تقييم استجابة عزلات الفطر *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* لمخلفات نبات الطماطه

علي فاضل مرجان[1] **جواد** كاظم **الجنابي[2]**

مدرس **استاذ**

[1]كلية الزراعة/ جامعة القاسم الخضراء/ العراق.

[2]كلية العلوم/ جامعة بابل/ العراق.

البريد الالكتروني: merjan1970@gmail.com

المستخلص:

هدفت هذه الدراسة الى مسح مرض الذبول الفيوزرمي في الطماطة في محافظة بابل و كربلاء و النجف و تشخيص مسببه و الكشف عن تأثير مخلفات نبات الطماطة في المحتوى الخلوي لعزلات الفطر *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* . اظهرت النتائج انتشار المرض في المحافظات الثلاثة تراوحت من 37 – 43 % و اظهر الفحص المظهري و الجزيئي وجود الفطر *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* وجود تاثيرات متباينة للمستخلصات العضوية للمخلفات نبات الطماطه في نمو الكتلة الحية للعزلات الفطرية اذ حفزت مستخلصات المخلفات الغير متحللة نمو عزلات الفطر *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* ، و كان لها تأثير في جينومات العزلات وفي التركيب الوراثي للاحماض النووية المنقوصة الاوكسجينDNA من خلال تفاعل البادئ الجزيئ P1 مع جنيومات العزلات الفطرية وما ينعكس على طبيعة بروتينات و الانزيمات المنتجة من قبل خلايا العزلات الفطرية بالمقارنة مع تأثير المستخلصات المتحللة التي كان لها تأثير تثبيطي لجميع تلك المؤشرات عند تعرضها الى هذه المستخلصات العضوية عند تركيز 1 %. من جهة أخرى فقد بينت النتائج ان للمستخلصات العضوية لمخلفات نبات الطماطة تأثير واضح وعلى تركيز الاحماض النووية المنقوصة الاوكسجين DNA.

Evaluation *Fusarium oxysporum* f. sp lycopersici isolates response to tomato plants debris

Ali Fadil Merjan[1] **Jawad Kadhium Aljenabi[2]**

Lecturer **Professor**

[1]Agriculture College/ Al- Qasim Green University/ Iraq.

[2] Science College/ Babylon University/ Iraq.

E-mail: merjan1970@gmail.com

Abstract:

The study was aimed to survey the dispersal of fusarium wilt in Babylon, Karbala and Najaf governorates, diagnose causes agent and detection of the effect of organic extracts of tomato debris Effect of organic on the cellular content of *Fusarium ox-*

ysporum f.sp. *lycopersici* isolates.The results showed that the prevalence of the disease in the three governorates ranged from 37 - 43% , morphological and molecular examination of showed the phenotypic and molecular examination of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* isolates, differentiated effects of organic extracts were found, non-decomposed extracts stimulated biomass growth and molecular they have genomic effect on DNA of isolates by using P1 primer this effect could reflected on protein composition and enzymatic production and in consequences of these isolates .

One other hand, the organic extract had a substantial effects on fungal genomes concentration of F4, F8 and F17 isolates.

•The paper is part of a Ph. D. thesis for the first author.

المقدمة:

يقدر الانتاج العالمي السنوي لمحصول الطماطة (*Solanum lycopersicum*) 162 مليون طن وبمساحة اجمالية تزيد عن 4.8 مليون هكتار، في العراق بلغ الانتاج السنوي لهذا المحصول 1.1 مليون طن بمساحة اجمالية تبلغ 62500 هكتار وبمعدل يقارب 17.6 طن \ للهكتار ، اذ يساهم العراق بـ 0.8٪ من إجمالي الإنتاج العالمي **(7)**. يعد مرض الذبول الفيوزارمي المتسبب عن الفطر *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Sacc.) W. C. Snyder & Hansen أحد أهم الأمراض المؤثرة اقتصاديا والتي يتعرض لها محصول الطماطه اذ يتواجد حيث يزرع هذا المحصول **(3)**.

ترك مخلفات نبات الطماطه في تربة الحقل قد تسبب في تراكم لقاح الفطر *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.**(20)**، استخدمت مستخلصات المخلفات العضوية لمحاصيل الخضر كواحدة من الوسائل البديلة للمبيدات الفطرية **(17)**.

