خارج الغشاء السيبوبلازمي (apoplastic space). يتميز PR-2b بوزن جزيئي قدرة 34 kDa ونقطة تعادل كهربائي مقدرة بـ 5.9. كما يقترح Hanselle وBarz (2001) بأن لهذا البروتين دورا هاما جدا في مقاومة الإصابة بالفطر *A. rabiei* بالتعاون مع بقية تفاعلات المقاومة في النبات.

6.1 . تحويل الفطر *Ascochyta rabiei*

ساهمت عملية بناء وعزل طافرات غير قادرة على إحداث الإصابة في فهم الوظائف الوراثية والإنزيمية المسؤولة عن إحداث الإصابة في العديد من نظم التفاعل الإمراضي بين الممرضات والنباتات العائلة (Howlett وIdnurm، 2001).

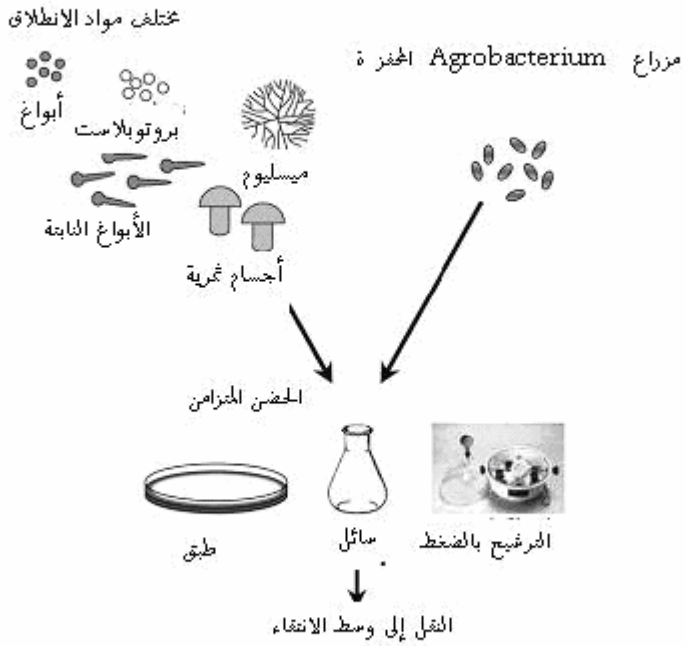
لقد تم تطوير العديد من طرق إنتاج الطافرات لدى الفطريات مثل طريقة التطفير بعناصر وراثية متنقلة (transposon mutagenesis) (Kuck وKempken، 1996؛ Capy وDaboussi، 2003) وطريقة الدمج باستعمال الإنزيمات الشرطية (restriction enzyme-mediated integration، REMI) (Holden وBrown، 1998؛ Basse وKahmann، 1999؛ Schafer وMaier، 1999). لكن هاتين الطريقتين لهما العديد من النقائص التي تحد من انتشار تطبيقها في عملية إنتاج الطافرات (Michielse وآخرون، 2005).

في السنوات الأخيرة من القرن الماضي وفي أوائل القرن الحالي تم التأكد من أن تقنية التطفير بالإضافة بوساطة البكتريا *Agrobacterium* (insertional mutagenesis via *Agrobacterium*-mediated transformation، ATMT) يمكن استعمالها خارج النباتات (De Groot وآخرون، 1998؛ Mullins وKang، 2001). ونظرا لاستعمالاتا الواسعة ولبساطتها النسبية فقد تم استعمال ATMT في تحويل العديد من الأنواع الفطرية (Michielse وآخرون، 2005). إلا أن فعالية هذه التقنية تختلف من نوع فطري إلى آخر كما يجب توفير الشروط المثلى لكل نوع (Gouka وآخرون، 1999؛ Abuodeh وآخرون، 2000؛ Mullins وآخرون، 2001؛ Sun وآخرون، 2002؛ Tanguay وBreuil، 2003؛ Vijn وGovers، 2003؛ Fang وآخرون، 2004).

حديثا تم تطبيق هذه التقنية في تحويل الفطر *A. rabiei* (Mogensen وآخرون، 2006؛ White وCheng، 2006). في السابق تم تحويل هذا الفطر باستعمال البروتوبلاست وpolyethylene glycol والمورثة المنبهة (reporter gene)(GUS-(β-glucoronidase بغرض دراسة آليته الإمراضية على نبات الحمص

(Köhler وآخرون، 1995) أو بالمورثة نازعة ميثيل البيساتين (pisatin demethylase) لدراسة هدم الفطر لفيتوألكسينات اللوبياء (pea phytoalexin pisatin) (Weltring وآخرون، 1995). إلا أنه في كلتي الدراستين كانت نسبة التحويل ضعيفة. كما أن تطبيق طرق أخرى للتحويل مثل طريقة الدمج باستعمال الإنزيمات الشرطية وطريقة إحداث الثغور بواسطة الصدمات الكهربائية (electroporation) والصدم بالجزيئات (particle bombardment) كانت ذات فعالية ضعيفة (Mogensen وآخرون، 2006).

تتميز تقنية ATMT بالعديد من المميزات والخصائص مقارنة ببقية التقنيات التقليدية، حيث يمكن استعمال الخلايا السليمة كالكونيدات والخلايا الخضرية والأجسام الثمرية والميسليوم (شكل 5.1)، كمادة أولية في عملية التحويل مبعدة بذلك استعمال البروتوبلاست (Michielse وآخرون، 2005). تسمح ATMT بالحصول على نسبة عالية من الطافرات مع نسخة وحيدة من الدمج والتي تسهل من عزل المورثات المستهدفة، كما يبدو بأن عملية الدمج تتم بشكل عشوائي (Abuodeh وآخرون، 2000؛ Bundock وآخرون، 2002؛ Michielse وآخرون، 2004a؛ Michielse وآخرون، 2005). بالإضافة إلى ذلك أثبتت هـذه الطريقـة (T-DNA) فعالية في إعادة التسلسل الوراثي المتماثل (homologous recombination) (Bundock وآخرون، 1999؛ Michielse وآخرون، 2005). مجموعة الخصائص هذه تجعل من هذه التقنية وسيلة هامة في التحليل التطفيري للفطريات سواء بعمليات الدمج الهدف (targeted integration) أو بعملية التطفير بالإضافة (insertional mutagnesis) (Michielse وآخرون، 2005).



الشكل 5.1. مخطط مراحل تحويل الفطريات بوساطة البكتريا *Agrobacterium* (Michielse **وآخرون**، 2005).

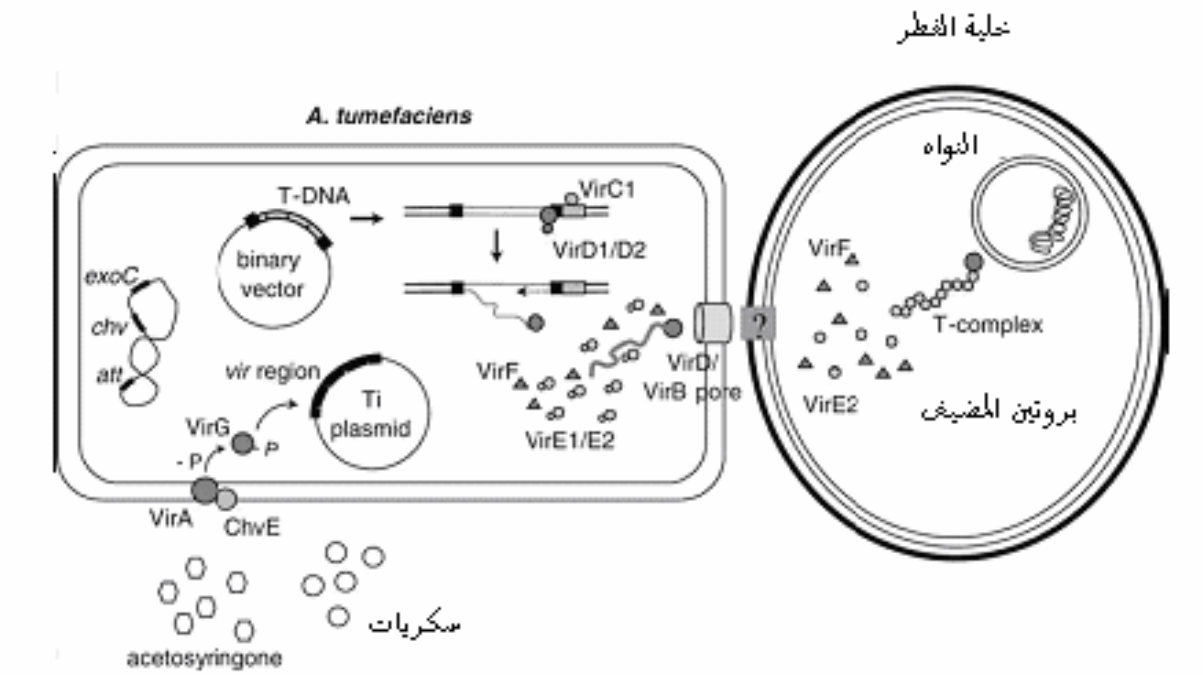
1.6.1. أسس ATMT.

Agrobacterium tumefasciens بكتريا سالبـة غـرام تسبـب مـرض التـدرن التاجـي (crown gall tumors) على النباتات (Stafford، 2000). تحث هذه البكتريا عملية تضخـم أو تورم الأنسجـة عبر نقلها لجزء من حمضهـا النـووي DNA (T-DNA) الموجـود علـى مستـوى البلاسميـد الحـاث للـورم (200-kbp tumor-inducing (Ti) plasmid) إلى النبات العائل. بعد عملية الدمج، تشفر المورثات الموجودة عادة على الحمض النووي T-DNA الإنزيمات المحفزة لمنظمات النمو، السيتوكينات (cytokinin) وحمض الأندول (indole acetic acid)، مسببة نموا غير منتظم وغير طبيعي لخلايا النبات العائل. يحتوي كذلك هذا البلاسميد قطعة (segment) تسمى منطقة القدرة على إحداث المرض (virulence region) متكونة من عدد كبير من مورثات الإمراضية (vir genes) الضرورية لإحداث الورم (Zhu وآخرون، 2000؛ Zupan وآخرون، 2000). تساهم البروتينات المشفرة من منقطة إحداث الإمراضية (virulence region) في تشكيل ونقل وحتى إدماج الحمض T-DNA (Zhu وآخرون، 2000). تكون منطقة إحداث الإمراضية (T-region) للبلاسميد الحاث للورم (Ti plasmid)محاطة بنهايات متكررة (border repeat) 24-bp تعمل كإشارة موضعية (cis-acting) لتحرير نظام الحمض DNA إلى الخلايا النباتية. لكن في المقابل يمكن حذف T-DNA الطبيعي وتعويضه بتسلسل DNA حمض نووي آخر دون أي تأثير سلبي على عملية النقل ضمن النباتات. حاليا يستعمل في عملية تحويل النباتات والفطريات هذا النظام الثنائي (binary vector system)، بحيث يتم نقل T-DNA ومنطقة القدرة على إحداث العدوى (virulence region) على بلاسميدين منفصلين، وهي طريقة سهلة للتعامل مع عملية المعالجة الوراثية للحمض T-DNA (Michielse وآخرون، 2005).

2.6.1. دمج الحمض T-DNA في العائل

تتم عملية تحويل الفطريات بالبكتريا *A. tumefasciens* عبر نظام القدرة على إحداث المرض (virulence system) (De Groot وآخرون، 1998). أثبتت التجارب مع طافرات البكتريا *Agrobacterium* والتي تم تثبيطها في أحد المواقع الحيوية المطلوبة لعمل نظام دمج والحمض النووي T-DNA (T-DNA transfer system) يثبط تماما تخليق ونقل خيطT أو يخفض بشكل كبير عدد طافرات الخميـرة *Saccharomyces cerevisiae* وطافرات الفطر *Aspergillus awamori* (Bundock وآخرون، 1995؛ Michielse وآخرون، 2004b). تثبت هذه التجارب أهمية نظام وآلية نقل T-DNA في تكوين الطافرات (Michielse وآخرون، 2005).

تشفر آلية نقل T-DNA بـ *A. tumefasciens* بمورثات Vir (Vir genes). تنشط هذه المورثات بمركبات فينولية مثل مادة acetosyringone (شكل 6.1). ينشط الجهاز المنظم والمتكون من المروثات VirA وVirG بعد التعرف على مادة acetosyringone بوجود وحيد سكر نوعي، يتفاعل البروتين الكروموزومي ChvE مع البروتين VirA للرفع من مستوى إدخال vir (Cangelosi وآخرون، 1990). Vir A عبارة عن بروتين غشائي داخلي متحسس لمادة acetosyringone مستجيبا بعملية فسفرة ذاتية. إثر عملية الفسفرة هذه ينشط البروتين VirG بانتقال مجموعة الفوسفريل إليه. يعمل البروتين النشط VirG ذي خصائص ربط أو تثبيت DNA على ترجمة وتنشيط ذاته مع مجموعة من المورثات الأخرى المتواجدة على مستوى منطقة إحداث الإصابة (Michielse وآخرون، 2005).



الشكل 6.1. مخطط نظام انتقال T-DNA لبكتريا *A. tumefasciens* (Michielse وآخرون، 2005).

ينقل T-DNA إلى المستقبل على شكل نسخة وحيدة من DNA. يحتاج تكوين هذه النسخة نتاج نشاط الوحدة المورثية (operons) للمورثات VirC وVirD. بالتعاون مع VirD1 يقوم البروتين VirD2 بعملية قطع في اية الخيط لكل اية متكررة (border repeats) . يعتقد أن تخليق DNA يبدأ انطلاقا من النهاية الحرة 3' OH من الجهة اليمنى من القطع وينتهي في الجهة اليسرى من النهاية المتكررة، مما يسمح بنقل وتحرير نسخة وحيدة لـ T-DNA. يحفز تشكيل نسخة T بـ (overdrive) تشكيل نسخة تسلسل 25-bp متواجدة بالقرب من النهاية اليمنى (Veluthambi وآخرون، 1988). ويمكن لـ VirC1 أن يرتبط بعملية التحفيز هذه وبالتالي تحفيز إنتاج خيط T (Toro وآخرون، 1988)، بينما يبقى البروتين VirD2 مرتبطا برابطة تكافئية مع النهاية 5' للخيط T.

تتمثل الخطوة التالية في قيادة نقل T-DNA وفي تمرير الخيط T عبر غشاء وخلايا جدار الخلية البكتيرية باستعمال آلية الإفراز من النوع IV. تحتاج هذه العملية إلى تدخل البروتينات VirB1-11 وVirD4. يشكل البروتين VirB ثغرة على سطح الخلية (T-pilus)، المتكونة من أهداب T (T-pilin) والتي هي عبارة عن شكل مهدم (processed form) من VirB2 (Kado، 2000). ينتمي البروتين الغشائي الداخلي VirD4 إلى العائلة المسماة بـ coupling proteins، والتي تعمل كوسيط في التفاعل بين خيط T و المركب VirB. بالإضافة إلى المركب الخيط T /VirD2 يتم نقل إنزيمات الإمراضية VirE2 وVirE3 وVirF عبر نظام الإفراز من النمط IV (Schrammeijer وآخرون، 2003؛ Vergunst وآخرون، 2000، 2003). VirE2 عبارة عن بروتين ارتباط وحيد لخيط DNA ويعتقد أن يشكل غطاء للخيط T لحمايته من إنزيمات nucleases وللحفاظ عليه في شكله الخيطي لتسهيل عملية نقله عبر فتحات النواة (Citovsky وآخرون، 1989).

يقاد توجه الخيط T إلى النواة بإشارة التنبيه الموضعي النووي (nuclear localization signal)، والذي يتواجد في وسط النهاية الكربوكسيلية لـ VirD2. وفور تواجده داخل النواة ينظم T-DNA بشكل ثابت إلى العدة الوراثية.

إلا أن آلية انظمامه إلى العدة الوراثية غير معروفة حاليا ويعتقد أن بروتينات العائل تلعب دورا هاما في هذا النظام (Bundock وآخرون، 1995؛ Gelvin، 2000؛ Van Attikum وآخرون، 2001؛ Tzfira وCitovsky، 2002).

3.6.1. دور بروتينات العائل في ATMT.

حديثا تم التعرف على البروتينات التي تساهم في علمية التحويل. على سبيل المثال يتفاعل VirD2 مع البروتين karyopherin a، والذي هو عبارة عن مركب ثابت من البروتين النووي في طريقة النقل النووي للبروتينات عند حقيقيات النواة (Ballas وCitovsky، 1997)، في حين يتفاعل VirE2 مع البروتيني 1 و2 (VIP1، VIP2؛ Tzfira وCitovsky، 2002). يؤدي فرط ترجمة (Over-expression) البروتين VIP1 عند نبات التبغ إلى زيادة قابلية النبات للإصابة بـ *Agrobacterium* كما يرفع من نسبة ترجمة مورثة T-DNA (Tzfira وآخرون، 2002).

يساهم تثبيط تخليق البيورين (purine) عند الفطريات في رفع مستوى التحويل بـ ATMT (Michielse وآخرون، 2005)، فقد وجد بأن طافرات الخميرة *S. cerevisiae* ذات العوز في تخليق البيورين أكثر فعالية في عملية التحويل من الأنواع الأصلية (wild type) (Roberts وآخرون، 2003).

4.6.1. العوامل المؤثرة على فعالية التحويل بـ ATMT.

يخضع تطوير آليات تحويل الفطريات إلى تأثير العديد من العوامل. تتضمن هذه العوامل والتي تؤثر على فعالية عملية التحويل، نوعية المادة الفطرية المستعملة كنقطة انطلاق وعزلات كل من البكتيريا والفطريات المستعملة بالإضافة إلى اختيار ظروف الحضن المتزامن (co-cultivation). يبدو أن كل فطر مع /أو العزلة يتطلب ظروفه المثلى حتى يمكن الحصول على نسبة تحويل مثلى (Michielse وآخرون، 2005).

1.4.6.1. عزلات الفطريات

لقد تم استعمال تقنية ATMT بنجاح في تحويل العديد من الأنواع الفطرية مثل *Agaricus bisporus* (Chen وآخرون، 2000) و*Fusarium circinatum* (Covert وآخرون، 2001) و *Mycosphaerella graminicola* (Zwiers وDe Waard، 2001) و*Verticillium fungicola* (Amey وآخرون، 2002) و*Colletotrichum lagenarium* (Tsuji وآخرون، 2003) و*Helminthosporium turcicum* (Degefu وHanif، 2003) و*Phytophthora infestans* (Vijn وGovers، 2003) و*Venturia inaequalis* (Fitzgerald وآخـ ـرون، 2003) و*Beauveria bassiana* (Fang وآخـ ـرون، 2004) و*Colletotrichum trifolii* (Takahara وآخرون، 2004) و*Aspergillus awamori* (Michielse وآخرون، 2004b) و*Aspergillus oryzae* (Michielse وآخرون، 2005). إلا أنه هناك أيضا حالات أين كان التحويل باستعمال ATMT ذو فعالية ضعيفة أو لم ينتج تماما طافرات. يذكر Rolland وآخرون (2003) أن تحويل الفطر *Sclerotinia sclerotiorum* لم ينتج عنه أي طافر رقم تغيير جميع عوامل (parameters) عملية التحويل. على العكس من ذلك فقد تحصلت Michielse وآخرون (2005) على عدد من الطافرات تراوح بين 0 طافر إلى 40 طافر لكل 10^6 بوغة من الفطر *Aspergillus oryzae* pyrG ، أما Mogensen وآخرون (2006) فقد تحصلوا على عدد من الطافرات تراوح بين 10.4 و16.1 طافر لكل 10^5 بوغة كونيدية للفطـر *A. rabiei* باستعمال العزلتين البكتيريتين LBA1126/pGreenhph1 وAGL1/pBIN7-1 على الترتيب.

2.4.6.1. مادة الانطلاق الفطرية

من بين محاسن تقنية ATMT استعمال العديد من المواد كمادة انطلاق في عملية التحويل. فقد سمح استعمال البروتوبلاست والأبواغ والميسليوم وأنسجة الأجسام الثمرية من الحصول على نتائج جيدة في عملية التحويل مع استعمال واسع للأبواغ والأبواغ النابتة (Michielse وآخرون، 2005). كما أعطت العديد من الدراسات نسبة فعالية متكافئة عند استعمال خلايا سليمة والبروتوبلاست عند عملية التحويل باستعمال *A. tumefaciens* (De Groot وآخرون، 1998؛ Abuodeh وآخرون، 2000؛ Zwiers وDe Waard، 2001). لقد تم استعمال الأبواغ النابتة كمادة أولية في عملية التحويل في العديد من الدراسات، وقد تبين بأن الأبواغ النابتة ضرورية وأساسية لنجاح عملية تحويل الفطر *Coccidioides immitis* وأن إطالة فترة الإنبات كانت ذات تأثير إيجابي على نسبة فعالية عملية التحويل (Abuodeh وآخرون، 2000). على العكس من ذلك لم يسمح استعمال الأبواغ النابتة ولا إطالة فترة الإنبات بالحصول على نتائج جيدة عند بعض الأنواع الفطرية الأخرى (Campoy وآخرون، 2003؛ Meyer وآخرون، 2001). يذكر كل من Chen وآخرون (2000) وMikosch وآخرون (2001) بأن استعمال الميسليوم الخضري وميسليوم الأجسام الثمرية سمح من الحصول على فعالية عالية في عملية التحويل كما كان الحال عند الفطر *Agaricus bisporus* ، رغم تسجيل بعض الاختلاف في حساسية مختلف أنسجة الأجسام الثمرية تجاه ATMT (Chen وآخرون، 2000، Mikosch وآخرون، 2001).

هناك عامل آخر يؤثر على فعالية التحويل ويتعلق الأمر بسن أو عمر مادة الانطلاق في العملية. فقد تبين بأن استعمال مستعمرات مسنة من الفطر *Blastomyces dermatitidis* لا يسمح بالحصول على فعالية كبيرة (Sullivan وآخرون، 2002). كما سجل Michielse وآخرون (2005) انخفاضا في نسبة الطافرات المتحصل عليها عند استعمال أبواغ مسنة للفطرين *A. awamori* و*A. niger* أو تلك التي تم حضنها لمدة طويلة في درجة

حرارة 4° م ، وقد يعود ذلك بقدر كبير إلى انخفاض حيوية الأبواغ أو انخفاض نسبة إنبات هذه الأبواغ مما ينتج عنه عدد ضئيل من الأبواغ الحساسة تجاه الاحتفاظ بـ T-DNA طيلة عملية الزرع المتزامن.

3.4.6.1. عزلات البكتريا *Agrobacterium*.

لقد تم استعمال العديد من العزلات البكترية في عملية تحويل الفطريات مثل العزلات LBA4404 وEHA105 وLBA1100 (Michielse وآخرون، 2005) وAGL1 (Lazo وآخرون، 1991) وLBA 1126 (Bundock وHookass، 1996). إلا أنه لم تتم مقارنة فعالية هذه العزلات في عملية التحويل حتى يتم اختيار الأفضل منها ليستعمل لاحقا في عمليات التحويل (Michielse وآخرون، 2005).

4.4.6.1. ظروف الحضن المتزامن

ترتبط كذلك فعالية تقنية ATMT بظروف الحضن المتزامن، وتشمل هذه الظروف نسبة خلايا البكتريا *A. tumefasciens* إلى نسبة خلايا وعاء التحويل أي نسبة خلايا الفطر وطول فترة الحضن ودرجة الحرارة ودرجة الحموضة ونوعية المرشح.

يسمح الرفع من نسبة خلايا البكتريا أو الخلايا المستقبلة (خلايا الفطر) في مزيج الزرع المتزامن في الكثير من الحالات إلى الرفع من نسبة عملية التحويل، إلا أنه في كلتا الحالتين لا يجب تجاوز تراكيز جد عالية، حيث تؤدي إضافة كمية كبيرة من *A. tumefasciens* إلى خفض نسبة فعالية عملية التحويل (Meyer وآخرون، 2003)، وقد يعود هذا إلى محدودية مصادر التغذية وكذلك إلى صعوبة التخلص أو قتل الكمية الزائدة من البكتيريا بعد الانتهاء من عملية التحويل.

يؤدي استعمال كميات كبيرة من الخلايا المستقبلة طيلة عملية الزرع المتزامن إلى نمو فطري كثيف قد يصعب من عملية عزل الطافرات المرجوة من العملية (Covert وآخرون، 2001). أكدت العديد من الدراسات بأن لكل فطر ظروف مثلى من الزرع المتزامن ومن درجة الحرارة لأجل الحصول على أقصى عدد ممكن من الطافرات (Mullins وآخرون، 2001؛ Rho وآخرون، 2001؛ Combier وآخرون، 2003؛ Meyer وآخرون، 2003؛ Rolland وآخرون، 2003؛ Gardiner وHowlett، 2004؛ Michielse وآخرون، 2004b). كما يساهم مستوى نمو الفطريات وحساسيتها تجاه *A. tumefasciens* في اختلاف النتائج المتحصل عليها.

تؤثر كذلك درجة حرارة الحضن المتزامن على فعالية عملية التحويل، فقد تم اختبار مجال من درجات الحرارة تراوح بين 20° م و37° م وتبين بأن درجة الحرارة المثلى تقع بين 22° م و25° م (Combier وآخرون، 2003؛ Rolland وآخرون، 2003؛ Gardiner وHowlett، 2004؛ Michielse وآخرون، 2004b). تماثلت هذه النتائج مع تلك التي تم التحصل عليها في عملية تحويل النباتات، حيث سجل بأن درجة الحرارة المثلى لنقـل T-DNA تقع بين 20° م و28° م (Dillen وآخرون، 2002؛ Salas وآخرون، 2002). كما تتوافق أيضا من النتائج التي تؤكد أن نظام نقل T-DNA لا يعمل بشكل جيد في درجات الحرارة المرتفعة (أكثر من 28° م) (Fullner وNester، 1996). كما قامت Michielse وآخرون (2004b) خلال دراسـة تحويـل الفطـر *A. awamori* باختبار التأثير المزدوج للحضن المتزامن مع درجة الحرارة أن الرفع التدريجي لدرجة الحرارة من 20° م إلى 28° م مع فترة حضن قصيرة لمدة 24 ساعة يسمح بالرفع من نسبة نجاعة عملية التحويل في حين ينخفض تأثير درجات الحرارة هذه عند إطالة فترة الحضن لمدة 48 ساعة و72 ساعة مع التوصل إلى نتائج غير قابلة للإعادة (irreproducible) مع ارتفاع نسبة نمو الفطر (fungal background growth) طيلة فترة الحضن المتزامن.

بالإضافة إلى هذه العوامل فقد تم استعمال بنجاح أثناء عملية الحضن المتزامن، العديد من المرشحات في عملية التحويـل مثل ورق النتروسيليلـوز وHybond وورق الترشيـح وورق السيلوفـان وpolyvinylidene difluoride (Michielse وآخرون، 2005).

5.4.6.1. تركيز Acetosyringone.

يبدو أن إضافة acetosyringone (AS) في مرحلة الحضن الأولي لـ *Agrobacterium* لا يؤثر على عملية تحويل الفطريـات، إلا أن عـدم إضافتـه يؤدي إلى انخفـاض نسبـة فعالية عملية التحويل لكل من *Beauveria bassiana* و*Fusarium oxysporum* و*Magnaporthe grisea* ويؤخر عملية تشكيل الطافرات (Mullins وآخرون، 2001؛ Rho وآخرون، 2001؛ Leclerque وآخرون، 2003). على العكس من ذلك لم يلاحظ كل من Combier وآخرون (2003) وTakahara وآخرون (2004) أي اختلاف في نسبة طافرات الفطرين *Hebeloma cylindrosporum* و*Colletotrichum trifolii* بغياب مادة AS خلال مرحلة الحضن الأولي. ويشير Leclerque وآخرون (2003) بأن رفع تركيز AS إلى 500 مكرومولار (µM) يمسح بزيادة عدد الطافرات وأن نسبة عالية من الطافرات لا يمكن الحصول عليها إلا بوجود تركيز كاف لمادة ليس فقط في فترة الحضن الأولي لـ *Agrobacterium* لكن أيضا في فترة الحضن المتزامن للبكتريا مع الفطر.

الفصل الثاني

عزل وتشخيص فطر *Ascochyta rabiei* في الجزائر

1.2. مقدمة

يمثل مرض التبقع الأسكوكيتي الناتج عن الإصابة بالفطر *Ascochyta rabiei* الطور الكامل *Didymella rabiei* أخطر الأمراض التي تصيب نبات الحمص في كثير من مناطق العالم وخاصة غرب آسيا وشمال إفريقيا وشمال شرق منطقة الهند والباكستان (Nene، 1982؛ Nene وReddy، 1987؛ Singh وReddy، 1993). يعتبر الفطر *Ascochyta rabiei* غير متماثل الطور (heterothallic) ثنائي النمط الوراثي (Trapero-Casas وKaiser، 1992). يتكون اللقاح الأولي لمرض التبقع الأسكوكيتي في معظم مناطق زراعة الحمص عبر الأبواغ الزقية التي تخرج من الأكياس الزقية التي يكو ا الفطر في طوره الكامل. وتنتشر هذه الأبواغ عن طريق الرياح، حيث بإمكا ا الانتقال لعدة كيلومترات من منطقة الإصابة الأولية (Trapero-Casas وآخرون، 1996). يبين تواجد النظام الوراثي الثنائي إمكانية حدوث التكاثر الجنسي عند الفطر وهذا ما يفسر التنوع المكتشف عند الفطر. تسمح هذه الخصائص للفطر بتطوير قدرته الإمراضية على الأصناف المقاومة أو تطوير المقاومة تجاه المبيدات الفطرية (Barve وآخرون، 2003). على هذا الأساس تم اقتراح نظام (مورثات *MAT* genes) كوسيلة لتحديد التنوع الوراثي وهي ذات ثبات كبير وعالي لكنها تتنوع داخل ا لموعة الواحدة من الأنواع (Turgeon، 1998).

