

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

علي عاجل الحيدري*

مجيد متعب ديوان

قسم وقاية النبات-كلية الزراعة-جامعة المثنى-العراق

قسم وقاية النبات-كلية الزراعة-جامعة الكوفة-العراق

المستخلص

شملت الدراسة عزل وتشخيص انواع الفطر *Pythium spp.* من ترب محافظة النجف الاشرف ، حيث تم عزل وتشخيص ٥ اجناس فطرية مختلفة من مناطق الدراسة وهي : بحر النجف والحساوية والبراكية والحيدرية وخان الربيع والمشخاب والعباسية والمزرعة الارشادية في الكوفة وللفترة الربيعية لعام ٢٠١٣ . أظهرت نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام زوج البادئات المتخصص للفطر *P.aphanidermatum* وتحليل ناتج الهجرة الكهربائية باستعمال الاجاروز بتركيز ١,٥% 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 الحزم متعددة الأشكال Polymorphic band وبنسبة ١٠٠% مع جميع العزلات . أتمدت 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 ١٣١ حزمة حيث سجل ١٨ حزمة في للبادئ الوراثي الأول (P1) و ٣٢ حزمة في البادئ الوراثي الثاني (P2) و ٤٠ حزمة في البادئ الوراثي الثالث (P3) و ٤١ 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-Iraq

Majeed Mete'b Dewan

Department of plant protection-faculty of
Agriculture-University of Kufa-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

يعود الفطر *Pythium Pringsh* إلى مملكة *Straminpila* : Kingdom صف الفطريات البيضية Oomycetes رتبة Pythiales عائلة Pythiaceae (٤ و ٢٢) ، ويضم هذا الجنس أكثر من ٢٠٠ نوعاً منتشرة في أنحاء العالم (11 و 16). وتوجد أنواع هذا الفطر أما مترممة في التربة او مخلفات الانسجة الميتة أو المياه وكذلك يوجد كمتطفل على مختلف النباتات المائية والارضية والطحالب المائية والفطريات والفقرات واللافقرات (١٧) . وتعد بعض أنواع الفطر *Pythium* من المسببات المهمة لمرض تعفن البذور وموت البادرات حيث انه يصب العديد من المحاصيل المهمة (٧).

إن الخصائص المظهرية والمجهريه 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 و ٢١) ، وتعد تقنية Polymerase Chain Reaction (PCR) للكشف عن الفطر *P.aphanidermatum* من أهم التطبيقات المعتمدة حالياً في التشخيص وذلك للتغيرات 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 إيجابية 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 و ٩ و ١٨ و 15 و ٢٣)

لذلك تمحورت الدراسة في عزل وتشخيص الفطر *P.aphanidermatum* المتواجد في تربة بعض الحقول الزراعية في محافظة النجف الاشرف وتشخيصها باستخدام طريقة PCR .

المواد وطرائق العمل

١. اختيار المناطق المشمولة بالمسح الميداني للفطر *Pythium sp.* لمحافظة النجف الاشرف :
تم اختيار عدة مناطق متنوعة في محافظة النجف الاشرف، وهي مناطق زراعية ومستمره بزراعة المحاصيل والخضر المتنوعة الصيفية والشتوية ، والمناطق كما موضحة بالجدول (١).

جدول (١) المناطق الزراعية المشمولة بالمسح ونوع المحصول المزروعة فيها

ت	المنطقة	المحاصيل التي تزرع فيها	pH	EC
١	ترب رملية	الحيدرية (خان النص)	٥,٧	٤,٦٦
٢		خان الربيع	٦,٠	٤,٣٥
٣	تربة مزيجية	الثواطي (بحر النجف)	٥,٣	٤,٢٦
٤	رملية	الكوفة قرب البراكية	٦,٠	٥,٥٣
٥	طينية	المشخاب	٦,٢	١,٧٦
٦		العباسية	٦,٦	١,٠٣
٧	مزيجية	الحساوية	٥,٨	٦,٧

ت	المنطقة	المحاصيل التي تزرع فيها	pH	EC
٨	رملية المزرعة الارشادية / الكوفة	باذنجان ، خيار ، طماطة	٥,٨	٥,٣٣

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

استعملت ثمار الخيار كوسط طبيعي للحصول على عزلات نقية للفطر ، تم عمل ٣ جروح في الثمرة بعمق ٢ - ٣ سم بواسطة مشروط 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 ايثيلين المعقمة ووضعت في الحاضنة في درجة حرارة $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ، وبعد ٣ 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 . شخّصت العزلات التابعة للفطر المعزولة في هذه الدراسة بمساعدة الاستاذ الدكتور مجيد متعب ديوان اعتمادا على الصفات التصنيفية الواردة في Plaats-Niterink (١٧) .

٣. تعزيز تشخيص الفطر *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 .

٤. طريقة استخلاص DNA

تم تنقية ١٢ عزلة من الفطر *P. aphanidermatum* وذلك بتنميتها في أطباق بتري تحوي الوسط الغذائي P.D.A. لمدة ٧ أيام ، قشطت مستعمرات الفطر باستخدام شفرة معقمة من دون أخذ أي كمية من الأكار واخذ من ١٠٠-٥٠٠ ملغم غزل فطري ، وضعت في أنابيب مخصصة لهذا الغرض Eppendorf tube تحت ظروف معقمة . وضعت العزلات في المجمدة لمدة ٤٨ ساعة عند درجة حرارة $-22 \pm 2^\circ\text{C}$ ، تم هرس العينات في داخل الأنابيب بواسطة micro pestle لمدة ٥ دقائق (١) . واستعملت عدة الاستخلاص المجهزة من شركة (BioBasic Incorporation/Korea) وهي عدة متخصصة لعزل genomic DNA من الفطريات.

