مقارنة عزلات مختلفة للفطر *Alternaria alternata* في قدرتها الامراضية وتشخيصها جزيئيا

مريم حسين جفات بان طه محمد رجاء غازي الجنابي
كلية الزراعة كلية التربية للعلوم الصرفة كلية الزراعة
E.mail: reemhch803@yahoo.com

المستخلص

اجريت سلسلة من التجارب المختبرية في قسم وقاية النبات بكلية الزراعه بجامعة كربلاء ، تم من خلالها دراسة 4 عزلات فطرية تحمل رموز هي AM1 و AM2 وAB وAK من الفطر *Alternaria alternata* وكانت اكثر العزلات امراضيه هي العزلة AM2 وكانت نسبة انبات بذور الرشاد والطماطة 0% لكلاهما ونسبة التثبيط 100% تلتها العزلة AB اذ كانت نسبة انبات بذور الرشاد 4.4% والطماطة 0% وبنسبة تثبيط 94.97% و100% على التوالي تلتها العزلة AM1 وكانت نسبة انبات بذور الرشاد والطماطة 8.86% 73.33% على التوالي ، اما نسبة التثبيط لبذور الرشاد والطماطة فكانت 89.87% و22.9% على التوالي وظهرت اقل العزلات امراضية هي العزلة AK وكانت نسبة انبات بذور الرشاد والطماطة فيها 60% و83.66% على التوالي اما النسبة المئوية للتثبيط 31.42%و12.12%لبذور الرشاد والطماطة على التوالي. بعدها تم تشخيص تلك العزلات بتقنية Polymerase Chain Reaction (PCR) وكانت جميع العزلات تابعة للفطر *A. alternata* وهي متماثلة من الناحية الوراثية.

Different Isolate Comparison of *Alternaria alternata* in their pathogenisity ability and molecular Diagnosing

M.H.Chaffat B.T.Mohammed R.GH.AL-Janabi

Abstract

Series of Laboratory experiment were conducted at the Department of plant protection ,College of Agriculture ,University of Kerbala. Fours fungal isolate designated here after by AM1 , AM2 , AB and AK of *Alternaria alternata* were studied . show that more pathogenic isolate was AM2 , germination percentage of the cress seeds and tomatoes was 0.0% for both , inhibition percentage was 100%. Then , in A.B isolate, germination percentage of the cress seeds was 4.4% and tomatoes 0.0% and inhibition percentage was 49.97% , 100% respectively. Then ,in A.M1 isolate, germination percentage of the cress seeds and tomatoes were 8.86% and 73.33% respectively, while the inhibition percentages of the cress seeds and tomatoes were 89.87% 22.9% respectively. The less pathogenic isolate was AK , the germination percentages of the cress seeds and tomatoes were 60.0% and 83.

* بحث مستل من رسالة الماجستير للباحث الأول

66% respectively and the inhibition percentages of the cress seeds and tomatoes were 31.42% and 12.12% respectively. where other isolate were less pathogenitic on the seed .these isolates were diagnosed by using PCR technique which were molecularly similar.

المقدمة

تعود الطماطة *Lycopersicon esculentum* الى العائلة الباذنجانية Solanaceae وهي من محاصيل الخضر المهمة اذ تمتاز باحتوائها على عناصر الكالسيوم والفسفور والبوتاسيوم والحديد وفيتامينات A و B_1 و B_2 و B_6 و C و E ، فضلاً عن النياسين والبيوتين وحامض الفوليك(4) .

يعد موطنها الاصلي امريكا الجنوبية وانتشرت الى الاقطار الاوربية في القرن السادس عشر (17) ، تصاب الطماطة بالعديد من الامراض بالاضافة الى الآفات الاخرى ويعد مرض التبقع الألترناري المتسبب عن الفطر *A.alternata* احد الامراض التي تصيب هذا المحصول ، اذ يصيب المجموع الخضري ويسبب ظهور بقع متباينة الشكل على الأوراق (12) ، كما يسبب تقرح الساق (3) ، وكذلك يصيب الثمار ويسبب ظهور بقع غائرة سوداء على سطح الثمرة(14) .