المناطق (ITSs) عبارة عن تسلسل متواجد في الحمض النووي الريبوزوي DNA (rDNA) لحقيقيات النواة بين مورثات 18S وrRNA 5.8S (ITS1) و بين مورثات 28S وrRNA 5.8S (ITS2). باستعمال الاستنساخ المتضاعف (PCR) لبادئات مكافئة لمورثات 18S وrRNA 28S يمكن مضاعفة كلتى السلسلتين مع rRNA 5.8S. لقد تمت دراسة تضاعف هذه السلسلة في العديد من الأنواع وخاصة الخمائر وبينت هذه

الدراسات بأن نسخ هذه الأجزاء يمنح عناصر بنيوية وبنى ثانوية (Insua وآخرون، 2003). يظهر تسلسل ITS أية فروق متواجدة في تسلسل الأحماض الأمينية ويسمح بالتفريق بين الأنواع الشديدة الارتباط (D'Amelio وآخرون، 2000).

يتضمن هذا الفصل، عزل الفطر من نباتات نامية في الجزائر ثم إجراء عملية التشخيص بتحديد تسلسل rDNA وأخيرا تحديد النمط الوراثي (mating types).

2.2. الوسائل والطرق

1.2.2. عزل وحفظ الفطر وتأكيد فرضية كوخ

تم عزل ثلاث عزلات من فطر *A. rabiei* سميت بـ Ag1 وAg2 وAg3 من نبات حمص مصاب بمرض التبقع الأسكوكيتي في ثلاث مدن، جزائرية، سطيف وقالمة وواد السمار على الترتيب. غسلت الأجزاء النباتية المصابة بالماء العادي ثم عقمت بمحلول ماء جافيل 2% ثم غسلت مرتين بالماء المقطر المعقم. زرعت هذه الأجزاء بعد ذلك على وسط مستخلص البطاطس (Potato Dextrose Agar، PDA، PDA, 39 g/l Oxoid, Unipath Ltd, UK)) (جدول 1.2، ملحق 1) لمدة 7 - 15 يوما في درجة حرارة 20 م°. نقلت المستعمرات النامية إلى أطباق بتري على نفس الوسط، وانطلاقا من المستعمرات النامية تم تحضير معلق للأبواغ في الماء المقطر. استعمل هذا المعلق في العدوى الإصطناعية على صنف الحمص Rabat-9 الحساس. بعد ظهور أعراض مرض التبقع الأسكوكيتي على النبات تم عزل وتنقية الفطر بطريقة البوغة الواحدة مع مقارنة شكل المستعمرات النامية مع مستعمرات مرجعية. إثر الحصول على مستعمرات الفطر النقية أعيد عزله ثانية بطريقة البوغة الواحدة وذلك بعدوى بذور حمص معقمة حسب طريقة Alam وآخرون (1987). تم غسل الأبواغ المتحصل عليها بهذه الطريقة ثلاثة مرات بالماء المقطر المعقم مع الطرد المركزي 3000 *g* لمدة 10 دقائق، ثم حضر تركيز

الأبواغ بمعدل 10^7 بوغة/مل في الماء المقطر المعقم المحتوي على الغليسيرول بنسبة 10% لتحفظ في درجة حرارة -80 م° أو في النيتروجين السائل إلى حين الاستعمال (Alam وآخرون، 1987).

تمت مقارنة شكل مستعمرات الفطر المعزولة من بقايا نبات الحمص مع تلك المتحصل عليها إثر العدوى الاصطناعية أما شكل البكنيديات والكونيديات فتمت مقارنته مع المراجع باستعمال المجهر الضوئي.

2.2.2. استخلاص الحمض النووي DNA.

انطلاقا من مستعمرات الفطر النامية على وسط مستخلص البطاطس (جدول 1.2، ملحق 1) تم أخذ خمسة أقراص من الميسليوم من كل عزلة (Ag1 وAg2 وAg3) ووضعها في أنبوب اختبار Eppendorf (1.5 مل) بعد نزع الأقار قدر الإمكان. تحتوي هذه الأنابيب على كرات زجاجية (Sigma, Sigma-Aldrich company Ltd., Fancy Road, Poole, Dorset, BH12 4QH, England), glass beads. أضيف إلى الأنابيب محلول Chelex-Tris (1 ml; 3% chelex w/v, 1 mM Tris, pH 8.0; Biorad Laboratories Ltd., Biorad House, Mayland Avenue, Hemel Hempstead, Herts, HP2 7TD) بمعدل 1 مل، ومزج جيدا بالرج لمدة دقيقة. جمدت الأنابيب في النتروجين السائل لمدة دقيقة واحدة ثم حضنت في درجة حرارة الغرفة لمدة دقيقة ثم وضعت في الماء المغلي لمدة دقيقة. أعيدت عملية التجميد والغلي ثلاث مرات. إثر ذلك يرج المعلق مرة أخرى لمدة دقيقة ثم يسخن في درجة حرارة 55 °م في حمام مائي لمدة 30-40 دقيقة. بعد انتهاء عملية الحضن يعرض المعلق إلى عملية طرد مركزي 13000 *g* لمدة 5 دقائق وتنقل إثرها 100مكرولتر إلى أنابيب اختبار Eppendorf معقمة.

3.2.2. تقدير تركيز الحمض النووي DNA.

تم تقديـر تركيـز الحمـض النـووي المستخلـص باستعمال جهاز امتصاص الطيف حسب المعادلة E = A x B x C، حيث E تركيز الحمض النووي، A طول موجة الامتصاص (260 نانومتر) في 1 سم من مسر الضوء، B تساوي 50 وهي ثابت الحمض النووي الثنائي الضفيرة المعياري أما C فهو معامل التخفيف. أما نقاوة الحمض النووي فقدرت بقياس درجة الامتصاص في طول موجة 280 نانومتر وذلك بحساب قيمة الامتصاص في 260/ قيمة الامتصاص في 280. إذا كانت هذه النسبة أصغر من 1.8 فإن الحمض النووي ملوث بتواجد الحمض النووي أما إذات هذه النسبة أكبر من 1.8 فإنه يكون ملوثا بتواجد البروتنيات.

4.2.2. التضاعف المتسلسل (PCR)

لمضاعفـــة الحمـض النـــووي للعـــزلات الثـــلاث استعمـلت بادئتـان ITS1F (5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC3′) وITS4 (5′-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3′) تم الحصول عليها من MWG (Mill Court Featherstone Road, Wolverton Mill Southt, Milton Keynes, MK12 5RD). تمثل هذا التفاعل في إضافة المزيج التالـي، قالب الحمض النووي DNA (2.0-2.5 pg) مع 4 مكرولتر من كل بادئة بتركيز 2.5 picomoles / مكرولتر) بالإضافةإلى "ready to GO" PCR glass beads (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Sweden) في جهاز التضاعف Progene Thermal Cycler (Techne). تضمن برنامج التفاعل مرحلة فصل (denaturation) الضفيرتين لمدة دقيقتين في 94 م° متبوعة بمرحلة تجين (annealing) متمثلة في 35 حلقة في 30 ثانية في درجة حرارة 94 م° ثم 30 ثانية في 55 م° وبعدها مرحلة استطالة (extension) لمدة دقيقتين في 72 م° وفي الأخير تحفظ الأنابيب في درجة حرارة 4 م° لحين الاستعمال (El- Kassas وآخرون، 2005).

بالإضافة إلى عملية التضاعف الأولى أجري تضاعف ثانـي للحمـض النـووي DNA المستخلـص باستعمـال ثلاثـة بادئـات Com-1 (5'-GCATGCCATATCGCCAGT-3') وSP21 (5'-ACAGTGAGCCTGCACAGTTC-3') وTail-5 (5'-CGCTATTTTATCCAAGACACACC-3') (MWG-Biotech AG, Ebersberg, Germany). تم الحصول عليها مجفـدة بتركيـز 100 picomole / مكرولتر ثم حضرت محاليل أساسية منها بتركيز 10 picomole / مكرولتر. استعمل في عملية التضاعف 2 مكرولتر من كل بادئة و9 مكرولتر من $MgCl_2$ (10 mM) و 2.5-2.0 pg من الحمض النووي القالب وخفف المزيج بالماء المقطر إلى حجم نهائي 30 مكرولتر.

أجري تضاعف الحمض النووي في 35 حلقة لمدة 30 ثانية في درجة حرارة 94 م° وهي مرحلة فصل الضفيرتين متبوعـة بـ 45 ثانيـة في 60 م° للتهجيـن ثم دقيقتيـن في 72 م° للاستطالـة ودقيقتيـن في 94 م° للفصـل وفي الأخير 7 دقائق في 72 م° للاستطالـة في جهـاز Progene Thermal Cycler (Techne Cambridge Ltd, UK) (Barve وآخرون، 2003).

5.2.2. تنقية الحمض النووي المتحصل عليه بتفاعل التضاعف المتسلسل

لتنقيـة الحمض النووي (10 مكرولتر) المتحصل عليه بعد عملية التضاعف المتسلسل، تم استعمـال النظـام المتمـثل في QIA quick PCR purification kit (Qiagen Ltd., Boundary Court, Gatwick Road, Crawley, West Sussex, RH10 9AX, UK). تمزج 10 مكرولتر من ناتج التضاعف مع 50 مكرولتر من المحلول المنظم PB ثم تمرر عبر عمود التنقية الموصول بأنبوب اختبار 2 مل لربط الحمض النووي . يعرض العمود إلى عملية طرد مركزي لمدة دقيقة بسرعة 13000 *g*، ثم يتم التخلص من المحلول قبل عملية الغسل بـ 750 مكرولتر من المحلول المنظم PE أين يتم تعريضه مرة ثانية لعملية الطرد المركزي لمدة دقيقة

بسرعة 13.000 *g*. تكرر عملية الطرد المركزي مرة ثانية بنفس السرعة ونفس الوقت ليتم التخلص من بقايا الإيثانول المحتوى في المحلول المنظم PE. يوضع العمود بعد ذلك في أنبوب Eppendorf (1.5 مل) جديد لتضاف إليه 30 مكرولتر من محلول الإخراج (elution). يترك الإنبوب بعدها بشكل شاقولي لمدة دقيقة واحدة ثم يعرض للطرد المركزي بسرعة 13.000 *g* لمدة دقيقة واحدة. يتم التأكد من نقاوة الحمض النووي بإجراء الهجرة الكهربائية على هلام الأجاروز (agarose).

6.2.2. الهجرة الكهربائية على هلام الأفاروز

أجريت الهجرة الكهربائية لنواتج تضاعف الحمض النووي على هلام الأفاروز (1.7%) المحتوي على ethidium bromide. مزجت العينات (5 مكرولتر) مع 4 مكرولتر من محلول الهجرة (المخفف 5:1) والمحتوي على أزرق البروموتيمول (bromothymol blue) و11 مكرولتر من الماء المقطر. وضع الحجم النهائي مكرولتر في بئر على هلام الأفاروز. لأجل تحديد حجم هذه النواتج يوضع الشاهد المحتوى على 4 مكرولتر من الحمض النووي 100 bp في البئر الأولى. تجرى الهجرة الكهربائية في شدة تيار 74 فولط لمدة ساعة ونصف، وتعاين في جهاز الكشف وتصور.

7.2.2. تحديد تسلسل القواعد

تم تحديد تتابع نواتج التضاعف المتسلسل باتباع طريقة Sanger dideoxy من كلا النهايتين باستعمال البادئتين ITS1 وITS4 باختبار تحديد التسلسل الدوري الذي يلون باللون الأحمر النكليوتيدات النهائية مع إنزيم التضاعف الثابت حراريا المستخلص من *Thermus aquaticus* ومحلول البيروفوسفات المنظم. أجري هذا الاختبار باستعمال جهاز Beckman CEQ2000XL الآلي لتحديد تتابع الحمض النووي. وحدد ترتيب القواعد باستعمال Sequencher 4.1. (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA)، وتم التعرف

على القواعد المتماثلة باستعمال BLAST (http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) لشهـر أكتوبر من العـام 2005. أما التماثـل بيـن السلاسل فقد تم إجراءه باتباع البرنامج Sequencher وClustal W (Http:// www. Ebi.ac. uk/clustal w).

3.2 . النتائج

1.3.2. تأكيد فرضية كوخ ونوع المسبب المرضي

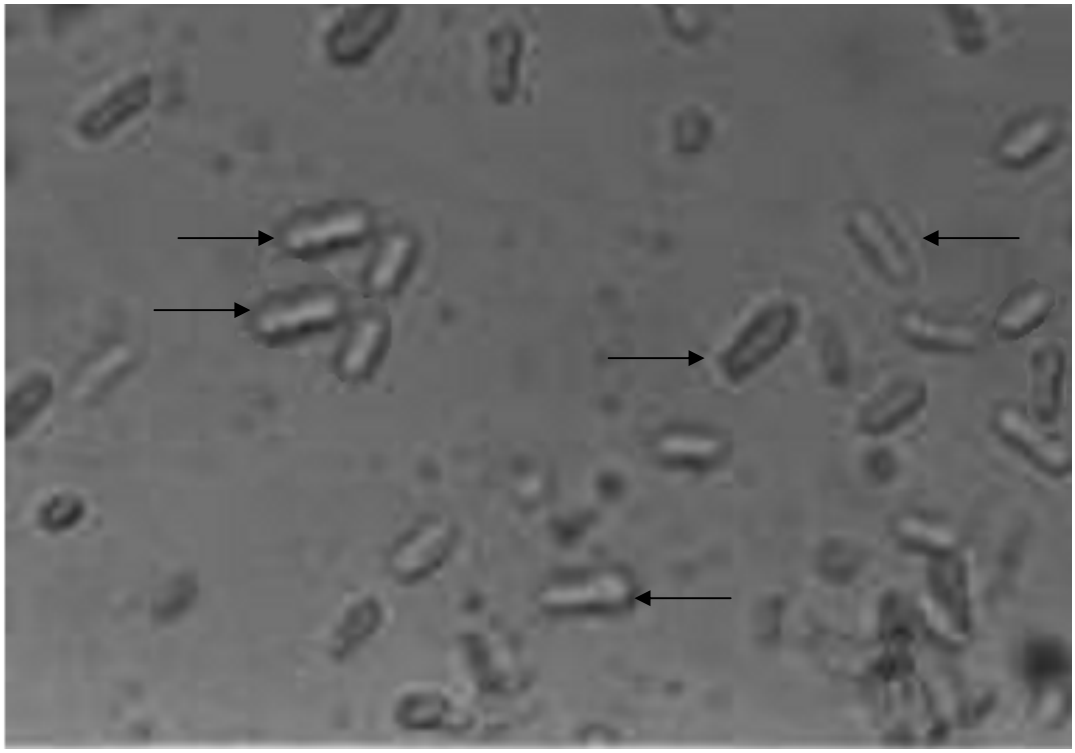
أخذت أجزاء نباتية مصابة في المناطق الثلاثة، سطيف وقالمة وواد السمار عليها أعراض المرض. تمثلت الأعراض في بقع بنية داكنة إلى سوداء متطاولة على السيقان ودائرية على الأوراق والقرون سمحت عملية العزل من هذه الأجزاء النباتية المصابة بالحصول على مستعمرات للفطر ذات مظهر مختلف من عزلة لأخرى (شكل 1.2)، تحتوي هذه المستعمرات على ميسليوم مقسم وبكنيديات كروية تحوي أبواغا وحيدة الخلية (شكل 2.2). كما نتج عن عملية العدوى الاصطناعية أعراضا للمرض تمثلت في بقع بنية غير منتظمة على الوريقات (شكل 3.2)، وأدت عملية العزل الثانية إلى الحصول على نفس شكل المستعمرات والبكونيديات والأبواغ (شكل 1.2). كما مكنت عملية تحديد تسلسل الحمض النووي الريبوزومي rDNA للعزلتين من الحصول على ترتيب 685 قاعدة آزوتية للعزلة Ag1 و572 قاعدة للعزلة Ag2 (شكل 4.2 أ، ب).

2.3.2. تحديد النمط الوراثي (Mating types) لعزلات الفطر *A. rabiei*.

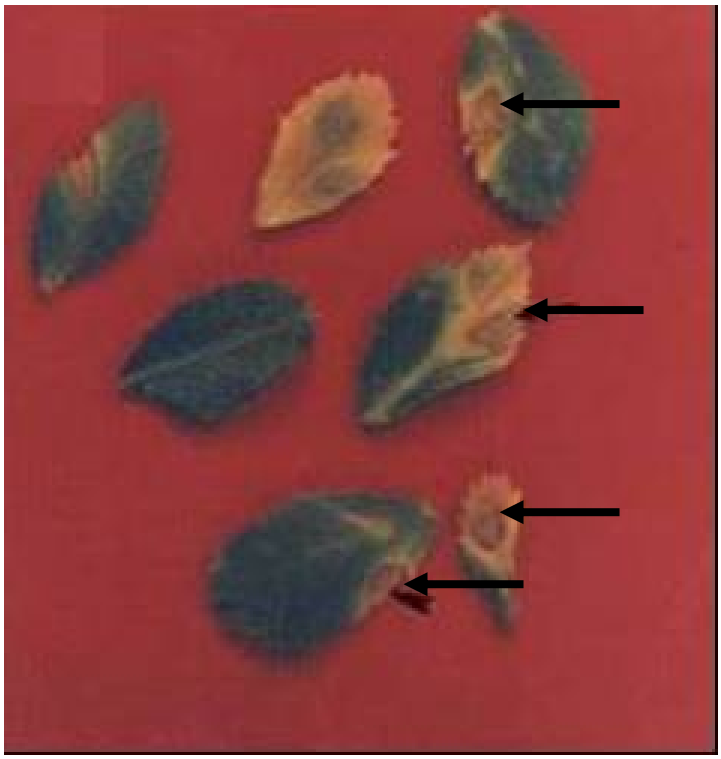
سمح التضاعف المتسلسل للحمض النووي المستخلص للعزلتين Ag1 وAg2 من تحديد النمط الوراثي باستعمال بادءات مكافئة، من الحصول على هجرة مساوية لـ 700 bp لكليهما مظهرة بأن هاتين العزلتين هما من النمط الوراثي رقم 1 (mating type 1) (شكل 5.2).

Ag1 **Ag2** **Ag3**

الشكل 1.2. شكل مستعمرات عزلات الفطر *A. rabiei* الثلاثة.



الشكل 2.2. الأبواغ البكنيدية (←)للفطر *A. rabiei* المعزولة بعد العدوى الاصطناعية.



الشكل 3.2. أعراض مرض التبقع الأسكوكيتي على أوراق نبات الحمص بعد العدوى الاصطناعية

```
SeqA Name       Len(nt)  SeqB Name       Len(nt)  Score
=========================================================
1    AR738      447      2    AG1ITSF1   685      99
=========================================================
```

Alignment

```
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment


AR738           ------------------------------------------------------------
AG1ITSF1        TATTAACTAGGCTAGACCGATAGGGTGAACCTAGCGGAAGGATCATTACCTAGAGTTTGT 60


AR738           ------TTGCCCGCTACCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACTTACGTTTCCTCGGCGGGT 54
AG1ITSF1        CGGGCTTTGCCCGCTACCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACTTACGTTTCCTCGGCGGGT 120
                      ******************************************************


AR738           CCGCCCGCCGATTGGACAAAATCAAACCCTTTGCAGTTGCAATCAGCGTCTGAAAAACAT 114
AG1ITSF1        CCGCCCGCCGATTGGACAAAATCAAACCCTTTGCAGTTGCAATCAGCGTCTGAAAAACAT 180
                ************************************************************


AR738           AATAGTTACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA 174
AG1ITSF1        AATAGTTACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA 240
                ************************************************************


AR738           AATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT 234
AG1ITSF1        AATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT 300
                ************************************************************


AR738           TGCGCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTGTACCTTCAAGCTT 294
AG1ITSF1        TGCGCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTGTACCTTCAAGCTT 360
                ************************************************************


AR738           TGCTTGGTGTTGGGTGTTTGTCTCGCCTCTGCGTGTAGACTCG-CCTTAAAACAATTGGC 353
AG1ITSF1        TGCTTGGTGTTGGGTGTTTGTCTCGCCTCTGCGTGTAGACTCTTCCTTAAAACAATTGGC 420
                ****************************************  ****************


AR738           AGCCGGCGTATTGATTTCGGAGCGCAGTACATCTCGCGCTTTGCACTCATAACGACGATG 413
AG1ITSF1        AGCCGGCGTATTGATTTCGGAGCGCAGTACATCTCGCGCTTTGCACTCATAACGACGACG 480
                ************************************************************ *


AR738           TCCAAAAGTACATTTTTACACTCTTGACCTCGGA------------------------- 447
AG1ITSF1        TCCAAAAGTACATTTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTA 540
                **********************************


AR738           ------------------------------------------------------------
AG1ITSF1        AGCATATCAATAAGCGGAGGAACATATCCCTACGCGGATGAGCCTATCCCTGGGCAGAGG 600


AR738           ------------------------------------------------------------
AG1ITSF1        AGCGTCTTCGTCACCAGGGAAAAATTTGCTTCTCAGGCATACCNTTGTATTGGGCANAAG 660


AR738           -------------------------
AG1ITSF1        GGCCCCTNGGCATTATNTACCCNAA 685
```

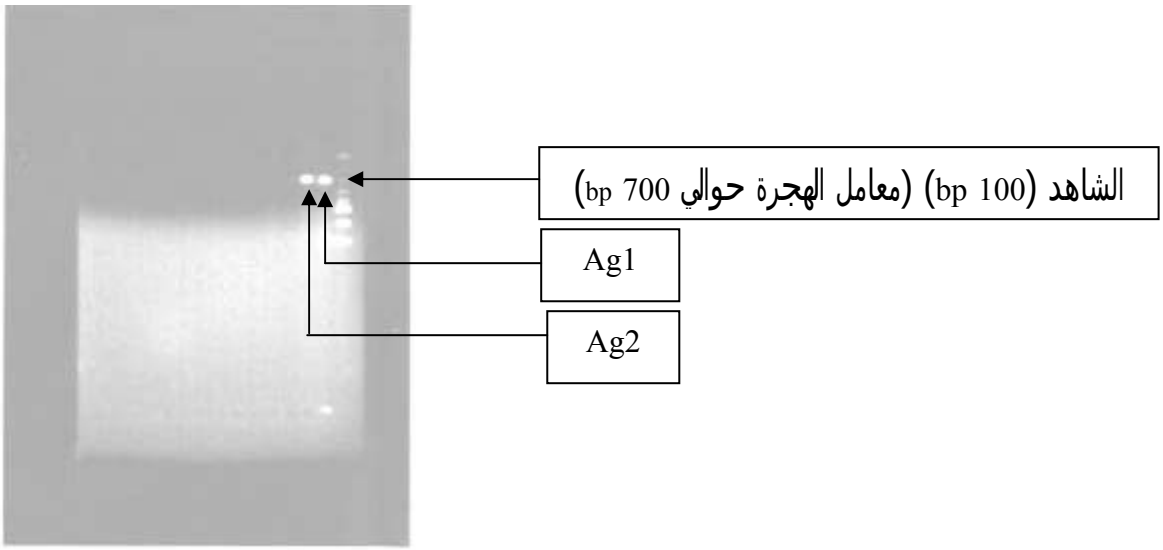
الشكل 4.2 أ. تسلسل الحمض النووي الريبوزومي (rDNA) للعزلة Ag1 مع العزلة المرجعية AR738 (رقم التسلسل Genbank accession number DQ383950)

```
SeqA Name       Len(nt)  SeqB Name       Len(nt)  Score
=========================================================
1    AR738      447      2    AG2ITSF1   572      98
=========================================================
```

Alignment

```
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment


AR738           ------------------------------------------------------------
AG2ITSF1        AGATCTTAACTANGCTGGAGCGAAGGGTGAACCTAGCGGAAGGATCATTACCTAGAGTTT 60


AR738           --------TTGCCCGCTACCTCTTACCCATGTC-TTTTGAGTACTTACGTTTCCTCGGCG 51
AG2ITSF1        GTCGGGCTTGGCCCGCTACCTCTTACCCATGTCATTTTGAGTACTTACGTTTCCTCGGCG 120
                        * ********************** *************************

AR738           GGTCCGCCCGCCGATTGGACAAAATCAAACCCTTTGCAGTT-GCAATCAGCGTCTGAAAA 110
AG2ITSF1        GGTCCGCCCGCCGATTGGACGAAATCAAACCCTTTGCAGTTAGCAATCAGCGTCTGAAAA 180
                ******************* ******************* ******************

AR738           ACATAATAGTTACAA-CTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGC 169
AG2ITSF1        ACATAATAGTTACAAGCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGC 240
                *************** ******************************************

AR738           AGCGAAATGCGATAAGTAG-TGTGAATT-GCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA 227
AG2ITSF1        AGCGAAATGCGATAAGTAGATGTGAATTAGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA 300
                ******************* ******** ******************************

AR738           CGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTT-CGAGCGTCATT-TGTACC 285
AG2ITSF1        CGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTACGAGCGTCATTATGTACC 360
                ************************************* *********** ******

AR738           TTCAAGCTTTGCTTGGTGTTGGGTGTTTGTCTCGCCTCTGCGTGTAGACTCGCCTTAAAA 345
AG2ITSF1        TTCAAGCTTTGCTTGGTGTAGGGTGTTTGTCTCGCCTCTGCGTGTAAACTCTCCTTAAAA 420
                ******************* ************************** **** ********

AR738           CAAT-TGGCAGCCGGCGTATTGATTTCGGAGCGCAGTACATCTCGCGCTTTGCACTCATA 404
AG2ITSF1        CAATGTGGCAGCCGGCGTATAGATTTCGGAGCGCAGTACATCTCGCGCTTAGCACTCATA 480
                **** *************** *************************** *********

AR738           ACGACGATGTCCAAAAGTACATTTTTACACTCTTGACCTCGGA----------------- 447
AG2ITSF1        ACGACGACGTCCAAAAGTACATTTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG 540
                ******* ***********************************

AR738           --------------------------------
AG2ITSF1        CTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAAGAAA 572
```

الشكل 4.2 ب. تسلسل الحمض النووي الريبوزومي (rDNA) للعزلة Ag2 مع العزلة المرجعية AR738 (رقم التسلسل Genbank accession number DQ383950)



الشكل 5.2. الهجرة الكهربائية لعزلتي الفطر *A. rabiei* (Ag1 وAg2).

4.2 . المناقشة

تم إثبات بأن عزلات الفطر الثلاثة هي *A. rabiei* باستعمال فرضية كوخ وتم التعرف على عزلتين منها من ناحية الخصائص الشكلية ومن خلال تحديد تسلسل الأحماض الأمينية لحمضها النووي الريبوزومي. كانت أعراض المرض المتحصل عليها على النباتات المعداة اصطناعيا والمتمثلة في ظهور بقع بنية غير منتظمة على الأوراق مشا ة لتلك التي تحصل عليها Haware وآخرون (1986) (شكل 6.2). أما بالنسبة لشكل مستعمرات الفطر المتحصل عليها فإن الاختلاف في الشكل المظهري قد يعزى إلى العديد من العوامل مثل مصدر العزلة ذاتا (Aujla، 1964؛ Vir وGrewal، 1974) بالإضافة إلى تأثير نوع الوسط على عزلات الفطر التي يمكن أن تبدو بمظهر مختلف عن بعضها البعض عن تنميتها على نفس الوسط، حيث أنه في البداية تم اعتماد الخصائص الشكلية لمستعمرات الفطر وللبكنيديات والكونيديات كعوامل تفريق بين سلالات الفطر المختلفة (Vir وGrewal، 1974؛ Grewal، 1984). بينت الملاحظة المجهرية للأبواغ الكونيدية لعزلات الفطر تطابقا مع النتائج التي تحصل عليها Haware وآخرون (1986) (شكل 1.1، الفصل الأول، شكل 1.2) وKhan وآخرون (1999a) والتي تبين بأن الفطر ينتج أبواغا متطاولة أحادية الخلية ذات نهايات دائرية.

سمحت عملية مقارنة تسلسل القواعد الآزوتية لعزلتي الفطر بتحديد تطابق في حدود 448 قاعـدة بالنسبة للعزلة Ag1 مع العزلة المرجعية AR 738 في Genbank (رقم العينة المرجعية accession number DQ383950؛ GenBank، 2006)، و454 قاعدة بالنسبة للعزلة Ag2 إلا أنه في هذه الحالة الأخيرة كان هنـاك عـدم تطابـق بالنسبـة لأربـع قواعـد ربمـا يعـود إلى ضعـف التنبيه المتحصل عليه (National Center for Biotechnology Information؛ Peever وآخرون، 2007) (أنظر الشكل 4.2 أ، ب).

عند مقارنة مسافة الهجرة على هلام الأجارور للعزلتين Ag1 وAg2 مع الشاهد المتمثل في الحمض النووي DNA 100 bp ، تبين بأن معامل الهجرة مساويا لـ 700 bp (أنظر الشكل 5.2)، وهذه النتيجة مكافئة للنمط الوراثي رقم 1.

