المؤتمر العلمي السنوي الثالث والعشرون الموسوم
(مؤتمر كلية التربية الأساسية في مجال العلوم الصرفة)
والمنعقد تحت شعار (بالبحث العلمي الرصين نرتقي ونتعلم ونتقدم)
للمدة 29ـ30 /4/ 2024

عزل وتشخيص الفطر Alternaria solani المتسبب عن مرض اللفحة المبكرة على الطماطم من مناطق مختلفة من العراق

*قاسم عطية عبد التميمي **حليمة زغير حسين *امنة محمد علي
drhalima@coagri.uobaghdad.edu.iqAmna_mo2@yahoo.com
halimaalbhadly@ahoo.com
qasmtyt586@gmail.com
*قسم علوم الحياة / كلية التربية الاساسية /الجامعة المستنصرية
**قسم وقاية النبات /كلية علوم الهندسة الزراعية /جامعة بغداد

مستخلص البحث:
اجريت هذه الدراسة في جامعة بغداد /كلية علوم الهندسة الزراعية/ قسم وقاية النبات / مختبر السموم الفطرية للعام الدراسي 2019-2020 اذ هدفت الى عزل وتشخيص فطر *Alternaria solani* المتسبب عن مرض اللفحة المبكرة في الطماطم تحت الظروف المختبرية اظهرت نتائج العزل والتشخيص الحصول على تسع عزلات من فطر *A .solani* اخذت من نباتات طماطم ظهرت عليها علامات واعراض المرض ، حيث شملت العزلات مناطق مختلفة من محافظة بغداد (النباعي واليوسفية والنهروان والعبايجي والتاجي وابي غريب) وتم تعليمها برموز(C،E ، N ، A ، T ، A.D)على التتابع ومحافظة وصلاح الدين (Q) ومحافظة كربلاء (EF) ومحافظةالبصرة(B) .
بينت نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز وجود ستة حزم واضحة لست عزلات من الفطر *A .solani* (A.D ,B,C,EF,T,E) والفطر المرافق له *Aspergillus sclerotiorum* شخصت جريئيا بتقانة PCR. وبينت نتيجة التضاعف لهذه الجينات اذ قدر الحجم الجزيئي لها بـ bp~(548،545 ، 545 ، 539 ، 546، 541) زوج قاعدي على التتابع واظهرت نتائج تعاقبات القواعد الناتروجينية نسبة تطابق 100% مع العزلات العالمية الموجودة في بنك الجينات العالمية NCBI وتم إيداع التتابع النيوكلوتيدي للعزلات في بنك الجينات تحت ارقام الانضمام (MT199203.1 و MT199327.1 و MT199152.1 و MT199337.1وMT199154.1 و MT199156.1 للفطر *A.solani* على التوالي ورقم الانضمام للفطر المرافق *Aspergillus sclerotiorum* الذي سجل لاول مرة في العراق على نبات الطماطم هو MT199218.1 .
اظهرت نتائج الفحص المجهري للعزلات امكانية الفطر على تكوين سلسلة بطول خمس ابواغ كما بينت نتائج اختبار المقدرة الامراضية للعزلات في مؤشر النمو DSI)disease severity index)تميزت العزلة E باعطائها مؤشر للامراضية على بذور الطماطم اذ بلغ 5 وهذا يعني ان العزلة شديدة الامراضية وتليها العزلات Q, N ، EF ، A ، C ، T ، A.D ، B اذ بلغت (4.25 ، 3.9 ، 3.69 ، 3.16 ، 2.43 ، 1.88 ، 1.58 ، 1.2 على التتابع ، كما اكدت نتائج اختبار مؤشر النمو على بذور الفجل تفوق نفس العزلة (E) اذ اعطت اعلى مؤشر امراضية بلغ 5 وتليها العزلات Q ، N ، C ، EF ، A ، T ، A.D ، B وبلغت (4.12 ، 3.98 ، 3.81 ، 3.54 ، 3.28 ، 2.85 ، 2.71 ، 1.76) مؤشرنموعلى التتابع اظهرت النتائج المختبرية مقدرة جميع العزلات على احداث خفض

معنوي للنسبة المئوية لانبات بذور الطماطم والفجل على PDA بالمقارنة مع معاملة المقارنة حيث اعطت عزلة (E)اقل نسبة انبات لبذور الطماطم والفجل اذ بلغت 00% و00% على التتابع واعطت عزلة A.D اعلى نسبة للانبات مقارنة مع العزلات ولكنها احدثت انخفاضا معنويا مع معاملة المقارنة حيث بلغ 33.33 و 38.33 على التتابع بينما بلغت النسبة المئوية للمقارنة لبذور الطماطم والفجل 100%و 100%

مقدمة:

يُعَدُّ مرض اللفحة المبكرة Early blight (E.B) واحداً من اهم الامراض التي تصيب الطماطم في العديدة من دول العالم مثل الولايات المتحدة الامريكية واستراليا والمملكة المتحدة والهند والعراق ، و هو من اهم الامراض الفطرية التي تصيب محصول الطماطم واكثرها انتشارا في العالم ، كمرض اقتصادي يؤثر بشكل مباشر على الاقتصاد الوطني.(Gomes واخرون ،2010). و يصيب الطماطم التي تزرع في الحقول المحمية والمكشوفة وان الحقول المحمية تكون اكثر عرضة لتاثير المرض بسبب الرطوبة العالية الموجودة في البيوت المحمية حيث لوحظ انخفاض كبير في كمية المحصول الناتج بنسبة قد تصل الى 79% (Kumar واخرون،2019) ويصعب في هذه الحالة ادارتها بسبب صعوبة عزل النباتات المريضة عن النباتات السليمة خلال المرحلة النشطة من دورة المرض.

(Roy واخرون، 2019) يؤدي المرض في الحالات الشديدة إلى تساقط الأوراق بالكامل وهو أكثر ضرراً بالطماطم في المناطق ذات الندى الكثيف والأمطار والرطوبة العالية ودرجات الحرارة المرتفعة ويتميز كذلك بمدى واسع من درجات الحرارة 8-38مْ يمكن أن تظهر أعراض هذا المرض على جميع أجزاء النبات . (Gomes واخرون ،2010). تستمر دورة المرض من خمسة الى سبعة ايام ، لذلك يمكن ان تتكرر الاصابة به عدة مرات في خلال موسم النمو، وتكون النباتات اكثر حساسية في فترات الاجهاد اثناء الاثمار او مهاجمة النيماتودا او قلة التسميد. (Shahbazi واخرون.، 2011) يبقى الفطر في البذور الملوثة وفي بقايا المحاصيل المصابة ، تعد بقايا النباتات المصابة والبذور الملوثة مصدراً أساسياً لإنتاج اللقاح. للعديد من الابواغ التي يتم انتاجها على الأنسجة المصابة بالفطريات في ظروف رطبة و ينتشر البوغ الفطري من نبات إلى آخر عن طريق الرياح والأمطار. وتساعد درجات الحرارة الدافئة والمدد الطويلة من بلل الأوراق على تطور المرض في المحاصيل المصابة. في ظل ظروف الإجهاد التي تنطوي على نقص النيتروجين في محاصيل الطماطم (Sreenivasuluواخرون، 2019). وتبدأ دورة مرض *A. solani* في النبات العائل بنجاح في ظروف رطوبة عند مدى واسع من درجات الحرارة. بعد الإنبات الناجح للكونيديا يؤدي إلى تكوين واحد أو أكثر من الأنابيب الجرثومية التي تخترق العائل عن طريق الرذاذ أو تدخل من خلال الجروح ، والثغور عن طريق نمو الخيوط الفطرية (Agrios، 2005) تظهر اعراض الاصابة بالمرض على الاجزاء النباتية الخضراء الناضجة الاكبر عمراًعلى هيئة بقع غامقة ودائرية ، لا تلبث ان تتسع مكونة حلقات متمركزة تحاط بنسيج اصفر تتحول فيما بعد اوراقها الى اللون البني، ثم تتساقط عند حدوث اصابة شديدة ، مما يعرض الثمار لاضرار اشعة الشمس المباشرة

(Chaerani ،واخرون، 2007) ينتج عن مرض اللفحة المبكرة تعفن الثمار الناضجة وذبولها بسبب الفطريات ، فيؤثر على الاوراق والبراعم الرقيقة والزهور والجذور يتسبب عنها خسائر فادحة في الجودة والمحصول(Pérez واخرون ،2016) ومن الفطريات التي تسبب مرض اللفحة المبكرة