تعد الزراعة المستمرة لنباتات الطماطة بنفس التربة ولمدة زمنية طويلة من الانشطة الزراعية الشائعة لكن هذا النمط من الزراعة يسهم في توطن مسبب الذبول الوعائي لنبات الطماطة *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* مما يزيد فرص اصابة نباتات بالمسبب المرضي من خلال المخلفات الخضراء المتروكة بالحقول وخاصة عند توفر الظروف البيئية المناسبة **(11)**.

تعد النواتج والمستخلصات العضوية للمخلفات النباتية المتحللة واحدة من افضل الطرق الصديقة للبيئة التي يمكن ان تستغل للسيطرة على مسببات امراض النبات التي تتوطن في التربة فقد اوضحت العديد من الدراسات ان المخلفات النباتية لمحاصيل الخضر تخفض بدرجة كبيرة من شدة اصابة النباتات بمسببات التربة المرضية كواحدة من الوسائل البديلة للمبيدات الفطرية **(17)**.

وجد **El – Masry (5)** ان المستخلصات العضوية للمخلفات النباتية المتحللة للحدائق المنزلية والمحاصيل الورقية لها دور تثبيطي كبيرا جدا تجاه الفطر *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* و *Rhizoctonia solani* و *Alternaria* sp و *Colletotrichum* sp.

كما اثبتت الدراسات ان المخلفات المحاصيل العضوية المتحللة لها تأثير مباشر في الجينات المسؤولة عن الامراضية في المسببات الفطرية الممرضة للنبات فقد وجد (**16**) ان مواقع جينية محددة في الاحماض النووية لمجاميع من الفطريات عانت من تغاير في تتابعات القواعد النتروجينية النامية على مخلفات المحاصيل الزراعية المتحللة مما وقد ادى ذلك الى قيامها بالتشفير لانتاج بروتينات تختلف عن مثيلاتها التي لم تتعرض للمخلفات الزراعية المتحللة ذاتها

تقوم تقانة التضخيم العشوائي لقطع متعددة الاطوال من الـ DNA، DNA – RAPD بإنتاج مدى واسع من القطع المضخمة في عدة مواقع من الجنيومات، باستخدام بوادئ عشوائية التي تعمل على تضخيم مواقع متعددة وموزعة على عدة مواقع بصورة عشوائية من الجنيوم مما يسهل من دراسة التغايرات الوراثية للاحماض النووية منقوصة الاوكسجين DNA لعزلات الفطرية عند تعرضها لمؤثر خارجي (**5**) ،لذا فقد هدفت الدراسة الى دراسة تأثير المستخلصات العضوية لنبات الطماطه في المحتوى الجيني لعزلات الفطر *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* باتباع تقنية التضخيم العشوائي متعدد الاطوال من الـ DNA.

المواد و طرق العمل:

المسح الحقلي وجمع العينات

اجري مسح حقلي لحقول الطماطه في محافظات بابل وكربلاء والنجف خلال شهري اب وايلول عام 2014 للتحري عن مرض الذبول الوعائي. اختيرت عشرة حقول عشوائيا سجلت النسبة المئوية للإصابة حسب طريقة **Asiama (1)**، جمعت العينات من نباتات يبدو عليها اعراض الذبول من فوق منطقة التاج تحديدا، حفظت العينات في اكياس ورقية وجلبت لمختبر وحدة الفطريات المتقدم في كلية الزراعة / جامعة الكوفة.

عزل و تشخيص العزلات الفطرية

قطعت الأجزاء النباتية المصابة الى قطع صغيرة حوالى 4-6 سم، عقمت سطحيا لمدة دقيقتين بمحلول هايبوكلورات الصوديوم التجاري(NaOCl) تركيز 1% ثم غسلت بالماء المقطر لإزالة تأثير المحلول اعلاه ثم عمل مقطع طولي و استخرجت الانسجة التي يبدو عليها التلون البني بواسطة الملقط و مبضع التشريح و عزلت على أطباق بتري حاوية على 20 مل من وسط اكار البطاطا والدكستروز بواقع خمسة قطع من الأجزاء النباتية لكل طبق. حضنت الأطباق بدرجة حرارة 25 ±2 م0 لمدة ثلاثة أيام وبعد ظهور المستعمرات أجريت عملية تنقية لمستعمرات الفطر باستخدام وسط اكار مستخلص بطاطا و دكستروز للحصول على مستعمرات نقية. كررت عملية التنقية لجميع العزلات التي أظهرت اختلافات مظهرية فيما بينها (**13**)، تم ادراج العزلات حسب المواقع الجغرافية التي عزلت منها. وبالاعتماد على الخصائص المزرعية و المجهرية الموصوفة من قبل (**13**) ، كما تم اعتماد البايلوجيا الجزيئية باستخدام تقانة تفاعل انزيم البلمرة و المشار اليها في **(14)** وادرجت العزلات المشخصة وفق الجدول 1.