٥. المحاليل والمواد المستعملة في تقنية PCR

١. محلول TE buffer مجهز من شركة Promega الأمريكية .
٢. البادئات primers المبينة تتابعها في الجدول (٢) والمجهزة من شركة Bioneer .

جدول (٢) البرايمرات المستعملة لإثبات تشخيص الفطر *P. aphanidermatum*

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

ادخل البرنامج الموضح في الجدول (٣) لتأكيد تشخيص الفطر *P. aphanidermatum* في جهاز PCR .

جدول (٣) البرنامج المستعمل في تأكيد تشخيص الفطر *P. aphanidermatum*

عدد الدورات	المرحلة	الدرجة الحرارية	المدة
1 cycle	Initial Denaturation	٩٥ م°	3min
35 cycles	Denaturation	٩٥ م°	1 min
	Annealing	٦٠ م°	1 min
	Extension	٧٢ م°	2 min
1 cycle	Final Extension	٧٢ م°	10 min

حسب ما ذكره Asano (٣) ، بعد إدخال البرنامج أعطي الجهاز تحضين لمدة ٥ دقائق عند درجة حرارة ٩٥ م° .

٦. Ladder المستخدم في الدراسة DNA Marker

يتكون Ladder من ١٣ قطعة DNA مزدوج الخيط بحجم ٥٠ زوج قاعدي (bp) من شركة Promega/USA .

٧. المحاليل والمواد المستعملة في عملية الترحيل الكهربائي

تم إجراء الترحيل الكهربائي Electrophoresis باستعمال هلام الاكاروز وفقاً لما ذكره Sambrook وآخرون (١٩) و Sambrook و Russell (٢٠) للكشف عن نواتج PCR ، المواد المستعملة :

١. محلول TBE solution مجهز من شركة Promega الأمريكية

٢. الاكاروز Agarose من شركة Norgen Biotechnology

٣. DNA Ladder ٥٠ bp مجهز من شركة Promega

٨. التمييز بين عزلات الفطر *P. aphanidermatum* بطريقة Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

طبقت العمليات ذاتها المستعملة في تشخيص الفطر *P. aphanidermatum* للتمييز بين العزلات بطريقة

RAPD مع بعض التغييرات . فقد استعملت بادئات عشوائية موضحة في الجدول (٤) .

جدول (٤) 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 (٥) وادخل البرنامج الموصوف في الجدول (٥) في جهاز PCR .

جدول (٥) البرنامج المستعمل للتمييز بين عزلات الفطر *Pythium aphanidermatum* بطريقة RAPD حسب الطريقة الموصوفة من قبل Kumar (٨)

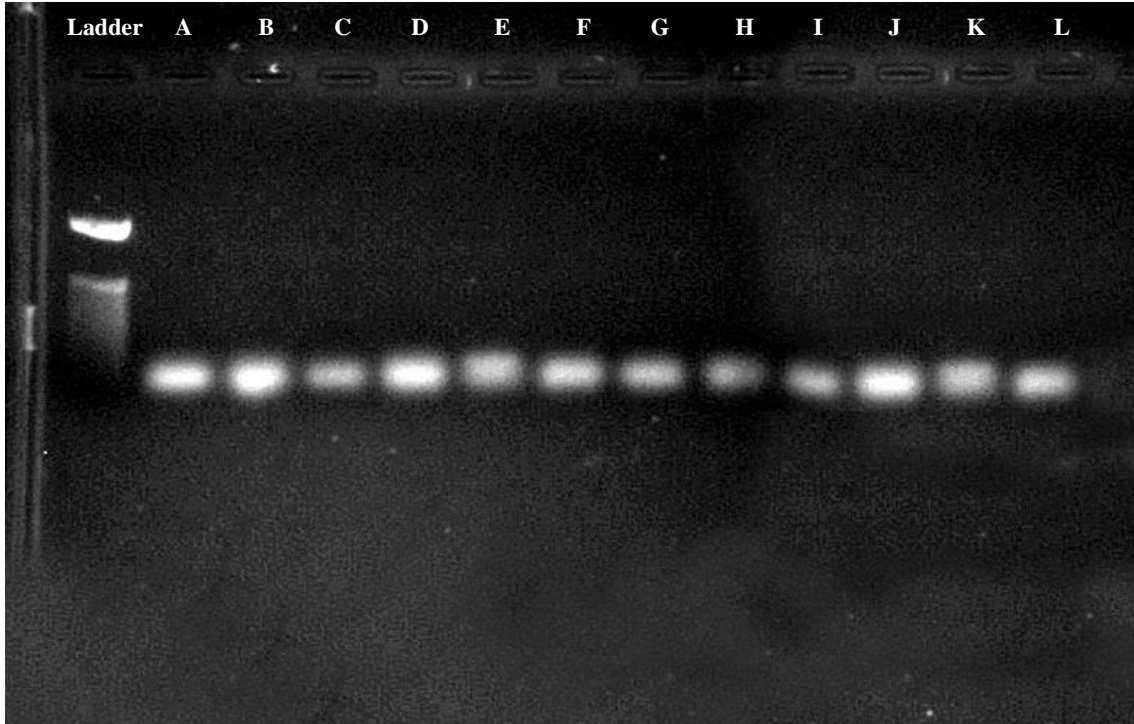
عدد الدورات	الغرض من العملية	الدرجة الحرارية	الوقت
1 cycle	Initial Denaturation	٩٤ م°	4 min
30 cycles	Denaturation	٩٤ م°	1 min
	Annealing	٣٤ م°	2 min
	Extension	٧٢ م°	2 min
1 cycle	Final Extention	٧٢ م°	1 min