يعد مرض التبقع الالترناري من الامراض التي تصيب ثمار الطماطة وتتطور الإصابة بعد الجني وفي أثناء الخزن (1) و تتمثل أعراضه على ثمار الطماطة بظهور بقع بمستوى سطح الثمرة ثم تصبح غائرة بتطور الإصابة وتكسبها لونا بنيا مخضرا إلى اسود كما يسبب الفطر أمراض تبقع الاوراق والتعفن واللفحة لعدد كبير من المحاصيل يصل الى 280 عائل نباتي (9).

يكون الغزل الفطري (mycelium) مقسم ومتفرع تفرعا بسيطا (5) غامق اللون ويكون ابواغا غامقة اللون على حامل بوغي قصير وبسيط وقائم وإن النوع *A.alternata* يكون مستعمرات عادة ذات لون اسود او زيتوني غامق او رصاصي غامق (7)، يكون في الانسجة المريضة او المتقدمة في السن حوامل بوغية (Conidiophore) قصيرة وبسيطة وقائمة يحمل سلسلة من الابواغ الكونيدية ذات سلاسل طويلة متفرعة ونامية من الاسفل إلى الأعلى بصورة متعاقبة وتاخذ اشكالا كمثرية، بيضوية وذات لون غامق وجدار املس ومقسم بحواجز عرضية ، طول الابواغ غالبا اكثر من 50 مايكرومتر وذات سمك 3–6 مايكرومتر والتي يكون طولها عادة ثلاث اضعاف طول الحامل البوغي وذات منقار(Peak) قصير يكون طوله غالبا2–5 مايكرومتر (13) وفي قمة الابواغ توجد ندب طرفية تشير إلى نقطة ارتباط الابواغ ببعضها (10) .

ويعتمد تصنيفها مظهريا على الشكل الظاهري وتطور الابواغ (conidia) وشكلها ووجود المنقار أو عدم وجوده وطوله (7)، لغرض التشخيص الدقيق للفطر لابد من الدراسة الجزيئية للفطر على المستوى الوراثي ودراسة الحامض النووي الرايبوزي DNA اذ تمت دراسة الـ DNA باستخدام تقنية الـ PCR (Polymerase Chain Reaction) (8).

2- 1 –المواد وطرائق العمل

2-1 اختبار القدرة الامراضية على بذور الرشاد في الوسط الزرعي WA

اجريت هذه التجربة لمعرفة تأثير القدرة الامراضية للعزلات الفطرية AM1 و AM2 و AB و AK على نسبة الإنبات في بذور الرشاد ، لقحت اطباق حاوية على WA بعزلات الفطر *A.alternata* كلا على انفراد حضنت المزارع لمدة ثلاثة ايام بدرجة حرارة 25 ± 2°م بعدها زرعت تلك الأطباق ببذور الرشاد المعقمة سطحيا و استخدمت 25 بذرة/ طبق و باربعة مكررات لكل عزلة مع معاملة مقارنه غير حاوية على الفطر وبعدد المكررات نفسها ووضعت في الحاضنة لحين اكتمال انبات البذور في المقارنة وبدرجة حرارة 25 ± 2° م بعدها تم حساب النسبة المئوية للبذور النابته باستخدام المعادلة التالية :

$$\text{النسبة المئوية لإنبات البذور} = \frac{\text{عدد البذورالنابتة}}{\text{العدد الكلي للبذور}} \times 100$$

واستخرجت النسبة المئوية للتثبيط باستخدام المعادلة التالية :

$$\text{النسبة المئوية للتثبيط} = \frac{\text{عدد البذورالنابتة في المقارنة} - \text{عدد البذور النابتة في المعاملة}}{\text{عددالبذورالنابتة في المقارنة}} \times 100$$

