التنميط الجزيئي لبعض عزلات الفطر *Pythium aphanidermatum* المأخوذة من مناطق مختلفة من ترب محافظة النجف الاشرف الزراعية

علي عاجل الحيدري*
قسم وقاية النبات-كلية الزراعة- جامعة المثنى- جمهورية العراق

مجيد متعب ديوان
قسم وقاية النبات-كلية الزراعة-جامعة الكوفة- جمهورية العراق

المستخلص

شملت الدراسة عزل وتشخيص انواع الفطر *Pythium* spp. من ترب محافظة النجف الاشرف ، حيث تم عزل وتشخيص 5 اجناس فطرية مختلفة من مناطق الدراسة وهي : بحر النجف والحساوية والبراكية والحيدرية وخان الربع والمشخاب والعباسية والمزرعة الارشادية في الكوفة وللفترة الربيعة لعام 2013.

أظهرت نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام زوج البادئات المتخصص للفطر *P.aphanidermatum* وتحليل ناتج الهجرة الكهربائية باستعمال الاجاروز بتركيز 1.5% ظهور حزم للعزلات (A، B، C، D، E، F، G، H، I، J، K، L) التي تؤكد تشخيص الفطر *P.aphanidermatum* . وجد من ناتج الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز أن جميع البادئات قد تفاعلت مع عزلات *P. aphanidermatum* ونجح كل بادئ وراثي في التمييز بين جميع العزلات حيث ظهرت الحُزم متعددة الأشكال Polymorphic band وبنسبة 100% مع جميع العزلات . أعتمدت تقنية مؤشرات التضاعف العشوائي متعدد الأشكال (RAPD) لسلسلة الحامض النووي منقوص الأوكسجين DNA لتحديد بصمة DNA لاثني عشر عزلة من النوع *P. aphanidermatum* إذ تم تعريض DNA إلى اربع بادئات التضاعف العشوائي وهي P1 و P2 و P3 و P4 حيث تمكنت من إنتاج عدد من الحزم بلغ 131 حزمة حيث سجل 18 حزمة في للبادئ الوراثي الأول (P1) و32 حزمة في البادئ الوراثي الثاني (P2) و40 حزمة في البادئ الوراثي الثالث (P3) و41 حزمة في البادئ الوراثي الرابع (P4) .

الكلمات المفتاحية : *Pythium aphanidermatum* ، تفاعل البلمرة المتسلسل PCR ، البادئ الوراثي

* البحث جزء من اطروحة دكتوراه للباحث الاول

Molecular identification for some *Pythium aphanidermatum* isolates from different fields of An-Najaf Al-Ashraf governorate

*Ali Ajil Al-Haidery
Department of plant protection-faculty of Agriculture-University of Al-Muthanna-Republic of Iraq

Majeed Mete'b Dewan
Department of plant protection-faculty of Agriculture-University of Kufa- Republic of Iraq

Abstract

The aim of the study included the isolation and identification of *Pythium* species depend on phenotypic biotechnique on culture media and test it's pathogenicity and identification isolates of *P. aphanidermatum* by molecular test and genotype by using PCR technique from soils of some locations of Najaf province. Five fungal genera were isolated and identified from: Baher Al-Najaf, Al-Hasaweya, Al-Barakia, Al-Haiderya, Khan Al-Rube', Al-Mushkhab, Al-Abbassia and extension farm in Kufa/Al-Najaf for spring 2013.

The results of the polymerase chain reaction (PCR) by using a pair primers specialist for *P.aphanidermatum* and analyze the results of immigration electric using agarose concentration of 1.5% the appearance of bands of isolates A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L which ensure the identification of *P.aphanidermatum* . It turns out the result of the migration to the electric gel Agarose that all primers have interacted with isolates of *P. aphanidermatum* and succeeded each primers to identify all isolates where appeared polymorphic band and 100% with all of the isolates. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) adopted to identify the fingerprint DNA of twelve isolates of *P. aphanidermatum* having been exposing DNA to four primers (P1, P2, P3 and P4) was able to produce a number of bands reached to 131 where recorded 18, 32, 40 and 41 bands in P1, P2, P3 and P4 primers respectively.

Keyword : *Pythium aphanidermatum* , polymerase chain reaction (PCR) , primers

* Part of PhD dissertation of the first author.

المقدمة

يعـود الفطـر *Pythium* Pringsh إلـى مملكـة Kingdom : Straminpila صـف الفطريات البيضية Oomycetes رتبة Pythiales عائلة Pythiaceae (4 و22) ، ويضم هذا الجنس اكثر من 200 نوع منتشرة في أنحاء العالم (11 و16). وتوجد انواع هذا الفطر أما مترممة في الترب او مخلفات الانسجة الميتة أو المياه وكذلك يوجد كمتطفل على مختلف النباتات المائية والارضية والطحالب المائية والفطريات والفقريات واللافقريات (17) . وتعد بعض انواع الفطر *Pythium* من المسببات المهمة لمرض تعفن البذور وموت البادرات حيث انه يصب العديد من المحاصيل المهمة (7).

إن الخصائص المظهرية والمجهرية هي أساس تشخيص أنواع الفطر *Pythium* إلا أن هذه الطرائق التشخيصية أصبحت غير كافية ما لم تكن مدعومة بالطرائق الجزيئية المعتمدة على الحامض النووي DNA خصوصا في الفطريات ذات الأهمية الكبيرة إذ إن نتائجها دقيقة ولا تتأثر بالتغيرات البيئية (10 و21) ، وتعد تقنية (Polymerase Chain Reaction) PCR للكشف عن الفطر *P.aphanidermatum* من أهم التطبيقات المعتمدة حالياً في التشخيص وذلك للتغاير العالي لهذا الفطر في البيئات والأوساط المختلفة كما إن تقنية RAPD-PCR تستخدم في تعريف وتوصيف الأنواع والسلالات والتراكيب الخاصة بالفطريات الممرضة للنبات فإن تقنية الـ RAPD تشكل إمكانية الإجابة عن الكثير من التساؤلات المتعلقة بخصوص العائل والمنطقة الجغرافية والقدرة الإمراضية للعزلات ، ودراسة احتمالية وجود تباينات وراثية في جنس معين باستخدام بادئات عشوائية في تفاعل التكبير العشوائي RAPD (2 و9 و 18 و15 و 23) . لذلك تمحورت الدراسة في عزل وتشخيص الفطر *P.aphanidermatum* المتواجد في ترب بعض الحقول الزراعية في محافظة النجف الاشرف وتشخيصها باستخدام طريقة PCR .

المواد وطرائق العمل

1. اختيار المناطق المشمولة بالمسح الميداني للفطر *Pythium* sp. لمحافظة النجف الاشرف :

تم اختيار عدة مناطق متنوعة في محافظة النجف الاشرف، وهي مناطق زراعية ومستمرة بزراعة المحاصيل والخضر المتنوعة الصيفية والشتوية ، والمناطق كما موضحة بالجدول (1).

2. عزل الفطر *P. aphanidermatum* من المناطق المدروسة :

استعملت ثمار الخيار كوسط طبيعي للحصول على عزلات نقية للفطر ، تم عمل 3 جروح في الثمرة بعمق 2 – 3 سم بواسطة مشرط معقم باللهب لكل مرة ، وأخذ جزء من عينة التربة بحدود نصف غرام أو متبقيات نباتية ووضع داخل الشق في الثمرة ثم وضعت الثمار داخل أكياس من البولي اثيلين المعقمة ووضعت في الحاضنة في درجة حرارة 25±2°م ، وبعد 3 أيام ظهر نمو فطري على سطح الثمرة . تم اخذ عينة من الغزل الفطري النامي على ثمار الخيار ونقلها الى اطباق بتري حاوية على الوسط الغذائي PSA . شخصت العزلات التابعة للفطر المعزولة في هذه الدراسة بمساعدة الاستاذ الدكتور مجيد متعب ديوان اعتمادا على الصفات التصنيفية الواردة في Plaats-Niterink (17) .