ملئ حوض الترحيل الكهربائي بمحلول TBE solution المخفف ١٠% بالماء المقطر حتى غُطي الهلام بمقدار ٣ ملم ربط القطب السالب قرب حفر الهلام وصل التيار الكهربائي على درجة ٨٠ volt لمدة ساعة . نقل الهلام إلى وحدة التصوير على الأشعة فوق البنفسجية U.V.- transilluminator لملاحظة الحزم الناتجة من ترحيل DNA صورت بواسطة الكاميرا المحمولة فوق وحدة الأشعة فوق البنفسجية .

النتائج والمناقشة

١. تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase Chain Reaction

تم اختيار ١٢ عزلة للفطر *P.aphanidermatum* بعد تشخيصها مظهرياً ، 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 الربع (E)، المشخاب (A)، العباسية (B) والارشادية (I). أظهرت نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام زوج البادئات المتخصص للفطر *P.aphanidermatum* وتحليل ناتج الهجرة الكهربائية باستعمال الاجاروز بتركيز ١,٥% ظهور حزم للعزلات (A ، B ، C ، D ، E ، F ، G ، H ، I ، J ، K ، L) التي تؤكد تشخيص الفطر *P.aphanidermatum* صورة (١) إذ كانت بحجم ١٦٣ bp وهذا هو الحجم المتوقع الذي ينتجه هذا الزوج من البادئات مع DNA للفطر *P.aphanidermatum*.



صورة (١) ناتج الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لعزلات للفطر *P. aphanidermatum*

(L ، K ، J ، I ، H ، G ، F ، E ، D ، C ، B ، A)

ان هذه النتيجة متفقة مع ما توصل اليه كثير من الباحثين من تخصص البادئات حيث صمم Wang وآخرون (٢٠٠٣) ٢٠ بادئ في تكبير PCR لمنطقة (ITS1) Internal Transcribed Spacer وهي المنطقة الداخلية لـ rDNA ٣٤ نوع من الفطر *Pythium*. واختبر تخصص هذه البادئات في المنطقتين ITS2 أو ITS4 في Forward و Reverse حيث حصل الباحثون على خمس انواع متخصصة من البادئات أما البقية كانت متباينة في تخصصها لانواع *Pythium* وحصل على كشف متخصص للفطر *P. aphanidermatum*.

ووجد Alsaadi وآخرون (٢٠٠٧) ان الفطر *P. aphanidermatum* قد تم عزله من كل مواقع دراسته البالغ عددها ١٣ موقع في عمان حيث شكل نسبة ٧٦% من مجموع ٩٨ عزلة *Pythium*، بينما شكل الفطر *P. spinosum* نسبة ٢٢% من ٧ مواقع. وان جميع عزلات الفطر *P. aphanidermatum* قد كانت متشابهة ١٠٠% عند تشخيصها بواسطة PCR. وحصل Lodhi (12) ان هناك تطابق ٩٩-١٠٠% بين عزلات الفطر *P. aphanidermatum* عند مقارنتها مع العزلة الموجودة في البنك الجيني باستخدام بادئات لمنطقتي ITS 1 and 2.

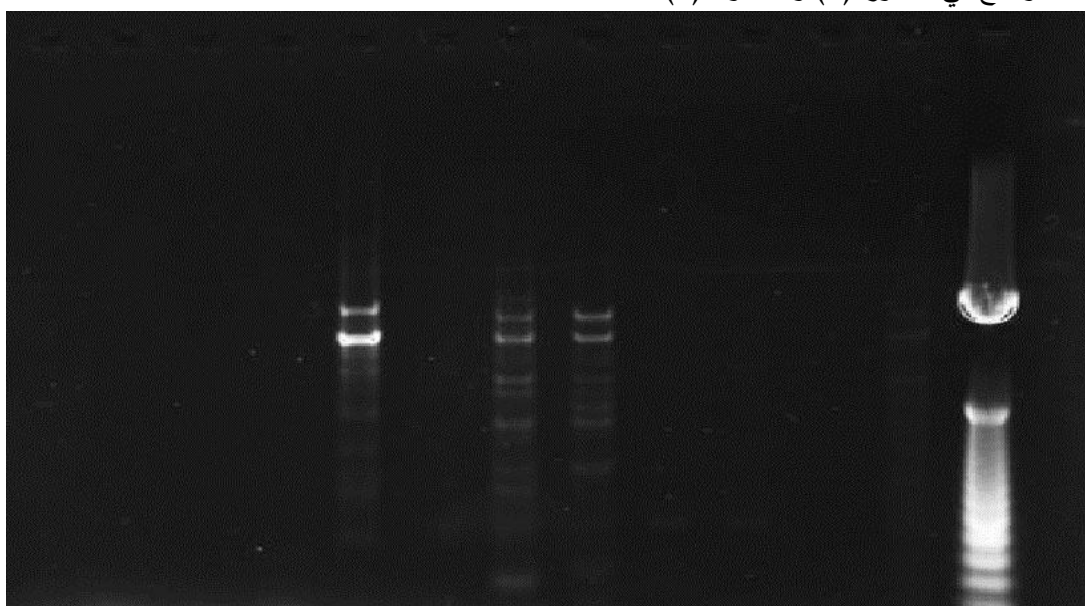
٢. التضاعف العشوائي متعدد الأشكال لعزلات الفطر *P. aphanidermatum* باستعمال بادئات عشوائية Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