2-2 اختبار المقدرة الامراضية على بذور الطماطة في الوسط الزرعي WA

اجريت هذه التجربة لمعرفة تأثير المقدرة الامراضية للعزلات الفطرية AM1 و AM2 و AB و AK على نسبة الإنبات في بذور الطماطة ،كررت نفس التجربة 2-1 ولكن باستبدال بذور الطماطة بدلا عن بذور الرشاد وبعدها تم زراعة اطباق حاوية على عزلات *A.alternata* بعمر ثلاثة ايام ببذور الطماطة المعقمة سطحيا ، استخدمت 25 بذرة / طبق و باربعة مكررات لكل عزلة مع معاملة مقارنة غير حاوية على الفطر وبعدد المكررات نفسها ووضعت في الحاضنة لحين اكتمال انبات البذور في المقارنة وبدرجة حرارة 25 ± 2° م بعدها تم حساب البذور النابتة ومنها استخرجت النسبة المئوية لانبات البذور والنسبة المئوية للتثبيط كما في الفقرة 2-1 واستخدم تصميم CRD في التجربة بعدها حللت النتائج وقورنت احصائيا باستخدام برنامج SAS للتحليل الاحصائي.

2-3 استخلاص الحامض النووي DNA و تنقيته

حسب المعلومات المأخوذة من شركة Biobasic لاستخلاص DNA الفطريات من الغزل الفطري لعزلات الفطر *A.alternata* بعد تنمية العزلات على وسط PSB السائل وكما ياتي :

استخدم الـ Kit الخاص باستخلاص DNA من الفطريات والمجهز من شركةBiobasic وتمت عملية الاستخلاص حسب الخطوات التالية :

1- بعد تجفيف الغزل الفطري على ورق نشاف تم سحقه باستخدام النايتروجين السائل .

2- اضافة 180 ميكروليتر من Universal Digestion Buffer و20 ميكروليتر من انزيم Proteinase K الى العينة ورج رجا خفيفا باستخدام جهازالهزاز الكهربائي Vortex ، ثم الحضن في حرارة 56°م لمدة 30-60 دقيقة.

3- اضافة 100 ميكروليتر منUniversal Buffer PF مع الرج والحضن في -20 °م.

4- اجراء طرد مركزي بسرعة 12000دورةادقيقة لمدة 5 دقائق تحت درجة حرارة الغرفة ،بعدها نقل الرائق الى انبوبة Eppendrof نظيفة .

5- اضافة 200 ميكروليتر من Universal Buffer BD للرائق ثم الرج بجهاز Vortex.

6- اضافة 200 ميكروليتر من الكحول الاثيلي بتركيز 96-100 % ثم الرج بجهاز Vortex .

7- نقل الخليط الى اعمدة EZ-10 الموضوعة في انبوبة جمع واجري طرد مركزي بسرعة 12000دورةادقيقة لمدة دقيقة ، وتم التخلص من الراشح .

8- اضيف 500 ميكروليتر من Universal PW Solution واجري طرد مركزي بسرعة 12000دورةادقيقة لمدة دقيقة ، وتم التخلص من الراشح .

9- اضيف 500 ميكروليتر من Universal Wash Solution واجري طرد مركزي بسرعة 12000دورةادقيقة لمدة دقيقة ، وتم التخلص من الراشح، واجري طرد مركزي بسرعة 12000دورةادقيقة لمدة دقيقتين لاجل تجفيف الفلتر الحاوي على الحامض النووي الموجود في اعمدة EZ-10 والتخلص من بقايا الكحول الاثيلي.

10- تم نقل اعمدة EZ-10 الى انبوبة Eppendrof نظيفة ثم اضيف 100 ميكروليتر من محلول TE وترك لمدة 1دقيقة تحت حرارة المختبر، واجري طرد مركزي بسرعة 12000دورةادقيقة لمدة دقيقة لاجل انزال الحامض النووي من اعمدة EZ-10 الى انبوبة Eppendrof وان تسخين TE Buffer الى 60 °م يزيد من كفائته في انزال الحامض النووي .