هي *A . solani* وهي كائنات دقيقة تتسبب بخسائر فادحة في المحصول الزراعي وخاصة الطماطم بسبب قدرتها على التسمم الفطري بانتاج سمومها محدثة تلوثا في المنتجات الزراعية المختلفة. (Grigolli ،واخرون ،2011) يحتوي الفطر *A .solani* على انزيمات سيليلوزية بامكانها تحطيم جدار خلية العائل وتحتوي ايضاً على البكتين مثيل كالاكتونان (Gondal واخرون ،2012)،وتوجد معظم انواع فطر *Alternaria* في التربة(Chandarana, K. A. & Amaresan,2022) ً او على الانسجة النباتية المتحللة ، وبعضها تسبب الامراض مجتمعة أو بشكل منفرد وتكون ذات تاثير اقتصادي مدمر عندما تتوافق مع الإصابة البيكترية (Sai Guo et.al.2024) . فيؤثر على مجموعات كبيرة ومتنوعة من النباتات الأخرى مثل الحبوب ونبات الزينة وعباد الشمس والخضروات الاخرى مثل القرنابيط والجزر والبطاطس والعنب والرمان والتفاح ، فهي قادرة على انتاج المستقلبات الثانوية السامة وبعض هذه السموم من الممكن أنْ يصيب الانسان بالسرطان ، وامراض الحساسية المفرطة حيث تتسبب في تكوين عدد كبير من الابواغ والسموم ، وبعضها قد يسبب العدوى ما بعد الحصاد ، حيث تقلل من امكانات التمثيل الغذائي مؤدية الى نخر بالنبات بسبب انقطاع النمو ، ومن الممكن أنْ تعيش ابواغ الفطر على بقايا النباتات المتحللة لفترة طويلة ، (Langsdorf واخرون ،1991)، يبدا الفطردورة حياته مع نبات الطماطم عند وجوده في بقايا المحاصيل بشكل فطر خامل وعند توفر الظروف المناسبة له ينبت ويسبب لها العدوى الفطرية الاولية ، اما المرحلة الثانوية فتكون عن طريق الانتشار بالرياح او الامطار وتلتصق على النباتات السليمة ثم تصيب الابواغ الكونيدية النبات عن طريق الثغور فتصيب نباتات اخرى. او اجزاء اخرى من النبات في الموسم نفسه عادة ما تتواجد ابواغ الفطر في الحقول التي نمت فيها النباتات المضيفة ولن تتمكن الابواغ من اصابة ورقة جافة وعند توفر درجة حرارة بين 26-29مْ وذلك قد يستغرق نصف ساعة حيث يحتاج الفطر من 3-12 ساعة لاختراق النبات بالاعتماد على توفر الظروف المناسبة ، وفي غضون يومين الى ثلاثة ايام تتكون ابواغ خاملة او العدوى خاملة وضعيفة الى ان تتوفر لها ظروف ملائمة من رطوبة ودرجة حرارة (Agrios ،Sherf 2005 ، MacNab ، 1986) اذ تنتشر العدوى وتمر بثلاث مراحل ، المرحلة الاولى / تبدا في التربة والبذور وعند توفر الظروف المناسبة كالرياح والامطار ، يتكيف الفطر مع الظروف الجديدة البيئية و المرحلة الثانية / يحيط الفطر نفسه بجدار الكونيديا السميك والقوي لمقاومة الظروف البيئية. المرحلة الثالثة / تتسبب العدوى الشديدة من جميع اجزاء النبات وتنتشر بشكل كبير من الاوراق مكونة عدوى اللفحة المبكرة ، والتي ينتج عنها تعفن الثمرة. وتبدأ العدوى بالاوراق ثم تنتشر الى جميع اجزاء النبات وهي غالبا ما تكون على شكل ابواغ صغيرة داكنة تقوم بنخر الاوراق ، وبعدها تتضخم الابواغ مكونة دوائر متحدة المركز وغالبا ما تكون محاطة بصبغة صفراء فتؤدي الى تساقط الاوراق حيث يضعف النبات ويصيب الثمرة بالتعفن وخاصة في منطقة الساق فيتسبب في موت النبات. وتكون له القدرة على اصابة الثمار شبه الناضجة اكبر من الثمار الناضجة، مما يؤثر بالنتيجة على تسويق النباتات الناضجة.

(Kumar وSrivastava ،2013) تم عزل العامل الممرض *A.solani* لنبات الطماطم لاول مرة في اليونان عام 1936 (Saregiannis ،1936) ولكنها اشتدت خلال الاعوام (1995-1998)، حيث ازدادت حدة المرض مما ادى الى تساقط الاوراق بالكامل لنبات الطماطم ، وادى ذلك الى خسائر كبيرة في الحاصل(Vloutoglou وKalogerakis ،2000) حيث ان الفطر *A. Solani* يسبب

تعفن الجذع ومن ثم يسبب تعفن الثمار . وقد وصف Matin&Ellis في دراسته الى ان الفطر *A. Solani* ينتمي الى الفطريات الناقصة Deuteromycotina عائلة Dematiaceae صنف Hyphomy cetes رتبة Hyphales جنس Alternaria . (Agrios، 2005) واشار Akram،واخرون(2018)
Dator، ولقلة الدراسات حول هذا المرض واهميته أجريت هذه الدراسة لتحديد العزلات الممرضة لنبات الطماطة وانتشار المرض في بعض محافظات العراق ليتسنى لنا حماية محصول الطماطة فيما بعد .

المواد وطرق العمل

2-1- تحضير المحاليل والاوساط الزرعية

1-2-1 وسط البطاطا والدكستروز الجاهز Potato dextrose Agar (PDA)

حضر هذا الوسط وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة HIMEDIA وذلك بإذابة 39 غم من مسحوق الوسط الجاهز في لتر من الماء المقطر ، وعقم بجهاز المؤصدة Autoclave بدرجة حرارة121مْ وضغط 1.5 كغم/سم^2 لمدة 20 دقيقة ، وبعد انتهاء مدة التعقيم بردت الى 45 مْ وأضيف المضاد الحيوي الاموكسلين بتركيز 500 ملغم .لتر الى الوسط الزرعي . وقد استعمل هذا الوسط لتنمية الفطريات المعزولة من نبات الطماطم وتنمية عزلات *A.solani*

2-2. جمع العينات

جمعت العينات من اوراق وثمارنباتات طماطم ظهرت عليها اعراض الاصابة بمرض اللفحة المبكرة من البيوت البلاستيكية من مناطق مختلفة من محافظة بغداد (التاجي واليوسفية والعبايجي وابي غريب والنباعي والنهروان) وكذلك من محافظة كربلاء (خان النص) ومحافظة صلاح الدين (قضاء الدجيل) ومحافظة البصرة للموسم الزراعي 2019-2020 . وتم وضعها في اكياس بولي اثلين حيث تم تسجيل عليها مكان وتاريخ جمع العينة . نقلت العينات الى مختبر المبيدات والسموم الفطرية في كلية علوم الهندسة الزراعية / جامعة بغداد في الجادرية لكي يتم عزل وتشخيص الفطر الممرض واستخدامه لاحقا لاغراض التجارب المختبرية والحقلية .

2-3. عزل وتشخيص الفطر *Alternaria solani*

عزلت تسع عزلات من الفطر الممرض بطريقة singal spore اي بطريقة البوغ المنفرد من الاوراق والثمار التي ظهرت عليها علامات المرض والتي تتم بوضع الاوراق والثمار المصابة و المواد اللازمة داخل غرفة laminar air flow كي يتم عزل البوغ المنفرد منها. اذ اخذت قطعة من وسط زرعي PDA من طبق بتري بواسطة spatula معقمة ، على ان لاتزيد مساحة القطعة عن مساحة السلايد او اقل من ذلك ، وضعت على الشريحة الزجاجية النظيفة . اخذت مسحة من جزء الورقة او الثمرة المصابة والمتجرثم عليها الفطر باستعمال الابرة المعقمة ، ونشرت على الشريحة بوجود قطرة ماء مقطر معقم . ووضعت الشريحة تحت المجهر بقوة تكبير X40 لمشاهدة ابواغ الفطر *A.solani* ، وباستعمال ابرة دقيقة ، تم نقل بوغ منفرد من الشريحة الى طبق بتري الذي يحتوي على وسط زرعي PDA ، وتم فحص الطبق تحت المجهر للتاكد من نجاح نقل البوغ المنفرد. وتم تسجيل تاريخ وموقع العينة على الطبق .حضنت الاطباق في الحاضنة عند درجة حرارة 27±2 مْ لمدة سبعة ايام. شخص الفطر من قبل الدكتورة حليمة زغير حسين بالاعتماد على المفتاح التصنيفي

المعتمد (Ellis ، 1971) . واعطيت العزلات تسمية رمزية (EF,A,A.D,E,Q,N,T,B,C) كلا حسب مكان جمع العينة (جدول1)