اتضح 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 القطع متعددة الأشكال Polymorphic band وبنسبة ١٠٠% مع جميع العزلات. أعمدت تقنية مؤشرات التضاعف العشوائي متعدد الأشكال (RAPD) لسلسلة الحامض النووي منقوص الأوكسجين DNA لتحديد بصمة DNA لاثني عشر عزلات من النوع *P.*

aphanidermatum إذ تم تعريض DNA إلى أربع بادئات التضاعف العشوائي وهي P1 و P2 و P3 و P4 حيث تمكنت من إنتاج عدد من الحزم بلغ ١٣١ حزمة وقد سجلت نتائج تحليل RAPD بالنسبة للبادئات P1 و P2 و P3 و P4 بالاعتماد على وجود الحزم أو غيابها وأعدادها وأوزانها الجزيئية وكانت بالشكل التالي :

١-٢ البادئ الوراثي الأول P1

بلغ عدد الحزم الناتجة من الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز عند ارتباط البادئ الأول مع DNA العزلات (A ، B ، C ، D ، E ، F ، G ، H ، I ، J ، K ، L) ١٨ حزمة توزعت بين عدم ارتباط البادئ مع كل من العزلات A و B و C و D و F و K وحزمة واحدة للعزلات L و J و I وأربع حزم للعزلة E و خمس حزم للعزلة H و ستة حزم للعزلة G . فيما تراوح الوزن الجزيئي للحزم الناتجة من هذا البادئ بين ٢٥٤,٨٠٢ bp عائد للعزلة I و ٧٩٦,٦٦٤ bp عائد للعزلة E الموضح في الصورة (٢) و الجدول (٦) .



صورة (٢) ناتج تفاعل الـ RAPD لـ DNA عزلات الفطر *P.aphanidermatum* باستخدام البادئ الوراثي P1 مع العزلات حيث أن ladder = M

نجد من الجدول (٦) هناك اختلاف واضح بين الأوزان الجزيئية لجميع الحزم الناتجة من ارتباط البادئ الأول مع عزلات الفطر *P.aphanidermatum* .

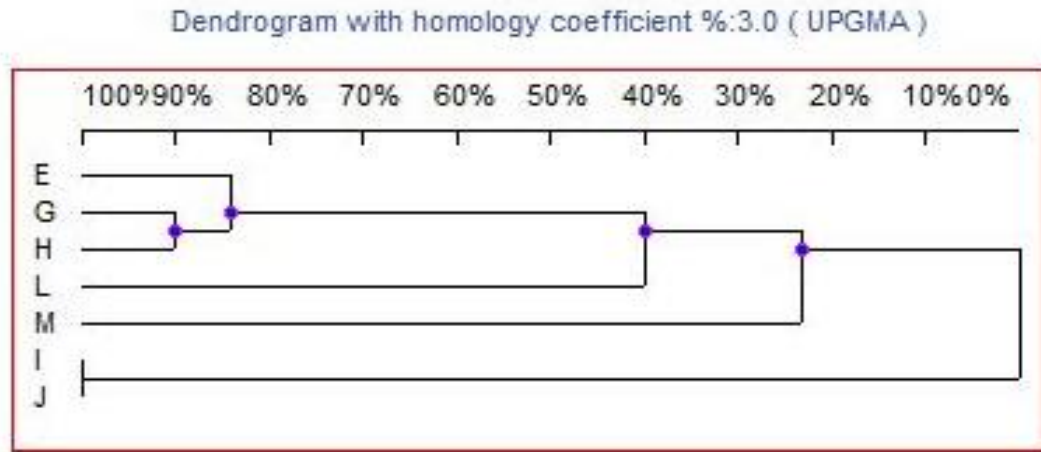
جدول (٦) أوزان الحزم (زوج قاعدي) للحامض النووي DNA لعزلات الفطر *P.aphanidermatum* والناتجة من

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												

M	L	K	J	I	H	G	F	E	D	C	B	A
400						395.034						
350												
300												
250			259.666	254.802								
200												
150												
100												
50												