جدول (1) المناطق الزراعية المشمولة بالمسح ونوع المحصول المزروعة فيها

ت	المنطقة		المحاصيل التي تزرع فيها	pH	EC
1	ترب رملية	الحيدرية (خان النص)	طماطة ، باذنجان ، بصل ، كرفس ، ريحان ، كراث	5.7	4.66
2		خان الربع	كرفس ، ريحان ، كراث ، بقدونس	6.0	4.35
3	تربة مزيجية رملية	الشواطي (بحر النجف)	كرفس ، ريحان ، فجل ، رشاد ، كراث	5.3	4.26
4		الكوفة قرب البراكية	كرفس ، فجل ، سلق ، ريحان	6.0	5.53
5	طينية	المشخاب	شلب ، شعير ، حنطة	6.2	1.76
6		العباسية	شلب ، شعير ، حنطة	6.6	1.03
7	مزيجية	الحساوية	كرفس ، ريحان ، رشاد	5.8	6.7
8	رملية	المزرعة الارشادية / الكوفة	باذنجان ، خيار ، طماطة	5.8	5.33

3. تعزيـــز تشـــخيص الفطـــر *P. aphanidermatum* باستعمال تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي Polymerase chain reaction (PCR)

تم تنفيذ هذه الدراسة في مختبر التقانات الحيوية في قسم الثروة الحيوانية/ كلية الزراعة/ جامعة القاسم الخضراء .

4. طريقة استخلاص DNA

تـــم تنقيـــة 12 عزلـــة مـــن الفطـــر *P.aphanidermatum* وذلك بتنميتها في أطباق بتري تحوي الوسط الغذائي P.D.A. لمدة 7 أيام , قشطت مستعمرات الفطر باستخدام شفرة معقمة من دون أخذ أي كمية من الأكار واخذ من 100- 500 ملغم غزل فطري , وضعت في أنابيب مخصصة لهذا الغرض Eppendrof tube تحت ظروف معقمة .

وضعت العزلات في المجمدة لمدة 48 ساعة عند درجة حرارة -22º م ± 2 , تم هرس العينات في داخل الأنابيب بوساطة micro pestle لمدة 5 دقائق (1) . واستعملت عدة الاستخلاص المجهـــزة مـــن شـــركة (BioBasic Incorporation/Korea) وهي عدة متخصصة لعزل genomic DNA من الفطريات.

5. المحاليل والمواد المستعملة في تقنية PCR

1. محلول TE buffer مجهز من شركة Promega الأمريكية .
2. البادئـات primers المبينـة تتابعهـا فـي الجدول (2) والمجهزة من شركة Bioneer .

6. Ladder المســتخدم فــي الدراســة Marker DNA يتكـون Ladder مـن 13 قطعـة DNA مـزدوج الخـيط بحجـم 50 زوجـا قاعـدا (bp) مـن شـركة Promega/USA.

7. المحاليل والمواد المستعملة في عملية الترحيل الكهربائي

تم اجراء الترحيل الكهربائي Electrophoresis باســتعمال هــلام الاكــاروز وفقــاً لمــا ذكــره Sambrook وآخـــرون (19) وSambrook و Russell (20) للكشف عن نواتج PCR , المواد المستعملة :

1. محلـول TBE solution مجهـز مـن شـركة Promega الأمريكية
2. الاكـاروز Agarose مـن شـركة Norgen Biotechnology
3. 50 bp DNA Ladder مجهـز مـن شـركة Promega

8. التمييـــز بـــين عـــزلات الفطـــر *P. aphanidermatum* بطريقـــة Random (RAPD) Amplified Polymorphic DNA طبقت العمليات ذاتها المستعملة في تشخيص الفطر *P.aphanidermatum* للتمييـز بـين العـزلات بطريقـة RAPD مـع بعـض التغييـرات . فقـد استعملت بادئات عشوائية موضحة في الجدول (4)

ملـئ حـوض الترحيـل الكهربـائي بمحلـول TBE solution المخفـف 10% بالمـاء المقطـر حتـى غُطيَ الهلام بمقدار 3 ملم ربط القطب السالب قرب حفر الهلام وصل التيار الكهربائي على درجة 80 volt لمدة ساعة . نقل الهلام إلى وحدة التصوير علـــى الأشـــعة فـــوق البنفســـجية U.V.- transilluminator لملاحظة الحزم الناتجة من ترحيل DNA صورت بوساطة الكاميرا المحمولة فوق وحدة الأشعة فوق البنفسجية .

جدول (2) البرايمرات المستعملة لإثبات تشخيص الفطر *P .aphanidermatum*

P.a	البادئان	Nucleotide Sequence	الناتج
Specific primers	Forward	5'CTGTTCTTTCCTTGAGGTG 3'	163 bp
	Reverse	5'GCGCGTTGTTCACAATAAATTGC 3'	

ادخل البرنامج الموضح في الجدول (3) لتأكيد تشخيص الفطر *P.aphanidermatum* في جهاز PCR .

جدول (3) البرنامج المستعمل في تأكيد تشخيص الفطر *P.aphanidermatum*

عدد الدورات	المرحلة	الدرجة الحرارية	المدة
1 cycle	Initial Denaturation	95 مº	3min
35 cycles	Denaturation	95 مº	1 min
	Annealing	60مº	1 min
	Extension	72 مº	2 min
1 cycle	Final Extension	72 مº	10 min

حسب ما ذكره Asano (3) ، بعد إدخال البرنامج أعطي الجهاز تحضين لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة 95 مº

جدول (4) البادئات العشوائية المستعملة في (RAPD)

رمز البادئ	Nucleotide Sequence
P1	5'- GGGCGCCTAG -3'
P2	5'- CACGGCGAGT- 3'
P3	5'- CGCGTTCCTG - 3'
P4	5' - AAGCCTCGTC -3'

تم حل البادئات حسب ما ذكر في الفقرة (5) وادخل البرنامج الموصوف في الجدول (5) في جهاز PCR .

جدول (5) البرنامج المستعمل للتمييز بين عزلات الفطر *Pythium aphanidermatum* بطريقة RAPD حسب الطريقة الموصوفة من قبل Kumar (8)

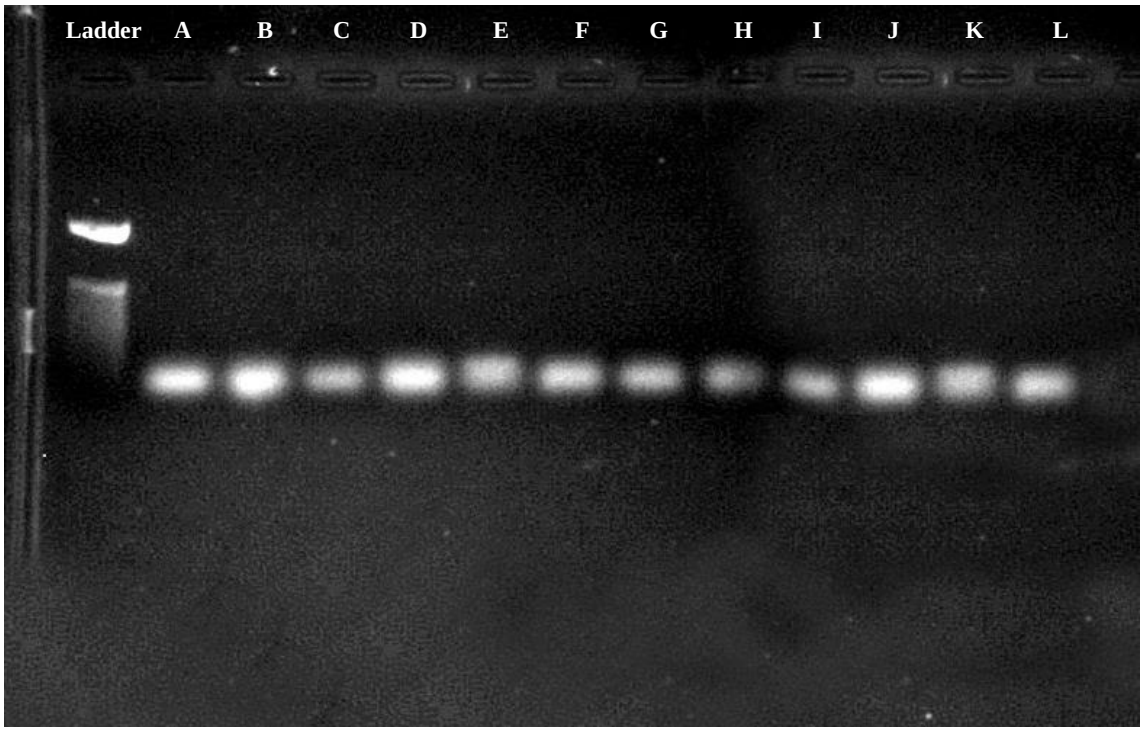
عدد الدورات	الغرض من العملية	الدرجة الحرارية	الوقت
1 cycle	Initial Denaturation	94 مº	4 min
30 cycles	Denaturation	94 مº	1 min
	Annealing	34 مº	2 min
	Extension	72 مº	2 min
1 cycle	Final Extention	72 مº	1 min

النتائج والمناقشة

1. تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR)

تـم اختيـار 12 عزلـة للفطـر *P.aphanidermatum* بعد تشخيصـها مظهريـاً، وهذه العزلات تمثل مناطق الدراسة الثمانية وهي : بحر النجف (C and G)، الحساوية (J and K)، البراكية (F and H)، الحيدرية (D and L)، خان الربـــع (E)، المشـــخاب (A)، العباســـية (B) والارشادية (I).