جدول 1: الرموز التي أعطيت للعزلات المسببة لمرض الذبول الوعائي التي جمعت من حقول الطماطه في محافظات بابل وكربلاء والنجف.

ت	الاسم العلمي	رمز العزلة	المحافظة
1	*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*	F6	بابل
2	*Fusarium* sp	F9	
3	*Fusarium nelsonii*	F13	
4	*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*	F17	
5	*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*	F2	كربلاء
6	*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*	F8	
7	*Fusarium* sp	F1	نجف
8	*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*	F4	

طريقة تحلل المخلفات النباتية

تم جمع مخلفات نباتات الطماطة من مزارع ناحية الحيدرية التابعة لمحافظة النجف الاشرف بعد زيارات ميدانية لعدد من مزارع المنطقة، جففت المخلفات و طحنت وخلطت بمخلفات مواشي بنسبة 5 % على اساس الحجم ووضعت باوعية بلاستك مثقبة لانسياب الماء الفائض و رطبت بالماء بينما ترك نصفها من دون ترطيب و تركت عند درجة حرارة المختبر 120 يوم **(22)**.

الاستخلاص العضوي لمخلفات نبات الطماطه

أخذ حجم مقداره 100 سم ^{3} من المخلفات الغير متحللة والمتحللة ثم وضعت كل على حده في بيكر زجاجي سعة 500 مل وأضيف لها 200 مل من الماء المقطر ونقلت الى حمام مائي عند 25 م^0 مدة 24 ساعة بعدها رفعت درجة الحرارة الى 80 م^0 مدة 30 دقيقة. ثم رشحت و عرضت لطرد مركزي 10000 دورة . دقيقة$^{-1}$ لمدة 15 دقيقة ثم امرر الراشح من خلال مرشحات دقيقة 0.2 مايكرومتر وحفظت عند 4 ْم لحين الاستعمال **(21)** و **(23)**.

تأثير مخلفات نبات الطماطة عزلات الفطر F.o.l.

الكتلة الحية لعزلات الفطر F.o.l

لقحت دوارق زجاجية سعة 250 مل تحوي على 100 مل من وسط بطاطا دكستروز السائل المدعم بالتراكيز: 0 و0.25 و0.75 و1 % من المخلفات الغير متحللة والمتحللة وبواقع ثلاث مكررات. بأقراص 1 سم من مستعمرات العزلات الفطرية F4 و F8 و F17 وحضنت على 25 م ^{0} ± 2 في حاضنه هزازة مدة 21 يوما. جمعت كتلة الغزل الفطري للعزلات الفطرية وجففت و حسب وزن الكتلة الحية للمستعمرات النامية **(21)**.

كثافة البروتوبلازم

تم تنمية مستعمرات فطرية للعزلات F4 و F8 و F17 على الوسط مدعم بالمستخلص العضوي، أقراص أخذت من مستعمرات حديثة للعزلات المذكوره آنفا بقطر 1 سم زرعت في مركز أطباق بتري على وسط غذائي PDA مدعم بـ 0 و0.25 و0.75 و1 % من المستخلص العضوي لمخلفات الطماطه الغير متحللة والمتحللة. حضنت الأطباق عند 25 م0 ± 2 مدة سبعة ايام. بعدها تم اخذ بصمة من المستعمرات بواسطة الشريط اللاصق الشفاف فوق السطح العلوي للمستعمرات الفطرية ولصقت على الشرائح الزجاجية المجهزة بقطرة من صبغة لاكتوفينول بلو. درست خصائص الغزل الفطري للعزلات والتي تم تصويرها بواسطة كاميرا من نوع DEC- 2، **(19)**.

المحتوى الجينومي لعزلات الفطر .F.o.l

لغرض الكشف عن تأثير المستخلصات العضوية لمخلفات نبات الطماطة في المحتوى الجينومي للعزلات F4 و F8 و 17 التابعة للفطر F.o.l نقيت العزلات بطريقة البوغ المنفرد و نميت على وسط غذائي PDA و حسب المعاملات: وسط PDA بدون اضافة مستخلص عضوي كمعاملة مقارنة و وسط غذائي PDA مدعم بـ 1 % من مستخلص عضوي غير متحلل لمخلفات نبات الطماطة و وسط غذائي PDA مدعم بـ 1 % مستخلص عضوي لمخلفات متحللة، وبثلاث تكررات.