جدول (1) مواقع وتاريخ جمع عينات الطماطم المصابة لكل منطقة

ت	رمز العزلة	موقع العزلة	تاريخ جمع العينة
1	C	النباعي	2019/9/4
2	A.D	ابي غريب	2019/10/27
3	B	محافظة البصرة	2019/10/30
4	EF	محافظة كربلاء	2019/12/1
5	N	النهروان	2019/12/4
6	E	اليوسفية	2019/12/11
7	A	العبايجي	2019/12/24
8	T	التاجي	2019/12/29
9	Q	محافظة صلاح الدين (الدجيل)	2020/1/23

2-4. فحص مقدرة الفطر *A.solani* على انتاج سلاسل كونيدية طويلة

حضرت الشريحة الزجاجية التي تحتوي على قطعة من الوسط الزرعي PDA كما في الفقرة (3-2) ، اخذ جزء من الورقة المصابة المتجرثم عليها الفطر وضع على شريحة بحيث لامست ورقة النبات الشريحة بشكل خفيف لترك بصمة عليها و رفعت ورقة النبات من الشريحة ، اخذت الشريحة ووضعت تحت المجهر بقوة تكبير X40 لغرض فحص الابواغ الكونيدية.(عبد الحسين ،2013)

2-5 . تحضير لقاح الفطر الممرض *Alternaria solani*

حضر اللقاح الفطري بزرع طبق بتري بقطر 9 سم يحوي على وسط زرعي PDA للعزلات التي تم تشخيصها سابقا حضنت الاطباق بالحاضنة بدرجة حرارة 27 +2 مْ لمدة 10 ايام ،ثم اضيف بعد ذلك 10 مل ماء معقم و مقطرالى مستعمرة الفطر وحركت مستعمرة الفطر باستعمال ابرة معقمة ، ثم جمع معلق الابواغ وبعد ذالك اضيف له ماء معقم و مقطر ضبط التركيز على 2x 10^5 بوغ . مل.

2-6 . اختبار المقدرة الامراضية لعزلات الفطر *Alternaria solani* على بذور لنباتي الطماطم و الفجل مختبريا:

اختبرت المقدرة الامراضية لتسع عزلات (بواقع ثلاث اطباق لكل عزلة) حسب طريقة Sneh واخرون (2004) بأستخدام بذور الطماطم اذ حضر الوسط الغذائي Water Agar بتركيز 2% و عقم في الموصدة بدرجة حرارة 121 مْ وضغط 1.5 كلغم . سم^2 وصبت في اطباق بتري بقطر 9 سم و بعد تصلبة اخذ قرص بقطر 0.5 سم من طرف مستعمرة كل عزلة بعمر خمسة أيام و لقح في وسط الطبق وحضنت في درجة حرارة 27∓2 م□ لمدة ثلاثة أيام لحين وصول المستعمرة الى النمو6 - 7سم حيث جلبت بذور الطماطم من صنف سان و عقمت بذور الطماطم سطحياً بكحول 70% لمدة دقيقتين . ثم غسلت بالماء المقطر المعقم لمدة دقيقتين وبعد ذلك تم غسلها مرة اخرى بماء مقطر ومعقم لمدة دقيقتين لتخلص من بقايا الكحول ثم وضعت على ورق نشاف لغرض تجفيفها وزرعت بواقع 20 بذرة لكل طبق دائرياً بالقرب من حافة المزرعة الفطرية بشكل دائري و أجريت التجربة بواقع 3 اطباق لكل عزلة مع ثلاثة اطباق زرعت بذور فقط للمقارنة حضنت الاطباق في درجة حرارة 27-2+ م لمدة تسعة أيام حيث اعتمد انبات البذور في اطباق المقارنة بشكل كامل ،وتم تقييم شدة المرض باستخدام مؤشر شدة المرض Disease severity index (DSI) اذ يتراوح هذا المؤشر من خمسة (0-5) حيث نأخذ معدل طول العفن الذي سببة الفطر بالساق ل 60 بادرة (3 اطباق و كل طبق 20 بذرة) لكل عزلة وحسب المقياس أدناه :-

0-<1 ملم =1 هذا الرقم يمثل Avirulent غير ممرض
1-<3 ملم=2 هذا الرقم يمثل Low virulent ضعيف الامراضية
3-<5 ملم =3 هذا يمثل Moderately virulent متوسط الامراضية
5-<7 ملم=4 هذا الرقم يمثل Virulent ممرض
= <7 ملم= 5 هذا الرقم يمثل Strongly virulent شديد الامراضية

و تم تكرار التجربة على العزلات التسع باستخدام بذور الفجل و تم تحديد العزلات الأشد أمراضية وتم تنقيتها في اطباق تحوي PDA وحفظها بدرجة حرارة 27 ∓ 2 مئوي.

تم حساب نسبة الانبات لبذور لنباتي الطماطم والفجل حسب المعادلة الاتية:

$$\text{النسبة المئوية للإنبات \%} = \frac{\text{عدد البذور النابتة}}{\text{عدد البذور الكلية المزروعة}} \times 100$$

7-2 التشخيص الجزيئي للفطر الممرض *Alternaria solani.*

تم تنقية عزلات بطريقة البوغ المنفرد حسب فقرة (3-2)وبعد مرور خمسة ايام تم ارسال عزلات *Alternaria solani.* والفطر المرافق له *Aspergillus sclerotiorum* الى شركة التقدم (بغداد -الحارثية)لكي يتم تشخيصها جزيئياً بطريقة تفاعل سلسلة المتبلمر PCR:

1-7-2. استخلاص الحامض النووي DNA :

استخلص الحامض النووي DNA من النمو الفِطْري باستعمال الـKit الخاص بشركة Promega الكندية و حسب الخطوات التالية :-

1- سحق الغزل الفِطْري باتخاذ Micropistel بعد اضافة النايتروجين السائل اليه .حتى تكون العينة على هيئة مسحوق

2- اضيف 200 مايكروليتر من Buffer CL و20 مايكروليتر من إنزيم Proteinase K إلى العينة وتم خلطها باستعمال جهاز الرجاج Vortex

3- حضنت العينات في الحمام المائي بدرجة حرارة 56 مْ لمدة 60 دقيقة.
4- اضيف 200 مايكروليتر من BL للعينة وحضنت بدرجة حرارة 70 مْ ولمدة 60 دقيقة
5- اضيف 200 مايكروليتر من protein precitation الى العينة وتم وضعها لمدة خمسة دقئق في الثلج
وضعت العينات بعناية في جهاز الطرد المركزي Centerfuge لمدة عشرة دقائق و بسرعة 13000 دورة . دقيقة
6- اضيف 600 مايكروليتر Isopropanol ووضعت في الثلج لمدة خمسة دقائق.
7- وضعت العينات بجهاز الطرد المركزي لمدة دقيقتين وبسرعة 13000 دورة لكل دقيقة ثم التخلص من الراشح
8- اضيف 200 مايكروليتر من الايثانول المطلق الى العينة وضعت بعناية بجهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة وبسرعة 13000 دورة . دقيقة اهمل الرائق وتم وضعها داخل الفرن لحين الجفاف
9- اضيف 80 مايكروليتر Rehydration للعينة وحضنت عند حرارة 65م

2-7-2. مضاعفة الحامض النووي المستخلص Amplification DNA :

أجري مضاعفة DNA حسب ما ذكره Sidharthan واخرون (2018) وذلك بأخذ 5 مايكروليتر من الحامض النووي المستخلص و 4 مايكروليتر من البادئ أو البرايمر (ITS1، ITS4) (2 مايكروليتر Forword و 2 مايكرولتر (Reverse وتسلسل القواعد النايتروجينية من (5'-3') (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) (TCCTCCGCTTATTGATATGC) بعدها أكمل الحجم إلى 20 مايكروليتر بإضافة 11 مايكروليتر الماء الأيوني المعقم Ionic distle water داخل أنابيب صغيرة محتوية على 5 مايكرولتر من مادة Master mix ثم خلطت المواد بواسطة جهاز الرجاج Vortex وبعدها وضعت العينات في جهاز البلمرة الحراري Thermocycler لتفاعل PCR وذلك لغرض إجراء عملية تضخيم DNA حسب الظروف المثلى للدورات الحرارية والمبينة في الجدول (2) والمتمثلة بعمليات فصل شريط الحامض النووي DNA (Denaturation) وارتباط البادئات مع الشريط المنفصل(Annealing) ومن ثم تطويل سلسلة الحامض النووي DNA (Extension).