لقد سمح تطور البيولوجيا الجزيئية من استعمال تقنيات الحمض النووي لتحديد نوع الفطريات بشكل محدد، حيث يمكن اعتبار تحديد تسلسل الأحماض النووية للعزلتين الفطريتين الجزائريتين وكذلك تحديد النمط الوراثي لها أول عمل يتم فيما يخص العزلات الجزائرية والتي يمكن أن تفتح الباب واسعا من أجل تحديد أوسع لأنواع العزلات المتواجدة في الجزائر بتأكيد تواجد النمط رقم 1 في الجزائر وربما أيضا النمط الوراثي رقم 2، خاصة وأنه تم إثبات وجوده في كل من تونس والمغرب، إلا أن يتطلب استعمال عدد كبير من العزلات

الشكل 6.2. أعراض مرض التبقع الأسكوكيتي على أوراق نبات الحمص (Haware وآخرون، 1986).

الفصل الثالث

دور سم Solanapyrone A في سمية رشاحة الفطر *A.rabiei* ضد نباتات الحمص

1. 3. مقدمة

يفرز الفطر *A. rabiei* سموم solanapyrone A وC عند تنميته على وسط Czapek Dox السائل، المضاف إليه مستخلص نبات الحمص (Alam وآخرون، 1989). وقد تمكن Chen وآخرون (1991) من استخلاص السم B بتغيير المرحلة المتحركة من الكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي مع تحديد تركيبة الوسط الغذائي الذي يسمح بإفراز هذه السموم. يتشمل هذا الوسط في وسط Czapek Dox السائل المضاف إليه الكاتيونات Zn وCa وCu وCo وMn (Chen وStrange، 1994).

يتناول هذا الفصل بالدراسة تأثير رشاحة الفطر على إنبات بذور نبات الحمص ونمو الجذير والسويقة، وذلك باستعمال سلسلة من تخافيف رشاحة عزلات الفطر *A. rabiei* الثلاثة Ag1 وAg2 وAg3 وتخافيف سم solanapyrone A النقي. انطلاقا من النتائج المتحصل عليها تم تحديد التراكيز المثبطة لـ 50% (ED_{50}) مع تحديد تركيز السم solanapyrone A في رشاحة الفطر للتأكد من أن هذا التركيز يفسر التأثير التثبيطي للرشاحة.

2.3. المواد والطرق

1.2.3. إنتاج الأبواغ

لغرض إنتاج معلق أبواغ الفطر *A. rabiei* تم غلي بذور نبات الحمص (20 بذرة) في الماء المقطر لمدة 30 دقيقة. بعد ذلك تم نزع الماء ثم عقمت في درجة حرارة 121 م° لمدة 15 دقيقة في دوارق سعة 250 مل. للحصول على معلق الأبواغ تم وضع قرصين من مستعمرات الفطر النامي على وسط PDA في أنابيب اختبار وإضافة 500 مكرولتر من الماء المقطر المعقم مع الرج اليدوي. إثر ذلك تلقح البذور المعقمة بـ 300 مكرولتر من معلق الأبواغ. بعد مرور 10 أيام من الحضن في درجة حرارة 20 م° سحت إضافة الماء المقطر المعقم إلى البذور مع الرج اليدوي بالحصول على معلق أبواغ نقي غير ملوث بميسليوم الفطر. إثر ذلك أخضع معلق الأبواغ إلى الطرد المركزي بسرعة 3000*g* لمدة 10 دقائق ثم غسلت ثلاث مرات بالماء المقطر المعقم ثم أعيد تحضير معلق للأبواغ وإجراء عملية طرد مركزي ثانية. أخيرا حضر معلق الأبواغ في محلول الغليسيرول 10% بتركيز 10^7 بوغة/ مل (حسب عدد الأبواغ باستعمال شريحة عد الكريات الحمراء) وحفظ في النيتروجين السائل لحين الاستعمال (Alam وآخرون، 1987).

2.2.3. نمو الفطر وإنتاج السم

نميت عزلات الفطر الثلاث على وسط Czapek Dox السائل (جدول 1.3، ملحق 1)، المضاف إليه الكاتيونات على شكل أملاح (جدول 1.3، ملحق 1) بمعدل 30 مل في دورق سعة 250 مل وبثلاثة مكررات (Hamid وStrange، 2000).

لقحت الدوارق بـ 30 مكرولتر من معلق الأبواغ (10^7 بوغة/مل) المحفوظ في الغليسيرول في درجة حرارة منخفضة. حضنت الدوارق دون رج في درجة حرارة 20 م° لمدة 14 و16 و18 يوما. بعد انتهاء فترة الحضن، رشحت مستعمرات الفطر عبر أربع طبقات

من قماش ترشيح (muslin) ثم أخضع الراشح إلى عملية طرد مركزي بسرعة 3000 *g* لمدة 20 دقيقة. إثر ذلك مرر الراشح عبر كبسولة (1 g: C18: International Sorbent Technology, Duffryn Industrial Estate, Ystrad Mynach, Hengoed, Glamorgan, UK). في البداية حضرت هذه الكبسولة بـ 5 مل من الميثانول متبوعة بـ 5 مل من الماء المقطر المعقم. بعد تمرير رشاحة الفطر عبر الكبسولة تم غسلها بـ 5 مل من الماء المقطر المعقم وتم استرجاع السم بـ 2 مل من المذيب العضوي acetonitrile (HPLC grade) (Hamid وStrange، 2000). تم التأكد من احتواء العينات على السم باستعمال الكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي (HPLC) وقدرت كمية السم بقياس درجة الامتصاص في طول موجة 327 نانومتر وباتباع المعادلة الحسابية التالية:

$$C = (A_{327} * MW) / (\varepsilon * l) * df/15$$

حيث:

C: تركيز السم في السائل (غ/ل)

A_{327}: الامتصاص في طول موجة نانومتر

MW: الوزن الجزيئي لسم Solanapyrone A (302 غ)

ε: معامل انكسار السم في 327 نانومتر (9400)

L: طول مسار الضوء (1 سم)

df: معامل التخفيف عادة 50

15: تم تركيز السم 15 مرة (30 مل من الوسط إلى 2 مل من المذيب العضوي).

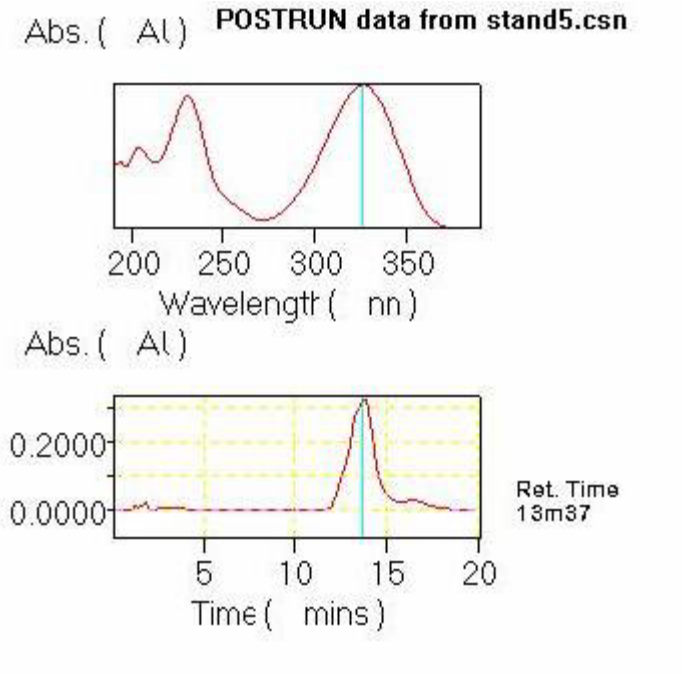
3.2.3. الكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي (HPLC)

فصلت عينات السم الذائبة في محلول الأسيتونيتريل (acetonitrile) في جهاز الكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي Philips HPLC والمزود بكاشف diode array باتباع طريقة Hamid وStrange (2000) باستثناء محاليل الفصل المستعملة والتي تمثلت في 60% ماء و20.1% ميثانول و18.1% tetrahydrofuran و1.8% acetonitrile (ح/ح/ح/ح). تضخ هذه المحاليل بمعدل تدفق 1 مل في الثانية. المرحلة الثابتة كانت عبارة عن عمود octodecylsilyl (ODS) (Spherisob ODS 2; 150 x 4.5 mm diam.; Jones Chromatography, Glamorgan, UK) محمية بـ guard column (بقطر 4.6 x 20) من نفس المادة.

تم التعرف على سم solanapyrone A حسب معامل الاحتباس وطيف امتصاص الأشعة فوق البنفسجية والتي تمت مقارنتها بتلك الخاصة بمحلول معياري(شكل 1.3). وتم تقديرها بمقارنة المساحة تحت المعول مع تلك الخاصة بالسموم المعيارية.

4.2.3. تنقية السموم بالمرحلة السائلة

ـدف الحصول على كميات كافـية مـن السـم نميـت العزلـة Tk21 علـى وسـط Czapek Dox Liquid Cation Medium (CDCLM)، لكن محتوى 33 دورقا (30 مل لكل دورق)، تم مزجه في عملية التنقية. عدل الأس الهيدروجيني للسائل إلى 3.00 باستعمال H_2SO_4 1 نظامي قبل الفصل بمحلول ethyl acetate بمعدل 1/3 الحجم ثلاث مرات. تم جمع الجزء العضوي من السائل ثم جفف بواسطة جهاز التبخير بالدوران (rotary evaporator) في درجة حرارة <35. وأذيبت الكمية الجافة المتحصل عليها في 2 مل من محلول dichloromethane (Hamid وStrange، 2000).



الشكل 1.3. . مطياف سم solanapyrone A المعياري

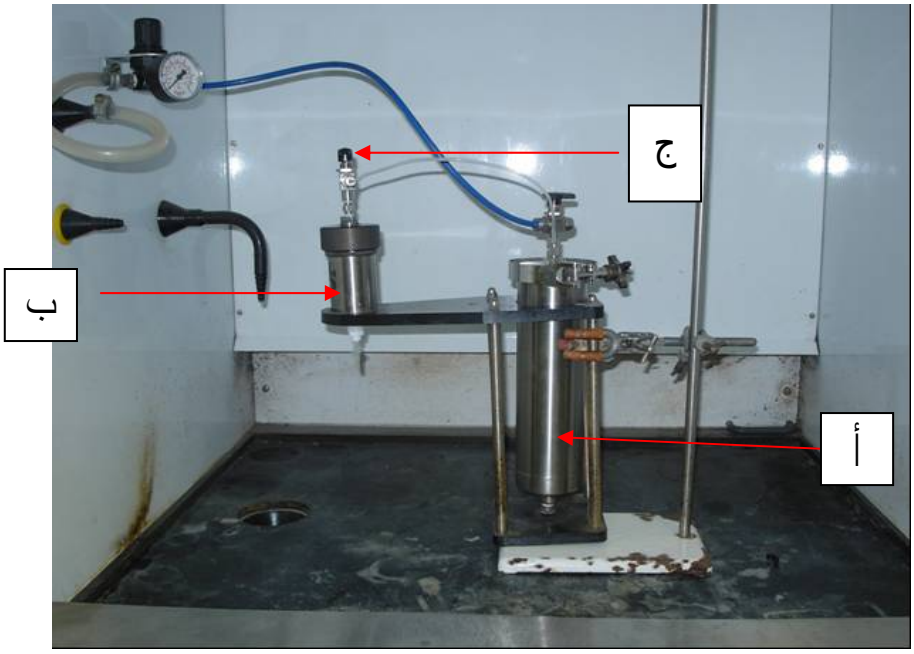
5.2.3. فصل سموم solanapyrone **بـ flash chromatography**

ضخ محلول Dichloromethane في كبسولة جافة من هلام السيليس ذات أبعاد 32-63 مكرومتر وذات مسامات بقطر 60 Å ومساحة 573 م^2 / غ(40 g : Biotage UK Ltd., 15 Harforde Court, Foxholes Business Park, John Tate Road, Hertford, UK) (شكل 2.3). بعد غسل الكبسولة بـ cyclohexane (110 ml) يتم إخراج (elution) السـم بـ dichloromethane, cyclohexane, ethyl acetate (3:3:1، 625 مل) وdichloromethane, cyclohexane, ethyl acetate (1:1:1، 400 مل) وأخيرا ethyl acetate (150 مل) تحت ضغط مباشر. جمع الناتج في قوارير بسعة 25 مل وسجل مطياف هذه الاميع من السائل في طول موجة من 200 نانومتر إلى 400 نانومتر (Hamid وStrange ، 1997). تجمع الاميع ذات الامتصاص المناسب لسم solanapyrone A مع بعضها البعض ثم تجفف بالتبخير ثم تذاب لاحقا في الميثانول.

6.2.3. سمية رشاحة الفطر *Ascochyta rabiei*.

1.6.2.3. تحضير تخافيف السم solanapyrone A.

لأجل اختبار تأثير سم solanapyrone A على إنبات البذور ونمو الجذير والسويقة، خفف محلول السم المتحصل عليه بتركيز 186 مكروغرام/مل في الميثانول إلى9:1 في الماء المقطر لأجل الحصول على تركيز نائي مقدر بـ 18.6 مكروغرام/مل. إثر ذلك تم إجراء تخافيف إضافية للحصول على التراكيز التالية من السم، 9.3 و4.65 و0.93 مكروغرام/مل.



الشكل 2.3. جهاز flash chromatography (Biotage UK Ltd., Hertford, UK) ، وعاء المحاليل الكيميائية (أ) والأسطوانة المحتوية على الكبسولة (ب) وفتحة الضخ (ج).

2.6.2.3. اختبار إنبات البذور

عقمت البذور بماء جافيل 2% لمدة دقيقتين ثم غسلت بالماء المقطر المعقم ووضعت على ورق ترشيح (Whatman رقم 1 بقطر 7 سم) في أطباق بتري (16 بذرة لكل طبق). عوملت البذور بـ 5 مل من الرشاحة ومن التخفيف بمعدل أربع مكررات (50% و25% و5%). عوملت البذور المستعملة كشاهد بالماء المقطر المعقم. تمت المحافظة على رطوبة الأطباق بإضافة الماء المقطر وحضنت لمدة 5 أيام. تم حساب نسبة تثبيط النمو باتباع طريقة Haider وآخرون (1986).

$$\text{نسبة التثبيط} = \frac{\text{نسبة الإنبات في الشاهد} - \text{نسبة التثبيط في المعاملة}}{\text{نسبة الثبيط في الشاهد}} \times 100$$

تم تحويل نسب التثبيط إلى probit (Finney، 1971، ملحق 2) ونسبت إلى لوغارتم معامل التخفيف لأجل تحديد التركيز المثبط لـ 50% من الإنبات.

3.6.2.3.اختبار نمو الجذير والسويقة

حدد تأثير رشاحة الفطر على نمو الجذير والسويقة بنفس التخافيف المستعملة في دراسة تأثير الرشاحة على الإنبات. تم وضع الجذير بطول 10 ملم في أطباق بتري وحضنت في تناوب الضوء والظلام باستعمال شدة ضوئية 300 µEinstein في درجة حرارة 25° م لمدة 5 أيام. قدرت نسبة التثبيط باستعمال طريقة Haider وآخرون (1986) كالتالي:

$$\text{نسبة التثبيط} = \frac{\text{الطول في الشاهد} - \text{الطول في المعاملة}}{\text{الطول في الشاهد}} \times 100$$

تم تقدير التثبيط بتقدير النتائج على معامل التخفيف لتحديد التركيز المثبط لـ 50%.

7.2. 3 التحليل الإحصائي

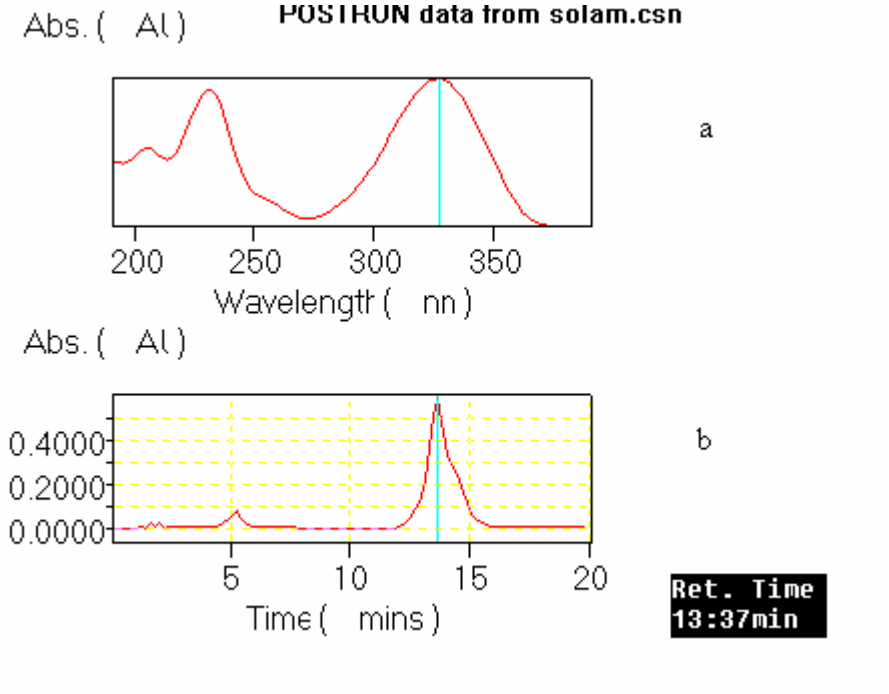
تم استعمال اختبار ANOVA one way في التحليل الإحصائي للنتائج المتحصل عليها باستعمال الاختبار Student-Newman-Keuls لدراسة تأثير الرشاحة على إنبات البذور ونمو الجذير والسويقة واختبار Tukey Test لدراسة إنتاج السم.

3.3. النتائج

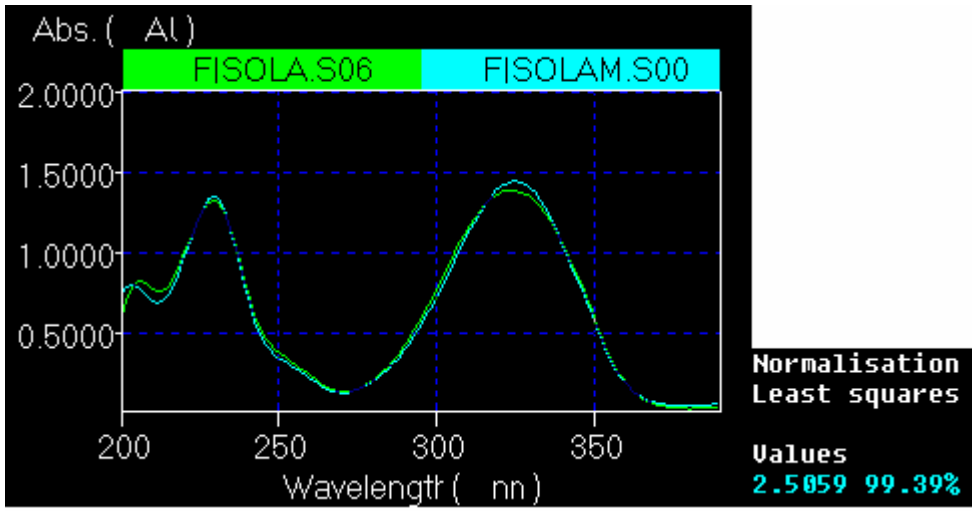
1.3.3. إنتاج سم solanapyrone A

نمت العزلات الجزائرية الثلاث والعزلة التركية (Tk21) بشكل جيد على وسط Czapek-Dox السائل المدعم بالكاتيونات (جدول 3.1، ملحق 1). أفرزت هذه العزلات سم solanapyrone A فقط وأحيانا بعض آثار السم solanapyrone C وقد تم التعرف على السم بزمن الاحتباس في الكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي ومطيافه (شكل 3. 3). أعطت العزلات الأربع مطياف شديد القرب من مطياف السم المعياري (شكل 4.3).

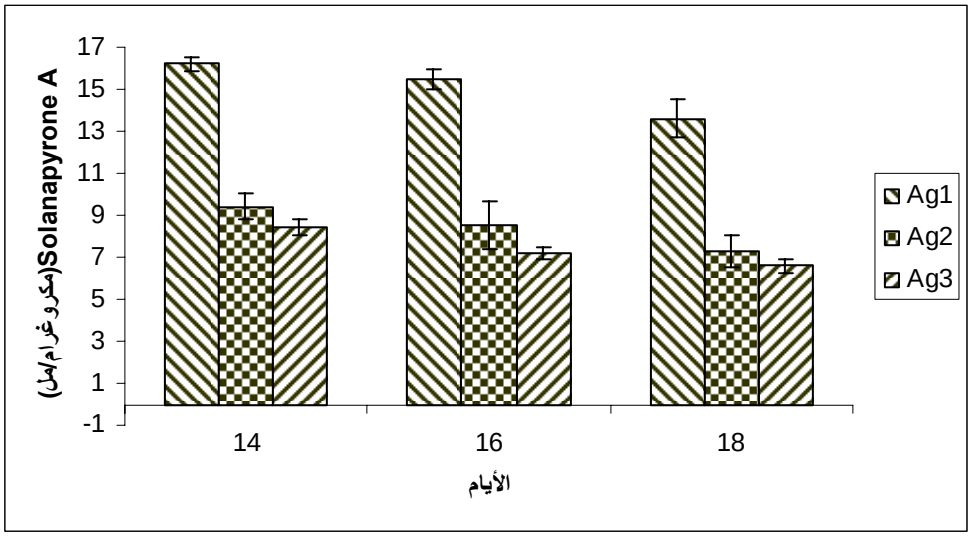
بلغت التراكيز العالية من سم solanapyrone A على أساس معامل احتباس السم المقدر بـ 9400 في طول موجة 327 نانومتر (Ichihara وآخرون، 1983)، 15.1 و9.4 و8.4 مكروغرام/لتر للعزلات Ag1 وAg2 وAg3 على الترتيب، وذلك بعد 14 يوما من الحضن. يتناقص تركيز السم المفرز بازدياد فترة الحضن، حيث انخفض إلى 14.3 و8.5 و7.2 مكروغرام/مل بعد 16 يوما و إلى 12.5 و7.3 و6.6 مكروغرام/مل بعد 18 يوما من الحضن لـ Ag1 وAg2 وAg3 على الترتيب (شكل 5.3).



الشكل 3.3. المطياف المتحصل عليه بالكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي من رشاحة العزلات الجزائرية الثلاث Ag1 وAg2 وAg3 والعزلة التركية Tk21.(a). مطياف السم solanapyrone A، (b) كروماتغرام عند طول موجة نانومتر يظهر معولا وحيدا في 13.37 دقيقة



الشكل 4.3. تطابق مطياف سم solanapyrone A المتحصل عليه في التجارب (لون أزرق) مع السم المعياري (لون أخضر) بنسبة بلغت 99.39%.



الشكل 5.3. إفراز عزلات الفطر *A. rabiei* وAg1 وAg2 وAg3 النامية على وسط Czapek-Dox لسم solanapyrone A.

2.3.3. فصل وتنقية سم solanapyrone باستعمال flash chromatography

أعطت الأجزاء من 8 إلى 22 من flash chromatography امتصاصا في طول موجة 327 نانومتر. وعند جمع هذه الأجزاء واختبار النقاوة لم يتم الكشف إلا على مادة وحيدة.

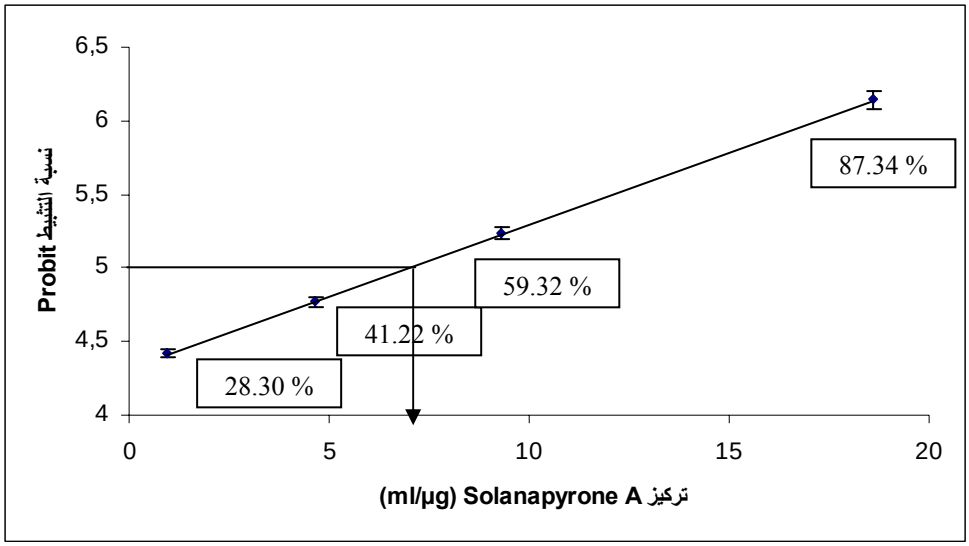
3.3.3. سمية رشاحة الفطر *Ascochyta rabiei*.

1.3.3.3. تثبيط سم solanapyrone A ورشاحة عزلات الفطر *A. rabiei* لإنبات بذور نبات الحمص

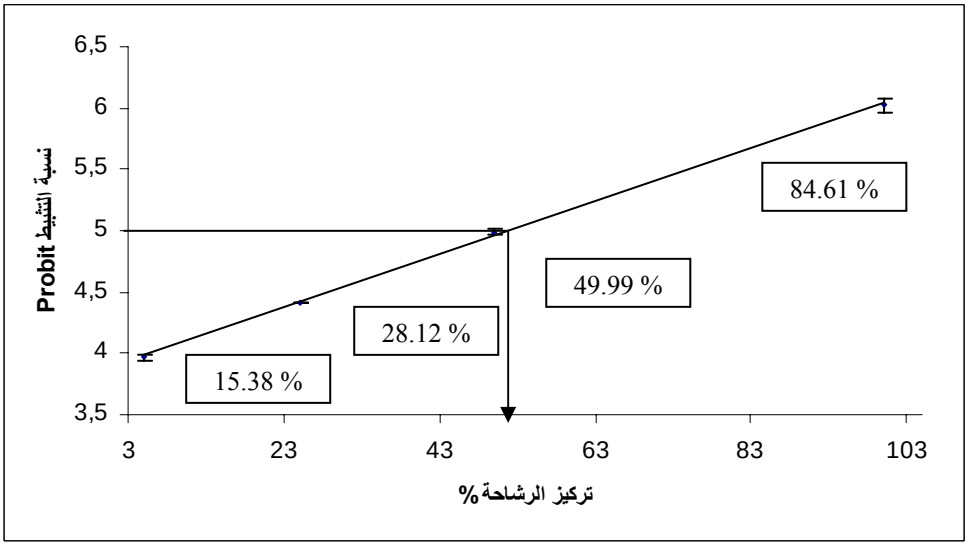
ثبط سم solanapyrone A ورشاحة العزلات الثلاث إنبات بذور الحمص، وتناسب هذا التثبيط مع تركيز السم أو الرشاحة. كانت Probit % التثبيط متناسبة مع تركيز السم أو مع معامل تخفيف الرشاحة.

بلغ تركيز السم المثبط لإنبات بـ 50% 6.93 ± 0.24 مكروغرام/مل (شكل 6.3) وكان تركيز الرشاحة المثبطة لنفس النسبة، 52.5% و55.0% و64.4% للعزلات Ag1 وAg2 وAg3 على الترتيب (شكل 7.3 و8.3 و9.3). تحتوي هذه التراكيز من الرشاحة على 7.93 ± 0.15 و5.10 ± 0.44 و5.38 ± 0.07 مكروغرام/مل من سم solanapyrone A على الترتيب. كان تركيز السم في رشاحة العزلة Ag1 المسبب لـ 50% من تثبيط الإنبات والمقدر بـ 7.93 ± 0.15 مكروغرام/مل كافيا لتفسير هذا التأثير التثبيطي، حيث لم يكن الفرق معنويا بين هذا التركيز وتركيز السم النقي المسبب لنفس نسبة التثبيط (7.10 ± 0.21 مكروغرام/مل) ($P<0.05$). لهذه الرشاحة.

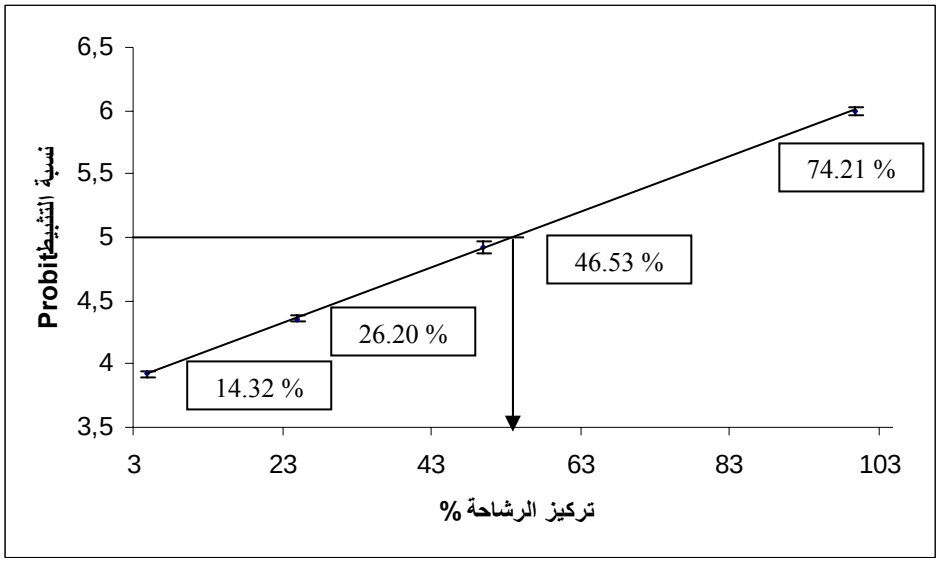
على العكس من ذلك فإن نسبة السم solanapyrone A في رشاحة العزلتين Ag2 وAg3 لا تفسر التأثير المثبط لـ 50% من الإنبات إلا بنسبة 75% و77% على الترتيب. وبين التحليل الإحصائي فرقا معنويا بين تركيز السم لرشاحة العزلتين 5.10 ± 0.44 و5.38 ± 0.07 مكروغرام/مل مع تركيز السم عن الرشاحة Ag1 (7.93 ± 0.15 مكروغرام/مل) وتركيز السم النقي (7.10 ± 0.21 كروغرام/مل) ($P<0.05$).