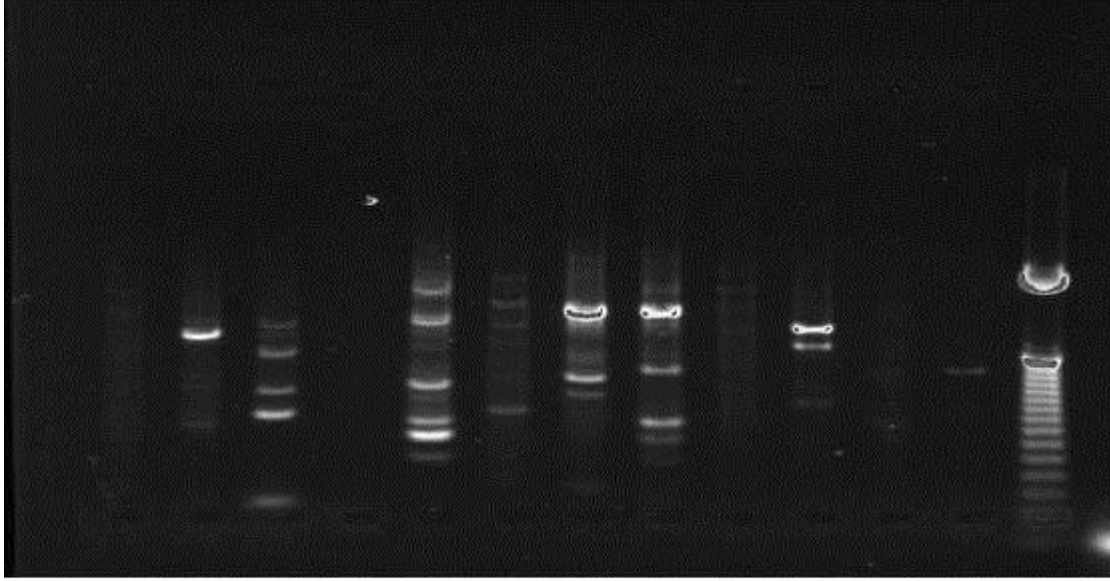
إن العلاقات بين العزلات تم تقييمها عن طريق تحليل مجموعة من البيانات استنادا إلى مصفوفة التشابه في شكل (١) حيث تم إنشاء Dendrogram بواسطة طرق تحليل تستعمل برنامج UV. I Band soft ware بالإستعانة بمعادلة القياس (UPGMA) واستنادا إلى النتائج التي حصل عليها من تطبيق البادئ الأول وجد أن جميع العزلات ممكن وضعها بأربع مجاميع : المجموعة الأولى تمثل العزلتين I و J إذ بلغت نسبة التشابه بينهما ١٠٠% ، والمجموعة الثانية تمثل العزلتين G و H حيث كانت نسبة التشابه بينهما ٩٠% ، والمجموعة الثالثة تمثل درجة التشابه بين العزلة E مع المجموعة الثانية وقد بلغت ٨٥% ، والمجموعة الرابعة تمثل درجة التشابه بين العزلة L والمجموعة الثالثة والتي بلغت ٤٠% .



شكل (١) درجة التشابه الوراثي بين عزلات الفطر *P.aphanidermatum* باستعمال البادئ الأول P1

٢-٢ 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) ٣٢ حزمة توزعت بين عدم ارتباط البادئ مع العزلتين A و K وحزمة واحدة للعزلة D و حزمتان لكل من العزلات L و I و B 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 ٤٢٢,٣١ bp عائد للعزلتين E و H و ٩٨٢,٨٦ bp عائد للعزلة C الموضح في الصورة (٣) و الجدول (٧) .



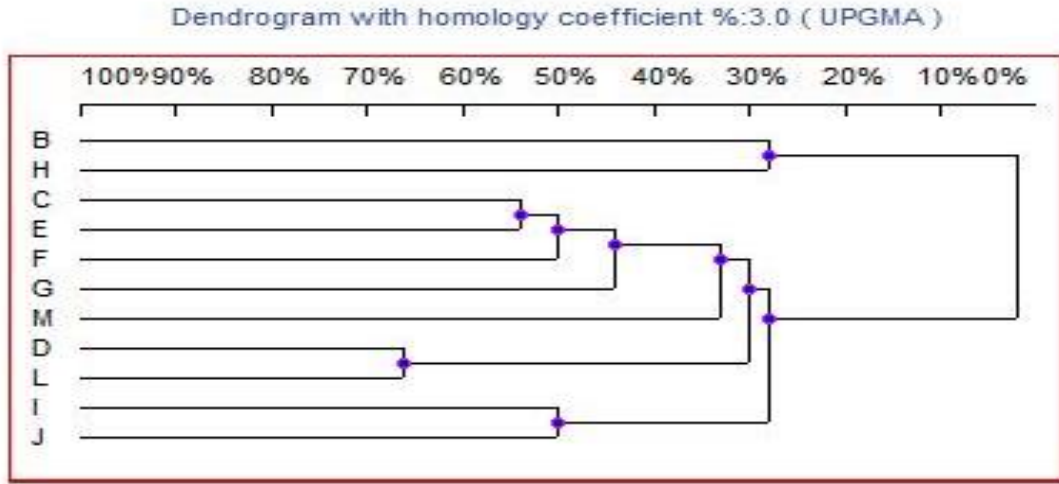
صورة (٣) ناتج الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز عند تطبيق البادئ الثاني

جدول (٧) 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 (٢) 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 ٢٨% ، المجموعة الثانية تمثلت بالعزلتين C و E وبلغت نسبة التشابه بينهما ٥٥% ، المجموعة الثالثة تمثلت بالعزلة F والمجموعة الثانية وبلغت نسبة التشابه بينهما ٥٠% ، المجموعة الرابعة تمثلت بالعزلة G والمجموعة الثالثة وبلغت نسبة التشابه بينهما ٤٤% ، المجموعة الخامسة تمثلت بالعزلتين D و L وبلغت نسبة التشابه بينهما ٦٧% ، المجموعة السادسة تمثلت