جدول(2) برنامج تفاعل PCR لتشخيص عزلات *A. solani*

Stepsالمراحل	°Cدرجة الحرارة	الزمن	Cycleعدد الدورات
Initial Denaturation	95	05:00	1
Denaturation	95	00:30	30
Annealing	55	00:30	
Extension	72	00:30	
Final extension	72	07:00	1

	10:00	10	Hold

3-7-2 تحضير هلام الأكاروز

1- أخذ 100 مل من محلول TBE Tris/ Borate /EDTA و إضافة 1 غم (1٪) من الاكاروز. و سخن المحلول حتى الغليان (باستخدام حمام مائي) حتى تذوب كل جزيئات الهلام. ويضاف 1 ميكرولتر من Ethidium Bromide (10 ملغ .مل) إلى الاكاروز، تم تقليب الاكاروز من أجل الاختلاط وتجنب الفقاعات. تم ترك المحلول ليبرد عند 50-60 م

2- سكب محلول الأكاروز في لوح زجاجي الهلام بعد أن تم ختم كلا الحواف بأشرطة السيلوفان وسمح للأكاروز بالتصلب في درجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة،تم رفع المشط بعناية ، ووضع الهلام في حوض الترحيل ثم ملئ الدرج بعازل الترحيل الكهربائي X1- TBE

3- مزج DNA مع5 مايكروليتر لمحلول التحميل ومن ثم حملت بواسطة ماصة دقيقة في حفر الهلام مع عدم اخراج العينة من حفرة الهلام ووضع مؤشر DNA للمقارنة على جانب الهلام

4- وصل الجهاز بالتيار الكهربائي وتشغيل الطاقة الكهربائية عند 1فولت.سم2 لمدة ساعة واحدة ينقل الحمض النووي من القطب السالب الى القطب الموجب عند وصول الصبغة مسافة 1سم للحافة ثم تم تصوير الملون بروميد الاثيديوم في هلام باستخدام نظام تصوير الهلام

4-7-2 الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR

استعملت الطريقة السابقة للترحيل لكشف ناتج عملية تفاعل الحراري لكن بتركيز1.5 للاكاروز مع الايثيديوم بروماید لكي يتم توضيح نتائج التفاعل وفحص الهلام بطول موجي 365نانو متر تحت الاشعة فوق البنفسجية

5-7-2 تحديد تتابع النيوكلوتيدات

إرسلت منتج PCR بطريقة Sanger باستخدام جهاز ABI3730XL ، بواسطة شركة Macrogen - كوريا. لكي يتم التعرف على تعاقب القواعد النتروجينة لنواتج التفاعل لتضخيم السلسلة الفاصلة للمنطقة البينية ITS4 , ITS1

8-2-تحليل البيانات وتاكيد التشخيص

حللت تعاقب القواعد النتروجينة ومقارنتها مع تعاقبات قياسية في بنك الجينات NCBIباستخدام :-

/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT199203.1
/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT199327.1
/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT199152.1
/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT199337.1
/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT199154.1
/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT199156.1
/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT199218.1 الفطر المرافق

- النتائج والمناقشة

1-3 جمع العينات

1-3- ا عزل وتشخيص الفطر *A.solani*

اظهرت نتائج جمع العينات لنبات الطماطم المصابة بمرض اللفحة المبكرة ، الحصول على تسع عزلات للفطر *A.solani* اذ تم الحصول عليها من مناطق مختلفة محافظات من بغداد وصلاح الدين وكربلاء والبصرة وتم تنقية الفطر من الاجزاء المصابة بواسطة البوغ المنفرد وتنميتها على وسط زرعي PDA حيث تم تعليم العزلات برموز حسب الجدول(1) في فقرة 3-2 حيث يصل الغزل الفطري الى حافة طبق بيتري بقطر 9سم ويغطي الطبق بالكامل بعد مرور 7 ايام من التحضين بدرجة حرارة 27_+ 2 مْ وتكون المستعمرة بلون بني غامق مائل الى الزيتوني اذ لوحظ ان الغزل الفطري متفرع ومقسم بشكل كثيف ومع تقدم العمر يصبح اللون غامقاً، والحوامل الكونيدية تكون غامقة اللون وقصيرة وتكون كونيديا مفردة حيث تكون واحدة او اثنين من كونيديا فقط وتكون غامقة اللون ذات شكل مغزلي و مقسم طوليا وعرضيا ذي حواجز عرضية ولها منقار طويل كما موضح في (شكل -1) كما بينت النتائج وجود الفطر الممرض *A.solani* في جميع المناطق التي تم جمع العينات منها وبينت النتائج عندعزل الفطر الممرض مرة اخرى من الاوراق المصابة حسب (فرضية كوخ) كانت الصفات المظهرية مطابقة لصفات الفطر الممرض حيث كونت ابواغاً كونيدية (Ellis ، 1971).

وتتفق هذه النتائج مع عدة دراسات في مواصفات الفطر حيث ذكر كل من Ellisو Gebson (1975) و Pandey (2012)عبد الحسين (2013) و عجيل (2015)

ان الغزل الفطري للفطر *A. solani* متفرع و مقسم ، متفرع بشكل كثيف و الحوامل الكونيدية له تكون غامقة اللون وقصيرة وتكون الكونيديا مفردة حيث تكون واحدة او اثنين من كونيديا فقط وتكون غامقة اللون ذات شكل مغزلي و مقسم طوليا وعرضيا ذي حواجز عرضية ولها منقار طويل

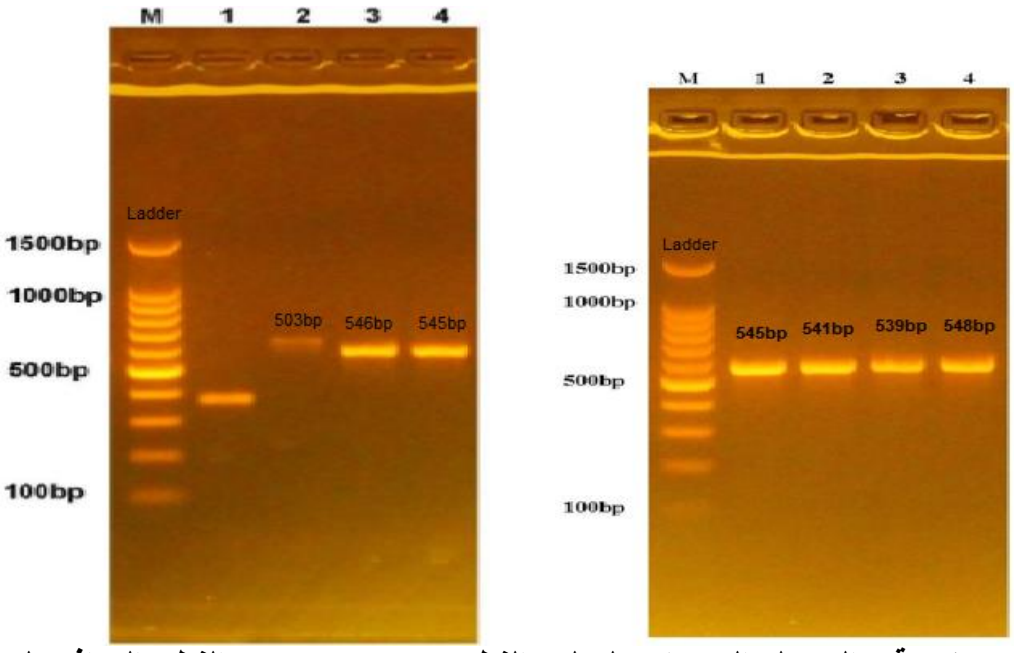
شكل (1) الجراثيم الكونيدية للفطر *A. solani* تحت المجهر المركب بقوة تكبير *X40*

2-3 تشخيص عزلات الفطر *Alternaria solani* بتقنية PCR:

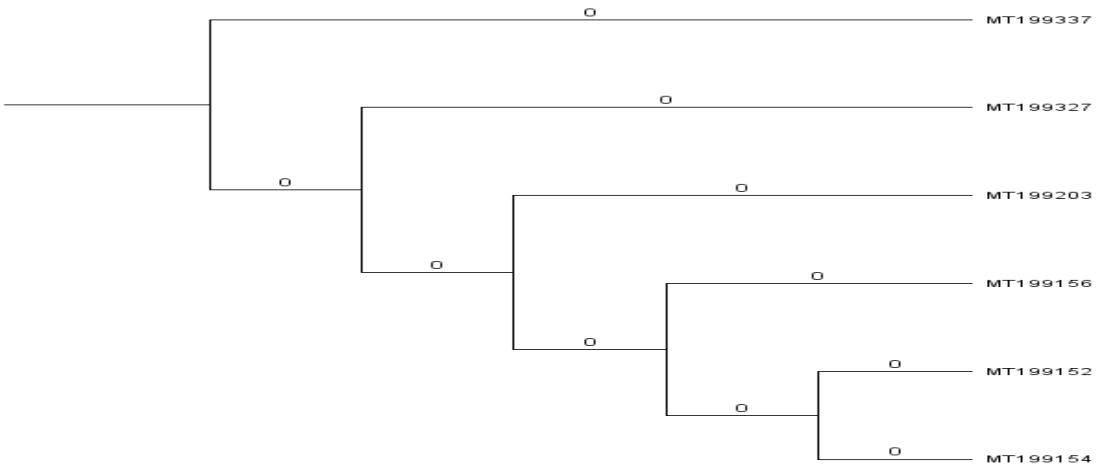
أظهرت نتائج التشخيص الجزيئي للعزلات الفطر *A. Solani* (A.D ,B,C,EF,T,E) والفطر المرافق له *Aspergillus sclerotiorum* بواسطة تفاعل سلسلة الدنا وباستخدام بادئات المنطقة البينية ITS1-ITS4 الواقعة ضمن الجين الرايبوسومي 18s rRNA والترحيل الكهربائي على هلام الآكاروز وجود ستة حزم واضحة نتيجة لتضاعف هذه الجينات حيث قدر الحجم الجزيئي بـ ~bp(548،545 ، 545 ، 539 ، 546، 541) زوجاً قاعدياً على التتابع بينما كان الحجم الجزيئي للفطر المرافق بحجم bp503 ،(شكل -2) زوجاً قاعدياً بالاعتماد على الدليل الحجمي للدنا المرحل على الهلام نفسه وتحت الظروف نفسها . اذ ان منطقة ITS هي اكثر ملائمة من بقية المناطق لتشخيص السلالات كما انها تكون محفوظة بسبب القيود التطورية حيث انها تميز السلالات والانواع التابعة لنفس الجنس وبدقة عالية(stoll واخرون،2003 ، 2005)