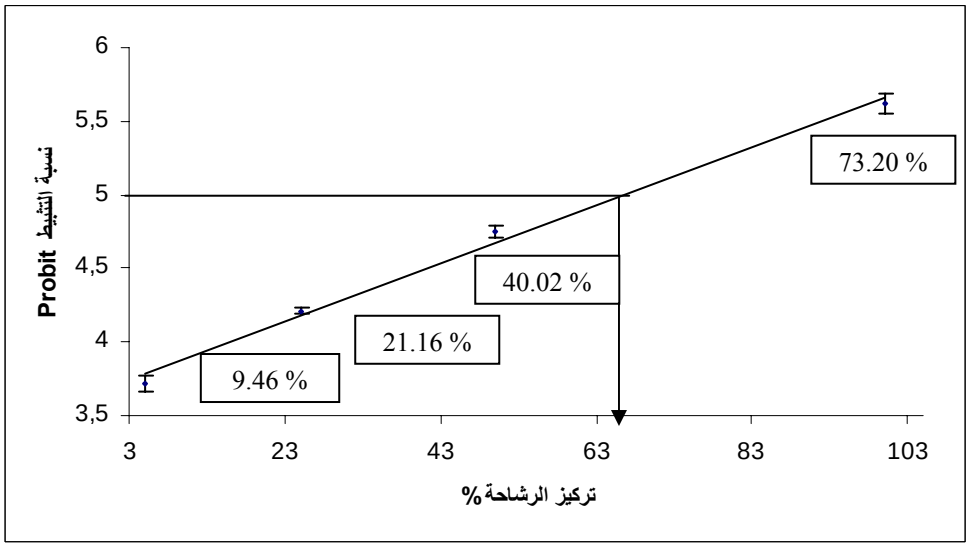
الشكل 6.3. تثبيط سم solanapyrone A لإنبات البذور. تم حساب نسبة التثبيط بالمعادلة C-T/C X 100، حيث C نسبة الإنبات في الشاهد وT نسبة الإنبات في المعاملة، لأجل حساب نسبة التثبيط بالنسبة للنسبة غير النابتة في الشاهد (87.9%). حولت النتائج إلى probit وقدر التركيز المثبط لـ 50% (ED_{50}) بـ 7.10 مكروغرام/مل (⟵).



الشكل 7.3. تثبيط رشاحة العزلة Ag1 لإنبات البذور. تم حساب نسبة التثبيط بالمعادلة C-T/C X 100، حيث C نسبة الإنبات في الشاهد وT نسبة الإنبات في المعاملة، لأجل حساب نسبة التثبيط بالنسبة لنسبة البذور غير النابتة في الشاهد (87.9%). حولت النتائج إلى probit. وقدر تخفيف الرشاحة المثبط لـ 50% (ED_{50}) بـ 52.5% مكروغرام/مل (⟵).



الشكل 8.3. تثبيط رشاحة العزلة Ag2 لإنبات البذور. تم حساب نسبة التثبيـط بالمعادلـة C-T/C X 100، حيث C نسبة الإنبات في الشاهد وT نسبة الإنبات في المعاملة، لأجل حساب نسبة التثبيط بالنسبة لنسبة البذور غير النابتة في الشاهد (87.9%). حولت النتائج إلى probit. وقدر تخفيف الرشاحة المثبط لـ 50% (ED_{50}) بـ 55% مكروغرام/مل (⟵).



الشكل 9.3. تثبيـط رشاحـة العـزلة Ag3 لإنبـات البذور. تـم حسـاب نسبـة التثبيـط بالمعادلـة C-T/C X 100، حيث C نسبة الإنبات في الشاهد وT نسبة الإنبات في المعاملة، لأجل حساب نسبة التثبيط بالنسبة لنسبة البذور غير النابتة في الشاهد (87.9%). حولت النتائج إلى probit. وقدر تخفيف الرشاحة المثبط لـ 50% (ED_{50}) بـ 64% مكروغرام/مل (⟵).

2.3.3.3.تثبيط سم solanapyrone A ورشاحة الفطر A. rabiei لنمو الجذير والسويقة.

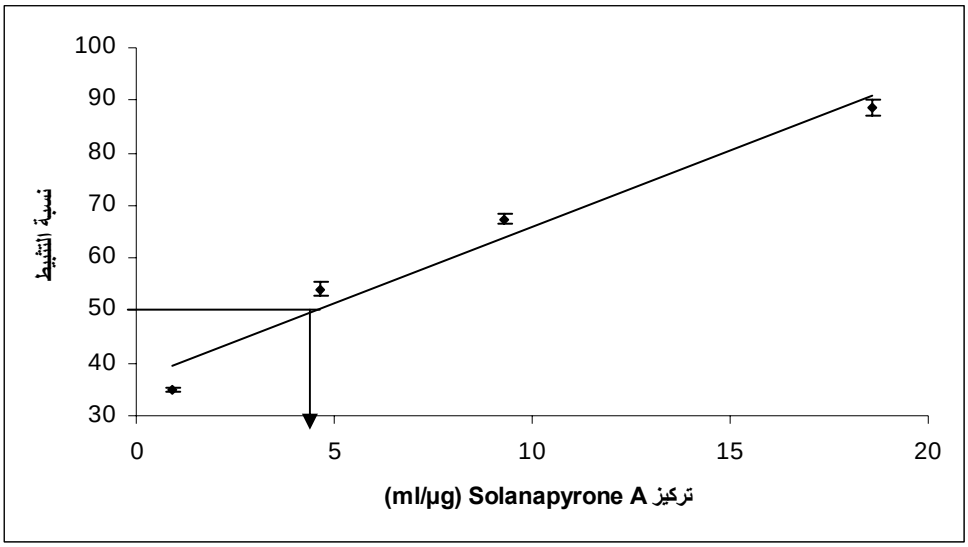
ثبط سم solanapyrone A ورشاحة الفطر *A. rabiei* نمو جذير وسويقة نبات الحمص بدرجات متفاوتة. تراوحت نسبة تثبيط السم لنمو السويقة بين 32,33% عند التركيز 0.93 مكروغرام/مل و85,7% عند التركيز 18.6 مكروغرام/مل. أما بالنسبة لرشاحة الفطر فقد اختلفت نسبة تثبيط نمو السويقة حسب عزلة الفطر مصدر الرشاحة فينما بلغت نسبة التثبيط 27,58% عند التخفيف 5% و83,65% باستعمال الرشاحة 100% بالنسبة للعزلة Ag1، انخفضت هذه النسبة إلى 19,24% و15,05% عند التخفيف 5% وإلى 76,23% و72,36% عند استعمال الرشاحة دون تخفيف (100%) بالنسبة للعزلتين Ag2 وAg3 على الترتيب. ترتفع نسبة التثبيط هذه بالنسبة لنمو الجذير مقارنة مع السويقة، حيث بلغت النسبة 35,17% و88,62% عند استعمال السم بتركيز 0.93 و18.6 مكروغرام/مل على الترتيب، وكانت هذه النسبة 30,94% و20,95% و18,07% عند تخفيف الرشاحة 5% و89,72% و76,23% و75,56% عند استعمال الرشاحة دون تخفيف (100%) بالنسبة للعزلات الثلات Ag1 وAg2 وAg3 على الترتيب.

بلغ تركيز السم المسبب لـ 50% من نمو الجذير 4.72 ± 0.3 مكروغرام/مل (شكل 10.3). في حين بلغ تركيز رشاحة العزلات الثلاث Ag1 وAg2 وAg3 المسبب لنفس نسبة التثبيط 30% و47.5% و53.0% على الترتيب (شكل 11.3 و12.3 و13.3). تحتوي هذه التراكيز من الرشاحة على 4.56 ± 0.25 و4.46 ± 0.17 و4.45 ± 0.06 مكروغرام/مل من سم solanapyrone A على الترتيب. لم تكن الفروق الإحصائية لهذه التراكيز معنوية مقارنة مع تركيز السم النقي ($P<0.05$)، إلا أ ا تفسر نتيجة تثبيط الرشاحة لنمو الجذير.

قدر تركيز سم solanapyrone A المسبب لتثبيط نمو السويقة بنسبة 50% بـ 6.56 ± 0.33 مكروغرام/مل (شكل 14.3).، في حين كان تركيز رشاحة الفطر المسبب لنفس نسبة التثبيط Ag1 وAg2 وAg3 45.0% و51.0% و59.0% على الترتيب (شكل 15.3 و16.3 و17.3). احتوت هذه النسب على

التراكيز التالية 6.79 ± 0.24 و4.81 ± 0.11 و4.97 ± 0.16 مكروغرام/مل من سم solanapyrone A على الترتيب. تركيز السم في رشاحة العزلة Ag1 كان كافيا لتفسير التأثير التثبيطي للرشاحة على نمو السويقة كما أن الفرق الإحصائي لم يكن معنويا مقارنة مع السم النقي ($P<0.05$)، في حين بالنسبة للعزلتين Ag2 وAg3 لم يفسر التأثير إلا بنسبة 73.02% و75.55% على الترتيب. وقد كان الفرق الإحصائي معنويا بالنسبة للعزلتين مع السم النقي.

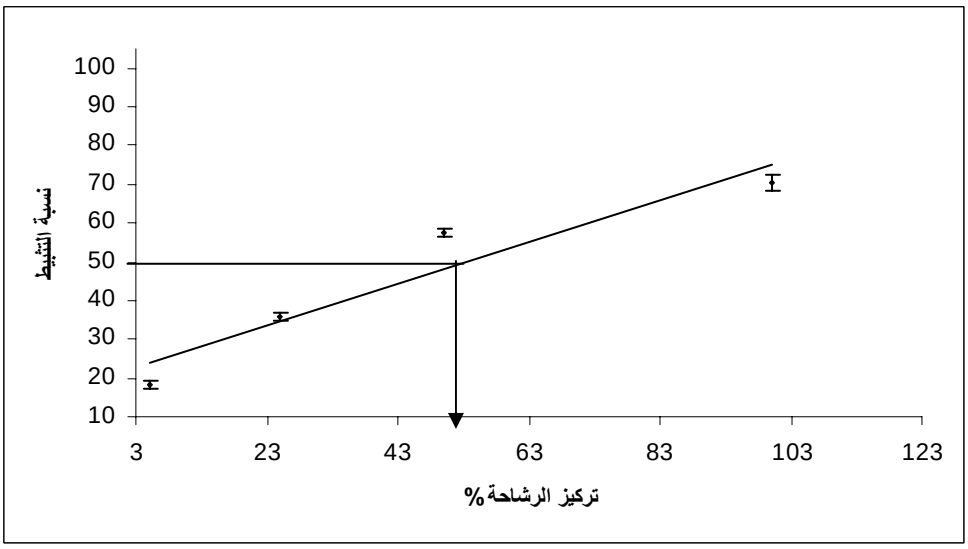
عند مقارنة التأثير التثبيطي على إنبات البذور ونمو الجذير والسويقة يبدو واضحا بأن الجذير أكثر حساسية للتأثير السمي بتراكيز كانت كالتالي 7.10 ± 0.21 مكروغرام/مل لإنبات البذور و4.72 ± 0.3 مكروغرام/مل لنمو الجذير و6.56 ± 0.33 مكروغرام/مل لنمو السويقة.



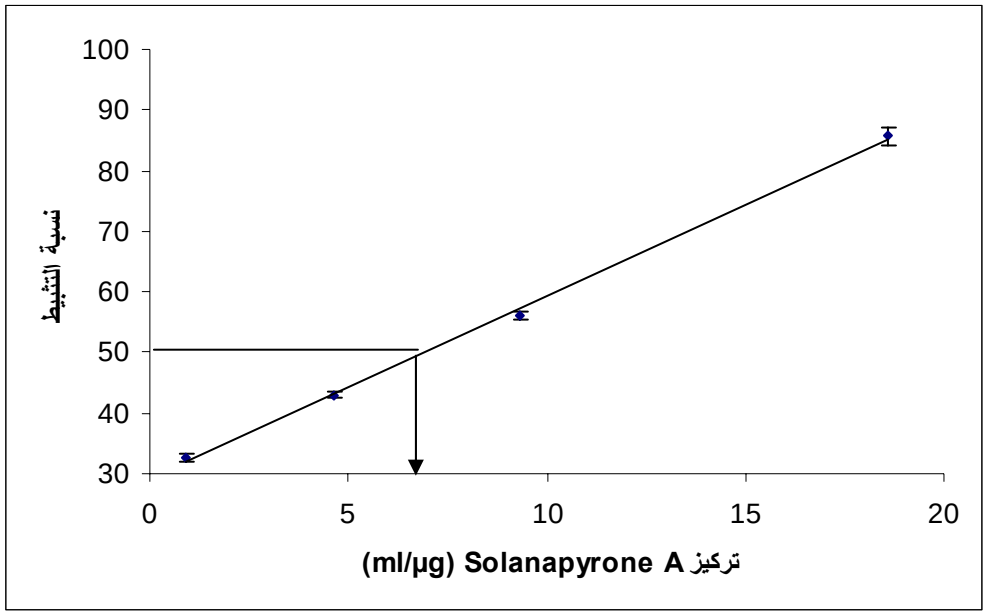
الشكل 10.3. تثبيط سم solanapyrone A لنمو الجذير. تم حساب نسبة التثبيط بالمعادلة C-T/C X 100، حيث C طول الجذير عند الشاهد (35.95 ± 2.41 ملم) وT النمو في المعاملة. قدر التركيز المثبط لـ 50% (ED_{50}) بـ 4.72 مكروغرام/مل (⟵).

الشكل 11.3. تثبيط رشاحة العزلة Ag1 لنمو الجذير. تم حساب نسبة التثبيط بالمعادلة C-T/C X 100، حيث C طول الجذير عند الشاهد (35.95 ± 2.41 ملم) وT النمو في المعاملة. وقدر تخفيف الرشاحة المثبط لـ 50% (ED_{50}) بـ 30% (⟵).

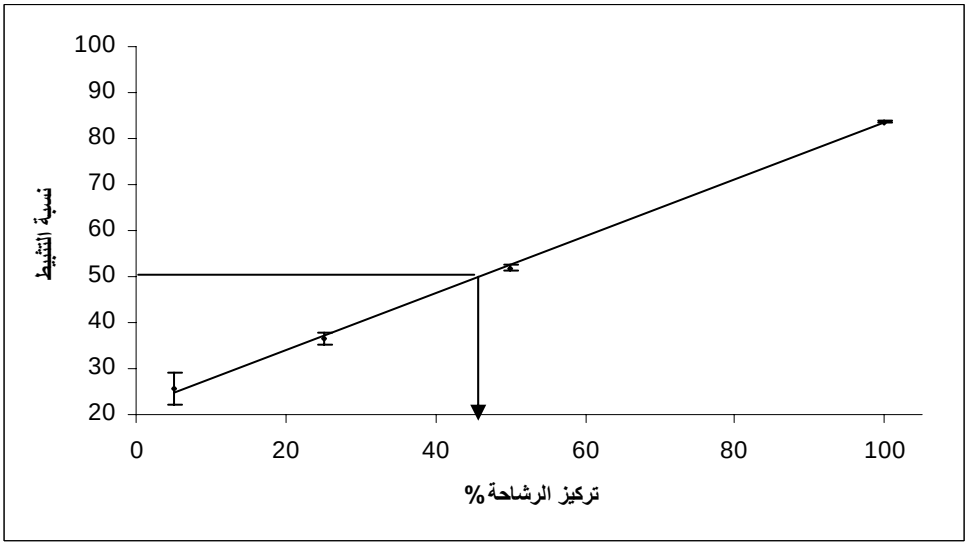
الشكل 12.3. تثبيط رشاحة العزلة Ag2 لنمو الجذير. تم حساب نسبة التثبيط بالمعادلة C-T/C X 100، حيث C طول الجذير عند الشاهد (35.95 ± 2.41 ملم) وT النمو في المعاملة. وقدر تخفيف الرشاحة المثبط لـ 50% (ED_{50}) بـ 47.5% (⟵).



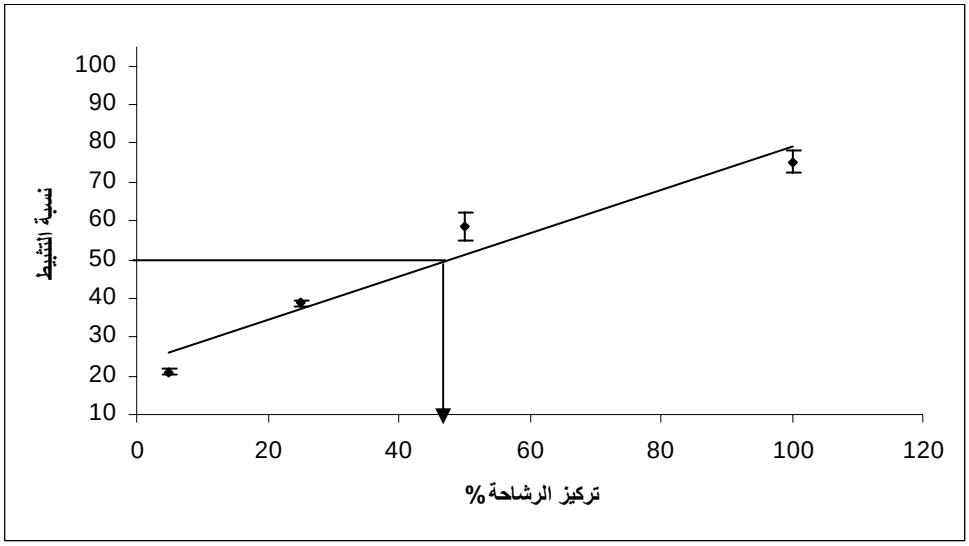
الشكل 13.3. تثبيط رشاحة العزلة Ag3 لنمو الجذير. تم حساب نسبة التثبيط بالمعادلة C-T/C X 100، حيث C طول الجذير عند الشاهد (35.95 ± 2.41 ملم) وT النمو في المعاملة. وقدر تخفيف الرشاحة المثبط لـ 50% (ED_{50}) بـ 53% (⟵).



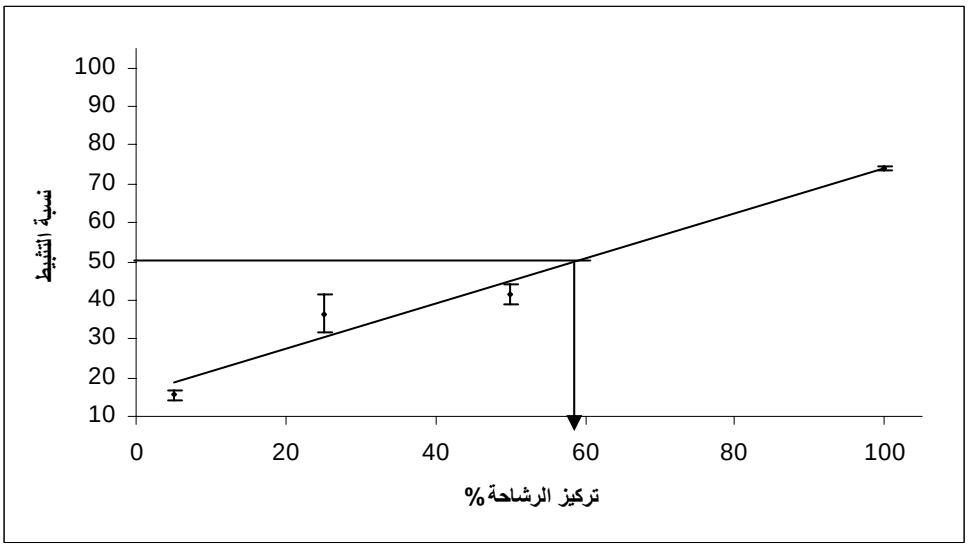
الشكل 14.3. تثبيط سم solanapyrone A لنمو السويقة. تم حساب نسبة التثبيط بالمعادلة C-T/C X 100، حيث C طول الجذير عند الشاهد (22.3 ± 1.98 ملم) وT النمو في المعاملة. قدر التركيز المثبط لـ 50% (ED_{50}) بـ 6.56 مكروغرام/مل (⟵).



الشكل 15.3. تثبيط رشاحة العزلة Ag1 لنمو السويقة. تم حساب نسبة التثبيط بالمعادلة C-T/C X 100، حيث C طول الجذير عند الشاهد (22.3 ± 1.98 ملم) وT النمو في المعاملة. وقدر تخفيف الرشاحة المثبط لـ 50% (ED_{50}) بـ 45% (⟵).



الشكل 16.3. تثبيط رشاحة العزلة Ag2 لنمو السويقة. تم حساب نسبة التثبيط بالمعادلة C-T/C X 100، حيث C طول الجذير عند الشاهد (22.3 ± 1.98 ملم) وT النمو في المعاملة. قدر تخفيف الرشاحة المثبط لـ 50% (ED_{50}) بـ 51% (⟵).



الشكل 17.3. تثبيط رشاحة العزلة Ag3 لنمو السويقة. تم حساب نسبة التثبيط بالمعادلة C-T/C X 100، حيث C طول الجذير عند الشاهد (22.3 ± 1.98 ملم) وT النمو في المعاملة. قدر تخفيف الرشاحة المثبط لـ 50% (ED_{50}) بـ 59% (⟵).

4.3. المناقشة

تفرز العزلات الثلاث سم solanapyrone A وأحيان قليلا من سم solanapyrone C. تبين وجود اختلاف في كمية سم solanapyrone A المفرز حسب عزلة الفطر وفترة الحضن، حيث بلغ التركيز 15.1 مكروغرام/مل عند العزلة Ag1 لينخفض إلى 9.4 و8.4 مكروغرام/مل عند العزلتين Ag2 وAg3 على الترتيب بعد 14 يوما من الحضن. تتوافق هذه النتائج مع أورده كل من Alam وStrange (1992) اللذين سجلا إفراز العزلة 6K لكميات من سم solanapyrone A بنسبة قد تصل إلى 6 مرات كمية السم الذي أفرزه بعض العزلات المستعملة في الدراسة و Latif وآخرون (1993) الذين سجلوا تباينا كبيرا في كمية السم المفرزة بين العزلات التسع موضوع الدراسة. نفس هذه الملاحظة تم تسجيلها في العلاقة بين كمية السم المفرزة وفترة الحضن، فكلما طالت فترة الحضن انخفضت كمية السم فعلى سبيل المثال بالنسبة للعزلة Ag1 تم تسجيل 15.1 مكروغرام/مل بعد 14 يوما من الحضن لينخفض إلى 12.5 مكروغرام/مل بعد 18 يوما من الحضن، فكلما زادت فترة الحضن عن 14 يوما انخفضت كمية السم المفرزة.

إن اثبات تواجد هذا السم في رشاحة الفطر يؤكد النتائج المسجلة والمتعلقة بأن العزلات التي تم التعرف عليها بكو ا عزلات الفطر *A. rabiei* كلها تنتج هذا السم وأن كمية السم المفرزة تتغير بحسب العزلة والوسط وظروف الحضن (Alam وآخرون، 1989؛ Chen وآخرون، 1991؛ Höhl وآخرون، 1991؛ Benning وBarz، 1995). باستثناء عزلة واحدة منتجة لسم cytochalasin D (Latif وآخرون، 1993)، مع انعدام تواجد تحديد تسلسل الحمض النووي DNA لهذه العزلة والتي يمكن أن تكون من الجنس *Phoma* المعروف بإصابته لنبات الحمص (Haware وNene، 1981)، حيث تنتج بعض أنواع هذا الجنس سموم cytochalasins (Evidente وآخرون، 2003).

بالإضافة إلى النتائج المسجلة والمتعلقة بإنتاج السم، فقد سجل اختلاف في حساسية مختلف أجزاء النبات المستعملة في الدراسة تجاه تأثير السم، فقد كان الجذير أكثر حساسية للتأثير التثبيطي للسم تليه في ذلك السويقة وأخير البذور التي كانت أقل حساسية تجاه السم. ومن ذلك يمكن اللجوء إلى استعمال الجذير كوسيلة لاختبار حساسية مختلف أصناف الحمص تجاه الفطر كوسيلة انتخاب في تجارب استنباط الأصناف المقاومة لمرض التبقع الأسكوكيتي، حيث يمثل طريقة أكثر بساطة وربما أقل تكلفة من استعمال النباتات في عملية الانتخاب.

يعتبر إنتاج عزلات الفطر *A. rabiei* لسم solanapyrone دليلا قويا على أهمية هذا السم وتأثيره على النبات العائل، ويبدو بأن لهذا السم دورا كبيرا في حدة المرض أو على الأقل له دور فعال في الإمراضية. فقد ذكر Latif وآخرون (1993) بأن أكثر العزلات سمية هي العزلات التي تفرز أكبر كمية من السم، كما أن معاملة نباتات الحمص بسم solanapyrone A يؤدي إلى ظهور أعراض شبيهة بأعراض الإصابة بالفطر كفقد اليخضور والذبول وتكسر الأفرع (Hamid وStrange، 2000). على هذا الأساس فإنه من المهم اللجوء إلى إنتاج طافرات من الفطر *A. rabiei* غير مفرزة للسم بحيث يسمح اختبارها على النبات العائل من التأكد التام من دور هذا السم في الإمراضية (Mogensen وآخرون، 2006؛ White وCheng، 2006).

الفصل الرابع

تحويل الفطر *A. rabiei* بوساطة البكتريا *Agrobacteirum tumefasciens*.

1.4. مقدمة

تم إثبات العزلات الجزائرية بأ ا عزلات الفطر *A. rabiei* بالاعتماد على نتائج تحليل الحمض النووي الريبوزومي (rDNA) في الفصل الثاني من البحث، كما تم في الفصل الثالث إثبات إفراز هذه العزلات الثلاث لسم واحد من أنواع سموم solanapyrone وعادة ما يكون السم solanapyrone A. اعتماد على النتائج المتحصل عليها فإنه من الضروري طرح فرضية أن إفراز سم solanapyrone A ضروري للفطر *A. rabiei* على أساس تأثيره على نبات الحمص، حيث يمكن أن يلعب دورا في تطفل هذا الفطر على النبات العائل (Hamid وStrange، 2000). تعتبر سموم الكائنات الدقيقة الممرضة للنباتات إما عامل إمراضية أو عوامل شدة المرض وهذا على حسب كو ا ضرورية لسمية الكائن المسبب للإصابة أو أ ا تساهم في شدة المرض على الترتيب.

على هذا الأساس فإنه من الضروري اختبار أهمية إفراز سم solanapyrone للفطر وذلك بإنتاج طافرات غير مفرزة للسم واختبار تأثيرها على النبات العائل. إن عدم قدرة هذه الطافرات على إصابة نبات الحمص بالمرض يكون دليلا قويا لتصنيف سم solanapyrone كعامل إمراضية (pathogenicity)في حين ظهور إصابة ضعيفة أو حدة مرضية ضعيفة على النبات العائل يسمح بتصنيفه ضمن عوامل حدة المرض.

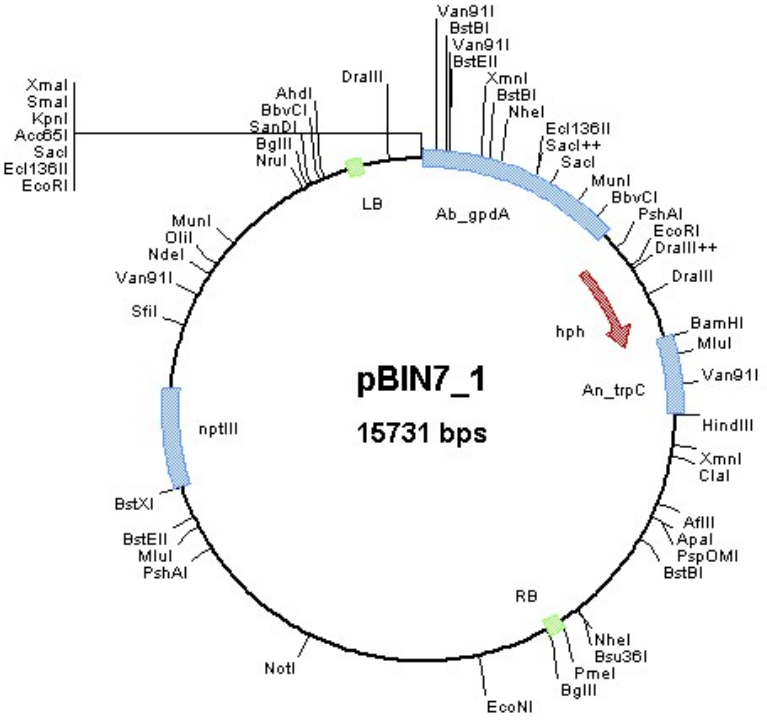
تعتبر طريقة التحويل (transformation) بوساطة البكتريا *Agrobacterium tumefasciens* واحدة من هذه الطرق. تعرف هذه البكتريا بكو ا المسبب المرضي لمرض التدرن التاجي (crown gall) على العديد من أنواع النبات، وذلك بإدماجها للمورثات المسؤولة على إفراز حمض indole acetic (IAA) والستيوكينات (cytokinins) (Deeken وآخرون، 2006). إلا أن هذه المورثات النامية من البلاسميدات، يمكن تعويضها

بمؤشرات منتخبة كالمورثات المسؤولة عن المقاومة للمضاد الحيوي hygromycin. يمكن لعملية الإضافة أن تأخذ مكا ا في العديد من المواضع في النبات مسببة طفرات إذا حدثت مع هذه المورثات (Deeken وآخرون، 2006). بالإضافة إلى ذلك فإن إضافة المورثات هذه ليس حكرا على النباتات (Mullins وKang ، 2001)، حيث استعملت في تطفير العديد من الأنواع الفطرية (Michielse وآخرون، 2005). وقد تبين حديثا بأ ا تحدث في منطقة مفضلة بعينها هي gene-rich regions عند *Leptosphaeria maculans* (Blaise وآخرون، 2007). ونتطرق في هذا الفصل إلى تطفير الفطر *A. rabiei* بالنمو المتزامن مع البكتريا المحتوية على البلاسميدات الحاملة للمورثة المقاومة للمضاد الحيوي hygromycin B.