أظهـرت نتـائج تفاعـل البلمـرة المتسلسـل باسـتخدام زوج البادئـــــات المتخصـــــص للفطـــــر *P.aphanidermatum* وتحليـل نـاتج الهجـرة الكهربائيـة باسـتعمال الاجـاروز بتركيـز 1.5% ظهور حزم للعزلات (A ، B ، C ، D ، E ، F ، G ، H ، I ، J ، K ، L) التـي تؤكـد تشـخيص الفطـر *P.aphanidermatum* صـورة (1) إذ كانت بحجم 163bp وهذا هو الحجم المتوقع الذي ينتجـه هـذا الـزوج مـن البادئـات مـع DNA للفطـر *P.aphanidermatum*.



*P.aphanidermatum*صورة (1) ناتج الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لعزلات للفطر (A ، B ، C ، D ، E ، F ، G ، H ، I ، J ، K ، L)

ان هذه النتيجة متفقة مع ما توصل اليه كثير من البـاحثين مـن تخصـص البادئـات حيـث صـمم Wangوآخـرون(22) بـادئ فـي تكبيـر لمنطقـة) وهي ITS1 (Internal Transcribed Spacer لـ 34 نـوع من الفطر rDNAالمنطقة الداخلية لـ . واختبـر تخصـص هـذه البادئـات فـي *Pythium* Forward فـــي ITS4 أو ITS2المنطقتـــين حيـث حصـل البـاحثون علـى خمـس Reverseو انـواع متخصصـة مـن البادئـات أمـا البقيـة كانـت وحصـل *Pythium*متباينـة فـي تخصصـها لانـواع علـــى كشـــف متخصـــص للفطـــر *P.aphanidermatum* .

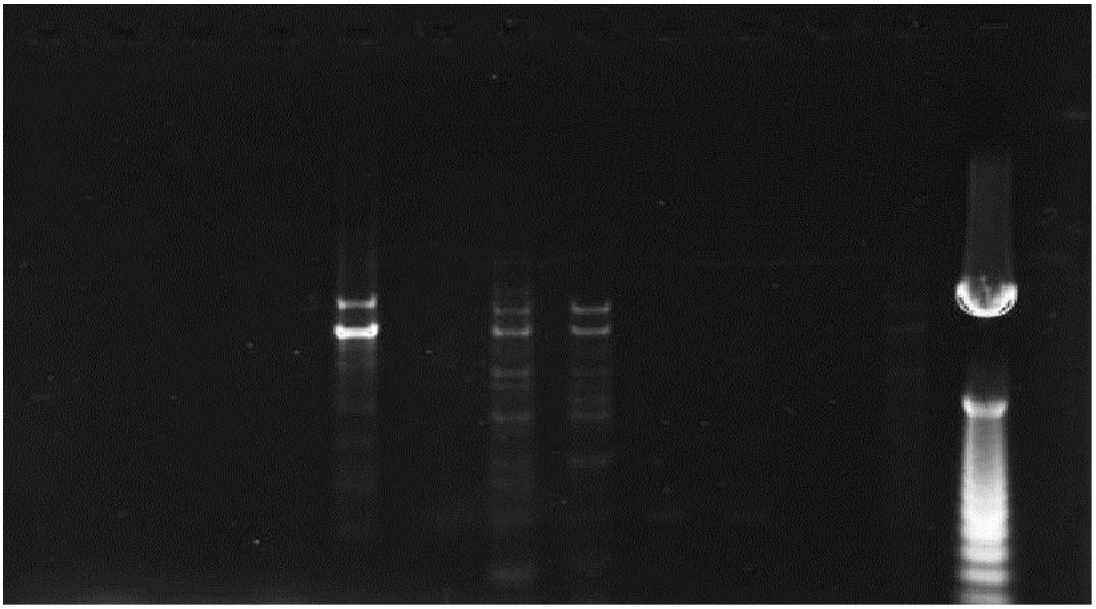
ووجـــد Alsaadi وآخـــرون (2007) ان الفطر *P. aphanidermatum* قد تم عزله من كل مواقـع دراسـته البـالغ عـددها 13 موقعـا فـي عمـان حيـث شـكل نسـبة 76% مـن مجمـوع 98 عزلـة *Pythium* ، بينمـا شـكلّ الفطـر *P. spinosum* نسبة 22% من 7 مواقع. وان جميع عزلات الفطر *P. aphanidermatum* قـد كانـت متشـابهة 100% عنـد تشخيصـها بواسـطة PCR . وحصـل Lodhi (12) ان هنـاك تطـابق 99-100% بـين عـزلات الفطـر *P. aphanidermatum* عنـد مقارنتهـا مـع العزلـة الموجـودة فـي البنـك الجينـي باستخدام بادئات لمنطقتي ITS 1 and 2 .

2. التضـاعف العشـوائي متعـدد الأشـكال لعـزلات الفطـر *P.aphanidermatum* باسـتعمال بادئـات عشـــوائية Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

اتضـح مـن نـاتج الترحيـل الكهربـائي لهـلام الاكاروز أن جميع البادئات قد تفاعلت مع عزلات *P. aphanidermatum* ونجح كل بـادئ وراثـي في التمييز بين جميع العزلات حيث ظهرت القطع متعـددة الأشـكال Polymorphic band وبنسـبة 100% مـع جميـع العـزلات . أعتمـدت تقنيـة مؤشـرات التضـاعف العشـوائي متعـدد الأشـكال (RAPD) لسلسـلة الحـامض النـووي منقـوص الأوكسـجين DNA لتحديـد بصـمة DNA لاثنـي عشر عزلات من النوع *P. aphanidermatum* إذ تم تعريض DNA إلـى اربـع بادئـات التضـاعف العشوائي وهي P1 و P2 و P3 و P4 حيث تمكنت من إنتاج عدد من الحزم بلغ 131 حزمة وقد سجلت نتـائج تحليـل RAPD بالنسـبة للبادئـاتP1 و P2 وP3 وP4 بالإعتمـاد علـى وجـود الحـزم أو غيابهـا وأعدادها وأوزانها الجزيئية وكانت بالشكل التالي :

1-2 البادئ الوراثي الأول P1

بلـغ عـدد الحـزم الناتجـة مـن الترحيـل الكهربائي لهلام الاكاروز عند ارتباط البادئ الأول مـع DNA العـزلات (A ، B ، C ، D ، E ، F ، G ، H ، I ، J ، K ، L) 18 حزمـة توزعـت بـين عدم ارتباط البـادئ مع كل من العزلات A و B و C و D و F و K وحزمـة واحدة للعزلات L وJ و I وأربع حزم للعزلـة E و خمس حزم للعزلة H و ستة حزم للعزلـة G . فيمـا تـراوح الـوزن الجزيئـي للحـزم الناتجـة مـن هذا البـادئ بـين 254.802 bp عائـد للعزلـة I و 796.664 bp عائـد للعزلـة E الموضح في الصورة (2) و الجدول (6) .