أرسلت تعاقبات القواعد النيتروجينية للمنطقة البينية ITS1-ITS4 لعزلات الفطر(A.D ,B,C,EF,E,T) والفطر المرافق له *Aspergillus sclerotiorum* الى شركة Marcogen الكورية. باستعمال برنامج Codon Code Aligner software ،اذ أظهرت نسبة تطابق 100% مع بعض العزلات العالمية الموجودة في بنك الجينات العالمية NCBI (شكل 4-5-6)، وتم إيداع

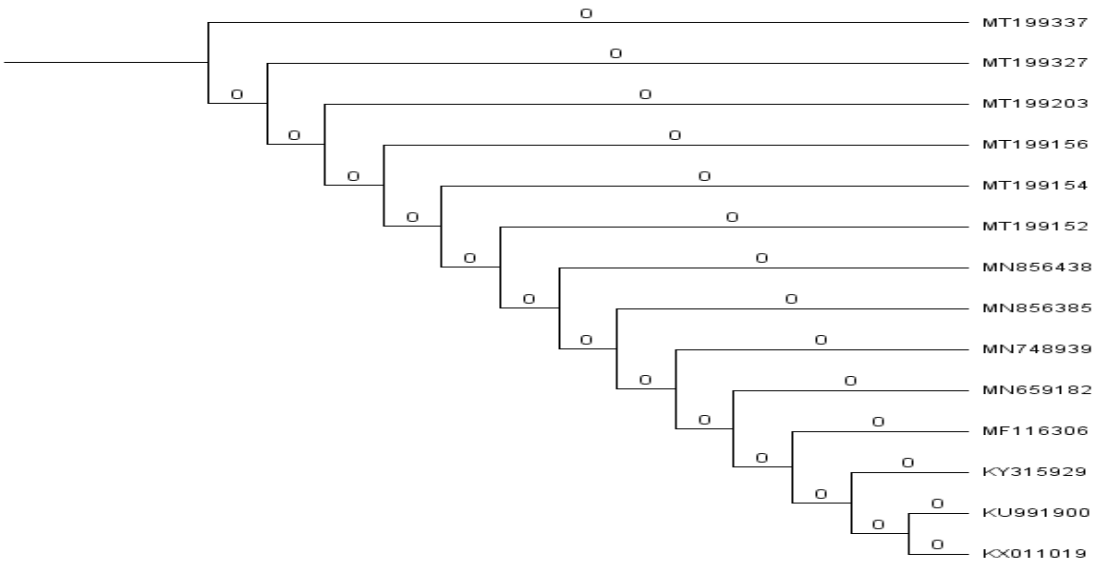
التتابع النيوكلوتيدي للعزلات في بنك الجينات تحت ارقام الانضمام (MT199203.1 و MT199327.1 و MT199152.1 و MT199337.1 و MT199154.1 و MT199156.1 للفطر *A.solani* التتابع ورقم الانضمام للفطر المرافق ***Aspergillus sclerotiorum*** الذي سجل لاول مرة في العراق على نبات الطماطم هو MT199218.1 .



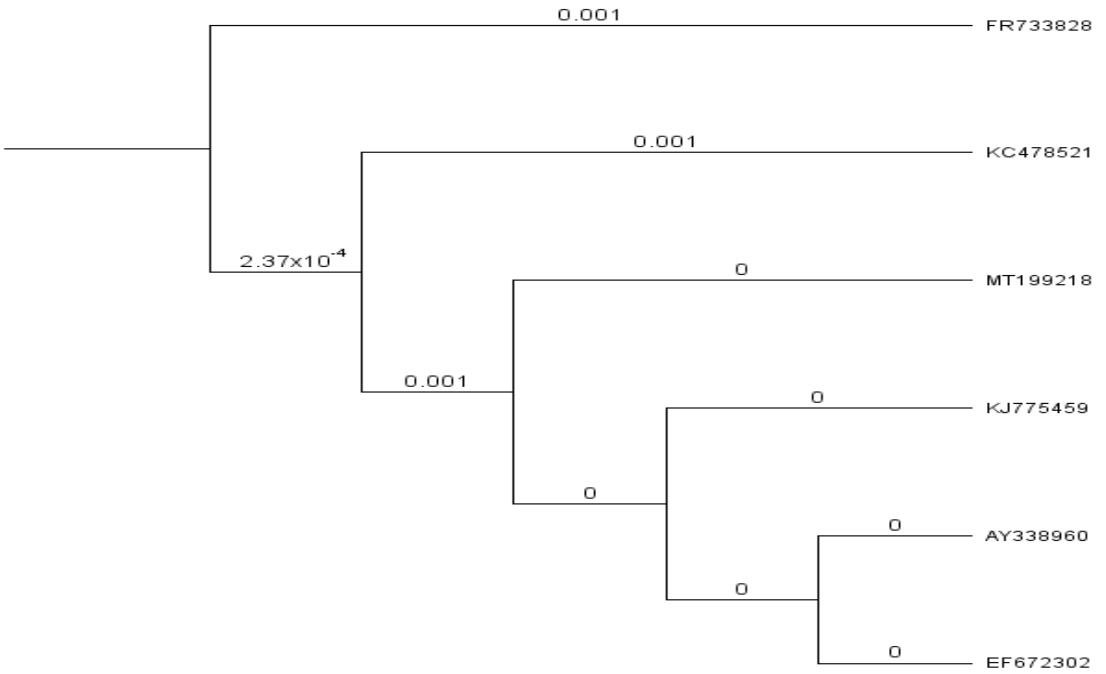
شكل -2 نتيجة الترحيل الكهربائي لعزلت الفِطر *A. solani* والفطر المرافق له *A. sclerotiorum* : على هلام الاكاروز لناتج تفاعل البلمرة PCR للبادئ ITS حيث يبين المنطقة الجينية الواقعة بين TS 1 و ITS4 باستعمال جهاز UV الذي يعتمد على الاشعة فوق البنفسجية في عمله .



شكل -3يمثل شجرة التحليل الوراثي التي تبين تطابق بين العزلات الفطر *A. solani* المحلية مع بعضها والمسجلة في بنك الجينات



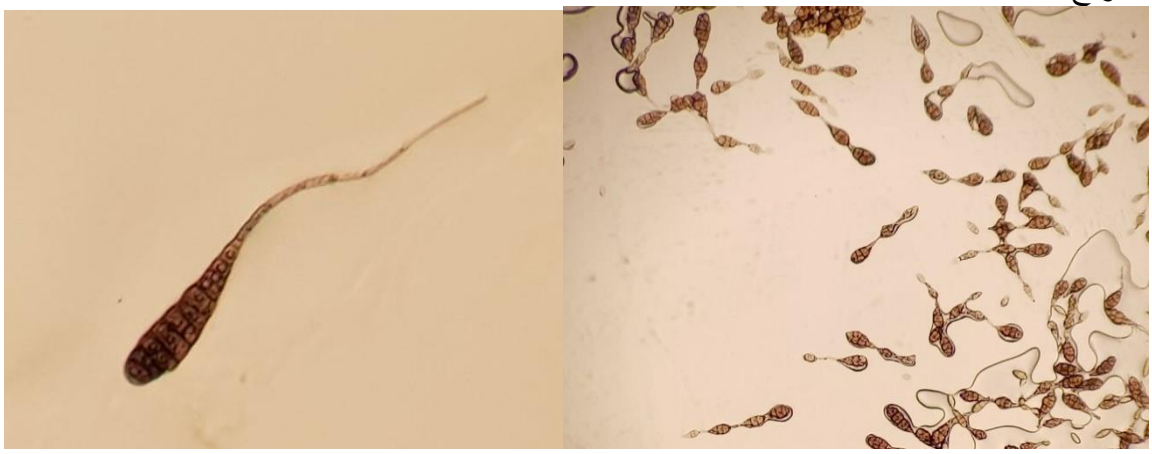
الشكل -4 يمثل شجرة التحليل الوراثي التي تبين التطابق بين العزلات الفطر *A. solani* المحلية والسلالات العالمية والمسجلة في بنك الجينات