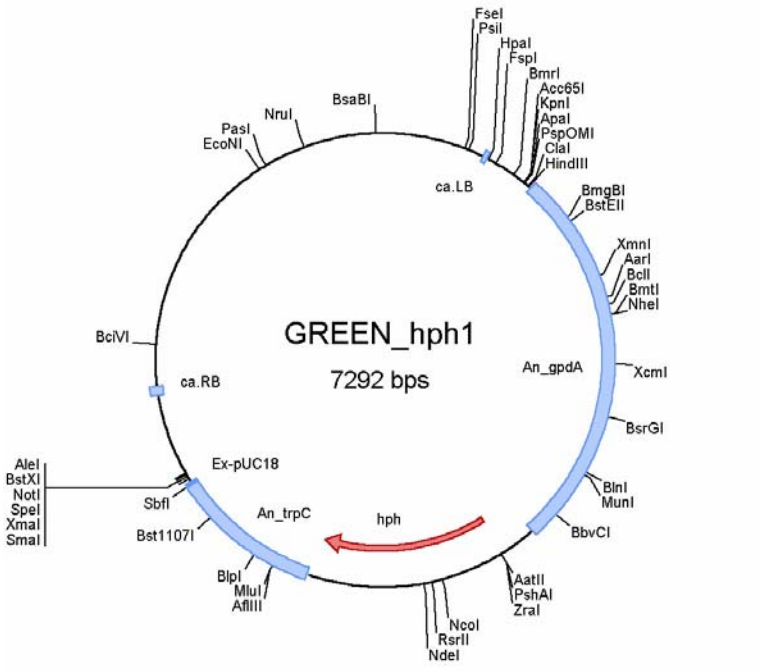
2.4. الوسائل والطرق

1.2.4. العزلات

هدف إنتاج طافرات من الفطر *A. rabiei* غير منتجة للسم تم استعمال العزلة الفطرية Tk21 وعزلتين بكتيرين AGL1 وLBA1126 لبكتريا *Agrobacterium tumefasciens* (تـم الحصـول عليهـا من عنـد M. P. Challen، Horticulture Research International, Wellesbourne, Warwick, CV35 9EF, UK). تحتوي العزلة AGL1 على البلاسميد pBin 7.1، في حين تحتوي العزلة LBA1126 على البلاسميـد pGreenhph 1 (شكل 1.4 و2.4).



الشكل 1.4. خارطة البلاسميد pBIN7-1 (Leach وآخرون، 2004).



الشكل 2.4. خارطة البلاسميد pGREEN_hph1 الثنائي المطور في Warwick HRI (Zhang وChallen، غير منشور).

2.2.4. زراعة وتحفيز البكتريا *A. tumefasciens*.

زرعت العزلتان البكتيريتان (AGL1 وLBA1126) على وسط Luria الصلب (LB agar) المضاف إليه المضادان الحيويان kanamycin (100 مكروغرام/مل، Melford, Laboratories Ltd., Bildeston Road, Chelsworth, Ipswich, IP7 7LE UK) وrifampicing (20 مكروغرام/مل، Melford, Laboratories Ltd., Bildeston Road, Chelsworth, Ipswich, IP7 7LE UK) (جدول 1.4، ملحق 1) وحضنت في درجة حرارة 28. إثر ذلك زرعت مستعمرة وحيدة من كل عزلة بكترية في 5 مل من وسط LB السائل والمحتوي على المضاد الحيوي kanamycin (100 مكروغرام/مل) وحضنت لليلة كاملة في درجة حرارة 28 مº في جهاز رج (150 دورة/دقيقة). انطلاقا من هذا الوسط السائل تم زرع 2 مل في 50 مل من الوسط الأدنى (minimal medium، جدول 2.4، ملحق 1) في دوارق سعة 250 مل وحضنت في نفس درجة الحرارة مع الرج (150 دورة/دقيقة) لليلة كاملة (Mogensen وآخرون، 2006).

بهدف الحصول على بكتريا *A. tumefasciems* المحفزة، تم نقل حجم من السائل البكتيري يسمح بالحصول على درجة امتصاص 0.5 في طول موجة 600 نانومتر عند تخفيفه إلى 50 مل إلى أنبوب اختبار (Falcon) وعرض للطرد المركزي بسرعة 4000 *g* لمدة 10 دقائق. يضاف بعد ذلك إلى الراسب 50 مل من وسط التحفيز (induction medium جدول 3.4، ملحق 1)، يحتوي هذا الوسط على مادة acetosyringone (2% في الميثانول، 100 مكرولتر) والمضاد الحيوي kanamycin (100 مكروغرام/مل) ويحضن في 28º م لمدة 3 و6 و9 ساعات مع الرج (150 دورة/دقيقة) (Michielse وآخرون، 2005؛ Mogensen وآخرون، 2006؛ White وCheng، 2006).

3.2.4. زراعة الفطر *A. rabiei*.

زرع معلق أبواغ الفطر المحضر حديثا (10^5 بوغة/مل؛ Alam وآخرون، 1987) فوق ورق السيلوفان (A.A. Packaging Led, Preston, Lancashire) على وسط الإنبات (germination medium، جدول 4.4، ملحق 1) في أطباق بتري وحضنت الأطباق في درجة حرارة 20º م لمدة 48 ساعة (Mogensen وآخرون، 2006).

4.2.4. تحويل الفطر *A. rabiei*.

يغمر كل طبق محتوي على أبواغ *A. rabiei* النابتة بـ 2 مل من معلق *A. tumefasciens* النامي على وسط التحفيز وتحرك الأطباق يدويا لأجل الانتشار الجيد للسائل البكتيري. تحضن الأطباق لمدة دقيقتين في درجة حرارة 20º م ثم يسحب السائل البكتيري الزائد بواسطة ماصة معقمة، إثر ذلك تنقل أوراق السيلوفان إلى وسط التحفيز الصلب وتحضن الأطباق في درجة حرارة 20 لمدة 39 ساعة (Mogensen وآخرون، 2006).

5.2.4. انتقاء الطافرات

بعد الحضن لمدة 39 ساعة في درجة حرارة 20º م، تقطع كل ورقة سيلوفان إلى 8 أجزاء وتوضع كل أربعة أجزاء في أطباق بتري على وسط Czapek-Dox الصلب المضاف إليه عصير V8 (جدول 5.4، ملحق 1) والمحتوي على المضاد الحيويين cefotaxime (200 مكرومولار، Sigma-Aldrich Chimie Gmbh P.O. 1120, 89552 Steinheim, Germany) وhygromycin B (50 مكروغرام/مل، Sigma-Aldrich Chimie Gmbh P.O. 1120, 89552 Steinheim, Germany). تحضن الأطباق في درجة حرارة 20º م وتنقل

المستعمرات النامية إلى نفس الوسط الصلب المحتوي على نفس المضادين الحيويين لتحضن كذلك في درجة حرارة 20 م°.

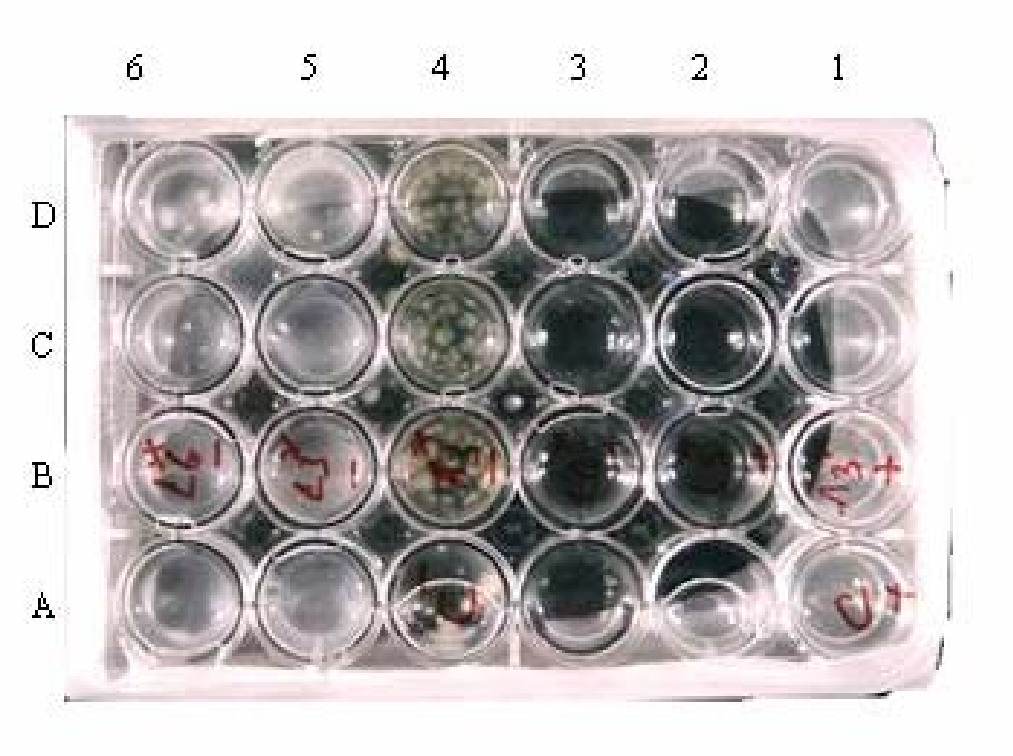
6.2.4. اختبار طافرات *A. rabiei* لإنتاج السم في صفائح المعايرة

نميت طافرات الفطر *A. rabiei* على وسط Czapek Dox المضاف إليه الكاتيونات على شكل أملاح (ملحق 1)، يحتوي هذا الوسط على المضادين الحيويين cefotaxime (200 مكروموالار،) وhygromycin B (50 مكروغـرام/مـل). وذلـك فـي صفائـح معايـرة 24 حفـرة بمعـدل 2.5 مـل لكـل حفـرة (Costar, Corning Inc., Corning, NY 14831, USA، شكل 3.4)، في حين نمي الشاهد (العزلة الأصلية) على نفس الوسط مع ودون المضادين الحيويين. تحضن صفائح المعايرة في درجة حرارة 20 م° لمدة 12 يوما، بعدها تأخذ عينات (1 مل) من الوسط السائل النامي عليه الفطر أو الطافرات وتقرأ درجة الامتصاص في طول موجة 327 نانومتر.

3.4 . النتائج

1.3.4. نمو *A. tumefasciens*.

نمت العزلتان البكتيريتان (AGL1 وLBA1126). بشكل جيد على وسط LB الصلب والسائل. كما نمت أيضا بشكل جيد على الوسط الأدنى (ملحق 1) عند تلقيحه بـ 2 مل من المعلق البكتيري معطية درجة امتصاص تراوحت بين 0.82 و1.33 بعد الحضن في درجة حرارة 28 م° لليلة كاملة. تم استعمال كميات من السائل مكافئة تسمح بالحصول على درجة امتصاص 0.5 في طول موجة A_{600} عند إعادة تحضير معلق البكتريا في وسط التحفيز.



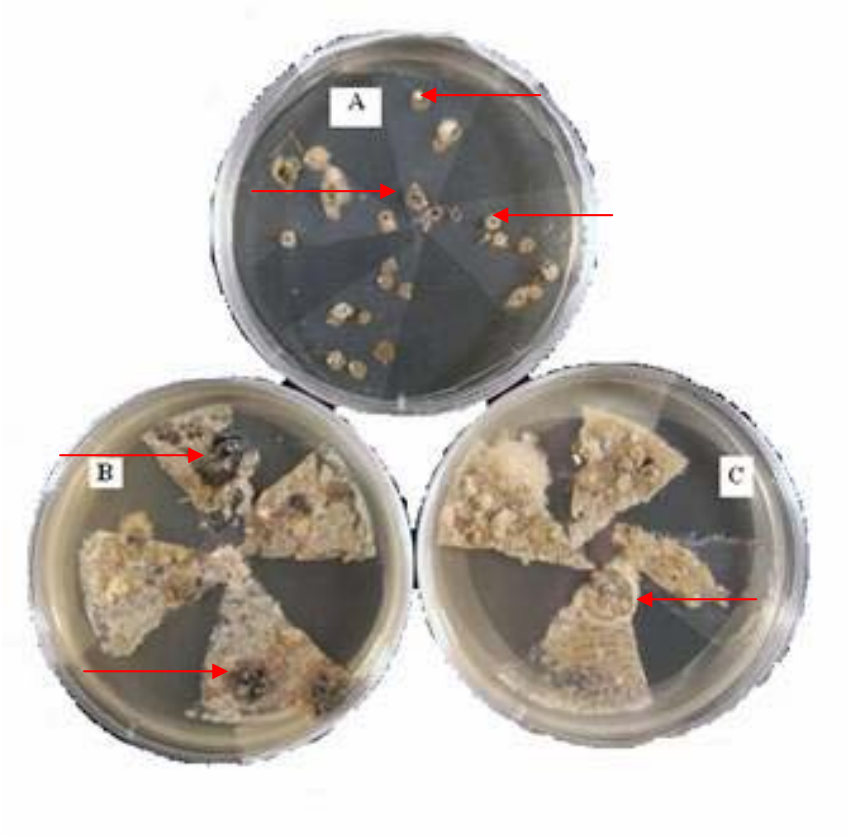
الشكل 3.4. نمو الطافرات أو الشاهد على صفائح المعيارة ذات 24 حفرة. تحتوي الآبار 1B و1C و1D الطافر رقم 1 و الآبار 2B و2C و2D الطافر رقم 2 وتحتوي الآبار 3B و3C و3D الطافر رقم 3 والمنماه على وسط Czapek Dox المضاف إليه المضادات الحيوية. بينما تحتوي الآبار 4B و4C و4D الطافر رقم 1 والآبار 5B و5C و5D الطافر رقم 2 وتحتوي الآبار 6B و6C و6D الطافر رقم 3 والمنمـاه على وسط Czapek Dox الخالي من المضادات الحيوية.وزرع الشاهد (العزلة الأصلية، wild type) في الآبار 1A و2A و3A و4A و5A و6A والتي تحتوي نفس الوسط المضاف إليه المضادين الحيويين والخالي منهما على الترتيب.

2.3.4. نمو طافرات الفطر *A. rabiei*.

نمت الأبواغ المزروعة على ورق السيلوفان بشكل جيد، وبعد مرور 48 ساعة ثم غمرهـا بمعلق البكتـريا *A. tumefasciens* وحضنها لمدة 39 ساعة ثم نقلها بعد مرور أربعة أيام إلى وسط CDV8 الصلب تم تسجيل نمو 498 طافر (شكل 4.4). تم الحصول على 281 طافر من الأبواغ المعاملة بالعزلة LBA1126 و215 طافر من الأبواغ المعاملة بالعزلة AGL1 (جدول 1.4). تمثل هذه الأرقام مردودية في عدد الطافرات بالنسبة إلى الأبواغ مقدرة بـ 46.8 و35.8 طافر لكل 10^5 بوغة مع LBA1126 وAGL1 على الترتيب. كانت الفروق الإحصائية غير معنوية بين عدد المستعمرات المتحصل عليها وفترة الحضن مع مادة acetosyringone ($P<0.05$) (جدول 1.4).

3.3.4. إنتاج طافرات الفطر *A. rabiei* لسم solanapyrone A.

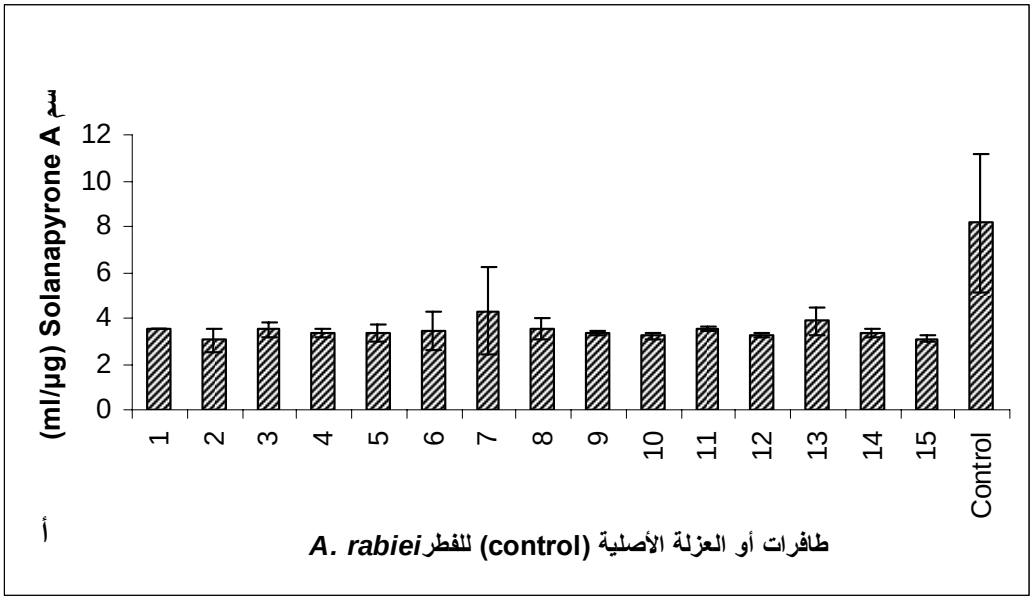
عند نمو 30 طافرا على وسط CDCLM في صفائح المعايرة (شكل 3.4)، أعطت كلها رشاحة تمتص في طول موجة 327 نانومتر وهو طول الموجة الأقصى (λmax) الذي يمتص عنده السم solanapyrone A. تفرز العزلة الأصلية لفطر *A. rabiei* بصفة أساسية سم solanapyrone A عند تنمتها على هذا الوسط (CDCLM) والذي يمتص في نفس طول الموجة (أنظر الفصل الثالث، شكل b2.3). على اعتبار أن هذا الأمر ينطبق على الطافرات النامية، فإن إنتاجها لسم solanapyrone A تراوح بين 2.11 ± 0.10 مكرغرام/مل للطافر رقم 30 و4.32 ± 1.93 مكروغرام/مل للطافر رقم 7 (شكل 5.4 أ و ب)، مثلت هذه النتائج انخفاضا في إنتاج السـم تـراوح بيـن 74.11% و46.99% بالمقارنة مع العزلة الأصلية الشاهد (8.15 ± 2.99 مكروغرام/مل؛ شكل 5.4 A وB). كانت الفروق الإحصائية معنوية في إنتاج سم solanapyrone A بين العزلة الأصلية والطافرات وغير معنوية فيما يخص تأثير فترة حضن البكتريا *A. tumefasciens* في وسط التحفيز على إنتاج المادة التي تمتص في طول موجة نانومتر 327 التي أفرزتا الطافرات ($P<0.05$) (جدول 2.4).

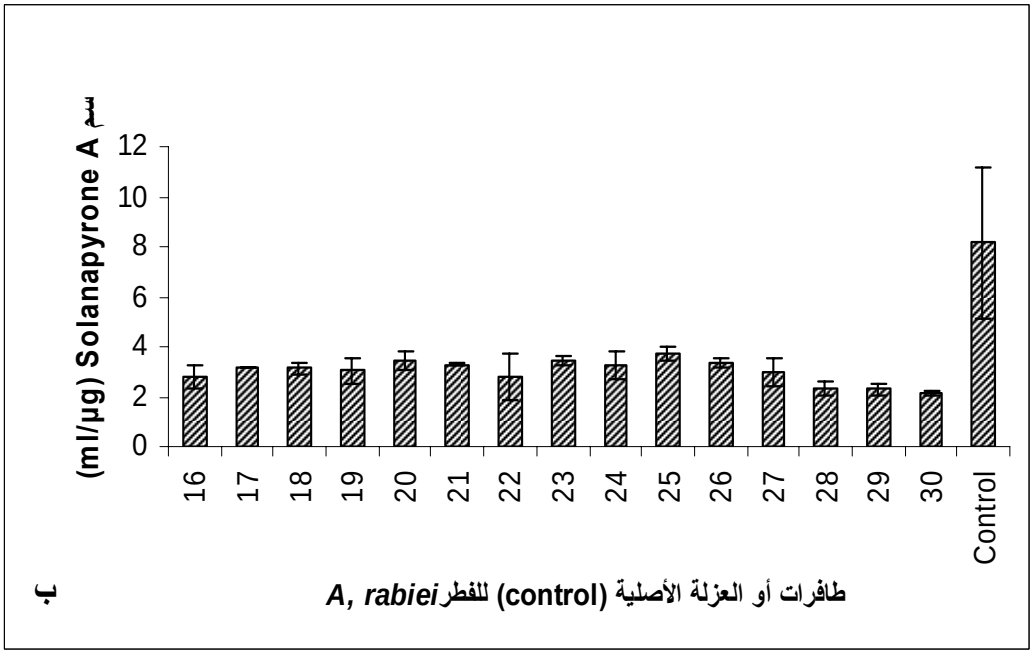


الشكل 4.4. نمو العزلة الأصلية (الشاهد) وطافرات الفطر *A. rabiei*. (A) العزلة الأصلية الشاهد النامية على وسط CD V8 الخالي من المضادين الحيويين، (B) و(C) الطافرات النامية على نفس الوسط المحتوي على المضادين الحيويين cefotaxime وhygromycin B .

جدول 1.4. عدد طافرات *A. rabiei* المتحصل عليها بعد المعاملة بعزلتين من البكتريا *Agrobacterium* وثلاث فترة حضن أولي مع acetosyringone.

عزلات *Agrobacterium*	فترة الحضن الأولي مع acetosyringone (ساعة)		
	3	**6**	**9**
	عدد المستعمرات		
AGL1	85	58	72
LBA1126	124	110	49





الشكل 5.4 أ و ب. إنتاج سم *A. rabiei* من طرف العزلة الأصلية الشاهد و30 طافرا النامية على وسط Czapek-Dox المدعم بخمسة كاتيونات.

جدول 2.4. إنتاج الطافرات لسم solanapyrone A مع أوقات مختلفة من حضن *A. tumefasciens* في وسط التحفيز.

الطافر	الحضن في وسط التحفيز (ساعة)	كمية solanapyrone A (مكروغرام/مل)
1	3	0.01 ± 3.52
2	3	0.55 ± 3.03
3	3	0.33 ± 3.50
4	3	0.18 ± 3.37
5	3	0.36 ± 3.36
6	3	0.84 ± 3.45
7	3	1.94 ± 4.32
8	3	0.45 ± 3.52
9	6	0.10 ± 3.31
10	6	0.15 ± 3.21
11	6	0.11 ± 3.54
12	9	0.11 ± 3.23
13	3	0.63± 3.88
14	3	0.25 ± 3.34
15	3	0.15 ± 3.09
16	3	0.48 ± 2.75
17	3	0.00 ± 3.17
18	3	0.23 ± 3.16
19	6	0.52 ± 3.05
20	6	0.36 ± 3.45
21	6	0.04 ± 3.27
22	6	0.97 ± 2.79
23	6	0.19 ± 3.45
24	6	0.52 ± 3.25
25	6	0.31 ± 3.73
26	9	0.21 ± 3.36
27	9	0.55 ± 2.97
28	3	0.25 ± 2.34
29	3	0.24 ± 2.28
30	9	0.10 ± 2.11

4.4. المناقشة

من الواضح جدا أن تأكيد دور المركبات الأيضية ذات الطبيعة السمية التي تفرزها الممرضات النباتية في الإصابة المرضية، يكون بتخليق واستعمال طافرات غير قادرة على إنتاج هذه المواد تكون أقل سمية أو غير ممرضة. يمكن إنتاج طافرات الفطريات بتعريضها للإشعاع أو تعريضها لمواد كيميائية مطفرة. إلا أن الطريقة الأفضل هي إنتاج طافرات بدمج حمض نووي DNA غريب أو خارجي داخل الحمض النووي DNA للفطر بحيث يحدث خللا في المورثات المسؤولة على إفراز السموم. تسمح مثل هذه الطريقة باستنتساخ المناطق الباورة لعملية الدمج والتعرف عن المورثات المهدمة أو المستهدفة. واحدة من هذه الطرق التي يمكن استعمالها في إنتاج الطافرات والتي تعتمد على الإخلال بعمل المورثات هي استعمال بكتريا *A. tumefasciens* ولقد كثر الاعتماد على هذه الطريقة لكو ا سهلة نسبيا وللعدد الكبير من الطافرت التي يمكن التحصل عليه. بلغت نسبة النجاعة في هذه الدراسة الحصول على 46.8 و35.8 طافرا لكل 10^5 بوغة باستعمال العزلتين LBA1126 وAGL1 على الترتيب، وكانت هذه النتائج مماثلة لتلك التي تحصل عليها Covert وآخـرون (2001) الذيـن تحصلوا على 2–150 طافرا لكل 10^5 بوغة للفطـر *Fusarium circinatum* عنـد استعمـال بكتريـا *A. tumefasciens* العزلة AGL1. كما كانت أيضا النتائج المتحصل عليها متقاربـة مـع تلـك لـ De Groot وآخرون (1998) الذين تحصلوا على 10–90 طافرا لكل 10^5 بوغة عند تحويل الفطر *Aspergillus awamori* باستعمال *A. tumefasciens* العزلة LBA1100. على العكس من ذلك تبدو النجاعة المتحصل عليها أكبر من تلك لـ *Aspergillus giganteus* (0.5–7.9 طافرا لكل 10^5 بوغة، العزلة LBA1100؛ Meyer وآخرون، 2003)، *Coniothyrium minitans* (7.56 طافرا لكل 10^5 بوغة germlings، العزلة AGL1؛ Rogers وآخرون، 2004)، *Botrytis cinerea* (1.5 طافرا لكل 10^5 بوغة ، العزلة LBA1126؛ Rolland وآخرون، 2003)، *Chaetomium globosum* (0.6–1.8 طافرا لكل 10^5 بوغة،

Gao وYang، 2003) و*A. rabiei* (10.4–16.1 طافرا لكل 10^5 بوغة، Mogensen وآخرون، 2006). كما كانت نسبة الانخفاض في كمية السم المنتج من الطافرات ضمن المال الذي تحصلت عليه Mogensen وآخرون (2006)، 43.5–90.2%.

يمكن كذلك تفسير هذه النتائج المتحصل عليها باحتمال كون التحويل متعدد النوى (heterokaryotic) مع احترام الجينات المسؤولة عن إنتاج السم، فبعض الأنوية يحتوي مورثات مشفرة لإنتاج السم والبعض الآخر لا يحتوي على هذه المورثات. إن نسبة تواجد نوعين مختلفين من الأنوية في الخلايا، يمكن إذا أن يفسر هذا الاختلاف المسجل في كمية السم التي أفرزها كل طافر.

الفصل الخامس

مناقشة عامة

1.5. التعرف وتحديد النمط الوراثي لـ *A. rabiei* في الجزائر

جمعت بقايا نبات الحمص عليها أعراض مشا ة لأعراض مرض التبقع الأسكوكيتي على نبات الحمص، من ثلاثة مناطق في الجزائر، سطيف وقالمة واد السمار. تم عزل من كل منطقة عزلة واحدة وتم التأكد من إمراضية هذه العزلات باستعمال فرضية كوخ. على أساس التقارب الكبير مع الجنس *Phoma* فإنه كان من الأهمية استعمال تقنيات البيولوجيا الجزيئية للتعرف على العامل الممرض (Khan وآخرون، 1999a). كانت النتائج المتحصل عليها في تحديد تتابع قواعد الحمض النووي rDNA شديدة القرب من النتائج التي تحصلها Peever وآخرون (2007) الخاصة بـ *Ascochyta rabiei*.