صورة (2) ناتج تفاعل الـRAPD لـ DNA عزلات الفطر *P.aphanidermatum* باستخدام البادئ الوراثي P1 مع العزلات حيث أن M = ladder

نجد من الجدول (6) هناك اختلاف واضح بين الأوزان الجزيئية لجميع الحزم الناتجة من ارتباط البادئ الأول مع عزلات الفطر *P.aphanidermatum* .

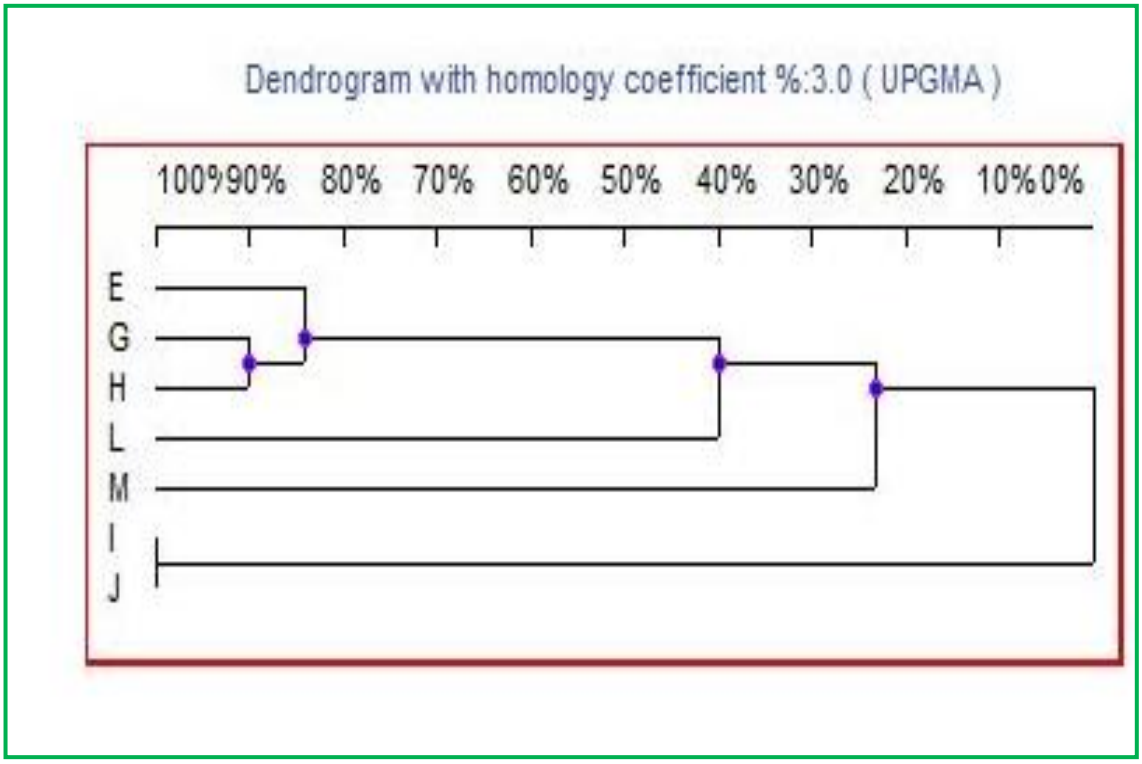
إن العلاقات بين العزلات تم تقييمها عن طريق تحليل مجموعة من البيانات استنادا إلى مصفوفة التشابه في شكل (1) حيث تم إنشاء Dendrogram بواسطة طرق تحليل تستعمل برنامج UV. I Band soft ware بالإستعانة بمعادلة القياس (UPGMA) واستنادا إلى النتائج التي حصل عليها من تطبيق البادئ الأول وجد أن جميع العزلات ممكن وضعها بأربع مجاميع : المجموعة الأولى تمثل العزلتين I و J إذ بلغت نسبة التشابه بينهما 100% , والمجموعة الثانية تمثل العزلتين G و H حيث كانت نسبة التشابه بينهما 90% , والمجموعة الثالثة تمثل درجة التشابه بين العزلة E مع المجموعة الثانية وقد بلغت 85% , والمجموعة الرابعة تمثل درجة التشابه بين العزلة L والمجموعة الثالثة والتي بلغت 40% .

2-2 البادئ الوراثي الثاني P2

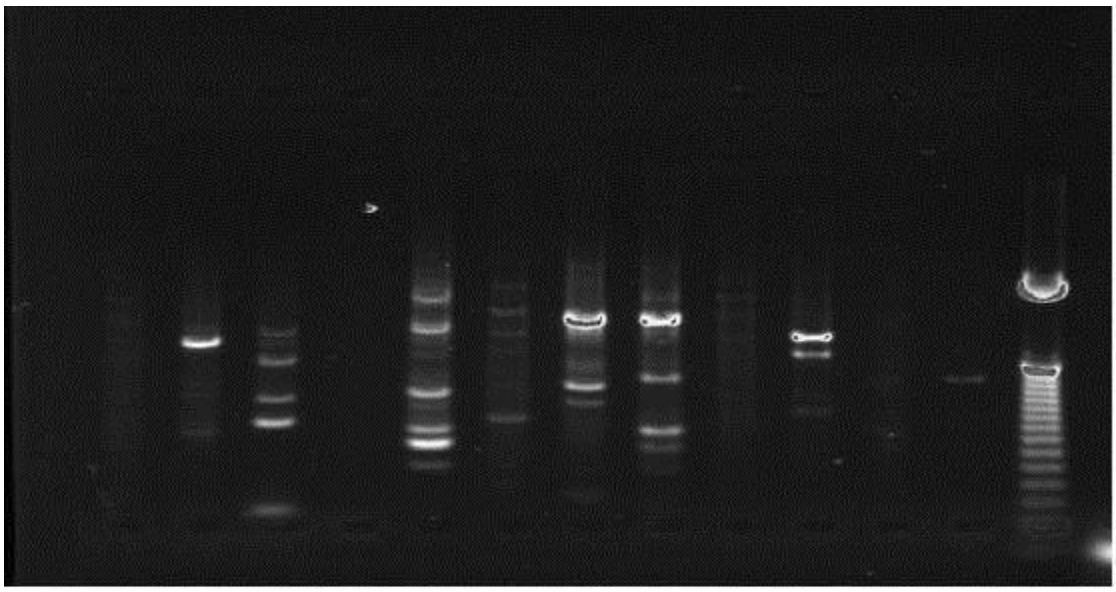
بلغ عدد الحزم الناتجة من الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز عند ارتباط البادئ الثاني مع DNA للعزلات (A ، B ، C ، D ، E ، F ، G ، H ، I ، J ، K ، L) 32 حزمة توزعت بين عدم ارتباط البادئ مع العزلتين A و K وحزمة واحدة للعزلة D و حزمتان لكل من العزلات L و J وI وB وثلاث حزم للعزلة F وأربع حزم للعزلة G وخمس حزم للعزلتين H و C وست حزم للعزلة E, فيما تراوح الوزن الجزيئي للحزم الناتجة من هذا البادئ بين 422.31 bp عائد للعزلتين E و H و 982.86 bp عائد للعزلة C الموضح في الصورة (3) و الجدول (7) .

