

التشخيص الجزيئي لعزلاتي من الفطر *Pythium aphanidermatum* المسببة لمرض تعفن بذور وموت بادرات نبات الخيار (*Cucumis sativus* L.)

صباح لطيف علوان¹ عقيل نزال العابدي² حسين عماد عبد الزهرة¹
استاذ استاذ مساعد استاذ

¹ قسم وقاية النبات/ كلية الزراعة/جامعة الكوفة

² قسم وقاية النبات/ كلية الزراعة/ جامعة كربلاء

البريد الالكتروني: kkuu767@gmail.com

المستخلص:

نفذت هذه الدراسة بهدف عزل و تشخيص ثلاث عزلات تابعة للفطر *Pythium aphanidermatum* المسبب لمرض تعفن بذور و موت بادرات الخيار (*Cucumis sativus* L.) جمعت من مناطق العباسية و أم عباسيات و القزوينية في محافظة النجف. أظهرت نتائج اختبار القدرة الامراضية لهذه العزلات الفطر *P. aphanidermatum* على بذور نبات الخيار ان جميع العزلات ادت الى زيادة تعفن البذور و كان أكثرها تأثيرا هي عزلة *P. aphanidermatum* المعزولة من منطقة العباسية، تلتها العزلة *P. aphanidermatum* المعزولة من منطقة أم عباسيات و من ثم العزلة المعزولة من منطقة القزوينية و بنسب تعفن بذور بلغت 90 و 74 و 72 %، على التوالي قياسا مع معاملة المقارنة التي بلغت فيها نسبة التعفن 0 % . كما اثبتت نتائج اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase chain reaction, PCR) لعزلاتي الفطر *P. aphanidermatum* الاولى و الثانية و التي كانت الاكثر امراضية لبذور نبات الخيار، امكانية مضاعفة نواتج من الحامض النووي (PCR-amplified products) بأحجام تراوحت بين 700-800 زوج قاعدة نايتروجينية (Base pairs, bp). اظهرت نتائج تحليل التتابع النيوكليوتيدي (Nucleotide sequence analysis) لنواتج الحوامض النووية المضاعفة من العزلات الفطرية و باستخدام برنامج BLAST بأن عزلاتي الفطر المعزول تعود الى الفطر *P. aphanidermatum* . كما اظهرت احدى العزلات نسبة تشابه بلغت 100% مع العزلات المعزولة عالميا و المثبتة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (National Center for Biotechnology Information, NCBI). وجد من خلال استخدام برنامج BLAST ان عزلة الفطر *P. aphanidermatum* المعزولة من منطقة العباسية في محافظة النجف ذات نسبة تشابه وراثي تراوحت بين 98-99 %، مما يثبت بأن هذه العزلة هي عزلة جديدة غير مذكورة سابقا في قاعدة البيانات العائدة للمركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI)، لذا تم تسجيلها و ايداعها في المركز المذكور تحت رقم الادخال (GenBank Accession No.) MF347709.

Molecular diagnosis of two isolates of *Pythium aphanidermatum* causing the disease of seed rot and seedling damping-off in cucumber (*Cucumis sativus* L.)

Sabah L. Alwan¹ Aqeel N. AL-Abedy² Hussein I. Abdulzahera¹
Professor Assistant Professor

¹ Plant Protection Department-Agriculture College-Kufa University

² Plant Protection Department-Agriculture College-Kerbala University

Email: kkuu767@gmail.com

Abstract:

This study was conducted to isolate and identify three isolates of the pathogenic fungus *Pythium aphanidermatum* causing seed rot and seedlings death in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) collected from three different regions, namely Abbasiya, Um-Abbasiyat and Qazwainiya in the province of Najaf. Pathogenicity test on cucumber seeds showed that all isolates from the three regions were pathogenic and caused seed rot. Isolate *P. aphanidermatum* from Al-Abbasiya region was the most aggressive isolate followed by the isolates obtained from Um-Abbasiyat and Qazwainiya regions that caused cucumber seed rot of 90, 74 and 72%, respectively; whereas no seed rot was seen in the control treatment.

Results obtained from the polymerase chain reaction (P.C.R) of two most pathogenic isolates (*P.a1* and *P.a2*) on cucumber seeds showed that it was possible to amplify 700-800 bp sized products. Results of the sequence analysis of nitrogen bases generated from the PCR-amplified products using BLAST showed that both isolates are belonging to the fungus *P. aphanidermatum*. The *P.a2* was 100% identical to the globally isolated fungus that deposited at the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The BLAST results showed that *P.a1* had similarity of 98-998% with the isolates recoded at NCBI; therefore this isolate was registered in NCBI as a new isolate under the GenBank accession no. MF347709.

المقدمة:

يعد نبات الخيار (*Cucumis sativus* L.) احد نباتات العائلة القرعية (Cucurbitaceae) و من محاصيل الخضر الصيفية المهمة التي عرفها الانسان منذ قديم الزمان في اغلب بلدان العالم ومنها العراق، و يزرع في العراق في الحقول المكشوفة في الموسم ربيعي والخريفي، كما انه يزرع في البيئة المحمية تحت الأنفاق البلاستيكية الواطئة والبيوت البلاستيكية والزجاجية (4). على الرغم من ان الماء يشكل النسبة الكبيرة من وزن الثمرة الا ان لثماره أهمية غذائية بسبب احتوائها على بروتينات و كربوهيدرات و حامض الأسكوربيك و عناصر غذائية كالپوتاسيوم والكالسيوم والفسفور و الحديد (1). بلغت المساحة المزروعة لمحصول الخيار في العراق لعام 2015 نحو 82160 دونم بإنتاج كلي بلغ 1902.8 طن أي بمعدل إنتاج مقداره 156334 كغم/دونم (2).

