

**التشخيص الجزيئي لعزلات تابعة للفطريات *Rhizoctonia solani* و *Fusarium verticilliodes* و *Fusarium solani* و *Pencillium tardochoyrogenum***

المعزولة من جذور بعض نباتات الطماطة (*Solanum lycopersicum* L.)

عقيل نزال العابدي<sup>1</sup> أحمد برير أبودكة<sup>1</sup> نور علي الغزالي<sup>1</sup> أمل عاجل علي<sup>2</sup>  
استاذ مساعد

<sup>1</sup>قسم وقاية النبات-كلية الزراعة-جامعة كربلاء

<sup>2</sup>قسم وقاية النبات-كلية الزراعة-جامعة الكوفة

البريد الالكتروني: aqlabedy@yahoo.co.uk

المستخلص:

اجريت هذه الدراسة في مختبر فايروسات النبات التابع لكلية الزراعة في جامعة كربلاء بهدف عزل و تشخيص بعض الفطريات، من جذور بعض نباتات الطماطة النامية في الانفاق البلاستيكية الواقعة في احدى المزارع الصحراوية في محافظة كربلاء خلال الموسم الزراعي 2016-2017، باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase chain reaction, PCR) و تحديد تسلسل القواعد النايتروجينية لنواتج الحامض النووي المضاعفة (PCR-amplified products) بواسطة البواديء ITS1 و ITS4.

اثبتت نتائج تحليل تسلسلات الحوامض النووية المضاعفة و باستخدام برنامج (Basic Local BLAST Alignment Search Tool) ان العزلات المشخصة هي عائدة الى الفطريات *Rhizoctonia solani* و *Fusarium verticilliodes* و *Fusarium solani* و *Pencillium tardochoyrogenum*.

كما وجد من خلال مقارنة تسلسلات القواعد النايتروجينية مع البيانات المتوفرة في قاعدة المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (National Center for Biotechnology Information, NCBI) ان عزلات الفطر *R. solani* و *P. tardochoyrogenum* (AQNOAH و Baghdad، على التوالي) المشخصة في هذه الدراسة هي عزلات جديدة غير معروفة سابقا، لذا تم تسجيلها في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) تحت ارقام الادخال (GenBank accession numbers) KY055374 و KY055375 4.

**Molecular identification of isolates belonged to the fungi *Rhizoctonia solani*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium solani* and *Pencillium tardochrysogenum* isolated from roots of some tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.)**

Aqeel N. AL-Abedy<sup>1</sup> Ahmed B. Abu-Duka<sup>1</sup> Noor A. AL-Ghazali<sup>1</sup> Amel A. Ali<sup>2</sup>  
Assistant Professor

<sup>1</sup>Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Karbala.

<sup>2</sup>Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Kufa.

E-mial address: [aqlabedy@yahoo.co.uk](mailto:aqlabedy@yahoo.co.uk)

**Abstract:**

This study was carried out in the Plant Virology Laboratory belonging to the Plant Protection Department at the Faculty of Agriculture-Karbala University with the aim of isolation and molecular identification of five fungi, isolated from the roots of some tomato plants growing in the plastic tunnels located in a desert region in Karbala governorate during the agricultural season 2017-2016, using the polymerase chain reaction (PCR) technique and determining the sequences of nitrogen bases of PCR products amplified by the universal primers ITS1 and ITS4.

Results, obtained from the PCR amplification and analysis of the sequences of nitrogen bases of PCR-amplified products using BLAST program (Basic Local Alignment Search Tool), showed that the identified isolates are belonged to the fungi *Rhizoctonia solani*, *F. verticillioides*, *F. solani* and *P. tardochrysogenum*. From the comparison of the sequences of nitrogen bases obtained from the identified fungal isolates with those available at the National Center for Biotechnology Information (NCBI), it was revealed that the identified fungi *R. solani* and *P. tardochrysogenum* were not previously recorded at NCBI, therefore; the identified sequences of these fungi have been deposited and recorded in GenBank database (NCBI) under the accession numbers: KX255861 and KX555634.

**المقدمة :**

لا يخلو اي مكان في الطبيعة من تواجد الفطريات فهي متواجدة في كافة الانظمة البيئية و بأعداد كبيرة قد تصل الى خمسة اضعاف اعداد النباتات بالرغم من ان العديد من بلدان العالم يفتقر الى التعريف الدقيق للفطريات و هذا ما يعكس الرأي العالمي بأن اكثر من 90% من انواع الفطريات ما زال غير معروف و يحتاج الكشف عنها (12,9). التربة هي المستودع الرئيس لجميع الكائنات الحية المجهرية ومنها الفطريات *Fusarium spp.* و *R. solani* و التي تعد من اخطر الفطريات ضررا على النباتات و منها النباتات الاقتصادية و كذلك نباتات الزينة و غيرها، اذا انها تتواجد بعيدة عن منظور الانسان و غالبا ما تظهر اثارها السلبية على النباتات بعد ان تكون قد فتكت تماما بمجموعها الجذري فضلا عن انها تمتلك مدى عائلي واسع، كما انها تتحمل الظروف البيئية المتطرفة (6, 15).

يعد التصنيف الدقيق للفطريات من الامور الضرورية جدا لأهميته في تشخيص المسبب المرضي و كذلك معرفة طرق انتشاره اضافة الى معرفة تأثير العوامل البيئية المختلفة عليه من اجل الوصول الى ادارة كفاءة