استخلاص الـ DNA لعزلات الفطر F.o.l

استعملت عدة الاستخلاص المنتجة من قبل شركة American Promega Company وبمساعدة انزيم lyticase لتكسير جدار الخلايا الفطرية وقد اتبعت الخطوات التالية حسب البروتكول Wizard® Genomic DNA Purification Kit \ 3.F الخاص بعدة الاستخلاص.

الكشف عن تركيز الـ DNA لعزلات الفطر F.o.l بجهاز Nano Drop :

تم قياس كمية DNA بوساطة جهاز Nano Drop المجهز من شركة Thermo Scientific الأمريكية لمعرفة تركيز الجينوم (كمية DNA في µl/ ng).

الكشف عن تركيز الـ DNA لعزلات الفطر F.o.l بوساطة تقانة الترحيل الكهربائي :

تم قياس كمية DNA بوساطة تقانة الترحيل الكهربائي بعد تحضير الحوض الترحيل الاكاروز بتركيز 1 % أي اذابة 0.2 غم من مادة الاكاروز في 25 مل من محلول 0.5 X TBE باستعمال 0.5 مايكرولتر من صبغة Ethidium bromide. اذ تم حقن 2 مايكرولتر من DNA المستخلص و1 مايكرولتر من صبغة Bromophenol blue في الحفر على 70 فولت و65 ملي امبير مدة 60 دقيقة لحين سريان صبغة Bromophenol blue من الحفر الى الجانب الأخر وبعد انتهاء عملية الترحيل تم الكشف عن الحزم المتكونة بواسطة جهاز الكشف عن الحزم بالأشعة الفوق بنفسجية من نوع DomiChem – Bio Rad انتاج USA.

التحري عن التغاير الوراثي لعزلات الفطر F.O.L بتأثير المستخلصات العضوية لمخلفات لنبات الطماطه باستخدام تقانة RBPD .استخدمت الخلطة الرئيسية Master mix (Accu Power ® PCR Pre Mix) والمنتجة من قبل شركة Bio neer الكورية الجنوبية الموضح بالجدول 2 .

ملحق 2: مكونات الخلطة الرئيسية حسب تقرير شركة Bio neer الكورية الجنوبية (الحجم الكلي 5 مايكرولتر).

ت	المادة	التركيز
1	Taq DNA Polymerase	1 U
2	Each : dNTP (dATP ,dCTP , dGTP ,dTTP)	250 µM
3	Tris – HCL (pH 9.0)	10 Mm
4	KCL	30 mM
5	MgCl2	1.5 mM
6	Stabilizer and tracking dye	

استعمل البادئ P1: GGGCGCCTAG **Amaral (2)** . تم تحضير البادئات بإذابتها بمحلول 1 X من TE buffer حسب التقرير المرفق من شركة المنتجة كمحلول خزين Stock solution ثم حضر محلول العمل work solution باخذ 10 مايكرو لتر من stock solution في أنبوبة Eppendorf tube أضيف إليها 90 مايكرو لتر من TE buffer، وضع20 مايكرو لتر من المزيج النهائي في كل من انابيب تفاعل انزيم البلمرة و كما موضحة جدول 3

جدول 3:المزيج النهائي للتفاعل انزيم البلمرة.

المادة الكيمائية	Master Mix	البادئ	قالبDNA	ماء مقطر	الحجم النهائي
الحجمµ l	5	3	6	6	20

ضبط جهاز المدور الحراري حسب البرنامج المبين بالجدول 4

جدول 4: برنامج تفاعل البادئات مع جنيومات العزلات المدروسة في تقانة RAPAD – PCR.

الوقت	الدرجة الحرارية	الغرض من العملية	عدد الدورات

1 cycle	Initial Denaturation	94 م°	4 min
40 cycles	Denaturation	94 م°	1 min
	Annealing	34 م°	2 min
	Extension or Elongation	72 م°	2 min
1 cycle	Final Extension	72 م°	5 min

ثم اجري التفاعل.