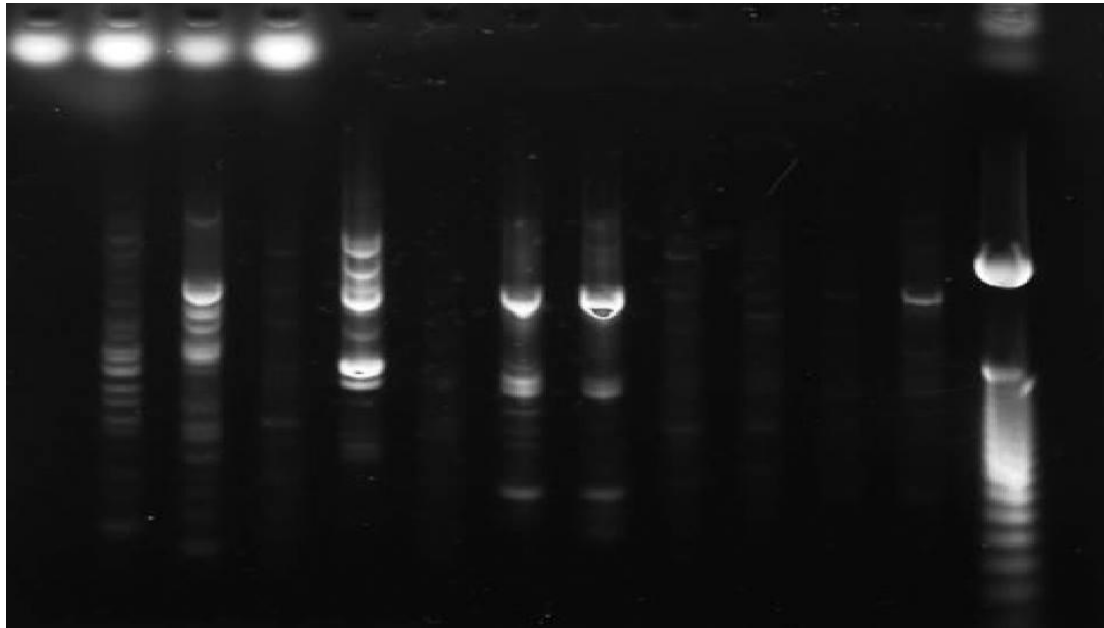
بالمجموعتين الرابعة والخامسة وبلغت نسبة التشابه بينهما ٣٠% ، المجموعة السابعة تمثلت بالعزلتين I و J وكانت نسبة التشابه بينهما ٥٠% ، المجموعة الثامنة تمثلت بالمجموعتين السادسة والسابعة وبلغت نسبة التشابه بينهما ٢٩% .



شكل (٢) درجة التشابه الوراثي بين عزلات الفطر *P.aphanidermatum* عند استعمال البادئ الثاني P2

٣-٢ البادئ الوراثي الثالث P3

عند استعمال البادئ الثالث بلغ عدد الحزم ٤٠ 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 ٣٥٠,٠٤ bp عائد للعزلة C و ٧٩٣,٨٦ bp عائد للعزلة G صورة (٤) وجدول (٨).



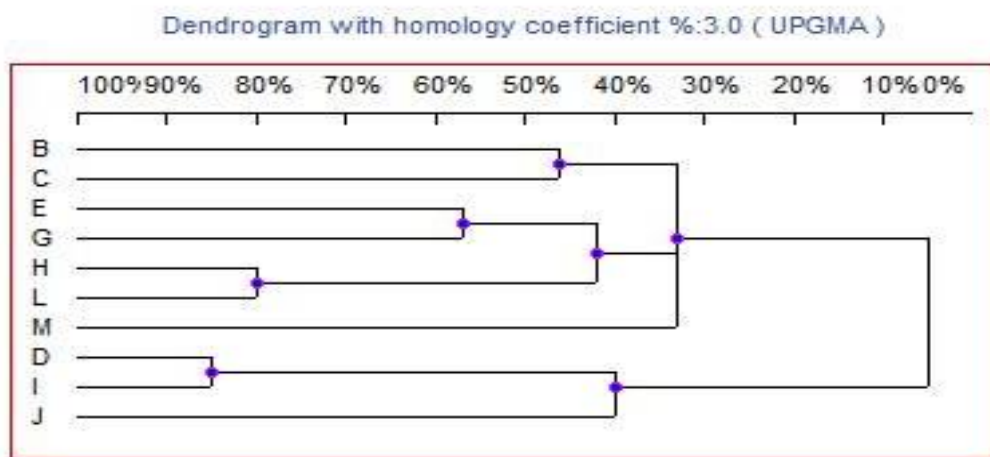
صورة (٤) ناتج الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز عند تطبيق البادئ الثالث

جدول (٨) الاوزان الجزيئية للحزم (زوج قاعدي) للحامض النووي DNA لعزلات الفطر *P.aphanidermatum* والنتيجة