يلعب التكاثر الجنسي دورا هاما في آليات التنوع عند الأنواع الفطرية. ففطر *A. rabiei* فطر متنوع الأطوار (heterothallic) مع نمطين وراثيين (Mat 1 وMat 2). ينتج عن التكاثر الجنسي بين النمطين أجسام ثمرية (pseudothecia) ، حيث تبين بأن هذه الأجسام الثمرية تحتوي أكياس (asci) بكل كيس 8 أبواغ ثنائية الخلايا. يذكر Kaiser (1995) بأن الأكياس الثمرية للفطر تنمو بشكل طبيعي على البقايا النباتية في العديد من المناطق التي يزرع ا نبات الحمص كشمال إفريقيا وشمال أمريكا وغرب آسيا وشرق وغرب أوروبا، مما يدل على مدى انتشار النمطين الوراثيين للفطر (Mat 1 وMat 2) في العالم. إلى غاية العام 2003 كانت الطريقة الوحيدة لتحديد النمط الوراثي للفطر *A. rabiei* هي اختبار عزلات الفطر مع عزلات معروفة النمط الوراثي ثم البحث عن الأجسام الثمرية (pseudothecia) المتكونة. بالاعتماد على هذه الطريقة حدد Navas-Cortés وآخرون (1998) النمط الوراثي لـ 48 عزلة من عزلات الفطر. 18 عزلة من إسبانيا، 7 عزلات كانت من النمط 1 و11 كانت من النمط 2، 16 عزلة من الهند والباكستان كانت جميعها من النمط 1، أما العزلات

الملوبة من الولايات المتحدة فأربعة (4) كانت من النمط 1 وثلاثة (3) من النمط 2. أربعة عزلات من اليونان والمغرب، عزلتين من كل دولة تم اختبارهما وكانت جميعها من النمط 2. بقية العزلات كانت من فرنسا وإيطاليا وتركيا، عزلة من كل دولة وكانت من النمط 1 و2 و1 على الترتيب. بالإضافة إلى هذه النتائج فقد حدد كذلك Khan وآخرون (1999a) النمط الوراثي لعزلتين من استراليا والذي كانت من النمط 1. في العام 2003 نشر Barve وآخرون (2003) مقالا يوضح تسلسل الأحماض الأمينية للنمطين الوراثيين مع تحديد البادئات النوعية المستعملة في عملية استنساخ وتضاعف الحمض النووي (PCR) المستعملة لتحديد النمط الوراثي لأي عزلة من الفطر. سهلت هذه التقنية عملية تحديد النمط الوراثي للفطر. سمح استعمال هذه التقنية في هذه الدراسة ولو بشكل محدود من تحديد النمط الوراثي لعزلتي الفطر في الجزائر، فقد كانت العزلتان من النمط الوراثي 1، لكن تواجد النمط الوراثي 2 في كل من المغرب وتونس يوحي بإمكانية تواجده في الجزائر.

2.5. تثبيط الفطريات المفرزة للسموم لإنبات البذور وللنمو

تناولت العديد من الدراسات تثبيط رشاحة الفطريات الممرضة لإنبات البذور. على سبيل المثال ذكر Haider وآخرون (1986) بأن نسبة تثبيط بذور *Helianthus annus* تراوحت بين 26.7 و100% عند معاملتها برشاحة الفطريات *Aspergillus flavus* و*Aspergillus niger* و*Penicillium expansum* و*Fusarium equistii* و*Alternaria alternata* كل على حدة أو كمزيج. كما ذكر Zeng وآخرون (2001a)، بأن رشاحة الفطر *A. japonicus* تثبط إنبات بذور كل من الفجل (Rape) واللفت (Radish) والخيار (Cucumber) بنسبة 81.4% و72.5% و75% على الترتيب. كما قام هذا الفريق بعزل حمض secalonic acid F من رشاحة الفطر، هذا الحمض يثبط تماما نمو جذورنباتي الفجل واللفت بتركيز 0.3 mM. قد يعود هذا الأثر التثبيطي إلى حمض secalonic acid F الذي ثبت تواجده في رشاحة هذا الفطر، حيث أن

هذا الحمض يثبط إنبات بذور العديد من المحاصيل (Zeng وآخرون، 2001a). إلا أن هذا الفريق من الباحثين لم يختبر هذه الفرضية كما تم في هذه الدراسة. يذكر Zeng وآخرون (2001b) بأن حمض secalonic acid F التجاري بتركيز 0.3 mM يثبط نمو جذور الذره السكرية (sorghum) وعشب الحقل (barnyardgrass) ونبات الحُسيكة (*Bidens pilosa*) بنسبة 72% و97% و93% على الترتيب. يذكر Tschen وآخرون (1997) بأن الفطر *Sarocladium oryzae* يفرز حمض helvolic، هذا الحمض الذي عند استعمالة بتركيز 1 ملغ/مل يخفض من طول جذور كل من *Echinochloa crus-galli* و*Eleusine indica* و *Impatiens walleriana* و*Bidens bipinnata* و*Dianthus chinensis* بنسبة 59% و55% و50% و43% و40% على الترتيب. كما بين Ravikumar وآخرون (2002) عند دراستهم لتأثير سم حمض fusaric الذي يفرزه الفطر *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* على إنبات حبوب الطلع وطول أنبوب الإنبات لصنفين مقاومين من أصناف الحمص (WR315 وK850)، بأن هذا الحمض يثبط تماما إنبات حبوب الطلع عند استعماله بتركيز 200 مكروغرام/مل مقارنة مع الشاهد أين بلغت نسبة الإنبات 80%، كما يؤدي إلى انخفاض طول أنبوب الإنبات إلى 50 مكرومتر عند استعماله بتركيز 50 مكروغرام/مل مقارنة مع الشاهد أين بلغ طول أنبوب الإنبات 250 مكرومتر.

تثبط رشاحة العزلات الجزائرية الثلاث لفطر *A. rabiei* إنبات بذور نبات الحمص ونمو الجذير والسويقة وتحتوي هذه الرشاحة على سم solanapyrone A،حيث تم التأكد من ذلك باستعمال الكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي (HPLC). على هذا الأساس كان من المهم تحديد هل تركيز السم المحتوى في الرشاحة كافيا لتفسير هذا التأثير التثبيطي أم غير كاف. كما تم التوصل إليه في الفصل الثالث فإن تركيز السم في رشاحة العزلة Ag1 كان كافيا لتفسير التأثير التثبيطي على إنبات البذور ونمو الجذير والسويقة. نفس هذا الاستنتاج يبقى صالحا بالنسبة للعزلتين Ag2 وAg3 إلا أن تركيز سم solanapyrone A في

رشاحتيهما لا يفسر التأثير التبيطي على إنبات البذور إلا بنسبة 75 أو 77% ولايفسر هذا التأثير على نمو الجذير والسويقة إلا بنسبة 73% أو 76% على الترتيب.

لقد بين العديد من الباحثين بأن الفطر *A. rabiei* يؤثر سلبا على حيوية بذور نبات الحمص حيث تتراوح نسبة إنبات البذور المصابة بين 8% و80% (Kaiser وHannan، 1988؛ Takao وآخرون، 2001؛ Ahmad وآخرون، 2006). في بعض الحالات تم تحسين نسبة إنبات البذور باستعمال المبيدات الفطرية.

اعتمادا على المراجع التي تم الاطلاع عليها فإن هناك مرجعا وحيدا تناول بالدراسة تأثير سموم solanapyrones على نمو نبات الحمص (Kaur، 1995). في هذه الدراسة كان التركيز 250 مكرومولار (µM)(=75.5 مكروغرام/مل) مثبطا لنمو جذور وشتلات نبات الحمص صنف Pusa 209 بـ 50%، حيث يعتبر هذا التركيز مرتفعت جدا إذا قورن مع التركيز المثبط لـ 50% التي تم الحصول عليه في هذه الدراسة 0.3 ± 4.72 مكروغرام solanapyrone A /مل، ويمكن أن يعزى هذا الاختلاف إلى اختلاف صنفي الحمص المستعملين في الدراسة. وقد تبين من هذه الدراسة بأن الجذير أكثر حساسية تجاه السم مقارنة مع البذور والسويقة.

3.5. إنتاج سم solanapyrone A.

تنتج عزلات الفطر الثلاث سم solanapyrone A وهذا الإنتاج مرتبط بالعزلة ذاتا وبفترة الحضن، حيث سجل أعلى تركيز للسم المفرز بعد مرور 14 يوما من الحضن ثم يبدأ هذا التركيز في الانخفاض بنسبة 11.3% بعد 16 يوما من الحضن و20.33% بعد 18 يوما من الحضن. تم التعرف ووصف سم solanapyrone A لأول مرة بكونه مركب يفرزه فطر *Alternaria solani* المسبب للفحة المبكرة على نباتي البطاطس والطماطم (Ichihara وآخرون، 1983). على أساس الاشتراك في إفراز نفس السم، يبرز التساؤل حول

إمكانية التطور المتوازي للفطرين، هل للفطرين نفس المنحدر الأصلي وهل هناك نقـل أفقي (horizontal transfer) للمورثات المشفرة لإنتاج هذا السم. إلى غاية اليوم لبس بالإمكان الإجابة على هذا التسائل نظرا للاختلاف الكبير بين الفطري من الناحية التصنيفية، حيث ينتمي الفطر *A. rabie*i إلى رتبة Coelomycetes وينتمي الفطر *Alternaria solani* إلى رتبة Hyphomycetes. بالإضافة إلى ذلك يضاف اختلاف كبير وجديد بين هذين الفطرين، هو الاختلاف الكبير في ترتيب قواعد الحمض النووي rDNA (شكل 1.5).

يؤكد تواجد مركبات solanapyrone في رشاحة الفطر الملاحظات السابقة التي تثبت بأن جميع العزلات التي تم التأكد من أ ا عزلات للفطر *A. rabiei* تفرز هذه المركبات، إلا أن تركيزها يكون مرتبطا بنوعية العزلة ووسط الزرع وظروف الحضن (Alam وآخرون، 1989؛ Chen وآخرون، 1991؛ Höhl وآخرون، 1991؛ Benning وBarz، 1995). باستثناء عزلة واحدة أين تم تسجيل إفراز سم cytochalasin D (Latif وآخرون، 1993)، لكن لم يتم الحصول على معطيات كافية من تسلسل الحمض النووي للتأكد من العزلة. يحتمل أن تنتمي هذه العزلة إلى الجنس *Phoma* الذي يصيب نبات الحمص (Haware وNene، 1981)، حيث أن بعض أنواع هذا الجنس تفرز سموم ytochalasins (Evidente وآخرون، 2003).

إن إنتاج الفطر *A. rabiei* لسموم solanapyrones بشكل عام يرجح بقوة أهمية هذا السم للفطر في قدرته على إصابة النبات العائل، حيث يبدو أن هذا السم يساهم في شدة الإصابة أو أنه ضروري للإمراضية. حقيقة فإن الأعراض التي يسببها السم من ذبول وفقد لليخضور وبقع نكروزية وانكسار الأفرع والبتيولات متشابه تماما للأعراض التي يسببها الفطر على النبات العائل (Strange، 1997). على الرغم من ذلك فإن التأكد بشكل كبير من ذلك يتطلب إنتاج طافرات للفطر غير قادرة على إنتاج السم مع إثبات دور هذا السم في المرض (Mogensen وآخرون، 2006؛ White وCheng، 2006).

```
SeqA Name       Len(nt)  SeqB Name       Len(nt)  Score
=========================================================
1    AR738      447      2    AF314576   580      82
=========================================================
```

Alignment

```
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment


AR738           ------------------------------------------------------------
AF314576        TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGCACCTCCC 60


AR738           -------------TTGCCCGCTACCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACTTAC-GTTTCCT 46
AF314576        GGGGTGGCCAGCCTTGCTGAAT-TATTCCACCCGTGTCTTTTGCGTACTTCTTGTTTCCT 119
                             ****    *   *   **** ********* ******   *******

AR738           CGGCGGGTCCGCCCGCCGATTGGACAAA---ATCAAACCCTTTGCAGTTGCAATCAGCGT 103
AF314576        TGGTGGGCTCGCCCACCACAAGGACCAACCCATAAACCTTTTTGCAATGGCAATCAGCGT 179
                 ** ***  ***** **    **** **   ** ** *  ****** * ***********

AR738           CTGAAA-AACATAATAGTT-ACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATG 161
AF314576        CAGTAACAATGTAATAATTTACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATG 239
                * * ** **  ***** ** ****************************************

AR738           AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATC 221
AF314576        AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATC 299
                ************************************************************

AR738           TTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTG 281
AF314576        TTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTG 359
                ******************* ***********  *************************

AR738           TACCTTCAAGCTTTGCTTGGTGTTGGGTGTTTGTCTCGCCTCTGCGTGT---AGACTCGC 338
AF314576        TACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTTGGGCGTCT-TTTTGTCTCTCCTTGCGGGAGACTCGC 418
                **** ********************** ** * * * * **** * **    ********

AR738           CTTAAAACAATTGGCAGCCGGCGTATTGATTTCGGAGCGCAGTACATCTCGCGCT---TT 395
AF314576        CTTAAAGTCATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAGTCGCGCTCTCTT 478
                ******   ************* ** ** ************* ***  *******   **

AR738           GCACTCATAACGACGA-TGTCCA--AAAGTACATTTTTACACTCTTGACCTCGGA----- 447
AF314576        CCAGCCCCAAGGTCTAGCATCCACCAAGCCTTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGG 538
                 **  *  ** * * *   ****  **      *****  *** ***********

AR738           ----------------------------------------
AF314576        TAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGGGGA 580
```

الشكل 1.5. تتابع قواعد الحمض النووي لفطر *Ascochyta rabiei* (Ar738) ولفطر *Alternaria solani* (AF 314576) مبديا اختلافا كبيرا بين الفطرين.

4.5. تحويل الفطر *A. rabiei*.

يعتبر تطوير تقنية تحويل ناجعة وفعالة مهم جدا لمعاملة المورثات ولدراسة الآلية الإمراضية للممرضات النباتية (Degefu وHanif، 2003). إن تقنية نقل الحمـض النـووي DNA بوساطة البكتريا *Agrobacterium tumefasciens* (DNA transfer mediated by *Agrobacterium tumefasciens*، ATMT) كانت فعالة في العديد من العوائل سواء كانت نباتات أو خلايا ثديية أو خمائر أو فطريات خيطية (Sullivan وآخرون، 2002؛ Mullins وآخرون، 2000؛ Kunik وآخرون، 2001). ففي حالة الفطريات الخيطية فقد تم استعمال ATMT بنجاح في تحوير الفطر *Calonectria morganii* (Malonek وMeinhardt، 2001) والفطر *Botrytis cinerea* (Rolland وآخرون، 2003) والفطر *Helminthosporium turcicum* (Degefu وHanif، 2003) والفطـر *Fusarium circinatum* (Park وKim ، 2003) وحديثـا الفطـر *A. rabiei* (Mogensen وآخرون، 2006؛ White وChen، 2006).تؤشر قابلية *A. tumefasciens* في نقل الحمض النووي DNA إلى فطريات من أصناف مختلفة إلى فعالية هذا النظام في بيوتكنولوجيا الفطريات (Michielse وآخرون، 2005). بالإضافة إلى ذلك يبدو أن تقنية ATMT أكثر فعالية كطريقة نقل للحمض النووي من تلك الطرق التي تحتاج إلى مرحلة استعمال البروتوبلاست (Amey وآخرون، 2002؛ De Groot وآخرون، 1998; Fitzgerald وآخرون، 2003؛ Meyer وآخرون، 2003).

على الرغم من ذلك فإن معلوماتنا عن ATMT الخاصة بالفطريات لازالت في ازدياد، حيث أنه لحد الآن لم نتمكن من فهم آلية عملية النقل الكلي لـ T-DNA وطريقة اندماجه أو العوامل التجريبية المتدخلة في عملية نقل الحمض النووي باستعمال *Agrobacterium* ولا حتى لماذا تستجيب الفطريات بشكل مختلف مع ATMT. إن الاستمرار في دراسة نظام نقل الحمض النووي T-DNA بوساطة البكتريا *A. tumefasciens* مع

تطوير نظم جديدة للنقل يساهم في فهم آليات النقل في ATMT كما قد يسمح بفهم كنه العوامل المطلوبة لتطوير ATMT ناجعة خاصة بلفطريات (Michielse وآخرون، 2005).

تبين بأن العديد من المركبات الخلوية للفطر *A. rabiei* من ضمنها سموم solanapyrones (Bahti وStrange، 2004) وإنزيم cutinase (Tenhaken وآخرون، 1997) لها دور في الإصابة المرضية إلا أنه لم يتم بشكل واضح إثبات دور هذه المركبات كعوامل لشدة المرض أو عوامل إمراضية. من بين الطرق التي يمكن استعمالها في تأكيد الدور النوعي لهذه المركبات في إحداث مرض التبقع الأسكوكيتي، هي إنتاج طافرات غير قادرة على إفراز هذه العوامل ومن ثم تجريب قدرة هذه الطافرات على إحداث الإصابة. فقد يسمح تطوير تقنية تحويل يتم فيها تعطيل الجينات المشفرة لإنتاج السموم بعملية إضافة لحمض نووي دخيل من تأكيد فرضية دور سموم solanapyrones لـ *A. rabiei* في إحداث المرض وفي شدة المرض (White وCheng، 2006).

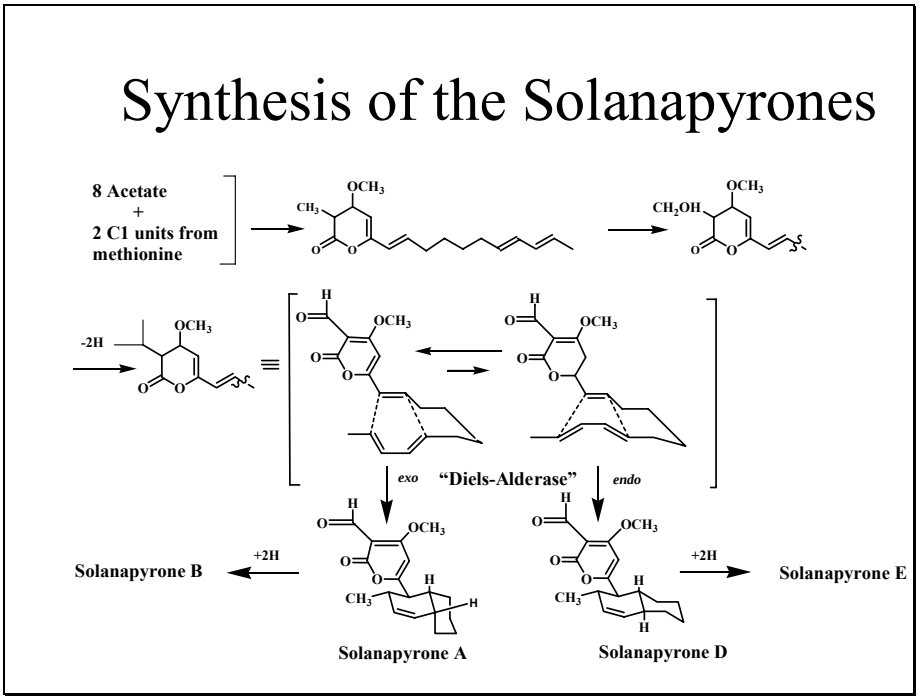
لقد تم تحويل الفطر *A. rabiei*. بجين β-glucuronidase باستعمال البروتوبلاست كطريقة نقل (Köhler وآخرون، 1995)، إلا أن نجاعة هذه الطريقة كانت ضعيفة. إن خطوة البروتوبلاست طريقة محدودة القدرة سواء تعلق الأمر باستعمال تقنية REMI أو استعمال تقنية النقل المباشر للمورثة وذلك لانعدام التوفر الدائم للإنزيمات المطلوبة في مثل هذه الطريقة (White وCheng، 2006). تمثل عملية ATMT التحويل المباشر لبكنيديات الفطر *A. rabiei* طريقة فعالة وسهلة لإنتاج الطافرات الهدف. يجب أن تكون هذه الطافرات غير منتجة للسم وبالتالي يمكن نسل والتعرف على المورثة أو المورثات المشفرة لإنتاج سم solanapyrone A (Mogensen وآخرون، 2006).

يتبع إفراز سموم solanapyrone طريقة بيوكيميائية معقدة، تساهم فيها العديد من المورثات المستهدفة التي قد ينتج عن الاخلال ا هذه الجينات خفض أو إيقاف تخليق السم (Katayama وآخرون، 1998، شكل 2.5). تتمثل عملية التطفير المثالية في تلك الطريقة التي تتم فيها عملية دمج وحيدة في المورثة

الهدف (White وCheng، 2006). عملية التطفير هذه يجب أن تكون على مستوى واحد من المورثات في اية مسار عملية التخليق مثل المورثة المشفرة للتفاعلات الداخلية لـ Diels–Alderase.

إن اكتشاف المورثة المشفرة للإنزيم الداخل جزيئي (intramolecular) Diels–Alderase والمطلوب لتخليق سموم solanapyrones سيكون من الأهمية بمكان، حيث لحد الآن تم التعرف ثلاثة أنـواع مـن Diels–Alderases الطبيعية وهي solanapyrone synthase التي تحفز تخليق سم solanapyrone A وlovastatin nonaketide synthase وmacrophomate synthase الفطري (Oikawa وآخرون، 1989؛ Katayama وآخرون، 1998؛ Ose وآخرون، 2003؛ شكل 2.5).

سمحت عملية التحويل التي تمت في هذه الدراسة من الحصول على طافرات أو عزلات محولة منتجة للسم بكميات قليلة مقارنة مع العزلة الأصلية. إلا أن البعض منها قد يفقد القدرة على التبوغ مما يوحي باشتراك عملية إنتاج السم وعملية التبوغ في المسار البيوكيميائي. ومع الأسف فإن هذا النوع من الطافرات لا يمكن اختباره في دراسة القدرة الإمراضية للفطر، حيث أن هذه الاختبارات تتطلب استعمال الأبواغ البكنيدية كلقاح.



الشكل 2.5. التخليق الحيوي لسموم solanapyrones (Katayama وآخرون، 1998).

5.5. خاتمة

تم في هذه الدارسة إثبات دور الفطر *Ascochyta rabiei* في إحداث أعراض مرض التبقع الأسكوكيتي على نبات الحمص النامي في الجزائر وذلك بالاعتماد على فرضية كوخ وعلى تحديد تسلسل قواعد الحمض النووي كتقنية مساعدة في عملية تشخيص الفطر. بالإضافة إلى ذلك تم تحديد النمط الوراثي لعزلتين من عزلات الفطر. كما بينت هذه الدراسة إفراز عزلات الفطر الجزائرية الثلاثة لسم solanapyrone A بأنه المسؤول كليا أو جزئيا عن التأثير التثبيطي لرشاحة العزلات على إنبات بذور الحمص ونمو الجذير والسويقة. وسمح تحويل الفطر *Ascochyta rabiei* لإنتاج طافرات غير قادرة على إفراز سم solanapyrone A بوساطـة البكتريا *Agrobacterium tumefasciens* (*Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation، ATMT)، من الحصول على طافرات أو عزلات محولة قادرة على النمو على وسط انتخابي والبعض منها أنتج كميات قليلة من سم solanapyrone A مقارنة مع العزلة الأصلية.

بناء على النتائج المتحصل عليها في هذا البحث فإنه من الضروري مستقبلا استكمال دراسة عزلات الفطر المحلية هدف تأكيد انتمائها لهذا الفطر (*Ascochyta rabiei*) ومن ثمَ تحديد هل النمطين الوراثيين متواجدين في الجزائر وما هو النمط السائد، بالإضافة إلى ذلك ونظرا لاختلاف الأنواع الفطرية في الاستجابة لعملية التحويل بوساطة البكتريا *Agrobacterium*، فإنه من المهم إجراء هذا الاختبار باستعمال عزلات جزائرية تسمح بالحصول على عزلات محولة يمكن استعمالها في دراسة مستقبلية لتحديد أهمية إفراز السم كعامل إمراضية في التفاعل بين مرض التبقع الأسكوكيتي ونبات الحمص في الظروف الخاصة بالجزائر.

المراجع

Abbo, S., Grusak, M.A., Tzuk T. and Reifen, R. 2000. Genetic control of seed weight and calcium concentration in chickpea seed. Plant Breed., **119 (5)**: 427-431.

Abuodeh, R. O., Orbach, M. J., Mandel, M. A., Das, A. and Galgiani, J.N. 2000. Genetic Transformation of *Coccidioides immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefasciens*. J. Infectious Dis., **181**: 2106–10.

Acikgoz, N., M. Karaca, C. Er, and K. Meyveci. 1994. Chickpea and lentil production in Turkey. *In* F.J. Muehlbauer and W.J. Kaiser (ed.) Expanding the production and use of cool season food legumes. Kluwer Academic Publ., Dordrecht, the Netherlands p. 388–398.

Aducci, P, Ballio, A, and Mara, M. 1997. Phytotoxins as molecular signals. In: Aducci P (ed.), Signal Transduction in Plants. Basel, Switzerland, Birkha¨ user Verlag, pp. 83–105.

Ahmad Z, Ghafoor A, Bashir M, 2006. Effect of seed borne pathogens on seed longevity in chickpea and cowpea under storage at 25°C to 18 °C degrees. Seed Sci. Technol., **34**: 69-75.

Akem, C., Malhotra, R.S., Bayaa, B., Mousselli, M.N. and Kabbabeh, S. 2000. Taking blight of chickpea. ICARDA-Caravan, **2**:18.

Alam, S.S. and Strange, R.N. 1992. Phytotoxins in chickpea. *In*: Status of plant poathology in Pakistan, Ghaffar A. and Shahzad S. (eds.). pp. 201-208.

Alam, S.S., Bilton, J.N., Slawin, A.M.Z., William, D.J., Sheppard, R.N. and Strange, R.N. 1989. Chickpea blight: production of the phytotoxins solanapyrones A and C by *Ascochyta rabiei*. Phytochemistry, **28**, 2627-2630.

Alam, S.S., Strange, R.N. and Qureshi, S.H. 1987. Isolation of *Ascochyta rabiei* and a convenient method for copious inoculum production. The Mycologist, **21**, 20.

Ambardar VK. and Singh S.K. 1996. Identification and elucidation of *Ascochyta rabiei* isolates of chickpea in Jammu. Indian J. Mycol. Plant pathol., **26**: 4-8.

Amey, R.C., Athey-Pollard, A., Burns, C., Mills, P.R., Bailey, A. and Foster, G.D. 2002. PEG-mediated and Agrobacterium-mediated transformation in the mycopathogen *Verticillium fungicola*. Mycol. Res., **106**:4–11.

Angelini, R. Bragaloni, M., Federico, R. infantino, A. and Potra-Puglia; A. 1993. involvement of polyamines, diamine oxidase and peroxidase in resistance of chickpea to *Ascohcyta rabiei*. J. Plant Pathol., **23**: 110-113.

Anonymous, 2005. http://www.agr.gov.sk.ca/docs/production/ascochytaonChickpeas.asp.

Anonymous, 2006. http://parids.usak.ca/specialcrop/pulse_disease/chickpea/ascochyta. html

Arino, A., Juan, T., Estopanan, G. qnd Gonzalez-Cabo, J.F. 2007. Occurrence of *Fusarium*-produced naphthazarins in citrus trees and sensitivity of rootstocks to isomarticin in relation to citrus blight. J. Food Prot., **70 (1)**: 151-156.

Aujla, S.S. 1964. Study on eleven isolates of *Phyllosticta rabiei* (Pass.) Trott. the causal agent of gram blight in the Punjab. Indian Phytopath., **17**: 83-87.

Bahti, P. and Strange, R.N. 2004. Chemical and biochemical reactions of solanapyrone A, a toxin from the chickpea pathogen, *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. Physiol. Mol. Plant Pathol., **64**: 9-15.

Ballas, N. and Citovsky, V. 1997. Nuclear localization signal binding protein from *Arabidopsis* mediates nuclear import of *Agrobacterium* VirD2 protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **94**:10723–10728.

Barve, M.P., Arie, T., Salimath, S.S., Muehlbauer, F.J. and Peever, T.L. 2003. Cloning and characterization of the mating type (*MAT*) locus from *Ascochyta rabiei* (teleomorph: *Didymella rabiei*) and *MAT* phylogeny of legume-associated *Ascochyta* spp. Fungal Genet. Biol., **39**: 151-167.

Bayaa, B., Udupa, S.M., Baum, M., Malhotra, R.S. and Kabbabeh; S. 2004. Pathogenic variability in Syrian isolates of *Ascochyta rabiei*. *In*: Proceedings of the 5th European Conference on

Grain Legume for Benefit of Agriculture, Nutrition and the Environment. Dijon, 7-11, June 2004. (European Association for Grain Legume Research: Dijon, France).

Bender, C., Palmer, D., Penaloza-Vazquez, A., Rangaswamy V. and Ullrich, M. 1996. Biosynthesis of coronatine, a thermoregulated phytotoxin produced by the phytopathogen Pseudomonas syringae. Arch. Microbiol., **166(2)**: 71–75.

Benning, G. and Barz, W. 1995. Accumulation and biosynthesis of solanapyrone phytotoxins by *Ascochyta rabiei*. J. Biosciences, **50 c**: 181-185.

Blaise, F., Rémy E., Meyer, M., Zhou, L., Narcy, J.P., Roux, J., Balesdent, M.H. and Rouxel, T. 2007. A critical assessment of *Agrobacterium tumefasciens*-mediated transformation as a tool for pathogenicity gene discovery in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculan*. Fungal Genet. Biol., **44**: 123–138.

Bouznad Z., Maatougi M.E. and Labdi M. 1996. Importance et distribution géographique des maladies fongiques des légumineuses alimentaires en Algérie. *In*: Proceedings du Symposium Régional sur les Maladies de Ccereals et Légumineuses Alimentaires, Rabat 1996: 13-19.

Bowyer, W. J., Ning, L., Daley, L. S., Strobel, G. A., Edwards,G. E. and Callis,J. B. 1998. *In vivo* fluorescence imaging for detection of damage to leaves by fungal phytotoxins. Spectroscopy, **13(11)**: 36–44.

Brieman, A. and Barash, I. 1981. Partial characterization of phytotoxic compound in culture filtrates of *Phytopththora citrophthora*. Phytopath. Zeist., **102**: 1-9.