4-2 الكشف عن الحامض النووي منقوص الاوكسجين DNA

اضيف 100 ميكروليتر من محلول ال DNA الى 10 مل من محلول الاذابة TE وقدر امتصاص المحلول للضوء فوق البنفسجي على الطولين الموجيين 260 و280 نانومتر في جهاز قياس الطيف الضوئي Specterophotometer ، وقدر تركيز ال DNA في المحلول وفق الاتي :

تركيز الـ DNA ملغم /مل = مقدار الامتصاص على الطول الموجي 260 نانومتر في 1 مل من حجم العينة × مقلوب التخفيف ×50 /100

وقدرت نقاوة الـ DNA وفق المعادلة

$$\text{نقاوة الـ DNA} = \frac{\text{مقدار الامتصاص على الطول الموجي 260 نانومتر}}{\text{مقدار الامتصاص على الطول الموجي 280 نانومتر}} \quad (15).$$

2-5 طريقة عمل تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction

استخدمت تقنية PCR لتضخيم القطعة الجينية aa-hsp-f1/aa-hsp-r1 المستخدمة في الدراسة باستخدام البرايمر (البادئ) المذكور في الجدول 1، حيث اجريت طريقة العمل بحجم 20 ميكروليتر كما موضح في الجدول 2 ، حسب (11) مع التحوير.

الجدول 1،البرايمر المستخدم بالدراسة :

Primer	Nucleotide sequence (5`-3`)	Length (BP)	Tm(c^o)	Size of product
Forward p.	ATCTCTGCTAAGAACGCTCTCG	22	62	(BP)18
Reverse p.	GCTGAGACTCGTACTCGTCCTT	22	64	

الجدول 2 ، مواد تفاعل PCR

المواد	الحجم بالميكروليتر
Master Mix	الانبوبة
Primer Forward	1
Primer Reverse	1
DNA	1
Free Water	اكمل الحجم الى 20
Total	20

بعد اكمال الاضافات جميعها طردت العينات مركزيا بوساطة جهاز الطرد المركزي الخاص بانابيب PCR ونقلت الى جهاز البلمرة الحرارية وضبط الجهاز على البرنامج التالي في الجدول 3.

الجدول 3 ، برنامج جهاز PCR

ت	خطوات الجهاز	درجة الحرارة	الزمن	عدد الدورات
1	Initial Denaturation	94	1 min	1
2	Denaturation	94	30 sec	40
3	Annealing	62	30 sec	
4	Extention	72	1 min	
5	Final Extention	72	5 min	1

6.2. – الترحيل الكهربائي لنواتج PCR :

استخدمت تقنية الترحيل الكهربائي Electrophoresis باستعمال هلام الاكاروز بتركيز 1% لكشف نواتج PCR وكانت المواد المطلوبة لذلك هي:

1- Agarose .

2- TBE Buffer .

3- Ethedium bromide .

4- DNA Marker.

وتم الترحيل حسب طريقة (15)

أ – تحضير المواد :

1- 10X – TBE (Tris- Base-EDTA 10X) حضر من المواد التالية:

المواد	الكمية
EDTA	9.3 gm
Tris- Base	108 gm
Boric acid	55 gm
D H_2O	To 1L
pH	8

و للحصول على TBE-1X يؤخذ90 مل ماء مقطر ويضاف له 10 مل من TBE-10X .

2- صبغة الاثيديوم بروميد : تم اخذ 0.25 من المسحوق في 5 مل ماء مقطر ثم رج Vortex .

3- تحضير هلام الاكاروز Agarose gel :

- وضع 100 مل من TBE-1X في دورق زجاجي .
- اضيف 1 غم من الاكاروز .
- وضع الخليط على Water –bath لحد ذوبان المكونات .
- رفع الهلام من التسخين وترك ليبرد حتى 50-60 ْم .
- اضيفت صبغة الاثيديوم بروميد كمية 3 ميكروليتر .