للمرض (15). اشارت العديد من الدراسات بأن الصفات المظهرية (Morphological characteristics) لا يمكن الاعتماد عليها في تشخيص الفطريات لأنها قد تعطي نتائج دقيقة احيانا الا انه في الغالب لا يعول عليها من قبل العديد من الباحثين لكونها تحتاج الى خبرة كافية في مجال تصنيف الفطريات و خاصة عند العمل مع المجاميع الفطرية القريبة الشبه الى حد كبير اضافه الى احتياجها الى وقت و جهد كبيرين، كما ان احجام و اشكال و كذلك الوان الابواغ و المستعمرات الفطرية ممكن ان تتأثر بعوامل البيئة المختلفة (11,17,20,21). اسهمت دقة و حساسية العديد من تقانات التصنيف المعتمدة على علم الاحياء الجزيئي (Molecular biology) في الكشف و دراسة الاختلافات الوراثية بين العديد من الكائنات الحية و منها الفطريات، اضافة الى التخلص من سلبيات الطرق التقليدية (8, 16). تعد تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase chain reaction, PCR) واحدة من التقنيات الجزيئية المعتمدة على استهداف و تضخيم منطقة معينة من جينوم الكائن الحي للكشف عن العلاقات الوراثية المختلفة بين انواع الفطريات و التي يمكن من خلالها دعم نتائج التشخيص المظهري للفطريات (3; 5). استخدم هذه التقنية من قبل العديد من الباحثين في تشخيص العديد الفطريات مثل *Fusarium spp.* و *Pileolaria terebinthi* و *R. solani* و *Aspergillus spp.* (1, 2), نظرا لأهمية التصنيف الدقيق للفطريات، فقد هدفت هذه الدراسة الى تشخيص عزلات مختلفة من الفطريات باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) و تحديد تسلسل القواعد النايروجينية لنواتج الحامض النووي المضاعفة (PCR amplified products) من الفطريات المعزولة بهدف معرفة أوجه التشابه و الاختلاف الوراثي بين هذه العزلات الفطرية و العزلات الاخرى المسجلة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (Center for Biotechnology Information, NCBI).

#### المواد وطرائق العمل:

#### مصدر العزلات الفطرية

جمعت عينات من جذور بعض نباتات الطماطة التي ظهرت عليها اعراض نمو غير طبيعية مثل الاصفرار و الذبول من بعض الانفاق البلاستيكية الواقعة في احدى المزارع الصحراوية في محافظة كربلاء و جلبت الى مختبر فايروسات النبات التابع لقسم وقاية النبات في كلية الزراعة/ جامعة كربلاء لأجراء عملية العزل للفطريات. غسلت الجذور تحت ماء حنفية لمدة 20 دقيقة ثم قطعت الى قطع صغيرة واعد غسلها بماء الحنفية مرة اخرى لإزالة الأتربة العالقة بها، ثم عقت بمحلول هايبيكلورايت الصوديوم (1%) لمدة دقيقتين، بعدها غسلت بماء مقطر معقم و نشفت بورق ترشيح لإزالة الماء الزائد منها. زرعت القطع النباتية في أطباق بتري حاوية على وسط البيطاطا الجاهز (PSA) المعقم و المضاف إليه المضاد الحيوي كلورام فينكول (Chloramphenicol) بتركيز 200 ملغم. لتر<sup>-1</sup> و حضنت في درجة حرارة 25 ± 2 م° لمدة اربعة ايام. تم تنقيته الفطريات النامية على نفس الوسط الغذائي (PSA) بإتباع طريقة طرف الهايفا و بتكرار عملية العزل للحصول على نموات نقية لاستخدامها في عملية استخلاص الحامض النووي (DNA). شخصت الفطريات

المعزولة بالاعتماد على تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) و حدد تسلسل القواعد النيتروجينية وفق طريقة العمل المذكورة لاحقاً.

### التشخيص الجزيئي للفطريات المعزولة في هذه الدراسة

#### استخلاص الحامض النووي منقوص الاوكسجين (Deoxyribonucleic acid, DNA)

استخلص الحامض النووي (DNA) باستخدام العدة (Cat. No: FAPGK100) المجهزة من قبل شركة فافورجين (Favorgen) تايوان - الصين، و بأتباع الخطوات الموصوفة من قبل الشركة المصنعة. تم قياس تركيز و نقاوة الحامض النووي DNA باستخدام جهاز قياس الطيف الضوئي (Spectrophotometer) تحت الاطوال الموجية 260 و 280 نانوميتر (19).

#### تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)

تم اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) باستخدام العدة (PCR PreMix, Cat. No. K-2012) المجهزة من قبل شركة Bioneer الكورية المنشأ. نفذ تفاعل البلمرة المتسلسل بحجم اجمالي 20 مايكرو ليتر و الحاوية على 1 مايكرو ليتر من الحامض النووي (DNA) و 1 مايكرو ليتر من كل البادئ الامامي (5'-TC (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGCI- الخلفي و CGTAGGTGAACCTGCGG-3':ITS1) (3':ITS4) (18). وضعت جميع المواد و بإضافاتها المطلوبة في الانبوبة المجهزة من قبل الشركة المصنعة و اكمال الحجم بالماء (Nuclease-free water) إلى 20 مايكرو ليتر.

تم مضاعفة الحامض النووي للفطريات المعزولة باستخدام خطوات و ظروف تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) التالية: عملية مسخ اولي (Initial denaturation) للحامض النووي (DNA) لمدة 5 دقيقة في درجة حرارة 94 م متبوعة بـ 35 دورة مكونه من بعملية مسخ نهائي (Final denaturation) لمدة 30 ثانية في درجة حرارة 94 م، ارتباط البوادئ (Primer annealing) لمدة 30 ثانية في درجة حرارة 55 م و من ثم استطالة اولية (Initial extension) لنواتج الحامض النووي المضاعف (PCR product) لمدة 1 دقيقة في درجة حرارة 72 م و انتهاء تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) بخطوة الاستطالة النهائية (Final extension) في درجة حرارة 72 م (21).

#### الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز (Agarose gel electrophoresis)

حضرت طبقة هلام الاكاروز (Agarose gel) بعد اخذ وزن 1 غم من مسحوق الاكاروز و اذابته في 100 مل من المحلول الدائري 1×TBE (Tris boric acid EDTA buffer) و لحين تحول الخليط الى محلول رائق، و بعدها اضيف 5 مايكروليتر من صبغة الاثيديم برومايد (Ethidium bromide) بعد انخفاض درجة المحلول (40-45 م). جهز القالب الخاص بصب هلام الاكاروز و الحاوي على المشط في إحدى نهاياته لعمل حفر داخل طبقة الجل، ثم صب الاكاروز المذاب و الحاوي على صبغة الاثيديم برومايد (Ethidium bromide) و ترك ليتصلب في درجة حرارة الغرفة. بعد تصلب طبقة الاكاروز، رفع المشط بحذر وأعيد القالب

الى مكانه في جهاز الترحيل، ثم أضيف المحلول الدارئ  $1 \times$  TBE إلى حوض الترحيل (Electrophoresis tank) مغطياً طبقة هلام الاكاروز بارتفاع 1 سم تقريباً.

اضيف 5 مايكرو ليتر من الحامض النووي المضاعف (PCR-amplified product) الى كل حفرة (Well) من حفر طبقة هلام الاكاروز. كما و تم اضافة 5 مايكرو ليتر من سلم الحامض النووي DNA (1Kbp DNA ladder marker) الى الحفرة الموجودة في الجانب الايسر من العينات المضافة بهدف تحديد احجام الحامض النووي المضاعف. أوصلت أقطاب الجهاز بالتيار الكهربائي و شغل جهاز الطاقة (Power supply) على 150 ملي امبير لمدة ساعة و نصف. بعد اكمال عملية ترحيل العينات، فحصت طبقة هلام الجل الحاوية على نواتج الحامض النووي تحت الاشعة فوق البنفسجية (UV transillumination) و اخذت صور لها.

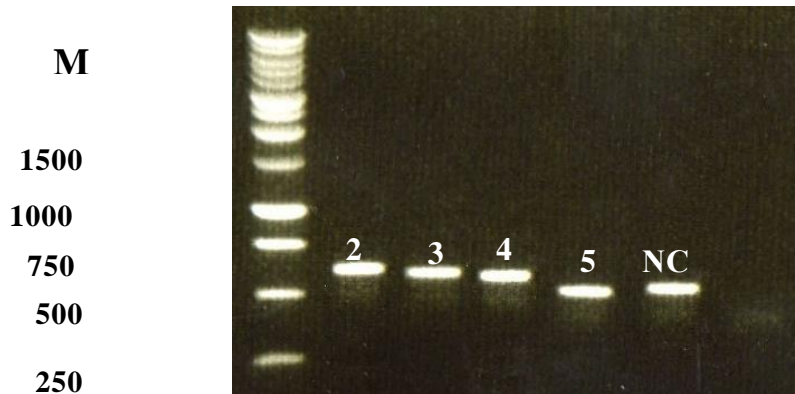
**تحليل تسلسل القواعد النايتروجينية للحامض النووي (DNA) المضاعف من الفطريات المعزولة**

تم ارسال نواتج الحامض النووي (PCR-amplified products) المضاعفة من الفطريات المعزولة بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) مع البودئ الامامية و الخلفية (ITS1 و ITS4) التي استخدمت لعملية التضاعف الى شركة Macrogen الكورية لغرض تحديد تسلسل القواعد النايتروجينية و بالاتجاهين الامامي و الخلفي للنواتج المضاعفة. حللت التسلسلات النايتروجينية باستخدام برنامج (Basic Local Alignment Search Tool) و تم مقارنتها مع البيانات المسجلة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (National Center for Biotechnology Information, NCBI) و العائدة لنفس العزلات الفطرية المشخصة عالمياً.

**النتائج و المناقشة :**

**تشخيص الفطريات المعزولة**

اظهرت النتائج امكانية مضاعفة نواتج من الحامض النووي (PCR products) و بأحجام تراوحت تقريباً بين 500-800 زوج قاعدة نايتروجينية (Base pairs, bp) بعد استخلاص الحامض النووي من الفطريات المعزولة و تعريضه الى تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) و بوجود البادئات الامامية و الخلفية ITS1 و ITS4 (شكل 1).



1) من الفطريات (PCR) المضاعفة باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (DNA): نواتج الحامض النووي 1 شكل  
M. = 1Kbp DNA ladder marker (5) و *P. tardochrysogenum* (4) و *F. solani* (3) و *F. verticillioides* (2) و  
PCR. الى بقية مكونات الـ DNA: معاملة مقارنة (بدون اضافة NC marker).

اثبتت نتائج تحليل تسلسل القواعد النايروجينية (اشكال 2 و 3 و 4 و 5 و 6) لنواتج الحامض النووي المضاعفة (PCR products) من الفطريات المعزولة في هذه الدراسة و باستخدام برنامج BLAST بأن العزلات المشخصة تعود الى انواع الفطريات *Rhizoctonia solani* و *Fusarium verticilliodes* و *Pencillium tardo-chrysogenum* و *Fusarium solani*.