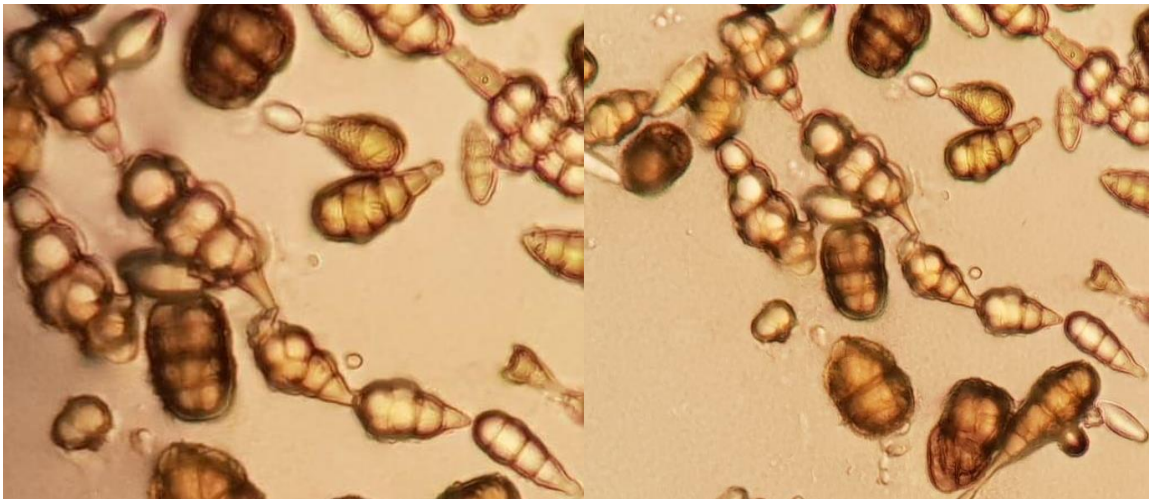


الشكل -5 يمثل شجرة التحليل الوراثي التي تبين التطابق بين عزلة الفطر *A. sclerotiorum* المحلية والسلالات العالمية والمسجلة في بنك الجينات

3-3. فحص مقدرة الفطر *Alternaria solani* في انتاج السلاسل الكونيدية الطويلة

بينت النتائج ان الفطر *A.solani* يكون سلاسل طويلة قد تصل الى خمسة ابواغ كونيدية وذالك عند عمل بصمة للفطر كما مذكورة في فقرة (3-3) وكما موضح في (شكل -6). حيث تتفق هذه النتيجة مع عبد الحسين (2013) وحيث ذكر ان الفطر له القدرة على انتاج سلاسل كونيدية تصل الى خمسة ابواغ .





شكل -6 تمثل تشخيص فطر *Alternaria solani* و تكوين سلاسل كونيدية .

3-4. اختبار المقدرة الامراضية لعزلات لفطر *Alternaria solani* علئ بذور الطماطم مختبريا

أوضحت نتائج اختبار المقدرة الامراضية على بذور الطماطم صنف سان ل 9 عزلات (جدول -3) ان جميع العزلات في المختبر اعطت درجات متفاوتة في مؤشر شدة الامراضية DSI (Disease Severity index) حسب ما وصف من قبل Sneh واخرون (2004) اذ حصلت عزلة اليوسفية (E) على اعلى مؤشر أمراضية درجة 5.00 وهي تعني شديدة ألامراضية (Strong virulent) ، تليها عزلة النهروان (N) درجة 4.25 وهي تعني شديدة الامراضية(Strong Virulent) وتليها عزلة (Q) درجة 3.90وعزلة (EF) بدرجة 3.65 وعزلة (A) بدرجة 3.16 وهي تعني ممرض(virulent) وتليها عزلة (C) بدرجة 2.43 وتكون متوسطة الامراضية Moderately virulent)) وتليها وعزلة (T) بدرجة 1.88 وعزلة A.D درجة 1.58 وعزلة (B) بدرجة 1.20 ضعيفة الامراضية (Low virulent) و لعل السبب في تفوق عزلة (E) هو الاختلاف في الظروف البيئية بين منطقة واخرى او اختلاف في التركيب الوراثي للفطر ان له مدى واسعاً لدرجات الحرارة من 8-32 مْ مما يسمح بتطور و انتشاره بشكل واسع كما ذكرShankar (2014) ان هذه المناطق يتوفر بها مدى حراري كذلك تكرار زراعة الطماطم في الأرض نفسها كل موسم من دون الاعتماد على طرق الادارة الصحيحة للارض في تلك المناطق يسبب حصول تغاير للمسبب الممرض مما زاد من شراسة المسبب الممرض في الاصابة وكما ان الرش المتكرر بالمبيدات الكيميائية جعل المسبب الممرض ينتج سلالات مقاومة لذا يصبح اكثر قوة في احداث المرض كما أفاد Thomas واخرون (2012) ، فضلا عن قدرة المسبب العالية على التكيف

جدول(3) اختبار المقدرة الامراضية لعزلات الفطر *A. solani* في بذور الطماطم

ت	اسم ومكان الغزلة	رمز العزلة	DSI	الامراضية
1	اليوسفية	E	5.00	شديدة الامراضية
2	النهروان	N	4.25	شديدة الامراضية
3	الدجيل	Q	3.90	ممرض
4	كربلاء	EF	3.69	ممرض
5	العبايجي	A	3.16	ممرض
6	النباعي	C	2.43	متوسط الامراضية
7	التاجي	T	1.88	ضعيف الامراضية
8	ابي غريب	A.D	1.58	ضعيف الامراضية
9	البصرة	B	1.20	ضعيف الامراضية
	LSD		0.42	

4-5. اختبار المقدرة الامراضية لعزلات الفطر *Alternaria solani* على بذور الفجل مختبريا

اظهرت نتائج اختبار المقدرة الامراضية على بذور الفجل ل 9 عزلات جدول (4) حيث اعطت جميع العزلات في المختبر اعطيت درجات متفاوتة في مؤشر شدة الامراضية DSI (Disease Severity index) حسب ما وصف من قبل Sneh واخرون (2004) اذ حصلت عزلة اليوسفية (E) على اعلى مؤشر أمراضية درجة 5.00 وهي تعني شديدة ألامراضية (Strong virulent) وتليها عزلة (Q) درجة 4.12 وهي تعني شديدة ألامراضية (Strong virulent) وتليها عزلة (N) درجة 3.98 وعزلة (C) 3.81 وعزلة (EF) درجة 3.54 وعزلة (A) درجة 3.28 وتعني ممرض(virulent) وتليها عزلة (T) درجة2.85 وعزلة (A.D) درجة 2.71 وهي تعني متوسطة الامراضية(Moderately virulent) في حين عزلة(B) فكانت ضعيفة الامراضية بدرجة 1.7 قد يعود السبب في هذا التفاوت الى نفس الاسباب اعلاه فضلا عن قوة الممرض في احداث المرض(Gusimini و اخرون، 2017) .

جدول(4) اختبار المقدرة الامراضية لعزلات الفطر *A. solani* في بذورالفجل

ت	اسم ومكان الغزلة	رمز العزلة	DSI	الامراضية
1	اليوسفية	E	5.00	شديدة الامراضية
2	الدجيل	Q	4.12	شديد الامراضية
3	النهروان	N	3.98	ممرض

4	النباعي	C	3.81	ممرض
5	كربلاء	EF	3.54	ممرض
6	العبايجي	A	3.28	ممرض
7	التاجي	T	2.85	متوسط الامراضية
8	ابي غريب	A.D	2.71	متوسط الامراضية
9	البصرة	B	1.76	ضعيف الامراضية
	LSD		0.48	