النتائج :

المسح الحقلي

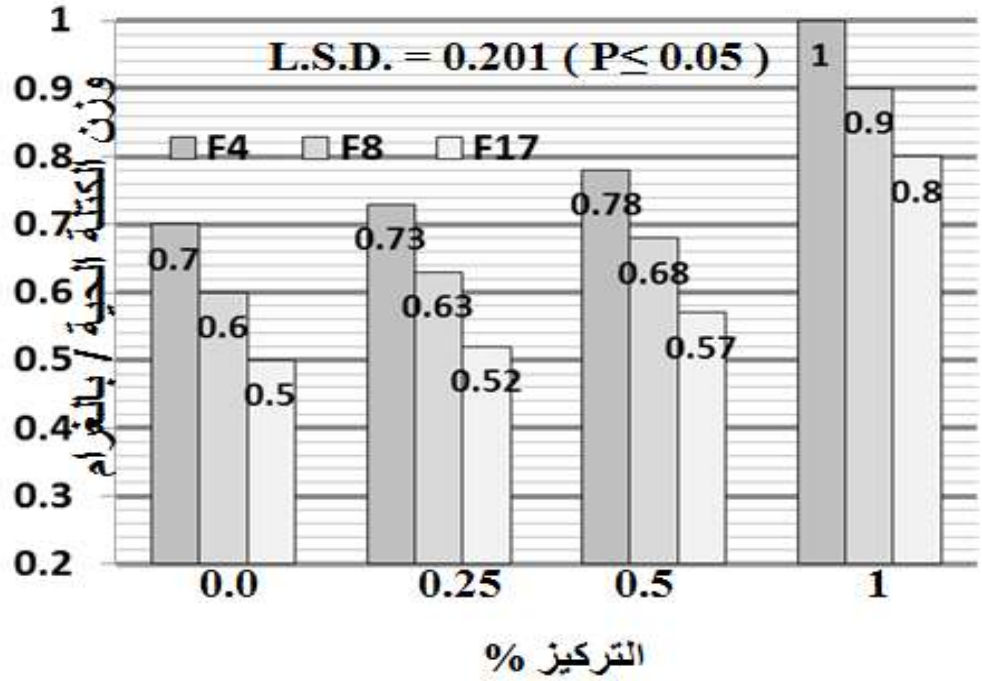
أظهرت نتائج المسح الميداني لمزارع الطماطه في محافظات بابل وكربلاء والنجف جدول 5 ارتفاع النسبة المئوية لمرض الذبول الوعائي في محافظتي كربلاء والنجف (43 %) بالمقارنة مع النسبة التي سجلت في حقول الطماطه لمحافظة بابل (37 %).

الجدول 5: النسبة المئوية لمرض الذبول الفيوزرمي في محفظات بابل و كربلاء و النجف.

ت	المحافظة	% للمرض
1	بابل	37
2	كربلاء	43
3	النجف	43

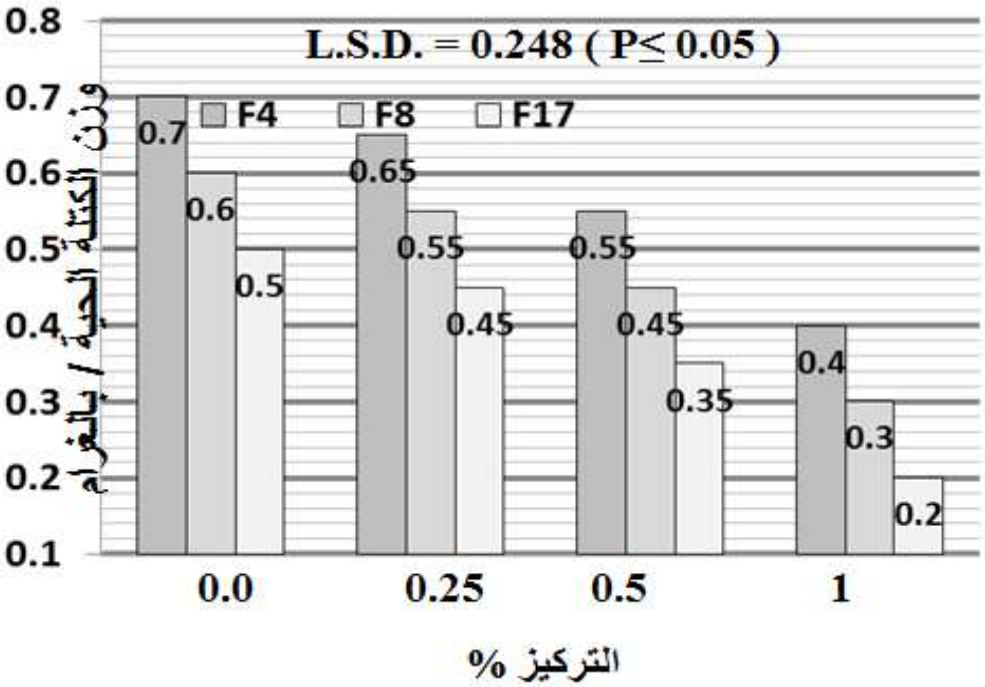
تاثير المستخلص العضوي لمخلفات نبات الطماطه في الكتلة الحية لعزلات الفطر F.o.l