ب- تحضير قالب هلام الاكاروز :

- وضع المشط في احدى نهايتي القالب .
- صب الهلام بعد سد نهايتي القالب ثم ترك ليبرد بدرجة حرارة المختبر .
- وضع القالب في تجويف جهاز الترحيل بعد رفع المشط عن قالب الهلام بعناية ثم يملأ تجويف الجهاز بمحلول TBE-1X .

ت- تحميل DNA على قالب هلام الاكاروز :

- تم مزج عينات DNA مع صبغة DNA Loading Dye ثم وضع المزيج في حفر الهلام .
- شغل جهاز الترحيل وجهز بتيار كهربائي بفرق جهد 100 فولت لحين سريان الصبغة الى الجانب الآخر من قالب الهلام.
- بعد اكتمال الترحيل وضع الهلام على جهاز الاشعة فوق البنفسجية UV وفحصت حزم DNA وقدر وزنها الجزيئي بالمقارنه مع DNA الدليل ،ثم صور الهلام بوساطة الة التصوير.

3. التحليل الاحصائي

استخدمت تجارب عامليه بالتصميم العشوائي CRD (Completely Randomized Design) وحللت النتائج باستخدام اختبار اقل فرق معنوي LSD(Least Significant Defferentation) وعلى مستوى احتمالية 0.05 باستخدام برنامج SAS للتحليل الاحصائي .

4- النتائج والمناقشة

4-1 اختبار المقدرة الامراضية لعزلات الفطر *A.alternata* على بذور الرشاد والطماطة على الوسط الزرعي .W.A

اظهرت النتائج في الجدول 4، ان جميع عزلات الفطر *A.alternata* اثرت في النسبة المئوية لانبات بذور الرشاد واختلفت جميع هذه المعاملات معنويا عن معاملة المقارنة والتي بلغت النسبة المئوية لإنبات البذور فيها 87.50 % وتفوقت العزلة AM2 معنويا عن باقي المعاملات وكانت نسبة المئوية لانبات بذور الرشاد فيها 0% والتي كانت نسبة التثبيط فيها 100% تليها العزلة AB وكانت نسبة الانبات فيها 4.4% ونسبة التثبيط 94.97 % واختلفت معنويا عن العزلةAM1 والتي بلغت نسبة الانبات فيها 8.86 ونسبة التثبيط 89.87 % واظهرت العزلة AK اقل العزلات امراضية على بذور الرشاد وبلغت 60% ونسبة التثبيط فيها 31.42 % ، وقد يعزى السبب في اختلاف العزلات فيما بينها في خفض النسبة المئوية لانبات بذور الرشاد الى اختلافها في افرازها العديد من الانزيمات وكذلك السموم التي تسبب تلف البذور او قلة نموها ومن اهم هذه السموم Alternariol (AOH) وAlternariol mono Methyl Ether (AME) و AAL وAK وهذه السموم تؤثر على الخلايا وتحدث تلون فيها (18 و2).

واظهرت النتائج في نفس الجدول ، ان عزلتي الفطر *A.alternata* وهما AB وAM2 سجلتا اقل نسبة مئوية لانبات بذور الطماطة والتي كانت 0% وكانت نسبة التثبيط لتلك العزلتين 100% واختلفتا معنويا عن العزلتين AK وAM1 والتي كانت نسبة انبات البذور فيها 83.66 و73.33 % على التوالي وكانت نسبة التثبيط فيها 12.12 و22.9% على التوالي واختلفت معنويا عن معاملة المقارنة والتي كانت نسبة انبات بذور الطماطة فيها 95.2% وهذه النتائج تتفق مع ما توصل اليه (16و6) في ان الفطر *A.alternata* يسبب انخفاض في النسبة المئوية للانبات بالبذور بسبب إفرازه المركبات السامة التي تؤثر على انبات البذور وبعضها