جدول (6) أوزان الحزم (زوج قاعدي) للحامض النووي DNA لعزلات الفطر *P.aphanidermatum* والناتجة من استعمال البادئ P1

M	L	K	J	I	H	G	F	E	D	C	B	A
800					793.326	792.212		796.664				
	775.418				774.289	773.159		773.159				
					734.557	736.99		744.204				
700					696.597	695.513		704.018				
600												
500												
					477.205	482.857						
450												
400						395.034						
350												
300												
250			259.666	254.802								
200												
150												
100												
50												



شكل (1) درجة التشابه الوراثي بين عزلات الفطر *P.aphanidermatum* باستعمال البادئ الأول P1

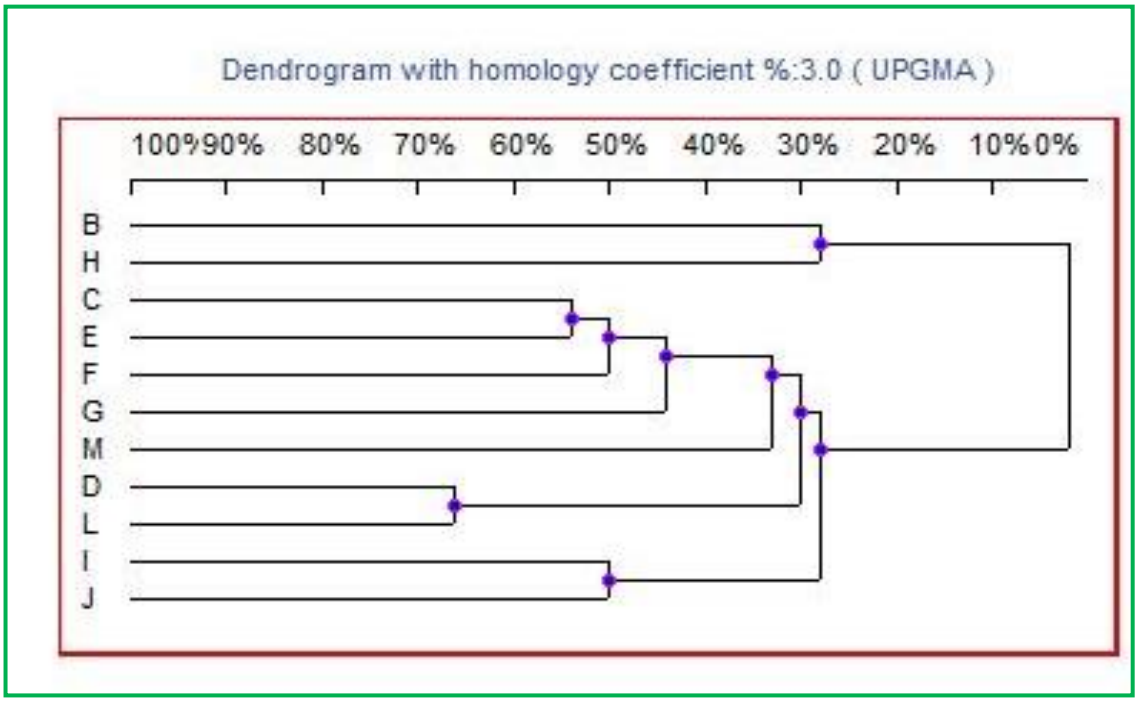


صورة (3) ناتج الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز عند تطبيق البادئ الثاني

جدول (7) الاوزان الجزيئية للحزم (زوج قاعدي) للحامض النووي DNA لعزلات الفطر *P.aphanidermatum* والناتجة من استعمال البادئ P2

Lane M	Lane L	Lane K	Lane J	Lane I	Lane H	Lane G	Lane F	Lane E	Lane D	Lane C	Lane B	Lane A
	973.91								978.88	982.86		
901.47												
857.36												
812.94								812.94				
785.32												
753.22					767.54			758.01				
722.33					731.67			726.89			731.67	
700.78							700.58			713.77		
682.47												
664.23						664.23						
641.62								641.68		655.17		
623.02	610.32				605.41	623.02						
578.19						578.19				570.11		
			547.21								529.76	
			511.14	507.48			502.31	493.54		502.22		
					471.26	466.43	448.64					
404.81				417.45	422.31			422.31				

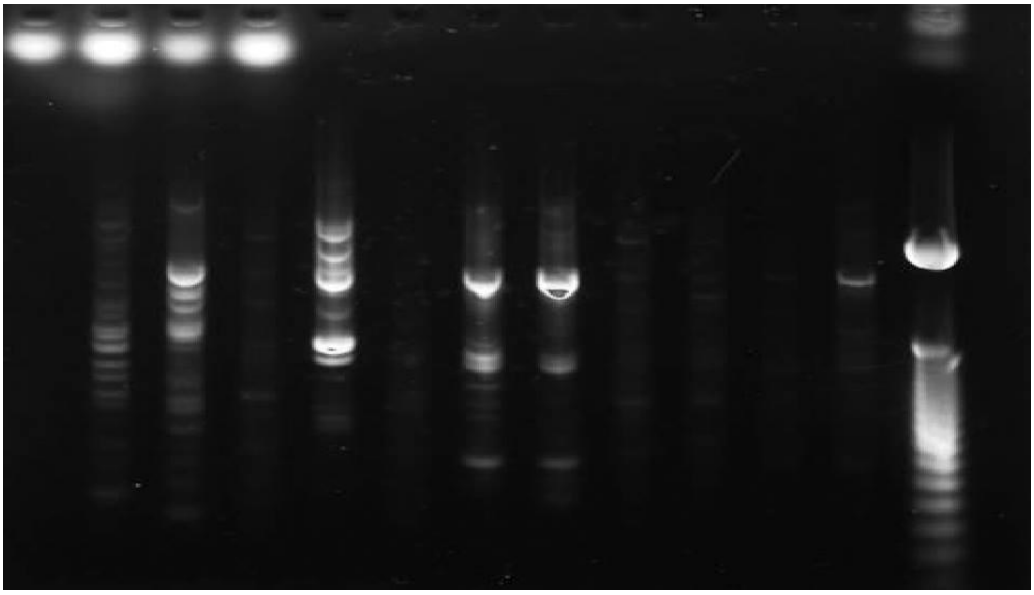
بينت النتائج في الشكل (2) المتحصل عليها من البادئ الثاني P2 حسب برنامج (UPGMA) حيث أمكن وضع عزلات الفطر في ثمان مجاميع: المجموعة الأولى تمثلت بالعزلتين B و H وبلغت نسبة التشابه بينهما 28% , المجموعة الثانية تمثلت بالعزلتين C و E وبلغت نسبة التشابه بينهما55% , المجموعة الثالثة تمثلت بالعزلة F والمجموعة الثانية وبلغت نسبة التشابه بينهما 50% , المجموعة الرابعة تمثلت بالعزلة G والمجموعة الثالثة وبلغت نسبة التشابه بينهما 44% , المجموعة الخامسة تمثلت بالعزلتين D و L وبلغت نسبة التشابه بينهما 67% , المجموعة السادسة تمثلت بالمجموعتين الرابعة والخامسة وبلغت نسبة التشابه بينهما 30% , المجموعة السابعة تمثلت بالعزلتين I و J وكانت نسبة التشابه بينهما 50% , المجموعة الثامنة تمثلت بالمجموعتين السادسة والسابعة وبلغت نسبة التشابه بينهما 29% .



شكل (2) درجة التشابه الوراثي بين عزلات الفطر *P.aphanidermatum* عند استعمال البادئ الثاني P2

3-2 البادئ الوراثي الثالث P3

عند استعمال البادئ الثالث بلغ عدد الحزم 40 حزمة توزعت بين عدم ارتباط البادئ مع العزلات A و F و K وحزمة واحدة للعزلة J , حزمتان للعزلة L , ثلاث حزم للعزلتين H و I وأربع حزم للعزلة D , وخمس حزم للعزلة B , وسبع حزم للعزلتين C و G , وثمان حزم للعزلة E , تراوح الوزن الجزيئي للحزم بين 350.04 bp عائد للعزلة C و 793.86 bp عائد للعزلة G صورة (4) وجدول (8).



صورة (4) ناتج الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز عند تطبيق البادئ الثالث

اتضح من الشكل (3) وتحليل النتائج المتحصل عليها من استعمال البادئ الثالث بواسطة طرق تحليل تستعمل برنامج UV. I Band soft ware بالإستعانة بمعادلة القياس (UPGMA) حيث أمكن وضع عزلات الفطر في خمس مجاميع رئيسة : المجموعة الأولى تمثلت بالعزلتين B و C وبلغت نسبة التشابه بينهما 47% , المجموعة الثانية تمثلت بالعزلتين E و G وبلغت نسبة التشابه بينهما 58% , والمجموعة الثالثة تمثلت بالعزلتين H و L وبلغت نسبة التشابه بينهما80% , والمجموعة الرابعة تمثلت بالعزلتين D و I وبلغت نسبة التشابه بينهما 88% , والمجموعة الخامسة بين العزلة J والمجموعة الرابعة وبلغت نسبة التشابه بينهما 42% , وكانت نسبة التشابه بين المجموعة الاولى والثانية 33% , وبين المجموعة الثانية والثالثة 43% , والمجموعة الخامسة مع المجاميع السابقة 5% كما موضح في الشكل .