يعد مرض تعفن البذور وموت البادرات وتعفن الجذور المتسبب عن الفطر *Pythium aphanidermatum* (Edson)Fitz من بين أكثر الأمراض المهمة التي تصيب نبات الخيار ويسبب خسائر

اقتصادية يحدث المرض بثلاثة حالات الاولى عندما تصاب البذور فيحدث لها تعفن و بالتالي عدم نجاح الانبات وتعرف هذه الحالة بتعفن البذور، اما الحالة الثانية فهي مهاجمة الفطريات للبادرات الخارجه من البذور و قبل ظهورها فوق سطح التربة وتعرف الحالة بموت البادات قبل الظهور (8). أما الحالة الثالثة للمرض فهي اصابة البادات بعد خروجها فوق سطح التربة او اصابة البادات المنقولة الى داخل البيوت المحمية و تعرف هذه الحالة بموت البادات بعد الظهور، أما النباتات الكبيرة فأن الإصابة فيها تؤدي إلى تعفن الشعيرات الجذرية (3).

أن سبب انتشار مرض تعفن البذور و موت البادات في البيوت البلاستيكية والحقل وزيادة الخسائر المادية بعد إعادة زراعة البذور المصابة ساهم في الحد من انتشار زراعة محصول الخيار في قضاء الكوفة في محافظة النجف و الذي كان الدافع في اجراء هذا البحث هادفين الى:

1- عزل و تشخيص الفطر المسبب لمرض تعفن بذور وموت بادرات الخيار مظهرياً.

2- اختبار القدرة المرضية للفطر *P. aphanidermatum* على بذور الخيار.

3- التشخيص الجزيئي لعزلات الفطر *P. aphanidermatum* باستخدام تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase chain reaction) وتحليل تسلسل قواعد النيروجينية لنواتج الحامض النووي المضاعفة من لعزلات الفطرية لمعرفة أوجه التشابه و الاختلاف بين عزلات الفطر المعزولة في هذه الدراسة و العزلات العائدة لنفس الفطر و المسجلة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (National Centre of Biotechnology Information, NCBI, USA).

المواد وطرائق العمل:

مصدر عزلة الفطر *P. phanidermatum*

أجري المسح الحقلية للبيوت البلاستيكية المزروعة بمحصول الخيار في منطقة العباسية وام عباسيات و القزوينية التابعة لقضاء الكوفة في محافظة النجف خلال الموسم الزراعي 2015-2016 و التي انتُخب ثلاثة حقول عشوائياً من كل منطقة وبالتحديد في الفترة الواقعة بين منتصف كانون الأول إلى منتصف كانون الثاني، جمع 50 نبات و بصورة عشوائية و وضعت في أكياس نايلون كتب عليها مكان و تاريخ الجمع و جلبت العينات الى مختبر الدراسات العليا في قسم وقاية النبات /كلية الزراعة/ جامعة الكوفة لغرض اجراء عملية العزل. وضعت الجذور النباتية تحت الماء الجاري لمدة 30 دقيقة و بعدها قطعت الى قطع صغيرة وغسلت بالماء الجاري بماء الحنفية مرة اخرى لإزالة الأتربة العالقة بها و بعدها غسلت قطع الجذور بماء مقطر معقم و نشفت بورق ترشيح للتخلص من الماء الزائد منها.

زرعت القطع النباتية في أطباق بتري حاوية على وسط البطاطا دكستروز آكار الجاهز (Potato Dextrose Agar, P.D.A.) ثم حضنت في درجة حرارة 25 ± 2 م° لمدة خمسة ايام. تم تنقيته عزلات الفطر *P. aphanidermatum* النامي على نفس الوسط الغذائي (P.D.A.).

شخص عزلات الفطر *P. aphanidermatum* مجهريا بأعتقاد المفاتيح التصنيفية المعتمدة (Tsuneowatanabe, 2002). وبمساعدة أ. د. مجيد متعب ديوان و أ. د. صباح لطيف علوان .. كما تم تشخيصها بالاعتماد على تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) و تحديد تسلسل القواعد النيتروجينية وفقاً لطريقة العمل الموصوفة لاحقاً.