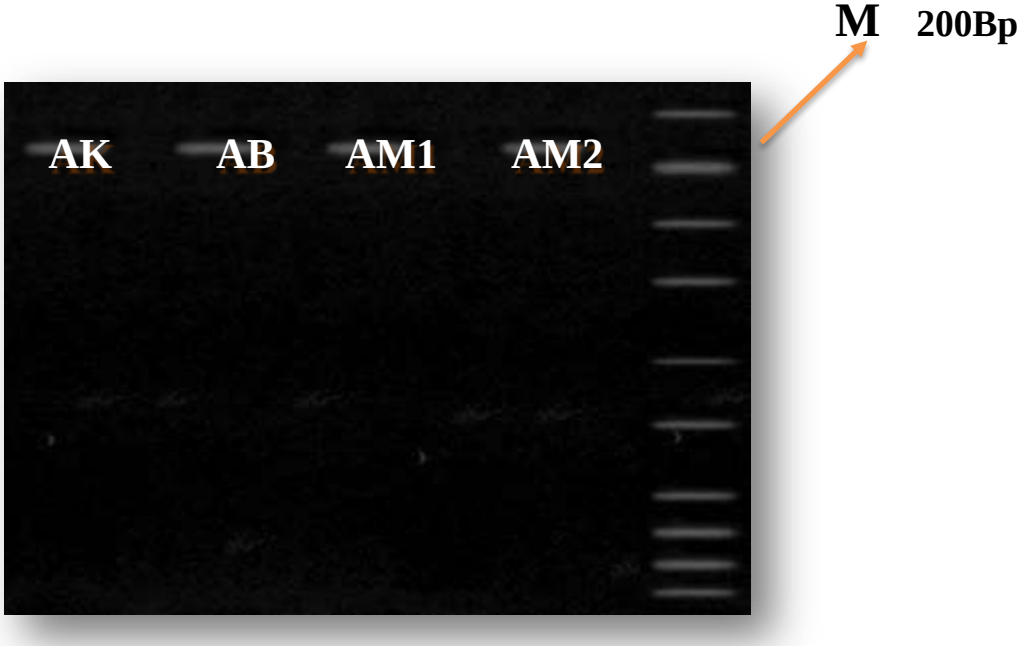
يسبب موت البادرات من خلال تحلل خلايا وتلف جدرانها وتلونها وهذا بالاضافة الى التغيرات الكيميائية التي يحدثها في انسجة الخلايا وهذا السبب في انخفاض النسبة المئوية للانبات .

الجدول 4: النسبة المئوية لانبات بذور الرشاد والطماطة المعاملة بعزلات مختلفة من الفطر *A.alternata*

العزلات الفطرية	النسبة المئوية لانبات بذور الرشاد	النسبة المئوية للتثبيط	النسبة المئوية لانبات بذور الطماطة	النسبة المئوية للتثبيط
المقارنة	87.50		95.2	
AK	60	31.42	83.66	12.12
AM1	8.86	89.87	73.33	22.9
AB	4.4	94.97	0	100
AM2	0	100	0	100
$LSD_{(0.05)}$	3.75	3.75	0.75	0.75

4 -3 تشخيص عزلات الفطر جزيئيا باستعمال تقانة الPCR

اجري اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل لاربعة عزلات تابعة للفطر *A.alternata* واظهرت النتائج ان العزلات تم التاكد من تشخيصها جزيئيا واظهرت النتائج عند الموقع 180 Bp.



الشكل1، الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لناتج التضاعف اربعة حزم من الـ DNA بنفس الحجم (181 قاعدة نايتروجينية) مضاعفة من عزلات الفطر *A. alternate* بأستعمال البرايمرات aa-hsp-f1/aa-hsp-r1. (M= marker ، AK, AB , AM1 , AM2 =عزلات الفطر *A. alternate*)

واظهرت العزلات نتيجة موجبة باستخدام البادئ الخاص ضمن الموقع 180Bp وهذا يجعل النتيجة مؤكدة ومتوافقة مع تشخيص الفطر مظهريا وهذه تتوافق مع ماذكره (11) عند استخدام نفس البادئ الذي ذكر انها تقع ضمن المدى 200 Bp .