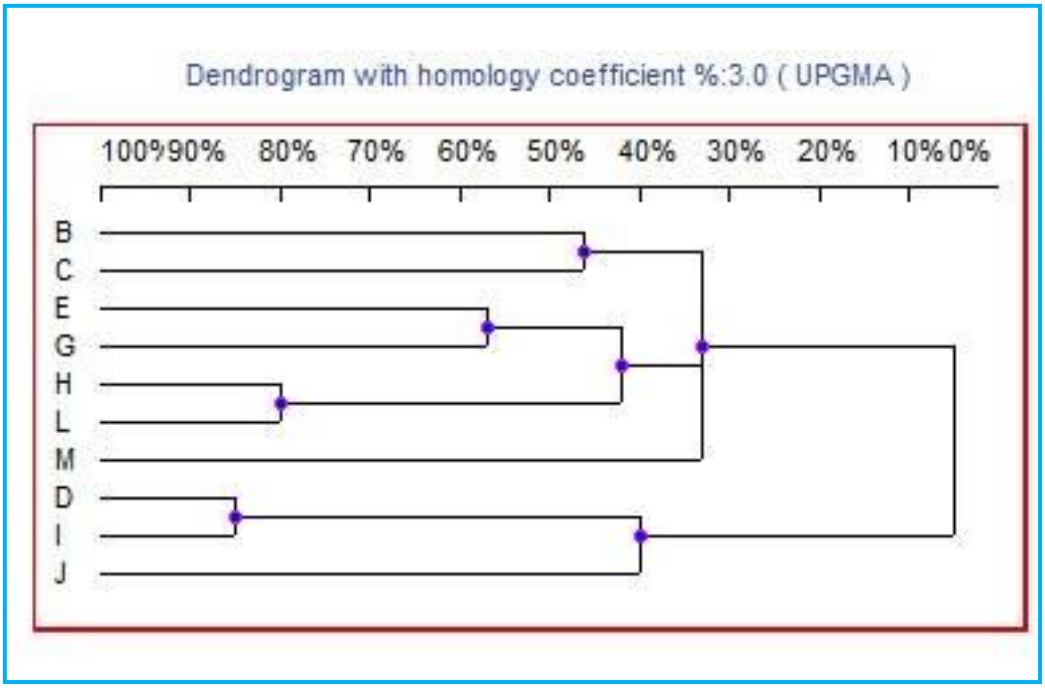
4-2 البادئ الوراثي الرابع P4

عند استعمال البادئ الرابع بلغ عدد الحزم الناتجة من ارتباط هذا البادئ مع عزلات الفطر 41 حزمة توزعت بين عدم ارتباط البادئ مع العزلات A و B و F و I و K وحزمة واحدة للعزلة L, ثلاث حزم للعزلة J, وأربع حزم للعزلة D , وخمس حزم للعزلة E , وثمان حزم للعزلة H , وتسع حزم للعزلة C , واحدى عشرة حزمة للعزلة G , تراوح الوزن الجزيئي للحزم بين 316.68 bp عائد للعزلة E و 735.63 bp عائد للعزلة H صورة (5) جدول (9) .

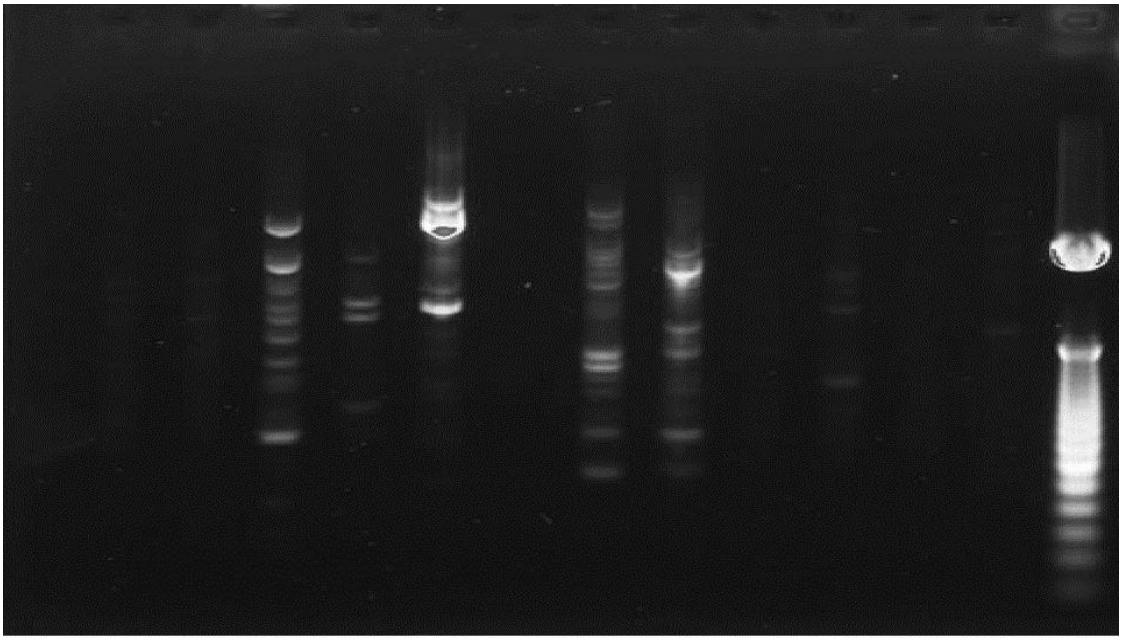
اتضح من الشكل (4) وتحليل النتائج المتحصل عليها من استعمال البادئ الرابع بواسطة طرق تحليل تستعمل برنامج UV. I Band software بالإستعانة بمعادلة القياس (UPGMA) حيث أمكن وضع عزلات الفطر في خمس مجاميع رئيسة : المجموعة الأولى تمثلت بالعزلتين G و H وبلغت نسبة التشابه بينهما 65% , المجموعة الثانية تمثلت بالعزلتين C والمجموعة الاولى وبلغت نسبة التشابه بينهما 60% , والمجموعة الثالثة تمثلت بالعزلة J والمجموعة الثانية وبلغت نسبة التشابه بينهما 50% ,

جدول (8) الاوزان الجزيئية للحزم (زوج قاعدي) للحامض النووي DNA لعزلات الفطر *P.aphanidermatum* والناتجة من استعمال البادئ P3

Lane M	Lane L	Lane K	Lane J	Lane I	Lane H	Lane G	Lane F	Lane E	Lane D	Lane C	Lane B	Lane A
964.24												
911.25												
865.33												
827.06												
803.66					791.77	793.86						
753.19										736.45		
718.21						716.83		714.53				
692.71				692.31		692.34				686.13		
664.42						660.43			676.32		670.23	
636.18										652.81	640.21	
	624.14				628.2	610.21		614.61			622.53	
600.32						584.68		588.22			590.41	
										565.38	571.33	
								535.01	513.45	521.62		
			501.17							501.61		
	477.03				458.81	487.63		487.63		475.72		
				467.21					461.29			
435.16								437.51				
				406.14				400.21	400.21			
										350.04		