اختبار القدرة الامراضية لعزلات الفطر *P. aphanidermatum*

صب الوسط الزرعي P.D.A والمحضر سابقا في اطباق بتري و بعد تصلبها زرع في وسط الطبق قرص قطره 1 سم² لعزلات الفطر *P. aphanidermatum* كل عذلة على انفراد و ذلك من حافة مزارع نقيه عمرها ثلاثة ايام للعزلات التي تم الحصول عليها و بثلاثة مكررات لكل منهما و حضنت الاطباق في الحاضنة. عقت بذور الخيار بهايوكلوورايت الصوديوم (2%) لمدة دقيقتين بعدها غسلت بالماء المقطر المعقم عدة مرات لإزالة وجود المادة المعقمة، ثم وضعت على ورق ترشيح لإزالة الماء الحر منها. زرعت 9 بذور داخل كل طبق بشكل دائري حول المستعمرات النامية لمدة 24 ساعة و على بعد 1 سم من حافة النمو القطري و ثم حضنت الاطباق مرة اخرى في الحاضنة و بعد 10 ايام حسبت النسبة المئوية للبذور المتعفة و حسب المعادلة الآتية:

$$\% \text{ للبذور المتعفة} = \frac{\text{عدد البذور المتعفة}}{\text{العدد الكلي للبذور المزروعة}} \times 100$$

استخلاص الحامض النووي منقوص الاوكسجين (DNA)

استخلص الحامض النووي (DNA) للعزلات الاكثر امراضية وهي المعزولتين من العباسية و أم عباسيات بالاعتماد على طريقة العمل الموصوفة من قبل شركة iNtRoN الكورية و باستخدام العدة (Cat. No. D6005) المجهزة من قبل الشركة المذكورة.

تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)

اجري اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل (P.C.R) باستخدام العدة (Maxime PCR PreMix (i-Taq), Cat. No. 25026) المجهزة من قبل شركة iNtRoN الكورية. نفذ تفاعل البلمرة المتسلسل (P.C.R) بحجم كلي 20 مايكروليتر و الحاوي على واحد مايكروليتر من كل من البادئ الامامي (TCCGTAGGTG (ITS1: AACCTGCGG و الخلفي (TS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC) و كما تم اضافة واحد مايكروليتر من الحامض النووي المستخلص. وضعت جميع هذه المكونات في الانبوبة المجهزة من قبل الشركة المصنعة و اكمل الحجم بالماء (Nuclease-free water) إلى 20 مايكروليتر. تم مضاعفة الحامض النووي (DNA amplification) للفطريات المعزولة باستخدام خطوات و ظروف تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) المبينة في جدول (2).

جدول 1: خطوات و ظروف تفاعل البلمرة المتسلسل (P.C.R) المستخدمة لمضاعفة الحامض النووي (DNA) للعزلات الفطر *P. aphanidermatum* المعزولة في هذه الدراسة.

عدد الدورات	الوقت	درجة الحرارة (م°)	خطوات تفاعل البلمرة المتسلسل
1	5 دقائق	94	مسح الـ DNA الاولي (Initial denaturation)
35	40 ثانيه	94	مسح الـ DNA النهائي (Final denaturation)
	40 ثانيه	55	ارتباط البادئ (Primer annealing)
	1 دقيقة	72	استطالة البادئ (Initial extension)
1	7_5 دقيقة	72	استطالة البادئ النهائية (Final extension)
		4	Hold

بعد اتمام عملية مضاعفة المنطقة المستهدفة و باستخدام البوادئ الامامية و الخلفية المذكورة اعلاه، اضيف خمسة مايكروليتر من الحامض النووي (PCR amplification) المضاعف الى كل حفرة (Well) من حفر طبقة هلام الاكاروز المحضرة سابقا و الحاوية على صبغة الايثيديم برومايد (Ethidium bromide). كما تم اضافة خمسة مايكروليتر من سلم الحامض النووي DNA (1Kbp DNA ladder marker) الى الحفرة الموجودة في الجانب الايسر من العينات المضاعفة لغرض تحديد احجام الحامض النووي المضاعفة. أوصلت أقطاب جهاز الطاقة بالتيار الكهربائي و شغل على 100 ملي امبير و لمدة ساعة و نصف. بعد اكمال عملية الترحيل (Electrophoresis)، فحصت طبقة هلام الاكاروز الحاوية على الحامض النووي المضاعف تحت الاشعة فوق البنفسجية (UV transillumination) و التقطت لها صور.

تحليل تسلسل القواعد النايتروجينية للحامض النووي (DNA) للعزلات الفطرية

ارسلت نواتج الحامض النووي (PCR products) المضاعفة من الفطريات المعزولة (PCR) مع البوادئ الامامية و الخلفية (ITS1 و ITS4) التي استخدمت لمضاعفة الحامض النووي الى شركة Macrogen الكورية لغرض تحديد التسلسل القواعد النيتروجينية و بكلا الاتجاهين الامامي و الخلفي للنواتج المضاعفة. حللت تسلسلات القواعد النايتروجينية باستخدام برنامج (Basic Local Alignment Search BLAST Tool) لمقارنتها مع ما هو متوفر من تسلسلات القواعد النايتروجينية لنفس المنطقة المضاعفة من جينوم الفطر و المتوفرة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية National Center for Biotechnology Information, NCBI).

النتائج و المناقشة:

اظهرت النتائج ان عزلة الفطر *P. aphanidermatum* المأخوذة من منطقة العباسية كانت الاشد تأثيرا في خفض نسبة انبات بذور نبات الخيار و بنسبة بلغت 90%، تلتها العزلة المأخوذة من من منطقة ام عباسيات (74%)، في حين كانت عزلة الفطر *P. aphanidermatum* المأخوذة من منطقة القزونية الاقل تأثيرا في

خفض نسبة الانبات و التي بلغت 72%. قد يعود السبب في اختلاف هذه العزلات الفطرية في شدة مقدرتها الامراضية الى وجود تغاير وراثي بينها و الذي قد يرجع له السبب في اختلاف تلك العزلات الفطرية الى قابليتها على انتاج بعض الانزيمات المحللة للبكتين و السيليلوز (14).