المصادر

1- البهادلي ، علي حسين ، اياد عبد الواحد الهيتي ، محمد بديع الهيتي ومعتصم سعيد الوتار. 1986.اصابة ثمار الطماطة بالفطر *Alternaria alternata* والسموم التي تفرزها. المؤتمر العلمي الرابع لمجلس البحث العلمي. وقائع البحوث الزراعية للفترة 23-28 تشرين الاول. (3):1531-1537.

2- الخيرو ،انور نوري والداوودي ،اياد جاجان .2010. التشخيص الكروموتوغرافي لبعض دفاعا الزيتون *Olea europaea* المستحثة بسموم الفطر *Alternaria conjuncta* Simmons . مجلة الموصل للعلوم الزراعية .

3- عبد الرزاق ، جنان خزعل . 1997 . دراسات في مرض تقرح ساق الطماطه المتسبب عن الفطر *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler f.sp. *lycopersici* . رسالة ماجستير . كلية الزراعة جامعة بغداد .

4- مطلوب ، عدنان ناصر و عز الدين سلطان و كريم صالح عبدول . 1989. أنتاج الخضروات. الجزء الثاني ، مطبعة التعليم العالي جامعة الموصل ، 373 صفحة.

5- Abkhoo , J. and Sabbagh, S. K. 2014. Evidence of *Alternaria alternata* Causing Leaf Spot of *Aloe vera* in Iran. Phytopathology. 162: 516–518 .

6- Akamatsu, H., Taga, M., Kodama, M., Johnson R., Otani, H., Kohmoto, K.1999. Molecular karyotypes for *Alternaria* plant pathogens known to produce host-specific toxins . Curr Genet. 35: 647–656 .

7- Barnett,H.L.and Hunter,B.B.1972.Illustrated genera of Imperfect Fungi .Burgess publishing company minneepolis,Minnesota. Third edition.pp:241.

8- Lievens,B.; M. Brouwer; A. C. R. C.Vanachter;C. A .Lévesque; B. P. A. Cammue andB. P. H. J Thomma. 2005. Quantitative assessment of phytopathogenic fungi in various substrates using a DNA macroarray, Jornal of Environmental Microbiology, 7: 1698–1710.

9- Miller, J . D . and Trenholm , H . L . 1994 . Mycotoxin in grains . Eagam Press . St . Poul . Minesota . USA .552 PP .

10- Misaghi, I. J., R. G. Grogan, J. M. Duniway, and K. A. Kimple. 1978. Influence of environment and culture media on spore morphology of Alternaria alternata. Phytopathology 68: 29-34.

11- Mmbaga , M.T., Shi , A., and Kim, M. .2011. Identification of Alternaria alternata as a Causal Agent for Leaf Blight in Syringa Species. Plant Pathol. 27 : 120-127.

12- Morris , P . F .; Mary , S . C .; Dina , A . and Clair , S . T . 2000 . Genetic diversity of *Alternaria alternata* isolated from tomato in California assessed using RAPDs . Mycological Resrarch . 104 : 286 – 292.

13- Neergaard, P. 1945.Danish Species of *Alternaria* and *Stemphylium*. London, UK: Oxford University Press.

14- Nowicki, M., Akowska, M., Niezgoda, A.,and Kozik, E.U. 2012. Alternaria Black Spot of Crucifers: Symptoms, Importance of Disease, and Perspectivitys of Resistance Breeding . Institute of Horticulture .76: 5-19.

15- Sambrook, J., Fritschi, E.F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning, a Laboratory manual 3rd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, , New York, USA.

16- Wagh,P.,Khare,U.Batta,J.andSahu,D.K.2012.Invitro selection against *Alternaria alternata* causing leaf spot of chadrasur throutoxic metabolites. 3rd national sympiosm on agriculture production and protection in context of climate change at Birsa agriculture University ,Ranchi.

17- Warner ,J.S.2012.Tomato disease .Manson publishing .UK.pp.688.

18- Woudenberg, J.H.C., Groenewald, J.Z., Binder, M. and Crous, P.W.2013. *Alternaria* redefined. Studies in Mycology 75: 171–212.