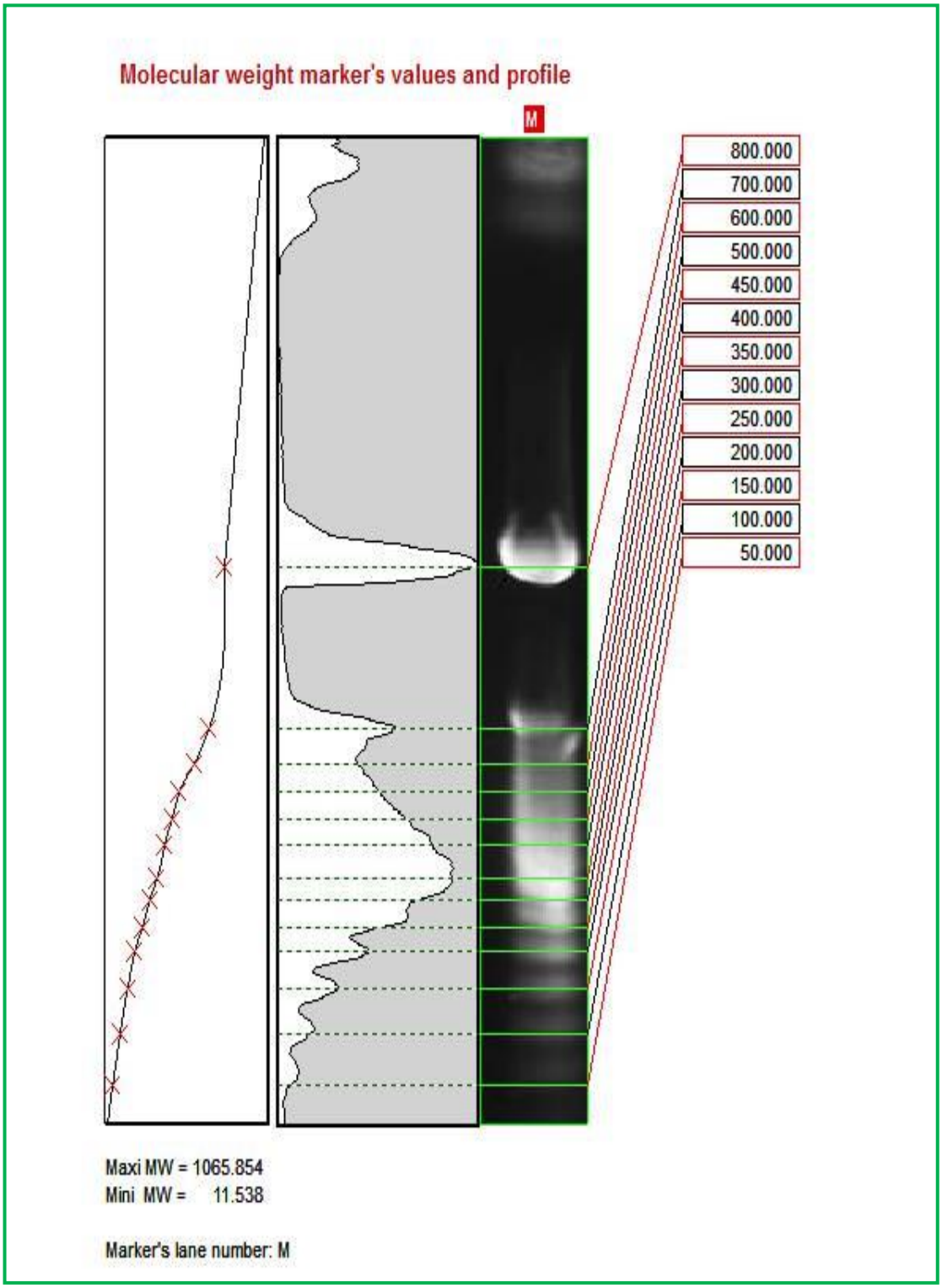
شكل (3) درجة التشابه الوراثي بين عزلات الفطر *P.aphanidermatum* عند استعمال البادئ الثالث P3



صورة (5) ناتج الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز عند تطبيق البادئ الرابع

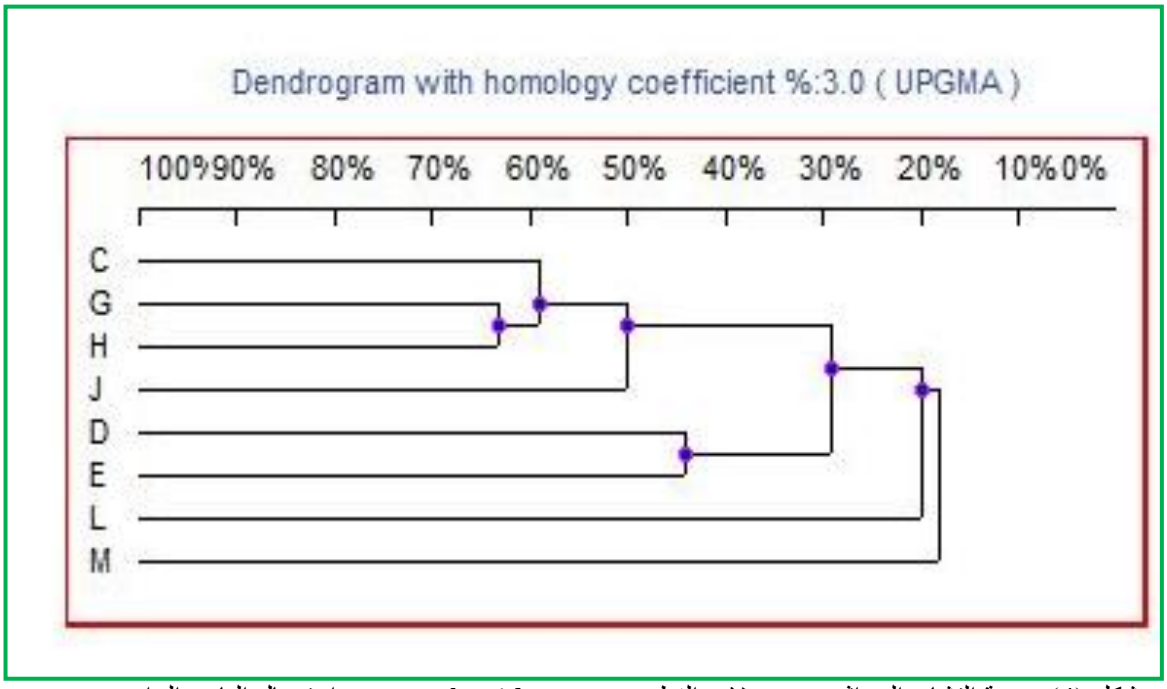
جدول (9) الاوزان الجزيئية للحزم (زوج قاعدي) للحامض النووي DNA لعزلات الفطر *P.aphanidermatum* والناتجة من استعمال البادئ P3

Lane M	Lane L	Lane K	Lane J	Lane I	Lane H	Lane G	Lane F	Lane E	Lane D	Lane C	Lane B	Lane A
926.66												
871.39												
836.58												
796.36												
758.48												
730.11					735.63	735.18						
701.38												
682.23					679.27	675.48				682.36		
664.82												
645.46												
622.65									633.24			
			595.67			611.37				597.69		
						571.59				565.48		
554.36					548.41	550.39						
	514.43									527.18		
					510.6				491.53	497.82		
			480.16			480.16		480.16	469.23	478.54		
					456.27	442.64		446.91		448.23		
			423.34		425.62	423.44				418.15		
399.11					389.4	397.12		399.76	397.54			
					367.69					357.21		
						344.61		344.56				
						327.32		316.68				



صورة (6) تبين قيم اللدر المستعملة في ترحيل DNA عزلات الفطر

P. aphanidermatum



شكل (4) درجة التشابه الوراثي بين عزلات الفطر *P.aphanidermatum* عند استعمال البادئ الرابع P4

والمجموعة الرابعة تمثلت بالعزلتين D و E وبلغت نسبة التشابه بينهما 57% , والمجموعة الخامسة بين العزلة L والمجاميع السابقة وبلغت نسبة التشابه بينهما 20% , وكانت نسبة التشابه بين المجموعة الرابعة والثالثة 30% , كما موضح في الشكل .

اشارت النتائج ان البادئ الاول لم يرتبط بالعزلات A و B و C و D و F و K والبادئ الثاني لم يرتبط بالعزلتين A و K والبادئ الثالث لم يرتبط بالعزلات A و F و K والبادئ الرابع لم يرتبط بالعزلات A و B و F و I و K , وقد وجد أن العزلتين A و K لم ترتبطا باي من البادئات المستعملة في الدراسة .

أثبتت نتائج التحليل الجزيئي وجود تباين وراثي بين عزلات الفطر *P.aphanidermatum* وأن هذا التباين بين العزلات يدل على وجود اختلافات حقيقية على المستوى الجيني بين العزلات ، وأيضا تدل على أن التنوع الكبير يختلف باختلاف العائل المعزول منه والظروف البيئية والموقع الجغرافي .

وجد كذلك أن البادئ الثاني (P2) وضع العزلات في ثمان مجاميع بخلاف (P1 و P3 و P4) التي كانت (اربع و خمس و خمس) على التوالي مما يشير إلى أفضلية إستعمال P2 عند التمييز بين عزلات الفطر *P.aphanidermatum* .