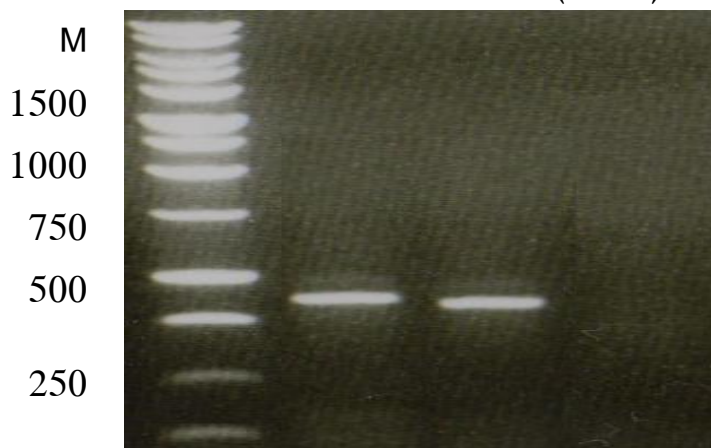
جدول 2 : تأثير الفطر *P. aphanidermatum* المعزول من بعض مناطق محافظة النجف على النسبة

المئوية لتعفن بذور الخيار المنماة في اطباق بتري تحتوي على الوسط الغذائي P.D.A.

المعدل	القزوينية	أم عباسيات	العباسية	المنطقة الفطر
0	0	0	0	Control
78.67	72	74	90	<i>P. aphanidermatum</i>
	36	37	45	المعدل
	4.172 = للتداخل	2.950 = للمنطقة	2.409 = للفطر	L.S.D _{0.05}

التشخيص الجزيئي لعزلات الفطر *P. aphanidermatum*

اظهرت نتائج استخدام البوادئ ITS1 و ITS4 امكانية مضاعفة نواتج الحامض النووي (PCR products) و بالحجم المتوقع (700-800 قاعدة نيتروجينية) بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) من عزلات الفطر *P. aphanidermatum* (شكل 1).



شكل 1: نواتج الحامض النووي المضاعفة بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR-amplified product) من عزلات الفطر *P. aphanidermatum* المعزولة في هذه الدراسة من محافظة النجف (1); و المعزولة من منطقة العباسية (2) والمعزولة من منطقة أم عباسيات (3). (M = 1Kbp DNA ladder marker ; NC : معاملة مقارنة Negative control) بدون DNA مضاف.

اثبتت نتائج تحليل تسلسل القواعد النايتروجينية (اشكال 2 و 3) لنواتج الحامض النووي المضاعفة (P.C.R amplified products) من العزلات الفطرية المعزولة و باستخدام برنامج BLAST بأن جميع العزلات المعزولة تعود الى الفطر *P. aphanidermatum*

.....
10	20	30	40	50
TTTCCACGTG	AACCGTTGAA	ATCATGTTCT	GTGCTCTCTT	TCGGGAGGGC
.....
60	70	80	90	100
TGAACGAAGG	TGGGCTGCTT	AATTGTAGTC	TGCCGATGTA	TTTTTCAAAC
.....
110	120	130	140	150
CCATTTACCT	AATACTGATC	TATACTCCAA	AAACGAAAGT	TTATGGTTTT
.....
160	170	180	190	200
AATCTATAAC	AACTTTCAGC	AGTGGATGTC	TAGGCTCGCA	CATCGATGAA
.....
210	220	230	240	250
GAACGCTGCG	AAC TGCGATA	CGTAATGCGA	ATTGCAGAAT	TCAGTGAGTC
.....
260	270	280	290	300
ATCGAAATTT	TGAACGCACA	TTGCACTTTC	GGGTTATGCC	TGGAAGTATG
.....
310	320	330	340	350
CCTGTATCAG	TGTCCGTACA	TCAAACCTGC	CTTTCTTTTT	CTGTGTAGTC
.....
360	370	380	390	400
AGGGAGAGAG	ATGGCAGAAT	GTGAGGTGTC	TCGCTGGCTC	CCTTTTCGGA
.....
410	420	430	440	450
GGAGAAGACG	CGAGTCCCTT	TAAATGTACG	TTCGCTCTTT	CTTGTGTCTA
.....
460	470	480	490	500
AGATGAAGTG	TGATTCTCGA	ATCGCGGTGA	TCTGTTTGGA	TCGCTTTGCG
.....
510	520	530	540	550
CATTTGGGCG	ACTTCGGTTA	GGACATTAAA	GGAAGCAACC	TCTATTGGCG
.....
560	570	580	590	600
GTATGTTAGG	CTTCGGCCCG	ACGTTGCAGC	TGACAGAGTG	TGGTTTTCTG
.....
610	620	630	640	650
TTCTTTCCCTT	GAGGTGTACC	TGAATTGTGT	GAGGCAATGG	TCTGGGCAAA
.....
660	670	680	690	700
TGGTTGCTGT	GTAGTAGGGT	TTTGCTGCTC	TTGGACGCC	TGTTTTCGGA
.....
	710	720		
	TAGGGTAAAG	GAGGCAACAC	CAA	