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          10          20          30          40          50
CGGAAGGATC ATTAATGAAC TCGGGAAGGA TCATTAATGA ATTTAATGTA
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          60          70          80          90         100
GAGATTTGGT TGTAGCTGGC CCCTTCAATT TAATTTGTTG TTGGGCATGT
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          110         120         130         140         150
GCACACCTTT TTTTTTCATC CACACACACC TGTGCACTTG TGAGACAGTT
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          160         170         180         190         200
TGGAGGACTT TATTGGACTC CCTTCTGTCT ACTTAATTTA CACAAACTCA
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          210         220         230         240         250
ATTTAATTTA AACTGAATGT AATTGATGTA ACGCATTAA TAATAAGTTT
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          260         270         280         290         300
CAACAACGGA TTTTTTGGCT CTCGCATCGA TGAAGAACGC AGCGAAATGC
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          310         320         330         340         350
GATAAGTAAT GTGAATTGCA GAATTCAGTG AATCATTGAA TTTTTGAACG
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          360         370         380         390         400
CACCTTGCGC TCCTTGGTAT TCCTTGGAGC ATGCCTGTTT GAGTATCATG
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          410         420         430         440         450
AAATTTTCAA AGTAAAATTT TTTGTTAAAT CAATTGGTTT TTTACTTTGG
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          460         470         480         490         500
TATTGGAGGT CTTTGCAGCT TCACACCTGC TCCTCTTTGT TTATTAGCTG
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          510         520         530         540         550
GATCTCAGTG TTATGCTTGG TTCCAATCGG CGTGATAAGT TATCTATCGC
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          560         570         580         590         600
TGAGGACACT GTAAAAGGTG GCCAAGGTAA ATGCAGATGA ACCGCTTCTA
.....|.....| .....|.....| .....|.....|
          610         620         630
ATAGTCATT GACTTGGACA ATAATTTTTA

```

شكل 2: تسلسل القواعد النايروجينية لناتج الحامض النووي (PCR-amplified product) المضاعف من الفطر *R. solani* (1) بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR).

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      10          20          30          40          50
ATTACCTGCG GAAGGATCAT TATTGAATTT AATGTAGAGA TTTGGTTGTA
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      60          70          80          90          100
GCTGGCCCCCT TCAATTTAAT TTGTTGTTGG CCATGTGCAC ACCTTTCTTT
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      110         120         130         140         150
TTCATCCACA CACACCTGTG CACTTGTGAG ACAGTTTGGG GGACTTTATT
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      160         170         180         190         200
GGACTCCCTT CTGTCTACTT AATTTACACA AACTCAATTT AATTTAAACT
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      210         220         230         240         250
GAATGTAATT GATGTAACGC ATTTAATAAT AAGTTTCAAC AACGGATTTT
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      260         270         280         290         300
TTGGCTTTTG CATCGATGAA GAACGCAGCG AAATGCGATA AGTAATGTGA
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      310         320         330         340         350
ACTGCAGAAT TCAGTGAATC ATTGAATTTT TGAACGCCCC TTGCGCTCCT
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      360         370         380         390         400
TGGTATTCCT TGGAGCATGC CTGTTTGGAGT ATCATGAAAT TTTCAAATA
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      410         420         430         440         450
AAATTTTTTG TTAAATCAAA TGGTTTTTTTA CTTTGGTATT GGAGGTCTTT
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      460         470         480         490         500
GCAGCTTCAC ACCTGCTCCT CTTTGTTTAT TAGCTGGTTC TCAGTGTAT
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      510         520         530         540         550
GCTTGGTTCC ACTCGGCGTG ATAAGTTATT ATCGCTGAGG AACTGTAAA
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      560         570         580         590         600
AGGTGCCAAG GTAAATGCAG ATGAACCGCT TCTAATAGTC CATTGACTTG
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      610         620
GACAATAATT TTTATGATCT GATC

```

شكل 3: تسلسل القواعد النايتروجينية لنتائج الحامض النووي (PCR-amplified product) المضاعف من الفطر *R. solani* (2) بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR).

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      10      20      30      40      50
TTCCGTAGGG TGACCTGCGG AGGATCATT ACCGAGTTTA CAACTCCCAA
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      60      70      80      90     100
ACCCCTGTGA ACATACCAAT TGTTGCCCTCG GCGGATCAGC CCGCTCCCGG
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     110     120     130     140     150
TAAAACGGGA CGGCCCGCCA GAGGACCCCT AA ACTCTGTT TCTATATGTA
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     160     170     180     190     200
ACTTCTGAGT AAAACCATAA ATAAATCAAA ACTTTCAACA ACGGATCTCT
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     210     220     230     240     250
TGGTTCGGC ATCGATGAAG AACGCAGCAA AATGCGATAA GTAATGTGAA
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     260     270     280     290     300
TTGCAGAATT CAGTGAATCA TCGAATCTTT GAACGCACAT TGCGCCCGCC
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     310     320     330     340     350
AGTATTCTGG CGGGCATGCC TGTTGAGCG TCATTTCAAC CCTCAAGCCC
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     360     370     380     390     400
TCGGGTTTGG TGTTGGGGAT CGGCGAGCCC TTGCGGCAAG CCGGCCCCGA
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     410     420     430     440     450
AATCTAGTGG CGGTCTCGCT GCAGCTTCCA TTGCGTAGTA GTAAAACCCT
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     460     470     480     490     500
CGCAACTGGT ACGCGGCGCG GCCAAGCCGT TAAACCCCA ACTTCTGAAT
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     510     520     530     540     550
GTTGACCTCG GATCAGGTAG GAATACCCGC TGA ACTTAAG CATATCAATA

```

شكل 4 : تسلسل القواعد النايروجينية لنتاج الحامض النووي (PCR-amplified product) المضاعف من الفطر *F. verticillioides* بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR).



```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      10      20      30      40      50
TCAGCTCATC ACCCTGTGAC ATACCTATAA CGTTGCCTCG GCGGGAACAG
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      60      70      80      90     100
ACGGCCCCGT AACACGGGCC GCCCCCGCCA GAGGACCCCC TAACTCTGTT
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     110     120     130     140     150
TCTATAATGT TTCTTCTGAG TAAACAAGCA AATAAATTAA AACTTTCAAC
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     160     170     180     190     200
AACGGATCTC TTGGCTCTGG CATCGATGAA GAACGCAGCG AAATGCGATA
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     210     220     230     240     250
AGTAATGTGA ATTCAGAAAT TCAGTGAATC ATCGAATCTT TGAACGCACA
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     260     270     280     290     300
TTGCGCCCGC CAGTATTCTG GCGGGCATGC CTGTTGAGC GTCATTACAA
.....|.....| .....|.....| .....|.....
     310     320
CCCTCAGGCC CCCGGGCCTG GCGCTTGG

```

شكل 5 : تسلسل القواعد النايتروجينية لنتاج الحامض النووي (PCR-amplified product) المضاعف *F. solani* بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR).

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      10      20      30      40      50
GTCCAACCTC CCACCCGTGT TTATTTTACC TTGTTGCTTC GCGGGGCCCG
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      60      70      80      90     100
CCTTAACTGG CCGCCGGGGG GCTTACGCC CCGGGCCCGC GCCCGCCGAA
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     110     120     130     140     150
GAAGACCCTC GAACTCTGTC TGAAGATTGT AGTCTGAGTA AAAATATAAA
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     160     170     180     190     200
TTATTTAAAA CTTTCAACAA CGGATCTCTT GGTTCCGGCA TCGATGAAGA
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     210     220     230     240     250
ACGCAGCGAA ATGCGATACG TAATGTGAAT TGCAAATTCA GTGAATCATC
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     260     270     280     290     300
GAGTCTTTGA ACGCACATG CGCCCCCTGG TATTCGGGG GGCATGCCTG
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     310     320     330     340     350
TCCGAGCGTC ATTGCTGCTC TCAAGCACGG CTTGTGTGTT GGGCCCCGTC
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     360     370     380     390     400
CTCCGATCCC GGGGGACGGG CCCGAAAGGC AGCGGCGGCA CCGCGTCGTG
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     410     420     430     440     450
GTCCTCGTGG CGTATGGGGC TTTGTCACCC GCTCTGTAGG CCCGGCCGGC
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     460     470     480     490     500
GCTTGCCGAT CAACCTAAAT TTTTATCCAG GTTGACCTCG GATCAGGTAG
.....|
GGATA