اظهرت النتائج ان المستخلصات العضوية لمخلفات نبات الطماطه قد احدثت تاثيرات معنوية في نمو العزلات المرضية التابعة للفطر F.o.l تمثل بالتاثير في وزن الكتلة الحية لعزلات الفطريات المدروسة إذ حفز المستخلص العضوي للمخلفات الغير متحللة من نمو المستعمرات لعزلات F.o.l اذ زاد معنويا وزن الكتلة الحية زيادة معنويا من 0.7 و 0.6 و0.5 غرام في معاملة السيطرة للعزلات F4 و F8 و F17 على التوالي الى 1 و 0.9 و 0.8 غرام عند تركيز 1 % والزيادة بنسبة مئوية مقدارها 30 و 33 و 60 % (الشكل 1).



الشكل1: تاثير المستخلص العضوي للمخلفات الغير متحللة في زيادة معدلات نمو العزلات الفطر F.o.l.

في حين احدث المستخلص العضوي للمخلفات المتحللة ثبيطاً معنوياً في نمو المستعمرات الفطرية التابعة للفطر F.o.l اذ انخفضت الكتلة الحية معنويا الى 0.4 و 0.3 و 0.2 غرام للعزلات الفطرية على التتابع عند تركيز 1 % عن معدلاتها في معاملة المقارنة وبنسبة مئوية للانخفاض مقدارها 43 و 42 و 40 % على التتابع الشكل 2.



الشكل 2: تأثير المستخلص العضوي للمخلفات المتحللة في تثبيط معدلات نمو عزلات فطر F.o.l.

قياس تركيز الـ DNA لعزلات الفطر F.o.l بواسطة جهاز النانو دروب Nanodrop

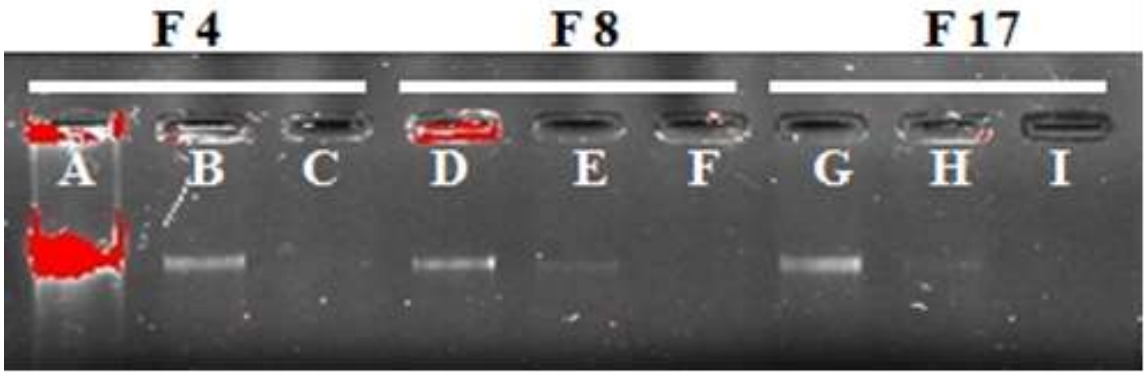
أظهرت النتائج جدول 6 التأثير الواضح للمستخلصات العضوية لمخلفات نبات الطماطه في تركيز الاحماض النووية المنقوصة الاوكسجين DNA للعزلات F4و F8 وF17، اذ ا ارتفع تركيز DNA للعزلات الفطرية النامية على وسط PDA مدعم بمستخلص عضوي (1%) لمخلفات غير متحللة اما العزلات النامية في وسط PDA مدعم بمستخلص عضوي (1%) لمخلفات متحللة فقد انخفض تركيز DNA .