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		

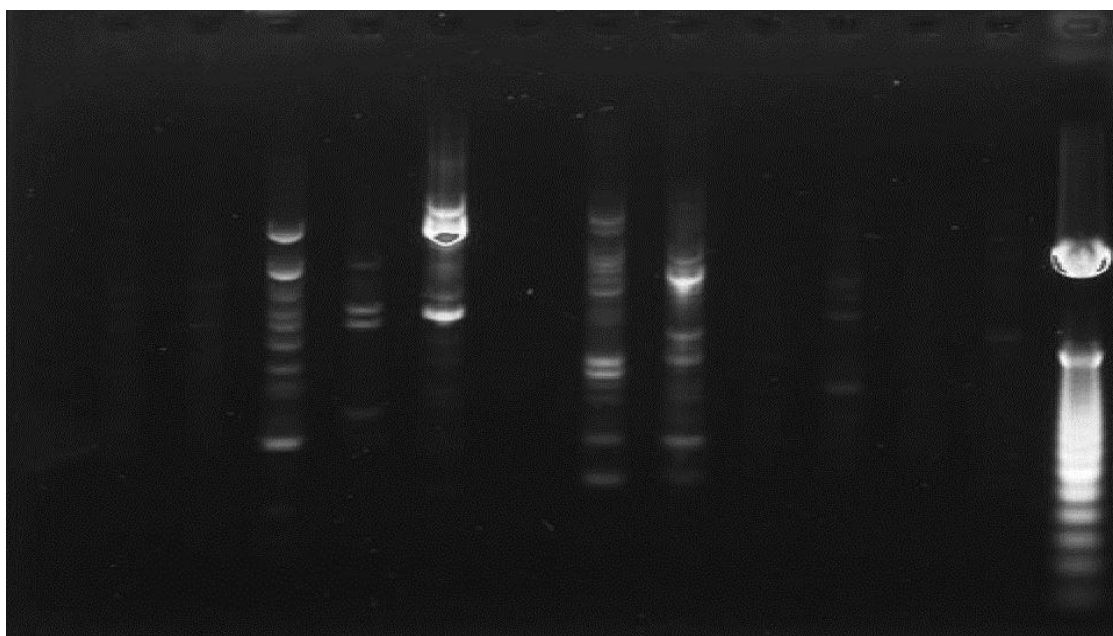
اتضح من الشكل (٣) وتحليل النتائج المتحصل عليها من استعمال البادئ الثالث بواسطة طرق تحليل تستعمل برنامج UV. I Band soft ware بالإستعانة بمعادلة القياس (UPGMA) حيث أمكن وضع عزلات الفطر في خمس مجاميع رئيسية : المجموعة الأولى تمثلت بالعزلتين B و C وبلغت نسبة التشابه بينهما ٤٧% ، المجموعة الثانية تمثلت بالعزلتين E و G وبلغت نسبة التشابه بينهما ٥٨% ، والمجموعة الثالثة تمثلت بالعزلتين H و L وبلغت نسبة التشابه بينهما ٨٠% ، والمجموعة الرابعة تمثلت بالعزلتين D و I وبلغت نسبة التشابه بينهما ٨٨% ، والمجموعة الخامسة بين العزلة J والمجموعة الرابعة وبلغت نسبة التشابه بينهما ٤٢% ، وكانت نسبة التشابه بين المجموعة الأولى والثانية ٣٣% ، وبين المجموعة الثانية والثالثة ٤٣% ، والمجموعة الخامسة مع المجاميع السابقة ٥% كما موضح في الشكل .



شكل (٣) درجة التشابه الوراثي بين عزلات الفطر *P. aphanidermatum* عند استعمال البادئ الثالث P3

٤-٢ البادئ الوراثي الرابع P4

عند استعمال البادئ الرابع بلغ عدد الحزم الناتجة من ارتباط هذا البادئ مع عزلات الفطر ٤١ 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 عشر حزمة للعزلة G ، تراوح الوزن الجزيئي للحزم بين ٣١٦,٦٨ bp عائد للعزلة E و 735.63 bp عائد للعزلة H صورة (٥) جدول (٩) .



صورة (٥) ناتج الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز عند تطبيق البادئ الرابع

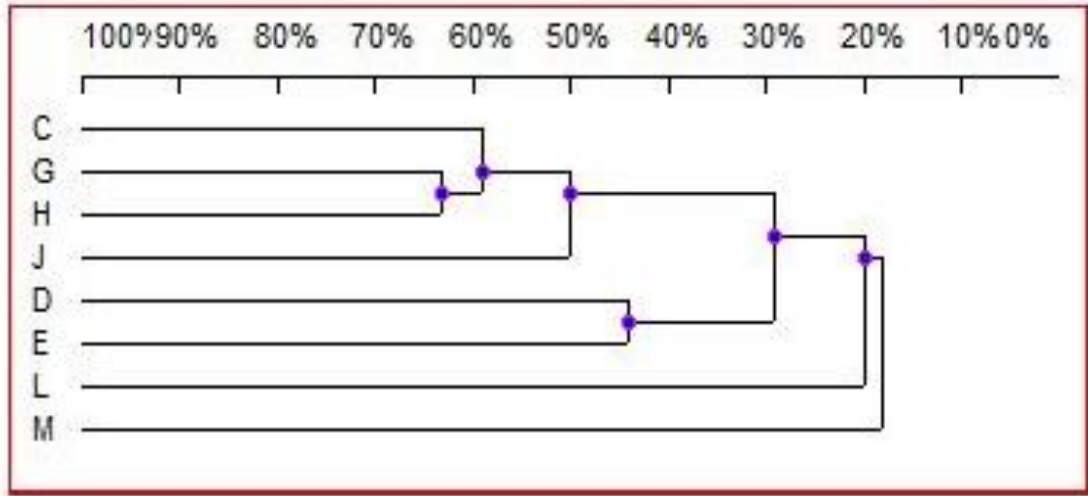
جدول (٩) الازان الجزيئية للحزم (زوج قاعدي) للحامض النووي DNA لعزلات الفطر *P.aphanidermatum* والنتيجة

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				

اتضح من الشكل (٤) 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 رئيسية : المجموعة الأولى تمثلت بالعزلتين G و H وبلغت نسبة التشابه بينهما ٦٥% ، المجموعة الثانية تمثلت بالعزلتين C والمجموعة الأولى وبلغت نسبة التشابه بينهما ٦٠% ، والمجموعة الثالثة تمثلت بالعزلة J والمجموعة الثانية وبلغت نسبة التشابه بينهما ٥٠% ، والمجموعة الرابعة تمثلت بالعزلتين D و E وبلغت نسبة التشابه بينهما ٥٧% ، والمجموعة الخامسة بين العزلة L والمجاميع السابقة وبلغت نسبة التشابه بينهما ٢٠% ، وكانت نسبة التشابه بين المجموعة الرابعة والثالثة ٣٠% ، كما موضح في الشكل .