```

شكل 6: تسلسل القواعد النايتروجينية لنتاج الحامض النووي (PCR-amplified product) المضاعف من الفطر *P. tardochrysoygenum* بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR).

اتضح من خلال مقارنة تسلسل القواعد النايتروجينية لنواتج الحامض النووي المضاعف من الفطر *R. solani* (1) مع البيانات المتوفرة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) ان اعلى نسبة تشابه وراثي لهذه العزلة بلغت 100 و 99% مع عزلات الفطر *R. solani* المعزولة من الهند (JF701745 و JF701744، على التوالي)، في حين كانت الاكثر تباعدا وراثيا (91%) عن عزله الفطر *R. solani* المعزول من كوستا ريكا (JX294349). كما اظهرت نتائج التحليل ان العزلات الاخرى اعطت نسب تشابه وراثي تراوحت بين 92-98% مع عزله الفطر *R. solani* المعزول في هذه الدراسة (جدول 1).

جدول 1: مقارنة بين نسب تشابه تسلسل القواعد النايتروجينية للفطر *R. solani* (1) المعزول في هذه الدراسة مع العزلات الاخرى التابعة لنفس الفطر و المسجلة عالميا في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI).

The most similar sequences in GenBank database

Fungus	Isolate or strain name	Origin	GenBank Accession Number	Sequence similarity (%)
		India	JF701745	
<i>R. solani</i>	RKNG9			100
<i>R. solani</i>	_*	Iraq	-	100
		India	JF701744	
<i>R. solani</i>	RKNM8			99
			KY055374	
<i>R. solani</i>	AQNOAH	Iraq		98
		India	JF701742	
<i>R. solani</i>	RKLC1			96
		India	JF701784	
<i>R. solani</i>	RUPP93			96
		India	KC997793	
<i>R. solani</i>	RKNM3			96
		Iraq		
<i>R. solani</i>	IQ49		KF372653	96
<i>R. solani</i>	IQ23	Iraq	KF372645	96
		Malaysia		
<i>R. solani</i>	SPM1		KX674533	96
		Mexico		
<i>R. solani</i>	AYS DIN		KX592586	96

		India	KJ466117	
<i>R. solani</i>	RsolTeaIN1			95
		India	JF701771	
<i>R. solani</i>	RUPC95			95
<i>R. solani</i>	IQ35	Iraq	KF372646	95
<i>R. solani</i>	IQ40	Iraq	KF372662	95
		India	JF701717	
<i>R. solani</i>	RDLM6			94
<i>R. solani</i>	Babylon	Iraq	KY283953	94
<i>R. solani</i>	CR 8	Brazil	KT362074	92
<i>R. solani</i>	CHR09-19	China	HQ270173	92
<i>R. solani</i>	RT 5-3	USA	FJ746908	92
<i>R. solani</i>	RT 8-2	USA	FJ746916	92
<i>R. solani</i>	EV_7	USA	KX118354	92
<i>R. solani</i>	KARS02_2_5	USA	KX118362	92
<i>R. solani</i>	RT 8-3	USA	FJ746917	92
		USA		
<i>R. solani</i>	KARS02_1_9		KX118361	92
<i>R. solani</i>	KARS02_1_8	USA	KX118360	92
<i>R. solani</i>	BVT_16	USA	KX118335	92
<i>R. solani</i>	RT 8-1	USA	FJ746915	92
<i>R. solani</i>	RT 5-1	USA	FJ746906	92
<i>R. solani</i>	BVT_20	USA	KX118337	92
<i>R. solani</i>	KARS02_1_6	USA	KX118359	92
<i>R. solani</i>	EV_19	USA	KX118351	92
<i>R. solani</i>	RT 5-2	USA	FJ746907	92
<i>R. solani</i>	G14	Costa Rica	JX294349	91

\*عزلة الفطر *R. solani* المعزولة في هذه الدراسة.

كما اظهرت نتائج مقارنة تسلسل ناتج الحامض النووي المضاعف من الفطر *F. verticillioides* مع البيانات المتوفرة في قاعدة المركز الوطني لعلوم التقنية الحيوية (NCBI) ان هذه العزلة كانت الاكثر تقاربا وراثيا مع عزلات الفطر *F. verticillioides* المعزولة من الصين (KT224787.1) و الهند

(KM434131.1) و ماليزيا (KM396284.1) و كينيا (KU680391.1) و بنسبة تشابه بلغت 99% (جدول 2).

جدول 2: مقارنة بين نسب تشابه تسلسل القواعد النايروجينية للفطر *F. verticillodes* المعزول في هذه الدراسة و العزلات الاخرى العائدة لنفس الفطر و المسجلة عالميا في المركز الوطني لمعلومات التقتية الحيوية (NCBI).