جدول 6: تركيز الاحماض النووية المنقوصة الاوكسجين DNA (ملغم/مل) المستخلصة من العزلات الفطر F.o.l المنماة بوسط PDA مدعم بمستخلص عضوي (1%) متحلل او غير متحلل من مخلفات نبات الطماطه.

ت	رمز العزلة	نوع المستخلص	التركيز (ملغم.مل$^{-1}$)
1	F4	معاملة السيطرة	112.2
2		مستخلص عضوي لمخلفات غير متحللة	136.1
3		مستخلص عضوي لمخلفات متحللة	87.3
4	F8	معاملة السيطرة	95.4
5		مستخلص عضوي لمخلفات غير متحللة	120
6		مستخلص عضوي لمخلفات متحللة	71.2
7	F17	معاملة السيطرة	88.7
8		مستخلص عضوي لمخلفات غير متحللة	110
9		مستخلص عضوي لمخلفات متحللة	65.8

الكشف عن الـ DNA لعزلات الفطر F.o.l بواسطة الترحيل الكهربائي

بينت النتائج صورة (3) وجود تباين في كثافة حزم الـ DNA التي تم استخلاصها من مستعمرات نامية على وسط PDA مدعم او غير مدعم بالمستخلص العضوي لمخلفات المتحللة او غير المتحللة. ان الحزم التي تمثل جينومات العزلات F4 و F8 و F17 والتي تم استخلاصها من مستعمرات غير معاملة باي مستخلص عضوي كانت هي الاكثر وضوحا ، اذ بدت الحزم اكثر بريقا صورة (3 – A و D و G). في حين كانت جينيومات العزلات التي استخلصت من مستعمرات نامية على وسط مدعم بالمستخلص العضوي لمخلفات غير متحللة ظهرت الحزم فيها باهتة مقارنة مع السيطرة صورة (18 – B و E و H) ، اما جينيومات العزلات النامية على وسط مدعم بالمستخلص العضوي لمخلفات متحللة فقد كانت الحزم خافته او تعذر مشاهدتها بصورة (3 – C و F و I).

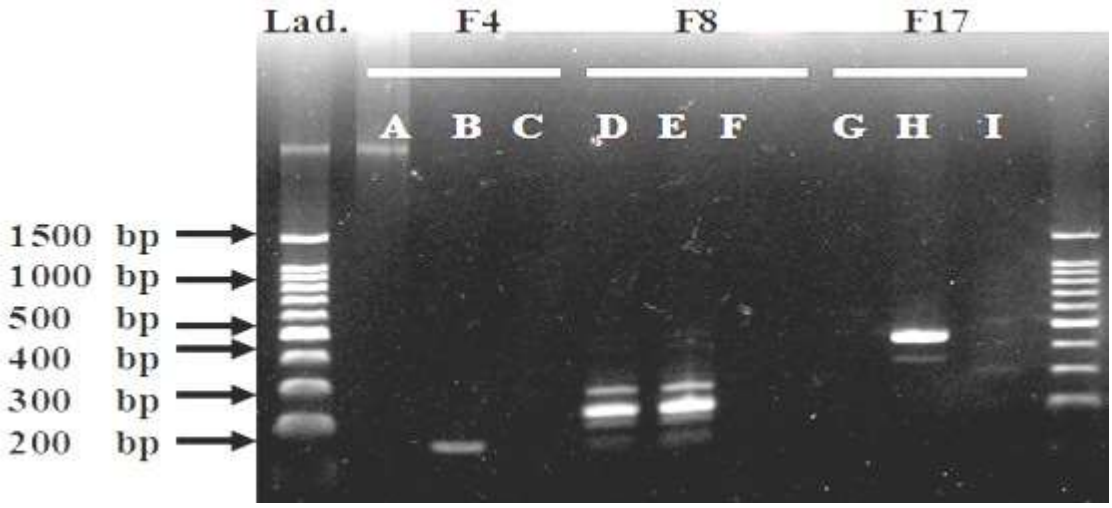


صورة 3: التباين في كثافة جينومات عزلات الفطري F4 (A وB وC) و F8 (D وE وF) و F17 (G و Hو I) النامية بوسط PDA. المعاملات ، السيطرة (A وD و G) وسط غذائي فقط ، وسط غذائي + مستخلص عضوي لمخلفات غير متحللة (B و E وH) ، وسط غذائي + مستخلص عضوي لمخلفات متحللة، (C وF و I) وسط غذائي + مستخلص عضوي لمخلفات غير متحللة .