شكل 2: تسلسل القواعد النيتروجينية لنتائج الحامض النووي (PCR-amplified product) المضاعف من الفطر *P. aphanidermatum* المعزول من منطقة العباسية في محافظة النجف الاشراف.


```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          10          20          30          40          50
AAGGATCATT ACCACACCAT AAAAAGTTTC CACGTGAACC GTTGAATCA
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          60          70          80          90          100
GAGGGCTGAA CGAAGGTGGG CTGCTTAATT TGTTCTGTGC TCTCTTTCGG
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
110          120          130          140          150
GTAGTCTGCC GATGTATTTT TCAAACCCAT TTACCTAATA CTGATCTATA
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          160          170          180          190          200
CTCCAAAAAC GAAAGTTTAT GGTTTTAATC TATAACAAC TTCAGCAGTG
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          210          220          230          240          250
GATGTCTAGG CTCGCACATC GATGAAGAAC GCTGCGAACT GCGATACGTA
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          260          270          280          290          300
ATGCGAATTG CAGAATTCAG TGAGTCATCG AAATTTTGAA CGCACATTGC
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          310          320          330          340          350
ACTTTCGGGT TATGCCTGGA AGTATGCCTG TATCAGTGTC CGTACATCAA
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          360          370          380          390          400
ACTTGCCTTT CTTTTTCTGT GTAGTCAGGG AGAGAGATGG CAGAATGTGA
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          410          420          430          440          450
GGTGTCTCGC TGGCTCCCTT TTCGGAGGAG AAGACGCGAG TCCCTTTAAA
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          460          470          480          490          500
TGTACGTTTC CTCTTTCTTG TGCTAAGAT GAAGTGTGAT TCTCGAATCG
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          510          520          530          540          550
CGGTGATCTG TTTGGATCGC TTTGCGCATT TGGGCGACTT CGGTTAGGAC
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          560          570          580          590          600
ATTAAAGGAA GCAACCTCTA TTGGCGGTAT GTTAGGCTTC GGCCCGACGT
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          610          620          630          640          650
TGCAGCTGAC AGAGTGTGGT TTTCTGTTCT TTCCTTGAGG TGTACCTGAA
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          660          670          680          690          700
TTGTGTGAGG CAATGGTCTG GGCAAATGGT TGCTGTGTAG TAGGGTTTTG
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          710          720          730          740          750
CTGCTCTTGG ACGCCCTGTT TTCGGATAGG GTAAAGGAGG CAACACCAAT
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          760          770
TTGGGACTGT TTGCAATTTA GTT

```

شكل 3: تسلسل القواعد النيتروجينية لنتائج الحامض النووي (PCR-amplified product) المضاعف من الفطر *P. aphanidermatum* المعزول في هذه الدراسة من منطقة أم عباسيات.

اظهرت نتائج المقارنة تتابع القواعد النيتروجينية لعزلة الفطر *P. aphanidermatum* المعزولة من منطقة أم عباسيات مع ما متوفر في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) بأنها كانت ذات تشابه وراثي بلغ 100% مع معظم العزلات الاخرى العائدة لنفس الفطر و المسجلة في المركز المذكور اعلاه، في

حين كان اقلها تشابهاً وراثياً (98%) مع عزلات الفطر *P. aphanidermatum* المشخصة سابقاً في فرنسا (Accession No. GU827462.1) و امريكا (Accession No. EU169128.1) و إندونيسيا (Accession No. KP183964.1). اما بالنسبة لبقية العزلات الاخرى التابعة للفطر *P. aphanidermatum* المشخصة عالمياً، فقد اعطت نسبة تشابه وراثي بلغت 99%.

جدول 3: مقارنة بين نسب تشابه تسلسلات القواعد النايروجينية لنواتج الحامض النووي المضاعفة من الفطر *P. aphanidermatum*، المعزول في هذه الدراسة من منطقة العباسية في محافظة النجف، و العزلات الاخرى لنفس التابعة لنفس الفطر و المسجلة عالمياً في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI).

Fungus	Isolate or strain name	Origin Iraq	The most similar sequences in GenBank database	
			GenBank Accession Number	Sequence similarity (%)
<i>P. aphanidermatum</i>	CUU 17	Iran	KX788823.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	CUU 21	Iran	KX788822.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	MI0142 18S	Iran	KY052059.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	AZ1	USA	KX397624.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	OPU852 18S	Japan	KT336808.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	KACC 47845	Korea	KR095341.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	PY1:OMAN:14	Oman	KM102739.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	FJTP01 18S	China	KJ162355.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	Pytom 18S 13	Argentina	KF561235.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	T1 18S	Japan	KC438411.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	18S	USA	JQ898455.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	Lev2150 18S	Canada	HQ643441.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	CBS28779 18S	Canada	HQ643439.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	CBS11880 18S	Canada	HQ643438.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	Lahijan 18S	Iran	JF775593.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	A 18S63	USA	EU162763.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	61A 18S	USA	EU162761.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	135	Canada	AY151180.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	S18	USA	DQ059574.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	S18 346952	USA	AF452151.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	340458 18S	USA	AF452148.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	2 18S	China	KC594034.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	LPa-7	Japan	LC143222.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	LPa-1	Japan	LC143220.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	Py7/10 18S	Italy	JX462954.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	R-4449 18S	USA	JF412451.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	GH-A 18S	China	EU327397.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	D 18S24	USA	EU162762.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	P36-3	Japan	AB095052.1	99