Fungus	Isolate name	Origin	The most similar sequences in GenBank database	
			Gen Bank Accession Number	Sequence similarity (%)
<i>F. verticillode</i>	*	Iraq	-	100
<i>F. verticillodes</i>	S9	China	KT224787.1	100
<i>F. verticillodes</i>	BPFus 01 18S	India	KM434131.1	99
<i>F. verticillodes</i>	UZ487 18S	Malaysia	KM396284.1	99
<i>F. verticillodes</i>	CSB_F256	Kenya	KU680391.1	99

المعزولة في هذه الدراسة *F. verticillode* \*عزلة الفطر

كما تبين من خلال مقارنة تسلسل القواعد النايروجينية لمنطقة الـ ITS1 و ITS4 المضاعفة من عزلة الفطر *F. solani* المعزولة في هذه الدراسة وجود نسبة تشابه وراثي بلغت 100% مع عزلة الفطر *F. solani* العراقية (Accession No: KX000895.1) المعزولة سابقا من نبات الذرة، في حين بلغت نسبة التشابه الوراثي لنفس تسلسل القواعد النايروجينية للفطر المعزول في هذه الدراسة 99% مع عزلات لفطر *F. solani* الاخرى المعزولة من مناطق مختلفة في العالم (جدول 3).

جدول 3: مقارنة بين نسب تشابه تسلسل القواعد النايتروجينية للفطر *F. solani* المعزول في هذه الدراسة و العزلات الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI).

Fungus	Isolate or strain name	Origin	The most similar sequences in GenBank database	
			GenBank Accession Number	Sequence similarity (%)
<i>F. solani</i>	AQRAJAA	Iraq	KX000895.1	100
<i>F. solani</i>	UENFCF251 18S	Brazil	JN006813.1	99
<i>F. solani</i>	TVD_Fungal-Culture 127	Canada	KF494125.1	99
<i>F. solani</i>	TVD_Fungal-Culture 132	Canada	KF494130.1	99
<i>F. solani</i>	TVD_Fungal-Culture 131	Canada	KF494129.1	99
<i>F. solani</i>	TVD_Fungal-Culture 114	Canada	KF494112.1	99
<i>F. solani</i>	TVD_Fungal-Culture 133	Canada	KF494131.1	99
<i>F. solani</i>	TVD_Fungal-Culture 115	Canada	KF494113.1	99
<i>F. solani</i>	1A44 18S	China	KF572456.1	99
<i>F. solani</i>	CS11723 18S	China	JX406551.1	99
<i>F. solani</i>	bxq33104	China	EF534185.1	99
<i>F. solani</i>	AL1	China	KX650831.1	99
<i>F. solani</i>	M5	China	KP399953.1	99
<i>F. solani</i>	CEF-325	China	KF999012.1	99
<i>F. solani</i>	091029 18S	China	HQ833835.1	99
<i>F. solani</i>	bxq33102	China	EF534183.1	99
<i>F. solani</i>	JM6201508003	China	KT366735.1	99
<i>F. solani</i>	D113	Ecuador	KU377510.1	99
<i>F. solani</i>	M5_1H	Hungary	KJ584550.1	99
<i>F. solani</i>	A11bs 10290 F7 18S	India	KP264956.1	99
<i>F. solani</i>	NBAIM:350	India	EU214559.1	99
<i>F. solani</i>	Fs1 18S	India	KC156593.1	99
<i>F. solani</i>	FUS ITS 11 18S	India	HQ384397.1	99
<i>F. solani</i>	CrP21	India	KC920847.1	99
<i>F. solani</i>	ABL1	India	KJ729475.1	99
<i>F. solani</i>	UOM AE	India	KF923870.1	99
<i>F. solani</i>	MML4006	India	JX535009.1	99
<i>F. solani</i>	JAI-MB22 18S	India	JQ954891.1	99
<i>F. solani</i>	BK-CB20 18S	India	JQ954888.1	99
<i>F. solani</i>	LCPANCF01	India	JN786598.1	99
<i>F. solani</i>	GIFUHF10	India	GQ121291.1	99
<i>F. solani</i>	MML4007	India	JX535010.1	99
<i>F. solani</i>	P1 18S	India	GQ451337.1	99
<i>F. solani</i>	MML4012	India	JX535014.1	99
<i>F. solani</i>	MML4011	India	JX535013.1	99
<i>F. solani</i>	ATS13	India	KU900493.1	99
<i>F. solani</i>	AFIC37 18S	India	KU872842.1	99
<i>F. solani</i>	AFIC10 18S	India	KU872820.1	99
<i>F. solani</i>	AFIC7 18S	India	KU872817.1	99
<i>F. solani</i>	FWC32	India	KU097267.1	99
<i>F. solani</i>	FWC30	India	KU097265.1	99
<i>F. solani</i>	FS5 18S	Ireland	HQ265423.1	99
<i>F. solani</i>	HBR16 18S	Malaysia	KT953310.1	99

<i>F. solani</i>	CIIDIRC-1	Mexico	JQ956459.1	99
<i>F. solani</i>	CIIDIRC-2	Mexico	JQ956460.1	99
<i>F. solani</i>	CBS 138803 18S	Netherlands	KU296243.1	99
<i>F. solani</i>	CBS 138805 18S	Netherlands	KU296242.1	99
<i>F. solani</i>	cv554 18S	Netherlands	KU296241.1	99
<i>F. solani</i>	TUFs8	SAUDI ARABIA	HG798753.1	99
<i>F. solani</i>	Fso8	Tunisia	KU528858.1	99
<i>F. solani</i>	Fso3	Tunisia	KU528851.1	99
<i>F. solani</i>	Fso6	Tunisia	KU528855.1	99
<i>F. solani</i>	18S	Turkey	KU325529.1	99
<i>F. solani</i>	AS408 18S	USA	KU382629.1	99
<i>F. solani</i>	AS349 18S	USA	KU382562.1	99
<i>F. solani</i>	AS319 18S	USA	KU382548.1	99
<i>F. solani</i>	AS337 18S	USA	KU382539.1	99
<i>F. solani</i>	AS329 18S	USA	KU382537.1	99

\*عزلة الفطر *F. solani* المعزولة في هذه الدراسة.