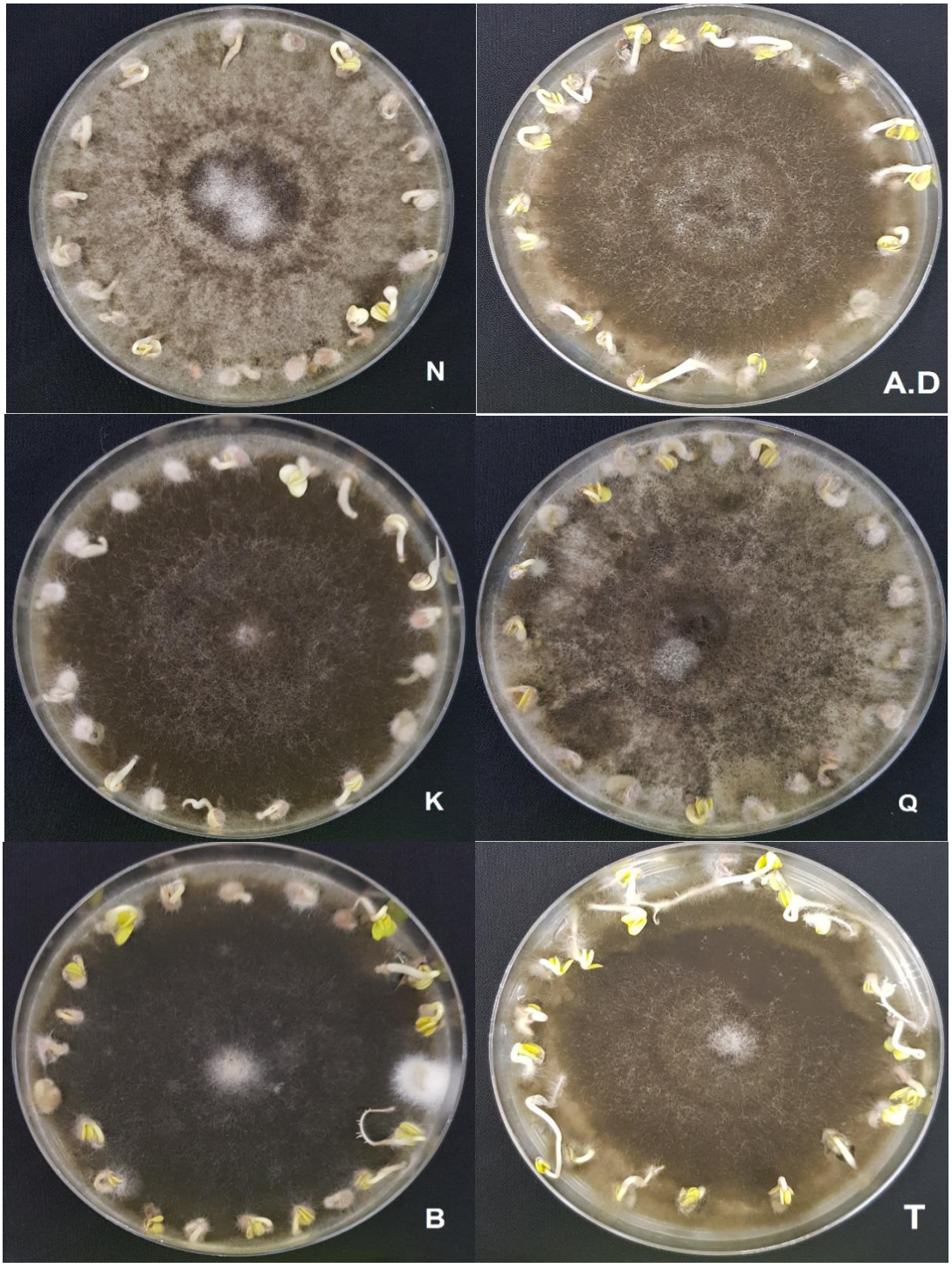
Disease Severity index = DSI

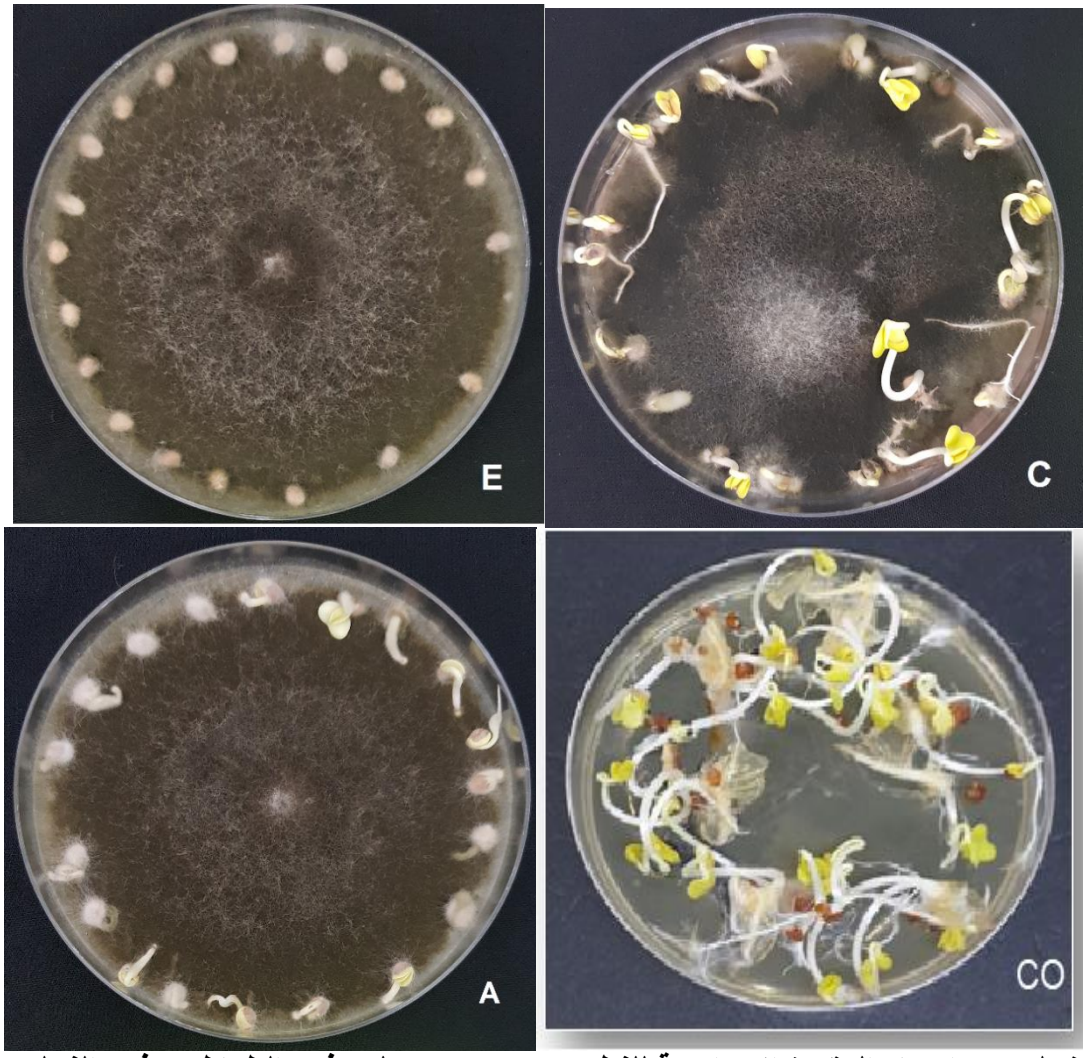
6-3 اختبار المقدرة الامراضية للفطر *Alternaria solani* على بذور الطماطم وبذور الفجل مختبريا

بينت النتائج (الجدول-5 و شكل – 7) مقدرة 9 عزلات من الفطر *A. solani* في احداث انخفاض معنوي في نسبة الانبات في بذور الطماطم صنف سان ووبذور الفجل مختبرياً حيث كانت هناك فروق معنوية بين العزلات في احداث الانبات وكذلك هناك فروق معنوية بين بذور الطماطم وبذور الفجل مقارنة مع معاملة السيطرة من دون فطر التي اعطت نسبة الانبات100.00 % لكل من بذور الطماطم والفجل ، و حققت العزلة E المعزولة من منطقة اليوسفية اقل نسبة انبات وبلغت 00%و00% على التتابع وتليها عزلة النهروان (N) اذ بلغت نسبة الانبات فيها 5.00% و 8.33% و عزلة (Q) 6.66% و15% وعزلة (EF) 11.66% و11.66% وعزلة (A) 15.00% و16.667% وعزلة (B) 23.33 و 26.66% وعزلة (C)30.00% و 28.33% وعزلة (T) 30.00% و 31.66 %وعزلة (A.D)33.33% و 38.33% على التتابع وقد يعود السبب في مقدرة الفطر *A. solani* في منع انبات البذور او احداث اصابة بشكل كبير هو مقدرة الفطر على افراز انزيمات الكايتنيز و السليلوز المحللة لجدار الخلايا وتحطيم المواد الكايتونية ،والسليلوزية وانتاج مواد ايضية مثل Lycomarsmin وFusaric acid و Dehydro Fusaric acid وهذه المواد تقلل من معدلات تنفس الخلية النباتية ، مما يمكن ان توثر على نفاذية اغشية الخلايا المصابة للنبات ولها دور في ضراوة المسبب ولها تاثير في العمليات الحيوية الاخرى (Burgess وآخرون، 1981 ؛ Calero-Nieto وآخرون، 2007).و قد يعزى الاختلاف بين العزلات في احداث نسبة الاصابة الى وجود اختلافات وراثية وكذلك الاختلاف في نسبة الانبات بين بذور الطماطم وبذور الفجل ربما بسبب الاختلاف في التركيب الفيسولوجي بين النباتات او قدرة النبات على مقاومة الفطر (عجيل ،2015).