<i>P. aphanidermatum</i>	ITS1, 5.8S	EGYPT	AJ628984.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	PY58	Italy	KF840479.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	A 18S66	USA	EU169132.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	P025	Oman	DQ298522.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	P12	USA	AF452153.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	NDSO_L_4-2	USA	KU210124.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	M-5	Oman	KY095191.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	Pa16	India	KF425541.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	PA1	India	JX473000.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	SQU14222	Oman	KY684284.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	C-NESO2_6-13	USA	KU211280.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	MAFF 725009	Japan	AB562499.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	S5.8	India	KY568695.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	DC16	China	AY278109.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	M-3	Oman	KY095179.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	Ger01 18S	USA	EU106140.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	D-11	Oman	KY095159.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	D-4	Oman	Y095128.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	BN-3	Oman	KY095125.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	C-SDSO2_1-5	USA	KU211462.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	NRr1 18S	Iran	KP063124.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	JKI-001-11-00-00-00-00 18S	Germany	KJ755088.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	CBS 118.80 18S	Canada	AY598622.2	99
<i>P. aphanidermatum</i>	HN2-0 18S	China	JN695784.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	Lev1800 18S	Canada	HQ643442.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	VRU 18S	Iran	JF775594.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	VxF1 18S	USA	EU253558.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	R 18S100439	USA	AF452149.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	R 18S141749	USA	AF452146.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	LPa-5	Japan	LC143221.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	UTHSCSA DI-14-349 18S	USA	KP331545.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	HN4-0 18S	China	JN695786.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	HN1298 18S	China	JN695785.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	SD-34.1 18S	France	HM008882.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	UOP390	Japan	AB355599.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	P36-3	Japan	AB095052.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	R 18S363669	USA	AF452150.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	D2.2.2	Australia	KX260336.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	PPRI9009	South Africa	FJ415895.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	WPC:1779B1862	USA	GU983641.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	WPC:1771B1140	USA	GU983640.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	MAFF 725009	Japan	AB562499.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	OA-2	Israel	MF118618.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	S5.8	China	KY568695.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	BS-100	Oman	KY095192.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	DC16	China	AY278109.1	99

<i>P. aphanidermatum</i>	BN-1	Oman	KY095123.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	M-3	Oman	KY095179.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	SQU14004	Oman	KY684286.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	BR-8	Oman	KY095184.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	BR-1	Oman	KY095169.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	BN-23	Oman	KY095166.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	D-12	Oman	KY095160.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	BS-7	Oman	KY095154.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	DK-5	Oman	KY095132.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	DK-2	Oman	KY095129.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	BN-22	Oman	KY095165.1	98
<i>P. aphanidermatum</i>	KW-211	Pakistan	KX364750.1	98
<i>P. aphanidermatum</i>	MAFF 725009	Japan	AB562499.1	98

كما وجد من خلال المقارنة بين تسلسلات القواعد النايتروجينية لنواتج الحامض النووي المضاعفة من الفطر *P. aphanidermatum* المعزول من منطقة منطقة العباسية في محافظة النجف مع قاعدة البيانات المتوفرة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI)، ان اعلى نسبة تشابه وراثي (99%) كانت مع معظم عزلات الفطر *P. aphanidermatum* المسجلة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI)، في حين كان ابعدها تشابهاً وراثياً مع عزلات الفطر *P. aphanidermatum* المعزولة عمان (Accession No. KY095165.1) و باكستان (Accession No. KX364750.1) و اليابان (Accession No. AB562499.1).

يتضح مما تقدم ان عزلة الفطر *P. aphanidermatum* المعزول من منطقة العباسية في محافظة النجف هي عزلة جديدة غير مسجلة سابقا في قاعدة بيانات المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI)، لذا تم تسجيلها و ايداعها في المركز المذكور (NCBI) تحت رقم الادخال (GenBank Accession Number) MF347709.

جدول 4: مقارنة بين نسب تشابه تسلسلات القواعد النايروجينية لنواتج الحامض النووي المضاعفة من الفطر *P. aphanidermatum*، المعزول في هذه الدراسة من منطقة أم عباسيات في محافظة النجف، و العزلات الأخرى لنفس التابعة لنفس الفطر و المسجلة عالمياً في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI).