اظهرت العزلة الاخرى من الفطر *R. solani* (2) اعلى نسبة تشابه وراثي بلغت 99% مع عزلات الفطر *R. solani* المعزولة من الهند (JF701744 و JF70771) و كوستا ريكا (JX294349) و امريكا (AF153794 و AF153793 و KX118384)، في حين كانت اكثرها تباعدا وراثيا عن عزلة الفطر *R. solani* المعزولة من تايوان (JX294349) التي اعطت نسبة تشابه بلغت 91%. كما اعطت العزلات الاخرى نسب تشابه وراثي تراوحت بين 92-98% (جدول 4).

جدول 4: مقارنة بين نسب تشابه تسلسل القواعد النايروجينية للفطر *R. solani* (2) المعزول في هذه الدراسة مع العزلات الاخرى التابعة لنفس الفطر و المسجلة عالميا في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI).

Fungus	Isolate or strain name	Origin	The most similar sequences in GenBank database	
			GenBank Accession Number	Sequence similarity (%)
<i>R. solani</i>	AQNOAH*	Iraq	KY055374	100
<i>R. solani</i>	G14	Costa Rica	JX294349	99
<i>R. solani</i>	P4B3	Greece	FJ480892	99
<i>R. solani</i>	L3B1	Greece	FJ480894	99
<i>R. solani</i>	RKNM8	India	JF701744	99
<i>R. solani</i>	RUPC95	India	JF701771	99
<i>R. solani</i>	16-1-3L	USA	AF153794	99
<i>R. solani</i>	Roth32	USA	AF153793	99
<i>R. solani</i>	ST81548	USA	KX118384	99

<i>R. solani</i>	RKNG9	India	JF701745	98
<i>R. solani</i>	RS5	India	JX454673	97
<i>R. solani</i>	RS2	India	JX454670	97
<i>R. solani</i>	Rs84/B	Argentina	KP736195	96
<i>R. solani</i>	RUPP93	India	JF701784	96
<i>R. solani</i>	RPBC1	India	JF701758	96
<i>R. solani</i>	Rs14/B	Argentina	KF686793	95
<i>R. solani</i>	AG-1 IB	Argentina	KM488565	95
<i>R. solani</i>	Rs26/B	Argentina	KF686797	95
<i>R. solani</i>	Rs10/B	Argentina	KF686790	95
<i>R. solani</i>	Rs56/B	Argentina	KP736174	95
<i>R. solani</i>	Rs28/B	Argentina	KF686798	95
<i>R. solani</i>	Rs20/B	Argentina	KF686796	95
<i>R. solani</i>	Rs5/B	Argentina	KF686785	95
<i>R. solani</i>	Rs11/B	Argentina	KF686791	95
<i>R. solani</i>	P20B	Greece	FJ480891	95
<i>R. solani</i>	RKLC1	India	JF70174	95
<i>R. solani</i>	R112	Canada	EU730832	94
<i>R. solani</i>	RS35	Poland	KU574260	94
<i>R. solani</i>	Rae354	Taiwan	AY684921	94
<i>R. solani</i>	R77	USA	EU591790	94
<i>R. solani</i>	AG-E	USA	FJ492073	94
<i>R. solani</i>	F14	USA	FJ492073	94
<i>R. solani</i>	AG 7	Belgium	KF907734	93
<i>R. solani</i>	RASC27	India	JF701713	92
<i>R. solani</i>	RASC27	India	JF701713	92
<i>R. solani</i>	RUPP93	India	JF701784	92
<i>R. solani</i>	AG-Fa	Malaysia	KX674533	92
<i>R. solani</i>	Rae354	Taiwan	AY684921	92
<i>R. solani</i>	G14	Taiwan	JX294349	91

(NCBI). المعزولة في هذه الدراسة و المسجلة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية *R. solani*\* عزلة الفطر

كما اثبتت نتائج تحليل تسلسل القواعد النايتروجينية بأن الفطر *P. tardochrysogenum* المعزول في هذه الدراسة كان الاقرب تشابها وراثيا (98%) مع عزلات الفطر *P. tardochrysogenum* و المسجلة سابقا في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) (جدول 5).

جدول (5) : مقارنة بين نسب التشابه النيوكليوتيدي للفطر *P. tardochrysogenum* المعزول في هذه الدراسة و العزلات الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI).

Fungus	Isolate or strain name	Origin	The most similar sequences in GenBank database	
			GenBank Accession Number	Sequence similarity (%)
<i>P. tardochrysogenum</i>	Baghdad*	Iraq	KY055375	100
<i>P. tardochrysogenum</i>	CBS 132200	Antarctica	NR_138308	98
<i>P. tardochrysogenum</i>	DTO 149B9	Antarctica	JX997028	98
<i>P. tardochrysogenum</i>	UFMGCB 9653	Brazil	KX788175	98
<i>P. tardochrysogenum</i>	UFMGCB100	Antarctica	KU880719	98

\*عزلة الفطر *P. tardochrysogenum* المعزولة في هذه الدراسة و التي سجلت في المركز الوطني لمعلومات التقنية (NCBI).

يتضح مما تقدم ان عزلات الفطر *R. solani* و *P. tardochrysogenum* (AQNOAH و Baghdad) المشخصة في هذه الدراسة هي عزلات جديدة غير معروفة سابقا و تم تسجيلها في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) تحت ارقام الادخال (GenBank accession numbers) KY055374 و KY055375 4.