Brown, J.S. and Holden, D.W. 1998. Insertional mutagenesis of pathogenic fungi. Curr. Opin. Microbiol., **1**:390–394.

Bruns, R. and Barz, W. 2001. Studies on Cell Number and Nuclei in Spores and on poidy Level in *Ascochyta rabiei* isolates. J. phytopathol., **149**: 253-258.

Buchwaldt, L. and Jensen, J. S. 1991. HPLC purification of destruxins produced by *Alternaria brassicae* in culture and leaves of *Brassica napus*. Phytochemistry, **30(7)**: 2311–2316.

Bundock, P. and Hooykaas, P.J. 1996. Integration of *Agrobacterium tumefasciens* T-DNA in the *Saccharomyces cerevisiae* genome by illegitimate recombination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **93**:15272–15275.

Bundock, P., Dulk-Ras, A., Beijersbergen, A. and Hooykaas, P.J. 1995. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefasciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. E.M.B.O. J., **14**:3206–3214.

Bundock, P., Mroczek, K., Winkler, A.A., Steensma, H.Y. and Hooykaas, P.J. 1999. T-DNA from *Agrobacterium tumefasciens* as an efficient tool for gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. Mol. Gen. Genet., **261**:115–121.

Bundock, P., Van Attikum, H., Dulk-Ras, A. and Hooykaas, P.J. 2002. Insertional mutagenesis in yeasts using T-DNA from *Agrobacterium tumefasciens*. Yeast, **19**:529–536.

Caldas, E.D., Jones, A.D., Ward, B., Winter, C.K. and Gilchrist, D.G. 1994. Structural characterization of three new AAL toxins produced *by Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. J. Agric. Food Chem., **42**: 327–33.

Campoy, S., Perez, F., Martin, J.F., Gutierrez, S. and Liras, P. 2003. Stable transformants of the azaphilone pigment-producing *Monascus purpureus* obtained by protoplast transformation and Agrobacterium-mediated DNA transfer. Curr. Genet., **43**:447–452

Cangelosi, G.A., Ankenbauer, R.G. and Nester, E.W. 1990. Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87**:6708–6712.

Chauhan, R.K.S. and Sinha, S. 1973. Effect of varying temperature, humidity and light during incubation in relation to disease development in blight gram (*Cicer arietium*) caused by *Ascochyta rabiei*. Proc. Nat. Sci. Acad., India, **37**: 473-482.

Chen, W., Coyne, C. J., Peever, T. L. and Muehlbauer, F. J. 2004. Characterization of chickpea differentials for pathogenicity assay of ascochyta blight and identification of chickpea accessions resistant to *Didymella rabiei*. Plant Pathol., **53 (6)**: 759–769.

Chen, X., Stone, M., Schlagnhaufer, C. and Romaine, C.P. 2000 A fruiting body tissue method for efficient Agrobacterium-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. Appl. Environ. Microbiol., **66**:4510–4513.

Chen, Y. and Strange, R.N. 1994. Production of a proteinaceous phytotoxin by *Ascochyta rabiei* grown in expressed chickpea sap. Plant Pathol., **43**: 321-327.

Chen, Y., Peh, E.K, and Strange, R.N. 1991. Application of solvent optimisation to the separation of the phytotoxins, solanapyrones A, B and C from culture filtrates of *Ascochyta rabiei*. Bioseparation, **2**: 107-113.

Chongo, G., Gossen, B.D., Buchwaldt, L., Adhikari, T., Rimmer, S.R., 2004. Genetic diversity of *Ascochyta rabiei* in Canada. Plant Dis. **88**, 4– 10.

Citovsky, V., Wong, M.L. and Zambryski, P. 1989. Cooperative interaction of *Agrobacterium* VirE2 protein with single-stranded DNA: implications for the T-DNA transfer process. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**:1193–1197.

Combier, J.P., Melayah, D., Raffier, C., Gay, G. and Marmeisse, R. 2003. *Agrobacterium tumefasciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. FEMS Microbiol. Lett., **220**:141–148

Cother, E.J., 1977. Identification and control of root rot fungi in *Cicer arietinum* (chickpea). Plant Dis. Rep., **61**: 736–740.

Covert, S.F., Kapoor, P., Lee, M., Briley, A. and Nairn, C.J. 2001 *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*.Mycol. Res., **105**:259–264

Csinos, A. and Hendrix, J.W. 1977. Toxin production by *Phytopththora cryptogea* active on excised tobacco leaves. Can. J. Bot., **55**: 1156-1162.

Cubero, J.I. 1987. Morphology of chickpea. In: The chickpea, pp. 35-66 (Eds. M.C. Saxena and K.B. Singh). CAB International, Wallingford, U.K. and ICARDA, Aleppo, Syria.

Cuppels, D.A. and Ainsworth, T.1995. Molecular and physiological characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* strains that produce the phytotoxin coronatine. Appl. Environment. Microbiol., **61(10)**: 3530–3536.

D'Amelio, S., Mathiopoulos, K.D., Santos, C.P., Pugachev, O.N., Webb, S.C., Picanço, M., and Paggi, L. 2000. Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: *Ascaridoidea*) defined by polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism. Int. J. Parasitol., **30**: 223.226.

Daboussi, M.J. and Capy, P. 2003. Transposable elements in filamentous fungi. Annu. Rev. Microbiol., **57**:275–299.

De Groot, M.J., Bundock, P., Hooykaas, P.J. and Beijersbergen, A.G. 1998. *Agrobacterium tumefasciens*-mediated transformation of filamentous fungi. Nat. Biotechnol., **16**:839–842.

Deeken, R., Engelmann, J.C., Efetova, M., Czirjak, T., Müller T., Kaiser, W. M., Tietz, O., Krischke, M., Mueller, M. J., Palme, K., Dandekar, T. and Hedricha, R. 2006. An integrated view of gene expression and solute profiles of *Arabidopsis* tumors: A genome-wide approach. The Plant Cell, **18**: 3617–3634.

Degefu, Y. and Hanif, M. 2003. *Agrobacterium tumefasciens*-mediated transformation of *Helminthosporium turcicum*, the maize leafblight fungus. Arch. Microbiol., **180**:279–284

Desjardins, A.E. and Hohn, T.M. 1997. Mycotoxins in plant pathogenesis. M.P.M.I., **10 (2)**: 147–152.

Dey, S.K. and Singh, G., 1994. Seedborne infection of *Ascochyta rabiei* in chickpea and its transmission to aerial plant parts. Phytoparasitica, **22**: 31–37.

Dickman, m.B., Podila, G.K. and Kolattukudy, P.E. 1989. Insertion of cutinase gene into a wound pathogens enables it to infect intact host. Nature, **342**: 446-448.

Dillen, W., DeClercq, J., Kapila, J., Zambre, M., Montagu, M van. and Angenon, G. 2002. The effect of temperature on *Agrobacterium tumefasciens*-mediated gene transfer to plants. Plant J., **12**:1459–1463.

Dolar, F.S. 1994. Development of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. in the leaves of susceptible and resistant chickpea cultivars. J. Turk. Phytopathol., **23**: 27-35.

Dolar, F.S. and Gurcan, A. 1993. The role of phytoalexins in chickpea resistance to chickpea blight (*Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.). J. Turkish Phytopathol., **22**: 17-26.

Dolar, F.S., Tenuta, A. and Higgins, V.J. 1994. Detached leaf assay for screening chickpea for resistance to ascochyta blight. Can. J. plant Pathol., **16**: 215-220.

Dubery, I. A., Meyer, D. and Bothma,C. 1994. Purification and characterization of cactorein, a phytotoxin secreted by *Phytophthora cactorum*. Phytochemistry, **35 (2)**: 307–312.

El-Kassas R, Karam El-Din Z, Beale MH, Ward JL, Strange RN, 2005. Bioassay-led isolation of *Myrothecium verrucaria* and verrucarin A as germination inhibitors of *Orobanche crenata*. Weed Res., **45**: 212-219.

Evidente A, Andolfi A, Vurro M, Zonno M.C, Motta A, 2003. Cytochalasins Z4, Z5, and Z6, three new 24-oxa[14]cytochalasans produced by Phoma exigua var. heteromorpha. J. Natural Prod., **66**:1540-1544.

Fang, W., Zhang, Y., Yang, X., Zheng, X., Duan, H., Li, Y. and Pei, Y. 2004. *Agrobacterium tumefasciens*-mediated transformation of *Beauveria bassiana* using an herbicide resistance gene as a selection marker. J. Invertebr. Pathol., **85**:18–24

FAOSTAT (Food and Agriculture organization of the United Nations, Statistical Databases). 2005.

Finney D.J. 1971. *Probit Analysis*. 3rd edition, Cambridge University Press.

Fisher, C., Porta-Pugla; A. and Barz; W. 1995. RAPD Analysis of pathogenic varaibility in *Ascochyta rabiei*. J. Phytopathol., **143**: 601-607.

Fitzgerald, A.M., Mudge, A.M., Gleave, A.P. and Plummer, K.M. 2003. *Agrobacterium* and PEG-mediated transformation of the phytopathogen *Venturia inaequalis*. Mycol. Res. **107**:803–810

Fullner, K.J. and Nester, E.W. 1996. Temperature affects the T-DNA transfer machinery of *Agrobacterium tumefasciens*. J. Bacteriol., **178**:1498–1504.

Galloway, J. and MacLeod, W.J. 2003a. *Didymella rabiei*, the teleomorph of *Ascochyta rabiei*, found on chickpea stubble in Western Australia. Austral.Plant Pathol., **32**: 127-128.

Galloway, J. and MacLeod, W.J. 2003b. Initiation of *Ascochyta rabiei* disease from pulse stubble in the Mediterranean climate of Western Australia. In: Proceedings of the 8th International Congress of plant pathology, Christchurch, New Zealand, 2-7 February; p. 102.

Gao, X.X. and Yang, Q. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Chaetomium globosum* and its T-DNA insertional mutagenesis. Wei Sheng Wu Xue Bao, **45**: 129–131.

Gardiner, D.M. and Howlett, B.J. 2004. Negative selection using thymidine kinase increases the efficiency of recovery of transformants with targeted genes in the filamentous fungus *Leptosphaeria maculans*. Curr. Genet., **45**:249–255

Gaur, R.B. 2000. Influence of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labrousse on chlorophyll of chickpea. Indian J. Plant Pathol., **28**:208-210.

Gelvin, S.B. 2000. Agrobacterium and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol., **51**:223–256

Gen Bank, 2006. National Center for Biotechnology Information, http://www.ncbi.nih.gov/

Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defence against biotrophic and necrotrophic pathogens. Ann. Rev. Phytopathol., **35**: 205-227.

Gorlenko MV and Bushkova LN, 1958. Perfect stage of the causal agent of ascochytosis of chickpea. in: Rev. Appl. Mycol., **37**: 695. (Abstract)

Gouka, R.J., Gerk, C., Hooykaas, P.J., Bundock, P., Musters, W., Verrips, C.T., de Groot, M.J. 1999. Transformation of *Aspergillus awamori* by *Agrobacterium tumefasciens*-mediated homologous recombination. Nat. Biotechnol., **17**:598–601.

Grewal, J.S. 1984. Evidence of physiologic races in *Ascochyta rabiei* of chickpea. *In*: Ascochyta blight and winter sowing of chickipeas (Saxena, M.C. and Singh, K.b. eds.) pp. 55-65. Martinus and Nojhoff/Dr. Junk, Publishers, The hague, The Netherlands.

Haider, M.M., Soulaiman, E.D, and Dawwood, R.K. 1986. Effect of culture filtrate of fungi on seed germination and seedling development of sunflower. J. Biol. Sci. Res., **17**: 141-150.

Hamid, K. and Strange, R.N. 2000. Phytotoxicity of solanapyrones A and B produced by the chickpea pathogen *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. and the apparent metabolism of solanapyrone A by chickpea tissues. Physiol. Mol. Plant Pathol., **56**: 235-244.

Hamid, K., Strange, R.N., 1997. An easy method for isolating solanapyrone toxins from culture filtrates of *Ascochyta rabiei*. I.C.P.N., **4**: 20-22.

Hanselle, T. and Barz, W. 2001. Purification and characterisation of the extracellular PR-2b β-1,3-glucanase accumulating in different *Ascochyta rabiei*-infected chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. Plant Sci.**, 161**: 773-781.

Hartman, G. L., Huang, Y. H. and Li, S. 2004. Phytotoxicity of *Fusarium solani* culture filtrates from soybeans and other hosts assayed by stem cuttings. Austral. Plant Pathol., **33(1)**: 9–15.

Haware, M.P. 1987. Occurrence of perfect state of *Ascochyta rabiei* in Syria. I.C.N., **17**: 29-30.

Haware, M.P. and Nene, Y.L. 1981. Phoma Blight - A New Disease of Chickpea. Plant Dis., **65**: 282-282.

Haware, P.M., Nene, Y.L. and Mathur, S.B. 1986. Seed borne diseases of chickpea. Bull. Inst. of Seed Pathology for Developing Countries, Copenhagen, Denmark, **N°1**: 8-15.

Höhl, B., Pfautsch, M. and Barz, W. 1990. Histology of disease development in resistant and susceptible cultivars of chickpea (*Cicer arietinum*) inoculated with spores of *Ascochyta rabiei*. J. phytopath., **129**: 31-45.

Höhl, M.M., Weidmann, C., Höhl, C. and Barz, W. 1991. Isolation of solanapyrone A, B and C from culture filtrate and spore germination fluids of *Ascochyta rabiei* and aspect of phytotoxin action. J. Phytopath., **132**: 193-206.

Ibrikci, H., Knewtson, S. and Grusak, M.A. 2003. Chickpea leaves as a vegetable green for humans: Evaluation of mineral composition. J. Sci Food Agric., **83**: 945–950.

Ichihara, A., Tazaki, H. and Sakamura, S. 1983. Solanapyrones A, B and C, phytotoxic metabolites from the fungus *Alternaria solani.* Tetrahedron Lett., **24**: 5299-5432.

Idnurm, A. and Howlett, B. 2001. Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. Mol. Plant. Pathol., **4:** 241-255.

Ilarslan, H. and Dolar, F.S. 2002. Histological and ultrastructural changes in leaves and stems of resistant and susceptible chickpea cultivars to *Ascochyta rabiei.* J. Phytopath., **150**: 340-348.

Insua, A., López-Piñón, M.J., Freire, R. and Méndez, J. 2003. Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer region in some scallop species (Mollusca: Bivalvia: Pectinidae). Genome, **46**: 595.604.

Jan, H. and Weise, M.V. 1991. Virulence of *Ascochyta rabiei* affecting chickpea in palouse. Plant Dis., **75**: 904-906.

Jhorar, O.P., Mathauda, S.S., Singh, G., butler, D.R. and Mavi, H.S. 1998. Effects of leaf wetness duration, relative humidity, light and dark on infection and sporulation by *Didymella rabiei* on chickpea. Plant Pathol., **47**: 586-594.

Jiménez-Díaz, R.M., Navas-Cortés, J.A. and Trapero-Casas, A. 1987. Ocurrence of *Mycosphaerella rabiei*, the teleomorph of *Ascochyta rabiei* in Andalucia. Proceedings

of the 7th Congress of the Mediterranean Phytopathology Union, Granada, Spain, p. 124-1253.

Jiménez-Díaz, R.M., P. Crino, M.H. Halila, C. Mosconi, and A.T. Trapero-Casas. 1993. Screening for resistance to fusarium wilt and ascochyta blight in chickpea. p. 77–95. *In* K.B. Singh and M.C. Saxena (ed.) Breeding for stress tolerance in cool-season food legumes. ICARDA. John Wiley & Sons, Chichester, UK.

Johnson, R.D., Johnson, L., Itoh, Y., Kodama, M., and Otani, H. 2000. Cloning and characterization of a cyclic peptide synthetase gene from *Alternaria alternate* apple pathotype whose product is involved in AM-toxin synthesis and pathogenicity. Mol. Plant-Microbe Interact., **13**:742–53.

Kado, C.I. 2000. The role of the T-pilus in horizontal gene transfer and tumorigenesis. Curr. Opin. Microbiol., **3**:643–648

Kahmann, R. and Basse, C. 1999. Restriction enzyme mediated integration (REMI) and its impact on the isolation of pathogenicity genes in fungi attacking plants. Eur. J. Plant Pathol., **105**:221–229

Kaiser, W.J. 1972. Occurrence of three fungal diseases of chickpea (*Cicer arietinum*) in Iran. Food and Agriculture Organisation Plant Protection Bulletin **20**: 73-78.

Kaiser,W.J., 1973. Factors affecting growth, sporulation, pathogenicity and survival of *Ascochyta rabiei*. Mycologia, **65**: 444–457.

Kaiser, W.J. 1991. Host range studies with the Ascochyta blight pathogen of chickpea. I.C.N., **25**: 25-26.

Kaiser, W.J. 1995. World distribution of *Didymella rabiei*, the teleomorph of *Ascochyta rabiei*, on chickpea. Phytopathology,85: 1040 (Abstr.).

Kaiser,W.J., 1997. Inter- and intranational spread of ascochyta pathogen of chickpea, faba bean, and lentil. Can. J. Plant Pathol., **19**: 215–224.

Kaiser, W.J. and Hannan, R.M. 1987. First report of *Mycosphaerella rabiei* on chickpeas in the Western Emisphere. Plant Dis., **71**: 192.

Kaiser, W.J., Hannan RM, 1988. Seed transmission of *Ascochyta rabiei* in chickpea and its oontrol by seed-treatment fungicides. Seed Sci. Technol., **16**: 625-637.

Katayama, K., Kobayashi, T., Oikawa, H., Honma, M. and Ichihara, A. (1998) Enzymatic activity and partial purification of solanapyrone synthase: first enzyme catalyzing Diels–Alder reaction. Biochim Biophys Acta 1384: 387–395.

Kaur, S. 1995. Phytotoxicity of Solanapyrone produced by the fungus *Ascochyta rabiei* and their possible role in blight of chickpea (*Cicer arietinum*). Plant Sci., **109**: 23-29.

Kempken, F. and Kuck, U. 1996. Transposons in filamentous fungi-- facts and perspectives. Bioassays, **20**:652–659.

Khan, M.S.A., Ramsey, M.D., Corbiere, R., Infantino, A., Porta-Puglia, A., Bouznad, Z. and Scott, E.S. 1999a. Ascochyta blight of chickpeas in Australia: identification, pathogenecity, and mating type. Plant Pathol., **48**: 230-234.

Khan, M.S.A., Ramsey, M.D. and Scott, E.S. 1999b. Host range studies with Australian isolates of *Ascochyta rabiei*. Austr. Plant Pathol., **28**: 170-173.

Khune, M.M. and Kapoor, J.M. 1980. *Ascochyta rabiei* synonymous with *Phoma rabiei*. Indian Phytopathol., **33**:119-120

Köhler, G., Linkert, C. and Barz, W. 1995. Infection studies of *Cicer arietinum* (L) with GUS-(*E. coli* β-glucuronidase) transformed *Ascochyta rabiei* strains. J. Phytopathol.-Phytopathologische Zeitschrift., **143:** 589-595.

Kohmoto, K., Kohguchi, T., Kondoh, Y., Otani, H. and Nishimura, S. 1985. The mitochondria: the prime site for a hostselective toxin (ACR-toxin I) produced by *Alternaria alternata* pathogenic to rough lemon. Proc. Jpn. Acad., **61B**:269– 72.

Kono, Y. and Daly, J.M. 1979. Characterization of the host-specific pathotoxin produced by *Helminthosporium maydis*, race T, affecting corn with Texas male sterile cytoplasm. Bioorg. Chem., **8**:391–97

Kovachevski, IC, 1936. The blight of chickpea (*Cicer arietinum*), *Mycosphaerella rabiei* sp. Ministry of Agriculture and National Domains, Plant Protection Institute, Sofia, Bulgaria.

Kövics, G., Holly, L. and Simay, E.I., 1986. An ascochytosis of the chickpea (*Cicer arietinum* L.) caused by *Didymella rabiei* (Kov.) v Arx: Imperfect *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. in Hungary. Acta Phytopathol. Entomol. Hyng., **21**: 147–150.

Kunik, T., Tzfira, T., Kapulnik, Y., Gafni, Y., Dingwall, C. and Citovsky, V. 2001. Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. Proc. Natl. Acad. Sc.USA, **98**: 1871-1876.

Latif, Z., Strange, R.N., Bilton, J. and Riazuddin, S. 1993. Production of the phytotoxins, solanapyrones A, and C and cytochalasin D among nine isolates of *Ascochyta rabiei*. Plant Pathol., **42**: 172-180.

Lazo, G.R., Stein, P.A. and Ludwig, R.A. 1991. A DNA transformation competent Arabidopsis genomic library in *Agrobacterium*. Biotechnology, **9**: 963–967.

Leach, K. Odon, V., Zhang, C., Kim, H.K., Henderson, J., Warner, P. Challen, M. and Elliott, T. (2004) Progress in *Agaricus bisporus* transformation: Agrobacterium methodologies and development of novel marker genes. Mushroom Sci., **16**: 93-102.

Leclerque, A., Wan, H., Abschutz, A., Chen, S., Mitina, G.V., Zimmermann, G. and Schairer, H.U. 2003 Agrobacterium-mediated insertional mutagenesis (AIM) of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Curr. Genet., **45**:111–119.

Luthra, J.C., Sattar, A. and Bedi, K.S. 1935. Life history of gram blight (*Ascochyta rabiei*) on gram and its control in the Punjab. Agriculture and Livestock in India,. **5**:489-498.

Lydon, J. and Patterson, C. D. 2001. Detection of tabtoxin-producing strains of *Pseudomonas syringae* by PCR. Lett. Appl. Microbiol., **32(3)**: 166– 170.

Maden, S. Singh, D., Mathur, S.B. qnd Neergaard, P. 1975. Detection of seed-borne inoculum of *Ascochyta rabiei* and its transmission in chickpea (*Cicer arietinum*). Seed Sci. Tchnol., **3**: 667-681.

Maier, F.J. and Schafer, W. 1999. Mutagenesis via insertional- orrestriction enzyme-mediated-integration (REMI) as a tool to tag pathogenicity related genes in plant pathogenic fungi. Biol. Chem., **380**:855–864.

Malonek S, Meinhardt F 2001. *Agrobacterium tumefasciens*-mediated genetic transformation of the phytopathogenic ascomycete *Calonectria morganii*. Curr. Genet., **40**:152–155

Meehan, F. and Murphy, H.C. 1947. Differential phytotoxicity of metabolic byproducts of *Helminthosporium victoriae*. Science, **106**:270–71.

Meeley, R.B. and Walton, J.D. 1991. Enzymatic detoxification of HC-toxin, the host selective cyclic peptide from *Cochliobolus carbonum*. Plant Physiol., **97**:1080–86.

Mesbah, L. A., van der Weerden, G. M., Nijkamp, H. J. J. and Hille, J. 2000. Sensitivity among species of *Solanaceae* to AAL toxins produced by *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici.* Plant Pathol., **49**: 734-741.

Meyer, V., Mueller, D., Strowig, T. and Stahl, U. 2003. Comparison of different transformation methods in *Aspergillus giganteus*. Curr. Genet., **43**: 371–377.

Michielse, C.B., Arentshorst, M., Ram, A.F.J. and van den Hondel C.A.M.J.J. 2005. Agrobacterium-mediated transformation leads to improved gene replacement efficiency in *Aspergillus awamori*. Fungal Genet. Biol. **42**:9–19.

Michielse, C.B., Ram, A.F.J., Hooykaas, P.J.J. and van den Hondel, C.A.M.J.J. 2004a. Agrobacterium-mediated transformation of *Aspergillus awamori* in the absence of full length VirD2, VirC2 or VirE2 leads to insertion of aberrant T-DNA structures. J. Bacteriol., **186**:2038–2045.

Michielse, C.B., Ram, A.F.J., Hooykaas, P.J.J. and van den Hondel, C.A.M.J.J. 2004b. Role of bacterial virulence proteins in Agrobacterium-mediated transformation of *Aspergillus awamori*. Fungal. Genet. Biol., **45**:571–578.

Mikosch, T.S., Lavrijssen, B., Sonnenberg, A.S. and Griensven, L.J. van. 2001. Transformation of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) using T-DNA from *Agrobacterium tumefasciens*. Curr. Genet., **39**:35–39.

Millan, T., Clarke, H.J., Siddique, K.H.M., Buhariwalla, H.K., Gaur, P.M., Kumar, J., Gil1, J., Kahl, G. and Winter, P. 2006. Chickpea molecular breeding: New tools and concepts Euphytica, **147**: 81–103.

Mirocha, C.J., Xie, W.P., Xu, Y.C., Wilcoxson, R.D., Woodward, R.P., Etebarian, R.H. and Behele, G. 1994. Trichothecene and zearalenone production, in culture, by isolates of *Fusarium pseudograminearum* from western Canada. Mycopathologia, **128 (1)**: 19-23.

Mitchell, R. E. 1978. Halo blight of beans: Toxin production by several *Pseudomonas phaseolicola* isolates. Physiol. Plant Pathol., **13**:37-49.

Miyashita, M., Nakamori, T., Miyagawa, H., Akamatsu, M. and Ueno, T. 2003. Inhibitory activity of analogs of AM-Toxin, a host-specific phytotoxin from the *Alternaria alternata* apple pathotype, on photosynthetic O_2 **e**volution in apple leaves *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, **67(3)**: 635–638.

Miyashita, M., Nakamori, T., Murai, T., Yonemoto, T., Miyagawa, H., Akamatsu, M. and Ueno, T. 2001. Structure-activity relationship study of host-specific phytotoxins (AM-Toxin Analogs) using a new assay method with leaves from apple meristem culture. Z. Naturforsch., C: Biosci., **56c**: 1029–1037.

Mogensen, E.G., Challen, M.P. and Strange, R.N. 2006. Reduction in solanapyrone phytotoxin production by *Ascochyta rabiei* transformed with *Agrobacterium tumefasciens*. FEMS Microbiol. Lett., **255 (2)**: 255-261.

Morjane, H., Geistlinger, J., Harrabi, M., Weising, K. and kahl, G. 1994. OligoNukleotide fingerprinting detects genetic diversity among *Ascochyta rabiei* isolates from a single chickpea field in Tunisia. Curr. Genet., **26**: 191-197.

Morrall, R.A.A. and Mckenzie, D.L. 1974. A note on the inadvertent introduction to North America of *Ascochyta rabiei*, a destructive pathogen of chickpea. Plant Dis. Report., **58**: 342-345.

Moyroud, J., Gelin, J., Chene, A. and Mortier, J. 1996. Synthèse d'analogues structuraux de thaxtomines, phytotoxines responsables de la gale de la pomme de terre. Tetrahedron, **52(25)**: 8525–8534.

Mullins, E.D. and Kang, S. 2001. Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants. Cell. Mol. Life Sci., **58**:2043–2052.

Mullins, E.D., Chen, X., Romaine, P., Raina, R., Geiser, D.M. and Kang, S. 2001. Agrobacterium-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. Phytopathology, **91**:173–180.

Nakashima, T., Ueno, T., Fukami, H., Taga, T. and Masuda, H. 1985. Isolation and structures of AK-toxin I and II, hostspecific phytotoxic metabolites produced by *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. Agric. Biol. Chem., **49**: 807–15

Navas-Cortés, J.A., Pérez-Artés, E. and Jiménez-Díaz, R..M., Llobell, A., Bainbridge, B.W. and Heale, J.B.1998. Mating Type, Pathotype and RAPDs Analysis in *Didymella rabiei*, the Agent of Ascochyta Blight of Chickpea. Phytoparasitica, **26(3)**:199-212.

Navas-Cortés, J.A., Trapero-Casas, A., Jiménez-Diaz, R.M., 1995. Survival of *Didymella rabiei* in chickpea straw debris in Spain. Plant Pathol., **44**: 332–339.

Nene, Y.L. 1982. A review of Ascochyta blight of chickpea. Tropic. Pest Manag., **28**: 61-70.

Nene, Y.L. and Reddy, M.V. 1987. Chickpea diseases and their control. In: *The chickpea*. (M.C. Saxena and K.B. Singh Eds.), 233-270. CAB International, Wallingford, U.K.

Oikawa, H., Yokota, T., Abe, T., Ichihara, A., Sakamura, S., Yoshizawa, Y. and Vederas, J.C. 1989. J. Chem. Soc. Chem. Commun., **9**: 1282-1284.

Ose T, Watanabe K, Mie T, Honma M, Watanabe H, Yao M, Oikawa H and Tanaka I, 2003. Insight into a natural Diels-Alder reaction from the structure of macrophomate synthase. Nature, **422:** 185-189.

Owens, L. D. 1969. Toxins in plant disease: Structure and mode of action. Science, **165**:18-25

Pande, S., Siddique, K.H.M., Kishore, G.K., Bayaa, B., Gaur, P.M., Gowda, C.L.L., Bretag, T.W. and Crouch, J.H. 2005. Ascochyta blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.): A review of Biology, pathogenicity and disease management.Austr. J. Agric. Res., **56 (4)**: 317-332

Pandey B.K., Singh, U.S. and chaube, H.S. 1987. Mode of infection of Ascochyta blight of chickpea caused by *Ascochyta rabiei*. J. Phyopathol., **119**: 88-93.

Park, S.M. and Kim, D.K. 2004. Transformation of a filamentous fungus Cryphonectria parasitica using *Agrobacterium tumefasciens*. Biotechnol Bioprocess Eng., **9**:217–222

Pedras, M. S. C. and Biesenthal, C. J. 2000. Vital staining of plant cell suspension cultures: evaluation of the phytotoxic activity of the phytotoxins phomalide and destruxin B. Plant Cell Rep., **19(11)**: 1135–1138.