Fungus	Isolate or strain name	Origin	The most similar sequences in GenBank database	
			Gen Bank Accession Number	Sequence similarity (%)
<i>P. aphanidermatum</i>	-	Iraq*	-	100
<i>P. aphanidermatum</i>	BS-100	Oman	KY095192.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	M-5	Oman	KY095191.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	AZ1	USA	KX397624.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	C-SDSO2_1-5	USA	KU211462.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	OPU852 18S	Japan	KT336808.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	KACC 47845	Korea	KR095341.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	UTHSCSA DI-14-349 18S	USA	KP331545.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	NRr1 18S	Iran	KP063124.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	KC3.3 18S	Iran	KP063123.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	JKI-001-11-00-00-00-00 18S	Germany	KJ755088.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	FJTP01 18S	China	KJ162355.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	13-Pytom 18S	Argentin	KF561235.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	CBS 118.80	Canada	AY598622.2	100
<i>P. aphanidermatum</i>	Py7/10 18S	Italy	JX462954.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	HN4-0 18S	China	JN695786.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	HN2-0 18S	China	JN695784.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	VRU 18S	Iran	JF775594.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	S18	Iran	JF775593.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	A 18S63	USA	EU162763.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	S18 346952	USA	AF452151.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	R 18S100439	USA	AF452149.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	S18 340458	USA	AF452148.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	ITS1, 5.8S	Egypt	AJ628984.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	SQU14004	Oman	KY684286.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	MI0142 18S	Spain	KY052059.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	PY58	Italy	KF840479.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	T1 18S	Japan	KC438411.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	VxF1 18S	USA	EU253558.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	135	Canada	AY151180.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	R 18S141749	USA	AF452146.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	CUU 21	Iran	KX788822.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	D2.2.2	Australia	KX260336.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	CBS11880 18S	Canada	HQ643438.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	S5.8	USA	GU983640.1	100

<i>P. aphanidermatum</i>	BN-2	Oman	KY095124.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	P15	China	KT429654.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	Ger2 18S	USA	EU106141.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	BN-1	Oman	KY095123.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	M-3	Oman	KY095179.1	100
<i>P. aphanidermatum</i>	UOP390	Japan	AB355599.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	ILSO_6-13c	USA	KU208871.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	R-4449 18S	USA	JF412451.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	D 18S24	USA	EU162762.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	GH-A 18S	China	EU327397.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	Pa4 18S	USA	EU162766.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	S18	USA	JQ898455.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	HN1298 18S	China	JN695785.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	A 18S35	USA	EU245039.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	A 18S61	USA	EU162761.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	S18	USA	DQ059574.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	A 18S66	USA	EU169132.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	PPRI9009	South Africa	FJ415895.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	SQU14003	Oman	KY684285.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	P063	Oman	DQ298523.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	P025	Oman	DQ298522.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	Py100	South Africa	KY019283.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	P12	USA	AF452153.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	C-NESO2_6-19	USA	KU211281.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	M-6	Oman	KY095193.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	S18 2	China	KC594034.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	R 18S363669	USA	AF452150.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	SQU14222	Oman	KY684284.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	HG09052001	China	KJ696535.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	SD-34.1 18S	France	HM008882.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	S18 2	China	KC594034.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	KW-211	Pakistan	KX364750.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	OPU811	Japan	AB543064.1	99
<i>P. aphanidermatum</i>	SU10A	France	GU827462.1	98
<i>P. aphanidermatum</i>	67B 18S	USA	EU169128.1	98
<i>P. aphanidermatum</i>	Pp 45	Indonesi	KP183964.1	98

*عزلة الفطر *P. aphanidermatum* المعزولة في هذه الدراسة من منطقة أم عباسيات في محافظة النجف.

استخدم في هذه الدراسة تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل (P.C.R) في تشخيص عزلتين من الفطر *P. aphanidermatum* و التي اثبتت دقتها العالية في تشخيص العديد من الكائنات الحية و منها الفطريات مثل الفطريات *Fusarium spp.* و *Rhizoctonia solani* و *Aspergillus spp.* و غيرها للتخلص من مشاكل التشخيص المعتمدة على الصفات المظهرية (Morphological characters) المختلفة. رغم فائدة تلك الصفات في حصر الفطريات قيد البحث في مجاميع اصغر قبل البدا باستخدام طرائق اخرى في التشخيص فأن هناك الكثير من المشاكل التي تصاحب التشخيص المظهري للفطريات منها الاحتياج الى وقت و جهد كبيرين،

فضلا عن حاجة القائم بعملية التشخيص الى منها خبرة عالية خاصة في الانواع الفطرية القريبة التشابه فيما بينها مثل بعض انواع الفطر (13و20 و 17 و 21و12). كما ان هناك عوامل أخرى ممكن ان تؤثر على تلك الصفات المظهرية و منها الرطوبة و الاضاءة و نوع و طبيعة وسط النمو التي من الممكن ان تؤثر على لون و اشكال و احجام الابواغ و المستعمرات الفطرية النامية. لوحظ من خلال اعادة التشخيص باستخدام تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل (P.C.R) ان هناك خطأ في التصنيف المظهري للعديد من الفطريات المشخصة في دراسات سابقة و منها انواع تابعة للفطر *Fusarium spp.* مثل *Fusarium verticillioides* و *Fuarium subglutinans* (11).

اثبتت طريقة التشخيص باستخدام تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل (P.C.R) و بالاعتماد على الاختلافات الموجودة في تسلسل الحامض النووي لمنطقة الـ ITS (Internal transcribed spacer) كفاءة عالية في تشخيص العديد من الفطريات مثل *Fusarium spp.* و *Cladosporium spp.* و *Fusarium verticillioides* (9 و 11 و 7 و 6). يعد التشخيص الدقيق للمسببات المرضية و منها الفطريات من الحاجات الملحة من اجل تحقيق الهدف المنشود في الوصول الى طريقة او طرائق كفؤة في إدارة المرض، عمليات الحجر الزراعي لحماية المحاصيل الزراعية و ايضا المصادر الطبيعية الاخرى (15).