وجد Herrero وKlemsdal (6) تباين وراثي قليل في عينة مكونة من 20 عزلة من الفطر *P. aphanidermatum* من تسعة دول باستخدام ثلاثة بادئات باستخدام تقنية RAPD وكذلك Garzón (5) الذين وجدوا تباين قليل في 25 عزلة من الفطر *Pythium* باسخدام تقنية AFLP .

وكما جاء عند دراسة Zadeh وآخرون (23) لتشخيص 14 عزلة من الفطر *P. aphanidermatum* جمعت من مناطق مختلفة من ايران استخدمت فيها تقنية RAPD لشخيص

الفطر عن باقي العزلات الفطرية باستخدام بادءات OPB-08 ، OPA-15 وOPA-03 (23) .

إن تفاعلي الـ PCR وRAPD تمكنا من توصيف الفطرين *P. aphanidermatum* و*P.ultimum* (10 و15 و21 و23) وأيضاً هذه التقنية تستخدم في تعريف وتوصيف الأنواع والسلالات والتراكيب الخاصة بالفطريات الممرضة للنبات وفي حالة الـ *P. aphanidermatum* فإن تقنية الـ RAPD تشكل إمكانية الإجابة عن العديد من الأسئلة المتعلقة بخصوص العائل والمنطقة الجغرافية والقدرة الإمراضية للعزلات ، وتم دراسة احتمالية وجود تباينات وراثية في جنس *Pythium* عن طريق استخدام بادئات عشوائية عامة في تفاعل التكبير العشوائي RAPD (2 و9 و18 و15 و23) .

ان تفاعل البلمرة (PCR) هو الأسلوب الأكثر أهمية وحساسية المتوفر حاليا للكشف عن مسببات الأمراض النباتية . والذي يسمح بتضخيم الملايين من النسخ من تسلسل الحمض النووي واستطالته في درجات حرارة مختلفة باستخدام Oligonucleotide محددة (dNTPs) و Taq DNA (13). وتم تضخيم الحمض النووي وصور بواسطة الترحيل الكهربائي لهلام agarose بعد تصبيغه بصبغة Ethedium bromide وهي الجزيء الذي له القدرة على الارتباط في الحمض النووي المزدوج (14). ان وجود حزم من DNA الخاص بالحجم المتوقع يدل على وجود الممرض المستهدف في العينة المراد فحصها . والتقدم في أساليب PCR تسمح بسرعة الكشف الدقيق لمسببات الأمراض (23) . وقد حدد الحجم المتوقع للحزم الناتجة من خلال مقارنته بقيم اللدر كما في الصورة (6) .

المصادر

1. كمال الدين ، زاهد نوري . 2014 . استحثاث المقاومة الجهازية في الطماطة باستخدام بعض العوامل الحيوية والمغذيات ضد مرض اللفحة المبكرة المتسبب عن *Alternaria solani* في الزراعة المائية . اطروحة دكتوراه ، كلية الزراعة – جامعة الكوفة. العراق .
2. Al-Sa'di, A. M., Drenth, A., Deadman, M. L., de Cock, A. W. A. M., and Aitken, E. A. B. 2007. Molecular characterization and pathogenicity of *Pythium* species associated with damping-off in greenhouse cucumber (*Cucumis sativus*) in Oman. Plant Pathology, 56: 140 –149.
3. Asano, T., Senda, M., Suga, H., and Kageyama, K. 2010. Development of multiplex PCR to detect five *Pythium* species related to turfgrass diseases. J. Phytopathol., 158:609-615.
4. Dick, M. W. 2001. Straminipilous Fungi. Dordrecht:Kluwer Academic Publishers.UK.
5. Garzón CD, Geiser DM, Moorman GW .2005. Diagnosis and population analysis of *Pythium* species using AFLP Wngerprinting. Plant Dis 89:81–89.
6. Herrero, M.L. and Klemsdal S.S. 1998. Identification of *Pythium*

Hostetler J, Jiang RH, Johnson J, Krajaejun T, Lin H, Meijer HJ, Moore B, Morris P, Phuntmart V, Puiu D, Shetty J, Stajich JE, Tripathy S, Wawra S, van West P, Whitty BR, Coutinho PM, Henrissat B, Martin F, Thomas PD, Tyler BM, De Vries RP, Kamoun S, Yandell M, Tisserat N, Buell CR .2010. Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen *Pythium ultimum* reveals original pathogenicity mechanisms and effector repertoire. Genome Biology, 11 (7): 1-22.

11. Lévesque, C.A. and De Cock, A.W.A.M. 2004. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. Mycological Research, 108: 1363-1383.
12. Lodhi, A.M., Khanzada, M.A., Shahzad, S., Ghaffar, A. 2013 . Prevalence of *Pythium aphanidermatum* in Agro-ecosystem of sindh provence of Pakistan. Pak. J. Bot., 45(2): 635-642.
13. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich H. 1986. Specifc enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. Cold

aphanidermatum using the RAPD technique. Mycol. Res., 102:136–140.

7. Kucharek, T. and D. Mitchell, 2000. Diseases of agronomic and vegetable crops caused by *Pythium*. Plant Pathology Fact Sheet, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Service, University of Florida, USA.
8. Kumar,V. , Haldar,S. , Pandey, K. K., Singh, R.P Singh, A.K. 2008. Cultural, morphological, pathogenic and molecular variability amongst tomato isolates of *Alternaria solani* in India .world J. Microbiol Biotechnol., 24:1003-1009.
9. Lee, S., Garzo´n ,C.D., and Moorman, G.W. 2010 . Genetic structure and distribution of *Pythium aphanidermatum* populations in Pennsylvania greenhouses based on analysis of AFLP and SSR markers. Mycologia, 102(4): 774–784.
10. Lévesque, C.A., Brouwer, H., Cano, L., Hamilton JP, Holt C, Huitema E,Raffaele S, Robideau GP, Thines M, Win J, Zerillo MM, Beakes, GW, Boore JL, Busam D, Dumas B, Ferriera S, Fuerstenberg SI,Gachon CM, Gaulin E, Govers F, Grenville-Briggs L, Horner N,

Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51: 263-273.

14. Mutasa, E.S., D.M. Chwarszczynska and Asher, J.C. 1996. Single-tube, Nested PCR for diagnosis *Polymyxa betae* infection in sugar beet roots and colorimetric analysis of amplified products. Physiopathology, 86(5): 493-497.
15. Nzungize, J.R., Lyumugabe, F., Busogoro, J.P. and Baudoin, J.P. 2012 . *Pythium* root rot of common bean: biology and control methods. A review . Biotechnol. Agron. Soc. Environ, 16(3):405-413.
16. Paul, B, Mathew, R., Kanak, B., Paul, A., Henry, M., Lefort, F. and Belbahri, L. 2008. Morphology, taxonomy, and phylogenetic analysis of a new species of *Pythium* isolated from France. Fungal Diversity, 28: 55-63.
17. Plaats-Niterink, A. J. van der. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. Studies. Mycology centralburcau voor – Schimmcleultures, Baarn, Netherlands. (21) p241.
18. Raju, K.S., Rao, C. C., and Raju, C. A. 2011 . Molecular Variability in *Pythium aphanidermatum* Causing Damping-off of Tobacco by RAPD and RAMS Markers. J Mycol Plant Pathol, 41(2):268-271.
19. Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rded. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. USA.
20. Sambrook, J.,Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning : a laboratory manual.2 nd ed Gold Spring Harbor. New York, USA. pp. 631-632 .
21. Schroeder, K.L., Martin, F.N., de Cock, W.A.M., Lévesque, C. A., Spies, C. F. J., Okubara, P.A, and Paulitz, T. C. 2013 . Molecular Detection and Quantification of *Pythium* Species: Evolving Taxonomy, New Tools, and Challenges. Plant Disease, 97 (1): 4-20.
22. Webster, J. and Weber, R. 2007 . Introduction to Fungi . Third Edition. Cambridge University Press. England , p 841.
23. Zadeh, N.A., Rezaee, S., Norouzi, P., Mahmoudi, S.B., Zadeh, H.R.Z. 2014 . Molecular identification of *Pythium aphanidermatum* isolates by using semi-specific primers . International Journal of Biosciences, 4(1): 185-193.