Pedras, M. S. C., Biesenthal, C. J. and Zaharia,I. L. 2000. Comparison of the phytotoxic activity of the phytotoxin destruxin B and four natural analogs. Plant Sci., **156(2)**: 185–192.

Peever, T.L., Barve, M.P., Stone, L.J. and Kaiser, W.J. 2007. Evolutionary relationships among *Ascochyta* species infecting wild and cultivated hosts in the legume tribes *Cicereae* and *Vicieae*. Mycologia (in press).

Plight, M. and Rudnick, R.M. 1979. Studies on the toxins of *Phytopththora cactorum* pathogenic to apple trees. Phytopath. Zeist., **70**: 270-278.

Porta-Puglia, A. 1990. Status of *Ascochyta rabiei* of chickpea in the medeterranean basin. Option Méditérranéen. Série séminaire N°9: 51-54.

Qureshi, S.H. and Alam, S.S. 1984. Pathogenic behaviour of *Ascochyta rabiei* isolates on different cultivars of chickpea in Pakistan. I.C.N., **11**: 29-30.

Ravikumar, R.L., Patil, B.S. and Thippeswamy, S. 2002. Effect of Fusaric Acid on In Vitro Pollen Germination and Tube Growth in Chickpea. ICPN, **9**: 20-22.

Rea, G., Laurenzi, M., Tranquilli, E., D'Ovidio, R., Federico, R. and Angelini, R. 1998. Developmentally and wound regulated expression of the gene encoding a cell wall copper amino oxidase in chickpea seedlings. FEBS Lett. **437**: 177–182

Rea, G., Metoui, O., Infantino, A., Federico, R. and Angelini, R. 2002. Copper Amine Oxidase Expression in Defense Responses to Wounding and *Ascochyta rabiei* Invasion. Plant Physiol. **128**: 865–875.

Reddy, M.V. and Kabbabeh, S. 1985. Pathogenic variability in *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. In Syria and Lebanon. Phytopath. Medit., **24**: 265-266.

Rho, H.S., Kang, S. and Lee, Y.H. 2001. *Agrobacterium tumefacien*-smediated transformation of the plant pathogenic fungus, Magnaporthe grisea. Mol. Cells, **12**:407–411

Roberts, R.L., Metz, M., Monks, D.E., Mullaney, M.L., Hall, T. and Nester, E.W. 2003. Purine synthesis and increased *Agrobacterium tumefasciens* transformation of yeast and plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **100**:6634–6639

Rogers, C.W., Challen, M.P., Green, J.R. and Whipps, J.M. 2004. Use of REMI and Agrobacterium-mediated transformation to identify pathogenicity mutants of the biocontrol fungus, *Coniothyrium minitans*. FEMS Microbiol. Lett., **241**: 207–214.

Rolland, S., Jobic C., Fevre, M. and Bruel, C. 2003. Agrobacterium-mediated transformation of Botrytis cinerea, simple purification of monokaryotic transformants and rapid conidia-based identification of the transfer-DNA host genomic DNA flanking sequences. Curr. Genet., **44**:164–171

Salas, M.G., Park, S.H., Srivatanakul, M. and Smith, R.H. 2002. Temperature influence on stable T-DNA integration in plant cells. Plant Cell. Rep., **2001**:701–705

Sattar, A. 1934. A comparative study of the fungi associated with blight disease of certain cultivated leguminous plants. Trans. Br. Mycol. Soc., **13**:276-301.

Scheel, B. 1992. Molecular Aspects of Host Defence Responses after Infection by Pathogenic Fungi: an overview. Chap. 9, In: Molecular biology of filamentous fungi. Stahr, V. and Tudzynski, P. (eds), Weinheim, Germany, p. 111-124.

Scheible, W. R., Fry, B., Kochevenko, A., Schindelasch, D., Zimmerli,L., Somerville, S., Loria R. and Somerville, C. R. 2003. An Arabidopsis Mutant Resistant to Thaxtomin A, a Cellulose Synthesis Inhibitor from *Streptomyces* Species. Plant Cell, **15**: 1781–1794.

Schrammeijer, B., Dulk-Ras, A., Vergunst, A.C., Jurado, J.E. and Hooykaas, P.J. 2003. Analysis of Vir protein translocation from *Agrobacterium tumefasciens* using *Saccharomyces cerevisiae* as a model: evidence for transport of a novel effector protein VirE3. Nucleic Acids Res., **31**:860–868.

Schuler, G., Gorls, H. and Boland, W. 2001. 6-Substituted Indanoyl Isoleucine Conjugates Mimic the Biological Activity of Coronatine. Eur. J. Org. Chem., **9**:1663–1668.

Shohet, S. and Strange, R.N. 1989. Use of isolated cells and protoplasts to detect phytotoxic activity in culture filtrates of . Physiol. Mol. Plant Pathol., **34**: 345-359.

Singh K.B., Hawtin, G.C., Nene, Y.L. and Reddy, M.V. 1981. Resistance in chickpeas to *Ascochyta rabiei*. Plant Dis., **65**: 586-587.

Singh KB, 1997. Chickpea (*Cicer arietinum* L.). Field Crops Res., **53**, 161-170.

Singh, K.B. and Reddy, M.V. 1993. Susceptibility of the chickpea plant to Ascochyta blight at different stages of crop growth. Phytopat. Medit., **32**: 153-155.

Singh, K.B., Malhotra, R.S., Saxena, M.C., Bejiga, G., 1997. Superiority of winter sowing over traditional spring sowing of chickpea in the Mediterranean region. Agron. J., **89**: 112–118.

Smithson, J.B., Thompson, J.A. and Summerfield, R.J. 1985. Chickpea (*Cicer arietinum* L.). p. 312-390. In: R.J. Summerfield and E.H. Roberts (eds.), Grain Legume Crops. Collins, London, UK.

Soukupova, J., Smatanova, S., Nedbal, L. and Jegorov, A. 2003. Plant response to destruxins visualized by imaging of chlorophyll fluorescence. Physiol. Plant., **118(3)**: 399–405.

Stafford, H.A. 2000. Crown gall disease and *Agrobacterium tumefasciens*: a study of the history, present knowledge, missing information, and impact on molecular genetics. Bot. Rev., **66**:101–118.

Strange RN, 1997. Phytotoxins associated with *Ascochyta* species. *In*: Toxins in plant disease development and evolving biotechnology, Upadhyay RK and Mukerji KG eds., pp. 167-181.

Strange, R.N. 2003. Introduction to Plant Pathology. 464 p. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.

Strange, R.N. 2007. Phytotoxins produced by microbial plant pathogens. Nat. Prod. Rep., **24**: 127–144.

Strange, R.N. and Alam, S.S. 1992. Toxins of *Ascochyta rabiei* and their putative role in screening chickpea for blight resistance. *In*: Proceedings of an International Consultancy Meeting on Ascochyta blight of Chickpea, 6-8 March 1989. (Eds. K. B. Singh and M.C. Saxena). International Centre for Agriculture Research in the dry Area, Aleppo, Syria, p. 170-180.

Strange, R.N., Pippard, D.J. and Strobel, G.A. 1982. A protoplast assay for phytotoxic metabolites produced by *Phytophthora drechsleri* in culture. Physiol. Plant Pathol., **20**: 359-364.

Strelkov, S.E., Lamari, L., Balance, G.M. 1999. Characterization of a host-specific protein toxin (Ptr ToxB) from *Pyrenophora tritici-repentis*. Mol. Plant-Microbe Interact., **12**:728–32.

Sullivan TD, Rooney PJ and Klein BS, 2002. *Agrobacterium tumefaciens* integrates transfer DNA into single chromosomal sites of dimorphic fungi and yields homokaryotic progeny from multinucleate yeast. Eukar. Cell, **1:** 895-905.

Sun, C.B., Kong, Q.L. and Xu, W.S. 2002. Efficient transformation of *Penicillium chrysogenum* mediated by *Agrobacterium tumefasciens* LBA4404 for cloning of *Vitreoscilla* hemoglobin gene. E.J.B. Electronic J. Biotech., **5 (1)**: 1-5.

Takahara, H., Tsuji, G., Kubo, Y., Yamamoto, M., Toyoda, K., Inagaki, Y., Ichinose, Y. and Shiraishi, T. 2004. *Agrobacterium tumefasciens*-mediated transformation as a tool for random mutagenesis of *Colletotrichum trifolii*. J. Gen. Plant Pathol., **70**:93–96

Takao M, Muhammad B, Zahoor A, Nabuo M, 2001. Mechanism of "Seed to Seedling Infection" by *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. in Chickpea. J. Biol. Sci., **1(5)**: 384-386.

Tanaka A, Shiotani H, Yamamoto M, Tsuge T. 1999. Insertional mutagenesis and cloning of the genes required for biosynthesis of the host-specific AK-toxin in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. Mol. Plant-Microbe Interact., **12**:691–702.

Tanguay, P. and Breuil, C. 2003. Transforming the sapstaining fungus Ophiostoma piceae with *Agrobacterium tumefasciens*. Can. J. Microbiol., **49**:301–304.

Tekeoglu M, Santra DK, Kaiser WJ, Muehlbauer FJ, 2000. Ascochyta blight resistance inheritance in three chickpea recombinant inbred line populations. Crop Sci., **40**: 1251-1256.

Tenhaken R., Arnemann, M., Köhler, G. and Barz, W. 1997. Characterization and cloning of cutinase from *Ascochyta rabiei*. J. Phyopathol., **52**: 197-208.

Tenhaken, R. 1992. Virulenfenzfaktoren phytopathogener Pilze – Biochemische und molekularbiolgische Untersuchungen zurinfektion der Kichererbse durch *Ascochyta rabiei*. Dissertation, Universität Münster.

Tenhaken, R. and Barz, W. 1991. Characterization of pectic enzymes from the chickpea pathogen *Ascochyta rabiei*. J. Phyopathol., **46**: 51-57.

Toro, N., Datta, A., Yanofsky, M. and Nester, E. 1988. Role of the overdrive sequence in T-DNA border cleavage in Agrobacterium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**:8558–8562.

Trapero-Casas, A. and Kaiser, W.J. 1992. Development of *Didymella rabiei*, the teleomorph of *Ascochyta rabiei*, on chickpea straw. Phytopatholog, **82**: 1261-1266.

Trapero-Casas, A., Navas-Cotès, J.A. and Jiménez-Díaz, R.M. 1996. Airborne ascosporess of *Didymella rabiei* as a major primary inoculum for Ascochyta blight epidemics in chickpea crops in southern spain. Eur. J. Plant. Pathol., **102**: 237-245.

Tripathi, H.S., Singh, R.S. and Chaube, H.S. 1987. Effect of fungicidal seed and foliar applications on chickpea ascochyta blight. Ind. Phytopathol., **40**: 63–66.

Tschen, J.S., Chen, L., Hsieh, S. and Wu, T. 1997. Isolation and phytotoxic effects of helvolic acid from plant pathogenic fungus *Sarocladium oryzae*. Bot. Bull; Acad. Sin., **38**: 251-256.

Tsuji, G., Fujii, S., Fujihara, N., Hirose, C., Tsuge, S., Shiraishi, T. and Kubo, Y. 2003. *Agrobacterium tumefasciens*-mediated transformation for random insertional mutagenesis in *Colletotrichum lagenarium*. J. Gen. Plant Pathol., **69**:230–239.

Turgeon, B.G. 1998. Applications of mating-type technology to problems in fungal biology. Ann. Rev. Phytopathol., **36**:115-137.

Tzfira, T. and Citovsky, V. 2002. Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by Agrobacterium. Trends Cell. Biol., **12**:121–129.

Tzfira, T., Vaidya, M. and Citovsky, V. 2002. Increasing plant susceptibility to Agrobacterium infection by over-expression of the Arabidopsis nuclear protein VIP1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **99**:10435–10440.

Van Attikum, H., Bundock, P. and Hooykaas, P.J. 2001. Non-homologous end-joining proteins are required for *Agrobacterium* T-DNA integration. EMBO J., **20**:6550–6558.

Van der Maesen, L.J.G. 1987. *Cicer* L. Origin, history and taxonomy of chickpea. *In*: M.C. Saxena and K.B. Singh (ed.), The Chickpea. C.A.B. International Cambrian News Ltd, Aberystwyth, UK, p.11-34.

Van Emden, H.F., S.L. Ball and M.R. Rao. 1988. Pest disease and weed problems in pea lentil and faba bean and chickpea. p. 519-534. In: R.J. Summerfield (ed.), World Crops: Cool Season Food Legumes. ISBN 90-247-3641-2. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Van Rensburg, J.C.J., Labuschagne, N. and Nemec, S. 2001. Occurrence of Fusarium-produced naphthazarins in citrus trees and sensitivity of rootstocks to isomarticin in relation to citrus blight. Plant Pathol., **50 (2)**: 258-265.

Veluthambi, K., Ream, W. and Gelvin, S.B. 1988. Virulence genes, borders, and overdrive generate single-stranded T-DNA molecules from the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefasciens*. J. Bacteriol., **170**:1523–1532.

Venora, G.R. and Porta-Puglia A. 1993. Observation on outer cell layers of stem in chickpea cultivars susceptible and resistant to Ascochyta blight. Petria, **3(3)**: 177-182.

Vergunst, A.C., Lier, M.C. van, Dulk-Ras, A. and Hooykaas, P.J. 2003. Recognition of the Agrobacterium tumefaciens VirE2 translocation signal by the VirB/D4 transport system does not require VirE1. Plant Physiol., **133**:978–988.

Vergunst, A.C., Schrammeijer, B., Den Dulk, A., Vlaam, C.M.T. de, Regensburg-Tuink, A.J. and Hooykaas, P.J. 2000. VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. Science, **290**:979–982.

Vidhyasekaran, P., Ruby Ponmalar, T., Samiyappan, R., Velazhahan, R., Vimala, R., Ramanathan, A., Paranidharan, V. and Muthukrishnan, S. 1997. Host-specific toxin production by *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight. pathogen. Phytopathol., **87**:1258-1263.

Vijn, I., and Govers, F. 2003. *Agrobacterium tumefasciens* mediated transformation of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. Mol. Plant. Pathol., **4**:459–467.

Vir, S. and Grewal, J.S. 1974. Physiologic specialisation in *Ascochyta rabiei* the causal organism of Gram blight. Indian Phytopath., **27**: 355-360.

Vogelsang, R. and Barz, W. 1993. Purification, characterization and differential hormonal regulation of a beta-1,3-glucanase and two chitinases from chickpea (*Cicer arietinum*). Planta, **189**: 60-69.

Weigand, F., Köster, J., Weltzien, H.C. and Barz, W. 1986. Accumulation of phytoalexins and isoflavones glucosides in a resistant and a susceptible cultivars of *Cicer arietinum* during infection with *Ascochyta rabiei*. J. Phytopathol., **115**: 214-221.

Weltring, K.M., Schaub, H.P. and Barz, W. 1995. Metabolism of pisatin stereosiomers by strains transformed with the pisatin demethylase gene of *Necteria haematococca* MP VI. Mol. Plant. Microbe Inter., **8**: 499-505.

Weltzien, H.C., Kaack, H.J., 1984. Epidemiological aspects of chickpea ascochyta blight. In: Proceedings of theWorkshop on Ascochyta Blight and Winter Sowing of Chickpeas, ICARDA, Aleppo, 4–7 May, p. Syria.

White, D. and Chen, W. 2006. Genetic transformation of *Ascochyta rabiei* using *Agrobacterium*-mediated transformation. Curr. Genet., **49**: 272–280.

William, P.C. and Singh, U. 1988. Quality screening and evaluation in pulses breeding.pp. 445-457 In: World crop: cool season food legumes. Summerfield, R.J. (eds.), Kluwer Academic Publishers, Ottawa, CANADA.

Williams, P.C. and Singh, U. 1987. Nutritional quality and the evaluation of quality in breeding programmes. In: The Chickpea, pp. 329-356 (Eds. M.C. Saxena and K.B. Singh). CAB International, Walling ford, U.K. and ICARDA, Aleppo, Syria.

Wilson, A. D. and Kaiser, W. J. 1995. Cytology and genetics of sexual incompatibility in *Didymella rabiei*. Mycologia, **87(6)**: 795-804.

Wolpert, T.J., Dunkle, L.D. and Ciuffetti, L.M. 2002. Host –Selective Toxins and Avirulence determinats: What's a Name?. Annu. Rev. Phytopathol., 40:251–85.

Yoder OC, Macko V, Wolpert TJ, Turgeon BG. 1997. *Cochliobolus* spp. And their host-specific toxins. In *The Mycota* Vol. 5: *Plant Relationships*, ed. G Carroll, P Tudzynski, pp. 145–66. Berlin: Springer Verlag.

Yoshida, M., Cowgill, S.E. and Wightman, J.A. 1997. Roles of oxalic and malic acids in chickpea trichome exudate in host-plant resistant to *Helicoverpa armigera*. J. Chemical Ecol., **23 (4)**: 1195-1210.

Zachos, D.G., Panagopoulos, C.G. and Makri, A. (1963). Recherche sur la biologie leidemiologie et la lutte contre lanthracnose dun poischiche. Ann. Inst. Phytopathol. Benaki, **NS5**, 167-192.

Zeng, R.S., Luo, S.M., Shi, M.B., Shi, Y.H., Zeng, Q. and Tan, H.F. 2001a. Allelopathy of *Aspergillus japonicus* on crops. Agron. J., **93**: 60-64.

Zeng, R.S., Luo, S.M., Shi, Y.H., Shi, M.B.. and Tu, C.Y. 2001b. Physiological and Biochemical Mechanism of Allelopathy of Secalonic Aicd F on Higher Plants. Agron. J., **93**: 72-79.

Zhang H-F, Franc, L.J., Jordah, J.G. and Meinhardt, S.W. 1997. Structural and physical properties of a necrosis-inducing toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. Phytopathol., **87**:154–160.

Zhang, C. and Challen, M. unpublished

Zhao, Y. F., Damicone, J. P. and Bender, C. L. 2002. Detection, Survival, and Sources of Inoculum for Bacterial Diseases of Leafy Crucifers in Oklahoma. Plant Dis., **86**: 883–888.

Zhu, J., Oger, P.M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P.J., Farrand, S.K. and Winans, S.C. 2000. The bases of crown gall tumorigenesis. J. Bacteriol., **182**:3885–3895.

Zupan, J., Muth, T.R., Draper, O., Zambryski, P. 2000. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefasciens* into plants: a feast of fundamental insights. Plant J., **23**:11–28.

Zwiers, L.H. and De Waard, M.A. 2001. Efficient *Agrobacterium tumefasciens*-mediated gene disruption in the phytopathogen *Mycosphaerella graminicola*. Curr. Genet., **39**:388–393.

ملحق 1
الأوساط الغذائية والمحاليل

الجدول 1.2. وسط مستخلص البطاطس (Potato Dextrose Agar، Oxoid LTD, Basingtoke, Hampshire, England).

المكونات	المقادير (غ/ل)
مستخلص البطاطس	4.00
الغلوكوز	20.0
الأغار	15.0
pH 5.6 ± 0.2	

الجدول 2.2. محلول الهجرة (Current protocols in Molecular Biology, Vol. 1; 10X stock solution، محلول أساسي 10X)

المكونات	المقادير (غ/ل)
Ficoll 400	20%
pH 8 Disodium EDTA	0.1M
Sodium dodecyl sulphate	1%
Bromophenol blue	0.25%
Xylene cyanol	0.25%

الجدول 1.3. وسط Czapeck السائل (Czapeck Dox Liquid Medium، CDCLM، Oxoid LTD, Basingtoke, Hampshire, England)

المكونات	المقادير (غ/ل)	الأملاح (الكاتيونات)	المقادير (ملغ/ل)
$NaNO_3$	2.0	$ZnSO_4.7H_2O$	50
KCl	0.5	$CaCl_2.2\ H_2O$	100
$MgSO_47H_2O$	0.5	$CoCl_2.6\ H_2O$	20
$FeSO_47H_2O$	0.01	$CuCl_2.6\ H_2O$	20
KH_2PO_4	0.35	$MnCl_2.4\ H_2O$	20
سكروز	30.0		
pH 6.8 ± 0.2			

الجدول 1. 4. وسط Lauria.

المكونات	الكمية (غ/ل)
Bacto-tryptone	10
Bacto مستخلص الخميرة	5
NaCl	10
ماء مقطر	كمية كافية للتر واحد
أغار Bacteriological Agar No.1	10

ملاحظة: يحتوي الوسط السائل نفس المكونات باستثناء الأغار.

الجدول 2. 4. الوسط الأدنى.

المكونات	الكمية (غ/ل)
محلول K pH 7.0	10
محلول M-N	20
$CaCl_2.2H_2O$ %1	1
%20 غلوكوز	10
$FeSO_4$ %0.01	10
$(NH_4)_2SO_4$ %20	2.5

ملاحظة: محلول K: 200 K_2HPO_4 غ/ل و145 KH_2PO_4 غ/ل
محلول M-N: 30 $MgSO_4.7H_2O$ غ/ل و NaCl 15 غ/ل

الجدول 3. 4. وسط التحفيز (الوسط الأدنى مضاف إليه المكونات التالية).

المكونات	التركيز (مل/ل)
حمض -morpholino-ethanesulfonic	40 mM (الوزن الجزيئي 213)
غلوكوز	10 mM (الوزن الجزيئي 180)
غليسيرول	%0.5
*Acetosyringone	200 µM/ml
*Kanamycin	100 µg/ml
يضاف إلى الوسط الصلب الأغار Bacteriological Agar No.1	10 غ

* تضاف بعد التعقيم

الجدول 4.4. وسط إنبات الفطر *A. rabiei*.

المكونات	الكمية (غ/ل)
مستخلص الخميرة	10
البيتون	20
الغلوكوز	30
الأغار Bacteriological Agar No.1	10

الجدول 5.4. وسط Czapeck الصلب المضاف إليه عصير V8 (200 مل/ل)

المكونات	الكمية (غ/ل)
Czapeck Dox nutrient	45.5
البيتون	1
مستخلص الخميرة	1
Casein hydrolysate	1
عصير V8	200 مل
الأغار Bacteriological Agar No.1	10

الجدول 6.4. عصير V8 (Campbell Grocery Products Ltd., UK)

المكونات	القيمة الغذائية	الكمية/100 مل
طماطم	طاقة	Kj 79
الكرفس	بروتينات	0.8 غ
سلطة	كربوهيدرات	3.2 غ
جزر	دهون	0.3 غ
الحرف	دهون مشبعة	0.1 غ
البقدونس	ألياف	0.5 غ
الشمندر	صوديوم	0.4 غ

ملحق 2

جدول تحويل النسب إلى probits

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.5	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.8	4.82	4.85	4.87	4.9	4.92	4.95	4.97
50	5	5.03	5.05	5.08	5.1	5.13	5.15	5.18	5.2	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.5
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
99	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

ملحق 3 تأثير رشاحة الفطر أو سم solanapyrone A على إنبات بذور نبات الحمص ونمو الجذير والسويقة

الجدول 1. عدد البذور النابتة بالنسبة إلى 16 بذرة

تركيز الرشاحة أو سم Solanapyrone A (100% = 18.6 µg/ml)	المكررات	العزلة أو سم Solanapyrone A							
		Ag1 (15.1 µg/ml)		Ag2 (8.4 µg/ml)		Ag3 (7.4 µg/ml)		Solanapyrone A (18.6 µg/ml)	
		المعاملة	الشاهد (الماء)	المعاملة	الشاهد (الماء)	المعاملة	الشاهد (الماء)	المعاملة	الشاهد (الماء)
5	1	12	13	10	14	13	14	9	15
	2	10	13	11	13	13	14	9	15
	3	11	13	12	14	12	13	9	15
	4	11	13	13	14	11	13	10	15
25	1	10	14	10	14	10	14	7	15
	2	9	13	12	15	10	14	8	15
	3	10	13	8	15	12	14	9	15
	4	11	16	10	14	12	14	12	16
50	1	7	13	8	14	8	14	5	14
	2	5	13	7	14	8	14	8	14
	3	8	13	10	14	8	13	6	16
	4	6	13	5	14	9	14	10	15
100	1	1	13	4	14	5	14	1	15
	2	0	13	3	14	4	14	2	15
	3	2	13	5	14	4	14	2	15
	4	5		2	14	2	14	3	15

الجدول 2. طول الجذير (ملم؛ 5 أرقام لكل مكرر ولكل تركيز)

تركيز الرشاحة أو سم Solanapyrone A (100% = 18.6 µg/ml)	العزلة أو سم Solanapyrone A																			
	Ag1 (15.1 µg/ml)					Ag2 (8.4 µg/ml)					Ag3 (7.4 µg/ml)					Solanapyrone A (18.6 µg/ml)				
	الشاهد	المكررات				الشاهد	المكررات				الشاهد	المكررات				الشاهد	المكررات			
		1	2	3	4		1	2	3	4		1	2	3	4		1	2	3	4
	38	27	35	23	19	30	19	22	23	25	45	37	38	35	38	45	30	22	20	26
	35	30	26	24	17	27	24	25	19	17	31	31	29	34	31	31	22	20	19	20
5	30	30	25	20	8	18	12	17	15	16	25	20	21	24	17	22	15	12	16	14
	30	20	21	21	21	15	9	11	12	13	18	15	11	17	16	10	7	4	6	9
	22	15	20	21	5	13	9	13	10	8	9	8	7	9	5	8	4	4	8	5
	38	20	19	18	18	30	20	18	16	17	45	32	28	39	20	45	20	17	23	21
	35	24	17	26	7	27	17	15	18	18	38	32	24	25	18	31	10	18	16	13
	30	14	15	29	1	18	10	11	12	13	25	20	16	18	13	22	11	9	11	8
25	30	29	6	10	13	15	8	10	6	12	18	12	10	15	9	10	5	3	2	8
	22	11	7	10	12	13	5	11	8	8	9	6	7	4	6	8	4	2	1	8
	38	13	25	3	10	30	14	11	9	15	45	20	19	18	21	45	15	9	23	12
	35	27	12	11	9	27	21	10	9	5	38	23	16	15	12	31	11	8	12	10
	30	18	10	11	9	18	8	7	5	9	25	11	9	8	15	22	8	5	9	7
50	30	19	12	9	1	15	7	4	3	11	18	10	8	6	7	10	3	2	5	1
	22	8	4	12	7	13	6	4	3	9	8	4	6	3	3	8	2	5	3	0
	38	4	0	8	4	30	4	10	9	7	45	13	13	14	12	45	5	2	7	7
	35	7	4	2	2	27	6	9	7	7	38	11	12	9	7	31	2	0	6	3
100	30	5	1	4	3	18	2	6	5	3	25	7	6	5	3	22	3	2	5	0
	30	5	1	1	4	15	4	5	2	4	18	5	7	3	4	10	2	1	2	0
	22	4	2	3	1	13	1	3	2	4	9	3	2	4	1	8	2	0	2	1

الجدول 3. طول السويقة (ملم؛ 5 أرقام لكل مكرر ولكل تركيز)

تركيز الرشاحة أو سم Solanapyrone A (100% = 18.6 µg/ml)	العزلة أو سم Solanapyrone A																			
	Ag1 (15.1 µg/ml)					Ag2 (8.4 µg/ml)					Ag3 (7.4 µg/ml)					Solanapyrone A (18.6 µg/ml)				
	الشاهد	المكررات				الشاهد	المكررات				الشاهد	المكررات				الشاهد	المكررات			
		1	2	3	4		1	2	3	4		1	2	3	4		1	2	3	4
5	25	18	17	16	19	24	19	19	20	18	23	20	16	19	23	45	16	20	9	17
	15	12	11	10	9	21	13	17	21	18	22	18	19	21	17	31	12	15	17	13
	19	13	14	12	16	19	13	14	19	16	17	16	15	13	14	22	20	16	19	21
	18	15	14	16	11	15	10	12	16	17	14	11	13	10	13	10	12	15	16	10
	12	10	6	9	10	14	12	11	12	11	12	11	10	9	11	8	13	12	16	10
25	25	21	14	10	17	24	19	16	12	14	23	16	15	12	19	45	20	16	15	8
	15	5	9	12	10	21	16	13	17	12	22	15	20	13	14	31	15	12	11	15
	19	12	13	10	12	19	12	9	15	13	17	12	16	9	10	22	13	20	15	16
	18	11	11	13	10	18	11	12	12	13	14	9	7	10	13	10	6	9	16	12
	12	7	7	9	8	14	9	7	8	12	12	7	5	9	12	8	9	14	7	14
50	25	18	12	10	15	24	20	7	8	15	23	14	11	18	13	45	10	9	13	9
	15	5	6	9	9	21	11	9	13	11	22	13	12	19	10	31	9	11	10	7
	19	3	13	14	6	19	9	10	12	8	17	12	10	10	8	22	14	12	12	10
	18	9	7	10	9	18	7	6	8	17	14	6	7	11	10	10	5	6	9	15
	12	4	2	7	8	14	7	9	6	8	12	9	7	6	6	8	10	8	6	7
100	25	24	23	20	21	24	23	22	21	20	23	22	21	20	19	45	22	23	24	25
	19	19	18	17	16	21	20	19	18	17	22	21	20	19	18	31	22	23	24	25
	18	17	16	15	14	19	18	17	16	15	20	19	18	17	16	22	21	22	23	24
	15	14	13	12	11	18	17	16	15	14	19	18	17	16	15	10	19	20	21	22
	14	13	12	11	10	17	16	15	14	13	18	17	16	15	14	8	18	19	20	21