Dendrogram with homology coefficient %:3.0 (UPGMA)



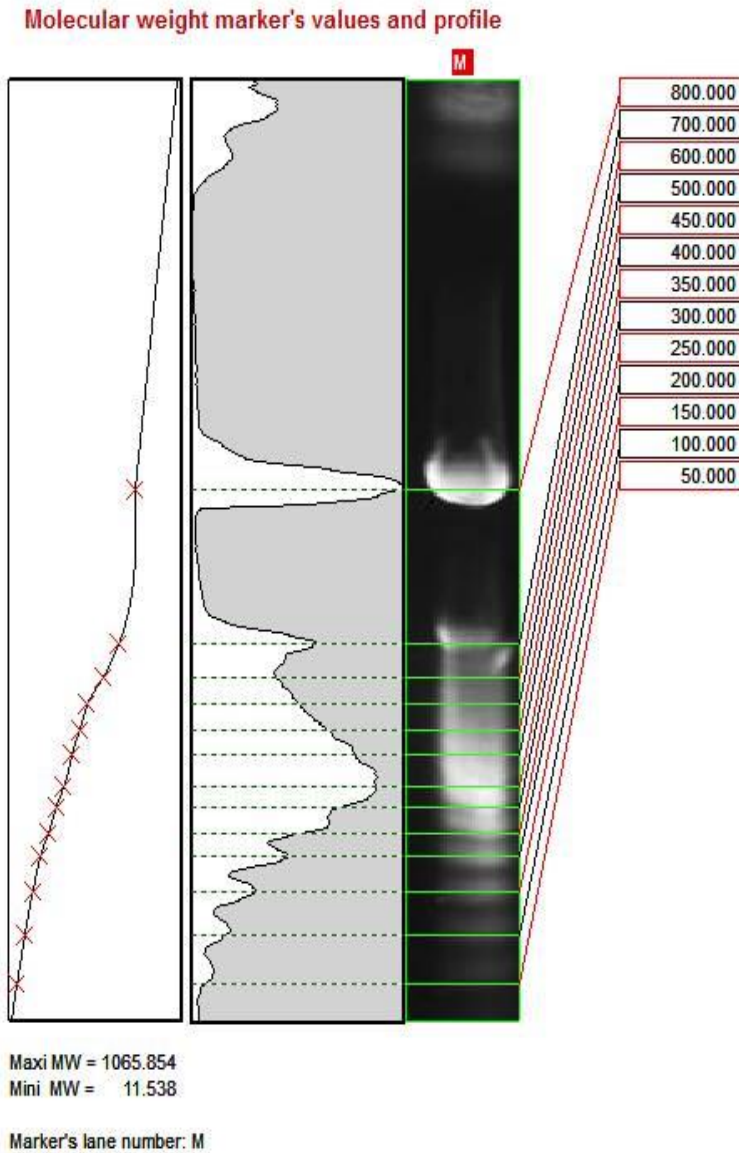
شكل (٤) درجة التشابه الوراثي بين عزلات الفطر *P.aphanidermatum* عند استعمال البادئ الرابع P4

أشارت 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 و Klemsdal (٦) تباين وراثي قليل في عينة مكونة من ٢٠ عزلة من الفطر *P. aphanidermatum* من تسعة دول باستخدام ثلاثة بادئات باستخدام تقنية RAPD وكذلك Garzón (٥) الذين وجدوا تباين قليل في ٢٥ عزلة من الفطر *Pythium* باستخدام تقنية AFLP . وكما جاء عند دراسة Zadeh وآخرون (٢٣) لتشخيص ١٤ عزلة من الفطر *P. aphanidermatum* جمعت من مناطق مختلفة من ايران استخدمت فيها تقنية RAPD لتشخيص الفطر عن باقي العزلات الفطرية باستخدام بادئات OPA-03 و OPA-15 ، OPB-08 (٢٣) .

إن تفاعلي الـ PCR و RAPD تمكنا من توصيف الفطرين *P. aphanidermatum* و *P. ultimum* (10 و 15 و ٢١ و ٢٣) 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 إيجابية 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 (٢ و 9 و ١٨ و 15 و ٢٣) .

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 تصبغه بصبغة Ethidium 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 (٢٣) . وقد حدد الحجم المتوقع للحزم الناتجة من خلال مقارنته بقيم اللدر كما في الصورة (٦) .



صورة (٦) تبين قيم اللدر المستعملة في ترحيل DNA عزلات الفطر *P. aphanidermatum*

1. كمال الدين ، زاهد نوري . ٢٠١٤ . استحثاث المقاومة الجهازية في الطماطة باستخدام بعض العوامل الحيوية والمغذيات ضد مرض الفحة 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 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., Garzón ,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, 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. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold 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. *Phytopathology*, 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 centralbureau voor – Schimmlecultures, 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*. 2nd 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.