جدول (5) اختبار المقدرة الامراضية لعزلات الفطر *Alternaria. solani* في نسبة انبات بذور نباتي الطماطم و الفجل مختبريا

ت	اسم ومكان العزلة	رمز العزلة	نسبة المئوية لانبات بذور الطماطم	نسبة المئوية لانبات بذور الفجل
1	التاجي	T	30.00	31.66
2	كربلاء	EF	11.66	11.66
3	الدجيل	Q	6.66	15.00
4	اليوسفية	E	00	00
5	العبايجي	A	15	16.66
6	النهروان	N	5.00	8.33
7	ابي غريب	A.D	33.33	38.33
8	النباعي	C	30.00	28.33
9	البصرة	B	23.33	26.66
10		control	100.00	100.00
	LSD		7.29	10.88


N
A.D
K
Q
B
T



شكل -7) اختبار المقدرة الامراضية للفطر *A. solani* على بذور الطماطم وبذور الفجل بعد 7أيام
(CO تمثل المقارنة و K,T,N,Q,B, E,A.D,C,A, تمثل العزلات

المصادر

❖ **عبد الحسين ، حسنين محمد (2013).** استحثاث المقاومة الجهازية ضد الفطر Alternaria solani في الطماطم . رسالة ماجستير .كلية علوم الهندسة الزراعية ،جامعة بغداد

❖ **عجيل ، حليم قاسم.(2015).** وبائية مرض اللفحة المبكرة على الطماطم المتسبب عن الفطر Alternaria solani على هجين الطماطم S-19 و S-10 المستنبط محلياً في الزراعة المحمية رسالة ماجستير ، كلية الزراعة ، جامعة بغداد.

❖ **Agrios, G.N. 2005.** Plant Pathology. Volume 5 Elsevier Academic Press; San Diego, CA, USA.

❖ **Akram, S.; Atiq; R., Tariq; A.; Mahmood and M. A. 2018.** Emerging Resistance in Alternaria solani Against Different Fungicides in Southern Punjab, Pakistan. Pakistan Journal of Life & Social Sciences. 16:2.

❖ **Burgess, A. E.; Wagner, R. F.; Jennings, R. J.; and Barlow, H. B. 1981.**Efficiency of human visual signal discrimination. Science. 214(4516): 93-94.

❖ **Chaerani, R.; Groenwold, R.; Stam, P.; and Voorrips, R. E. 2007**. Assessment of early blight (Alternaria solani) resistance in tomato using a droplet inoculation method. Journal of General Plant Pathology. 73(2): 96-103.

❖ Chandarana, K. A. & Amaresan, N.(2022).Soil protists: an untapped microbial resource of agriculture and environmental importance. Pedosphere 32, 184–197.

❖ **Datar, V. V. ; and Mayee C. D. 1981**. Assesment of loss in tomato yield due to early blight. Indian Phytopathol. 34: 191-195.

❖ **Ellis, A. 1971.** Growth through reason: Verbatim cases in rational-emotive therapy. Science and Behavior Books.

❖ **Ellis, M.B.; and Gibson, I.A.S. 1975.** Alternaria solani no. 45 set 48. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, UK.

❖ **Gomes, S. M. D. T. P.;Romano, E. D. B.; Pignoni, E.; Teixeira, M. Z.; da Costa Vasconcelos, M. E.; and JosÃƒÆ, Ã. 2010.** Effect of biotherapic of Alternaria solani on the early blight of tomato-plant and the in vitro development of the fungus. International Journal of High Dilution Research-ISSN. 1982-6206- 9(33): 147-155.

❖ **Gondal, A.S.; Ijaz M.; Riaz K.; and Khan, A.R. 2012.** Effect of different doses of fungicide (Mancozeb) against Alternaria leaf blight of tomato in Tunnel. Plant Pathology and Microbiology. 3(3): 1-3.

❖ **Grigolli, J. F. J.; Kubota, M. M.; Alves, D. P.; Rodrigues, G. B.; Cardoso, C. R.; Silva, D. J. H. D.; and Mizubuti, E. S. G. 2011.** Characterization of tomato accessions for resistance to early blight. Crop Breeding and Applied Biotechnology.11(2): 174-180.

❖ **Gusmini, G., Rivera-Burgos, L. A.; and Wehner, T. C. 2017.** Inheritance of resistance to gummy stem blight in watermelonHortScience. 52(11):1477-1482.

❖ **Kumar S.; Srivastava K. 2013.** Screening of Tomato Genotypes Against Early Blight (Alternaria solani) under field condition. The Bioscan.8(1):189193.

❖ **Kumar, T. Ramesh, and Praveen Kumar M. 2019.** "Effect of Dates of Sowing and Weather Factors on Early Blight of Tomato (Alternaria solani)

❖ .". 7(1):539–44.

❖ **Langsdorf, G.;park, P.; and nlshlmura, S. 1991.** Investigations on Alternaria solani Infections. Japanese Journal of Phytopathology. 57(1): 32-40.

❖ **Pandey D.B.P.2012.** plant pathology. S.Chand and company Ltd., Ram nagar , New Delhi, pp.437.

❖ **Pérez-MartínezI, S.; SolórzanoII, E.; del CastilloI, D. S.; and CocaIV, B. M. 2016.** Induction of tomato resistance to Alternaria solani Sor. by biological and chemical activators in the field. Ec. Rev. Protección Veg. Predatory protists reduce bacteria wilt disease incidence in tomato plants31(3): 201-212.

❖ **Roy, C. K.; Akter, N.; Sarkar, M. K.; Pk, M. U.; Begum, N.;Zenat, E. A.; and Jahan, M. A. 2019.** Control of Early Blight of Tomato Caused by and Screening of Tomato Varieties against the Pathogen. The Open Microbiology Journal, 13.

❖ Sai Guo 1,2, Zixuan Jiao 1 , Zhiguang Yan 1 , Xinyue Yan 1 , Xuhui Deng1,2, Wu Xiong 1,2, Chengyuan Tao 1,2, Hongjun Liu1,2, Rong Li 1,2 , Qirong Shen 1 , George A. Kowalchuk 3 & Stefan Geisen4(2024). Predatory protists reduce bacteria wilt disease incidence in tomato plants., Nature Communications | (2024) 15:829

❖ **Saregiannis and J. A. 1936.** Liste (II) des maladies des plantes cultiveÂes et autres de la GreÂce. Annals Institute Phytopathologique Benaki. 2: 8-12.

❖ **Shahbazi H.;Aminian H.; Sahebani N.; and Halterman D. 2011.** Effect of Alternaria solani exudates on resistance and susceptible potato cultivars from two different pathogen isolates. The Plant Pathology Journal. 27(1): 14-19.

❖ **Shankar, S.; and Shanker, U. 2014.** Arsenic contamination of groundwater: a review of sources, prevalence, health risks, and strategies for mitigation. The scientific world journal.

❖ **Sherf AF. and Macnab AA .1986.** Tomato. In Sherf AF and Macnab AA (eds.) Vegetable diseases and their control. John Wiley & Sons, New York, p. 599-696.

❖ **Sneh, B.; Yamoah, E.; and Stewart, A. 2004.** Hypovirulent Rhizoctonia spp isolates from New Zealand soils protect radish seedlings against dampingoff caused by R solani. New Zealand Plant Protection.57: 54-58.

❖ **Sreenivasulu, R.; Reddy, M. S. P.; Tomar, D. S.; Sanjay, M. S. S.; and Reddy, B. B. 2019.** Managing of Early Blight of Tomato Caused by Alternaria solani through Fungicides and Bioagents. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 8(6): 1442-1452

❖ **Stoll, M.; Begerow, D.; and Oberwinkler, F. 2005.** Molecular phylogeny of Ustilago, Sporisorium, and related taxa based on combined analysis of rDNA sequences. Myco. 109: 342-356.

❖ **Stoll, M.; Piepenbring, M.; Begerow and Oberwinkler, F. 2003.**Molecular phylogeny of Ustilago and Sprosorium spacies (Basidiomycota , Ustlaginales) based on internal transcribed spacer (ITS) sequences. Can. J. of Bo. 81:976-984.

❖ **Vloutoglou, I. ; Kalogerakis, and S. N. 2000.** Effects of inoculum concentration, wetness duration and plant age on development of early blight (Alternaria solani) and on shedding of leaves in tomato plants. Plant pathology. 49(3):339-345.