References:

1. **Stephen, Zahir A. (2007)** Protected vegetable diseases Ministry of Agriculture Extension Department And agricultural training, guidance manual
2. **Central Statistical Organization (2015)** Annual Statistical Abstract-Ministry of Planning – Iraq.
1. **Maulan, Y. Y; Salaheddine H. M and Yasser E. I. (2008)** Diagnosis Fungal diseases and methods of control. King Saud University, Faculty of Food and Agricultural Sciences, Department of Plant Protection.
2. **Wanted, Adnan N. Izzedine S. and Karim S. J. (1989)** Production of vegetables. Mosul Press. 337 pages.
3. **Alaei H; Amir H. M. and Ali D. (2012)** Molecular characterization of the rDNA-ITS sequence and a PCR diagnostic technique for *Pileolaria terebinthi*, the cause of pistachio rust. *Phytopathologia Mediterranea*, 51(3) : 488-495.
4. **Alhussaini, M. S; Moslem, M. A.; Alghonaim, M. I.; Al-Ghanayem, A. A.; AL-Yahya, A. A. I.; Hefny, H. M. and Saadabi, A. M. (2016)** Characterization of *Cladosporium* species by internal transcribed spacer-PCR and microsatellites-PCR. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4(19) : 143-157.
5. **Arif, M.; Shilpi, C; Zaidi, N. W.; Rayar J. K.; M. Variar and U. S. Singh (2012)** Development of specific primers for genus *Fusarium* and *F. solani* using rDNA sub-unit and transcription elongation factor (TEF-1 α) gene. *African Journal of Biotechnology*, 11(2) : 444-447.
6. **Agrios , G. N. (2005)** Plant pathology .5th ed .Academic Press .PP.952

7. **Chandra, S. N.; Shankar, A. C. U.; Niranjana, S. R. and Prakash, H. S. (2008)** Molecular detection and characterization of *Fusarium verticillioides* in maize (*Zea mays* L.) grown in southern India. *Annals of Microbiology*, 58 (3): 359 - 367.
8. **Dewan, M.M. (1989)** Identity and frequency of occurrence of fungi in roots of Wheat and rye grass and their effect on take-all and host growth. Ph. D. Thesis, Univ. Wes. Australia. 210pp.
9. **Hsuan, H. M.; Baharuddin, S. and Latiffah, Z. (2011)** Molecular Identification of *Fusarium* Species in *Gibberella fujikuroi* Species Complex from Rice, Sugarcane and Maize from Peninsular Malaysia. **International Journal of Molecular Sciences**, 10(12) : 6722-6732.
10. **Huang, A.; Li, J. W.; Shen, Z.Q.; Wang, X.W. and Jin, M. (2016)** High-throughput identification of clinical pathogenic fungi by hybridization to an oligonucleotide microarray. *Journal of Clinical Microbiology*, 9 (44) : 3299-3305.
11. **Leslie, J.F. and B.A. Summerell. (2006)** The *Fusarium* Laboratory Manual photographs by Suzanne Bullock. 388 . pp .
12. **Onuh, O. M. and Ohazurike, N. C. (2008)** Effects of culture ages on the production and activities of polygalacturonase and cellulose (Cx) enzymes produced by *Pythium aphanidermatum* (Edson Fitzpat.) isolated from soft stem rot disease of cowpea. *Science World Journal*, 3 (2):5-9.
13. **Rossman, A.Y; G. J. Samuels, C.T. Rogerson and R. Lowen (1999)** Genera of Bionectriaceae, Hypocreaceae and Nectriaceae (Hypocreales, Ascomycetes). *Studies in Mycology*, 1 (42);1-248.
14. **Tsuneo watanabe (2002)** Pictorial atlas of soil and seed fungi Morphologies of Cultured fungi and Key to Species .Second Edition.
15. **Wang, Y. K.; Shi, Y.X.; Li, B. J. and Chen, H. M. (2008)** Studies on identification and expeditious detection of cucumber *Fusarium* wilt. *China Vegetables*, 1 (11); 18-22.
16. **Zhang S.; Zhao, X.; Wang, Y.; Li, J.; Chen, X.; Wang, A. and Li, J. (2012)** Molecular detection of *Fusarium oxysporum* in the infected cucumber plants and soil. *Pakistan Journal of Botany*, 44(4): 1445-1451.
17. **William W. W; Mackey K. and Chomczynski P. (1997)** Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity . *Biotechnology techniques*, 22 (3) : 474 – 481.
18. **Yahya, A. A.I.; Hefny, H. M. and Saadabi, A. M. (2016)** Characterization of *Cladosporium* species by internal transcribed spacer-PCR and microsatellites-PCR. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4(19) : 143-157.
19. **Zheng, Z. X. and Shetty, K. (2000)**. Enhancement of Pea (*Pisum Sativum*) Seedling vigor and associated phenolic content by extracts of apple pomace fermented with *Trichoderma* spp . *Process Biochemistry*, 36 (1 - 2) : 79 - 84.