في هذه الدراسة شخّصت الفطريات *R. solani* و *F. verticillioides* و *F. solani* و *P. tardochrysogenum* جزيئياً باستخدام تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) التي عرفت بدقتها العالية في تشخيص العديد من الكائنات الحية و منها الفطريات مثل *Fusarium spp.* و *Aspergillus spp.* و *Pythium spp.* و غيرها بهدف التخلص من سلبيات التشخيص المعتمد على الصفات المظهرية (Morphological characters) (11). رغم ان للتشخيص المظهري اهمية في حصر الفطريات قيد البحث في مجاميع اصغر قبل البدء باستخدام طرائق و تقنيات اخرى في التشخيص فأن هناك الكثير من المشاكل التي تصاحب التشخيص المظهري للفطريات منا حاجة الباحث او القائم بعملية التشخيص الى خبرة عالية خصوصا في الانواع الفطرية القريبة التشابه فيما بينها مثل بعض انواع الفطريات *Aspergillus spp.* و *Fusarium spp.* فضلا الى حاجتها الى وقت و جهد كبيرين (7). اضافة الى تلك المشاكل فأن هناك بعض العوامل



الآخري التي تؤثر على تلك الصفات المظهرية و منها الرطوبة و نوع و طبيعة وسط النمو و كذلك الإضاءة التي قد تؤثر على لون و اشكال و احجام الابواغ و المستعمرات الفطرية النامية و التي قد تؤدي الى تشخيص خاطئ. فقد لاحظ العديد من الباحثين ان هناك خطأ في التصنيف المظهري للعديد من الفطريات المشخصة في دراسات سابقة و منها انواع تابعة للفطر *Fusarium spp.* مثل *Fusarium verticillioides* و *Fusarium subglutinans* عند اعادة تشخيصها مرة اخرى باستخدام تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) (10). اسهمت طريقة التشخيص الجزيئي بالاعتماد على الاختلافات الموجودة في تتابع الحامض النووي لمنطقة الـ ITS (Internal transcribed spacer) كفاءته عالية في تشخيص العديد من الفطريات مثل *Fusarium spp.* و *Cladosporium spp.* و *F. verticillioides* (2; 4; 5; 10). يعد التشخيص الدقيق للمسببات المرضية و منها الفطريات من الحاجات الضرورية من اجل الوصول الى طريقة او طرائق فعالة في أداراه المرض و كذلك عمليات الحجر الزراعي (Quarantine purposes) لحماية المحاصيل الزراعية و كذلك المصادر الطبيعية الآخري من خطر تلك المسببات المرضية (14).

#### References :

1. 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.
2. 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*, 7: 143-157.
3. Al-Sanae, E. A.; Afaf I.; Shehata, A. H.; Mohammed A. and Amal A. A. (2016). Molecular detection and characterization of *Fusarium sporotrichioides* based on ITS2 rDNA. *Polymorphism. Human Journals*, 2(3): 365-376.
4. Arif Mohammad, S. C; Zaidi, N. W; Rayar, J. K; Variar, M. and Singh, U.S. (2012) Development of specific primers for genus *Fusarium* and *F. solani* using rDNA sub-unit and transcription elongation factor (TEF-1 $\alpha$ ) gene. *African Journal of Biotechnology* 11(2), 444-447.
5. 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.
6. Erlacher, A.; Cardinale, M; Grosch R.; Grube M. and Gabriele B. (2014) The impact of the pathogen *Rhizoctonia solani* and its beneficial counterpart *Bacillus amyloliquefaciens* on the indigenous lettuce microbiome. *Frontiers in Microbiology*, 5 (175), 1-8.

7. **Faria C. B.; Abe C. A. L.; Silva C.N.; Tessmann D. J. and Barbosa-Tessmann I.P. (2012)** New PCR assays for the identification of *Fusarium verticillioides*, *Fusarium subglutinans*, and other species of the *Gibberella fujikuroi* complex. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 115-132.
8. **Giantsis, I. A. ; Chaskopoulou, A. and Bon, M. C. (2017)** Direct Multiplex PCR (dmPCR) for the Identification of Six Phlebotomine sand fly species (Diptera: Psychodidae), including major leishmania vectors of the mediterranean. *Journal of economic Entmology*, 110 (1), 172-182.
9. **Hawksworth, D.L.; Kirk, P. M.; Sutton, B. C. and Pegler, D. M. (1995)** Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi. 8th edition. CAB International, Wallingford.
10. **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**, 12, 6722-6732.
11. **Huang, A.; Li, J.W.; Shen, Z. Q.; Wang, X.W.; Jin, M. (2016)** High-throughput identification of clinical pathogenic fungi by hybridization to an oligonucleotidemicroarray. *Journal Clinic Microbiology*, 44:3299-3305.
12. **Maggi, O.; Tosi, S.; Angelova, M.; Lagostina, E.; Fabbri, A.A.; Lorenzo, P.; Altobelli, E.; Picco, A. M.; Savino E.; Branda, E.; Turchetti, B.; Zotti, M; Vizzini, A. and Buzzini, P. (2013)** Adaptation of fungi, including yeasts, to cold environments, Plant Biosystems. *An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology: Official Journal of the Societa Botanica Italiana*, (147)1, 247-258.
13. **Romberg M.K. and Davis R.M. (2007)** Host range and phylogeny of *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* from potato and tomato in California. *Plant Diseases*. 91: 585-592.
14. **Rossmann, A. Y.; Palm-Hernandez, M. E. (2008)** Systematics of plant pathogenic Fungi. Why it matters. *Plant Diseases*, 92, 1377-1386.
15. **Schisler, D. A.; Neate, S. M. and Masuhara, G. (2012)** The occurrence and pathogenicity of *Rhizoctonia* fungi in South Australian plant nurseries. *Mycological Research* 98(1), 77-82.
16. **Stanis, C. S.; Song, B.K.; Chua, T.H.; Lau, Y. L. and Jelip, J. (2016)** Evaluation of new multiplex PCR primers for the identification of Plasmodium species found in Sabah. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 46, 207-218.
17. **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*, 11: 18-22.
18. **White, T. J.; T. Bruns, S.; Lee and Taylor J. W. (1990)** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p.

315-322. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (ed.), PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, Inc; New York, N.Y.

19. **William, W.W., Mackey K. and Chomczynski, P. (1997)** Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* 22: 474-481.
20. **Yang, X. H.; Lu, G. Z.; Zhao, Z.H.; Liu, L. L. and Yao, X. M. (2007)** Isolation and identification of *Fusarium* species from cucumber wilt diseased plants in vegetable greenhouses in northeastern China. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 38(3): 308-311.
21. **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.