التحري عن التغاير الوراثي لعزلات الفطر F.O.L بتأثير المستخلصات العضوية لمخلفات نبات الطماطه باستخدام تقانة RBPD.

أوضحت النتائج ان البادئ الجزيئي P 1 لم يتفاعل مع جينوم العزلة F4 المستخلص من مستعمرة معاملة السيطرة اذ لم يتم تشخيص أي حزمة في المسار المخصص لهذا الجينوم (صورة 4- A) ، لكن ارتبط البادئ المذكور مع جينيوم العزلة المعاملة بمستخلص عضوي لمخلفات غير متحللة فقد تم تحديد حزمة حوالي 200 bp صورة (4 - B) ، بينما لم يرتبط البادئ P1 مع جينوم نفس العزلة المعامله بمستخلص عضوي لمخلفات متحللة ولم تظهر أي حزمة بسبب عدم حدوث تفاعل صورة (4 - C).

كذلك الحال بالنسبة للعزلة F8 فان البادئ P1 قد تفاعل مع الجينوم في معاملة السيطرة ، أما جينوم العزلة المعاملة بمستخلص عضوي لمخلفات غير متحللة فقد نتج عن التفاعل اربعة مقاطع جينومية متشابهة في كلتا المعاملتين تراوحت اطوالها ما بين 200 bp , 300 bp لاحظ صورة (4- D و E). في حين لم يتفاعل البادئ مع جينوم نفس العزلة المعاملة بمستخلص عضوي لمخلفات متحللة صورة (4 - F). وفي المقابل فان جينوم العزلة F17 أظهرت استجابة مغايرة عن سابقتها من الجينيومات اذ لم يتفاعل البادئ P1 مع جينوم السيطرة صورة (4 - G). لكنه تفاعل مع جينوم المستخلص العضوي لمخلفات غير متحللة ، كما كان هناك تفاعل للبادئ المستعمل مع جينيومات المعاملة بمستخلصات عضوية لمخلفات متحللة و تم تضخيم اربعة قطع باطوال 200 bp و 300 bp و 400 bp و 500 bp ولكن كان مظهرها باهت صورة (4 - I).



صورة 4: المحتوى الجيني للعزلات الفطرية F4 (A وB وC) وF8 (D وE وF) و G(F17 وH وI) النامية بوسط PDA التي تم تضخيمها بواسطة تفاعل RAPD – PCR وبمساعدة البادئ الجزيئي P1. المعاملات ، السيطرة (A وD و G) وسط غذائي فقط ، وسط غذائي + مستخلص عضوي لمخلفات غير متحللة (B و E وH) ، وسط غذائي + مستخلص عضوي لمخلفات متحللة (C وF و I).

المناقشة:

قد يعزى تساوي نسبة الاصابة في حقول الطماطه في محافظتي كربلاء والنجف الى استخدام نفس الاصناف التجارية في كلا المحافظتين و التشابه الكبير في الظروف البيئية الصحراوية ومواصفات نسجة التربة الرملية المستغلة للزراعة في هاتين المحافظتين التي شملهما المسح بينما كانت نسبة المرض في محافظة بابل اقل نسبيا ومن المحتمل ان يكمن السبب في الاختلاف في الظروف البيئية فضلا عن التباين في خصائص التربة التي تزرع بمحصول الطماطه. اذ ان نسجة التربة ربما يكون لها دورا في زيادة نسبة مرض الذبول الفيوزارمي، وهذا ما اشار اليه **(12)** الذي بين ان نسبة مرض الذبول الفيوزارمي في محصول الطماطه يزداد بالترب الرملية قياسا بالترب الطينية خصوصا مع ارتفاع درجة الحرارة وانخفاض الرطوبة **(8).**

ان ما تم التوصل اليه في هذه الدراسة من قدرة المخلفات النباتية المتحللة من التاثير في نمو العزلات الفطري تتفق مع ما وجده **(9)** في ان تدعيم الوسط السائل PDB لنمو الفطر Forl المسبب لمرض الذبول الوعائي و عفن جذور نبات الطماطه بمستخلص عضوي لمخلفات الشاي المتحللة يعمل على تثبيط نمو الكتلة الحية للفطر وبنسبة 70 %، و مع ما وجده **(10)** ان الوسط الزرعي PDA المدعم بالمستخلص العضوي لمخلفات نباتات خضر ومخلفات مواشي كان ذي تاثير تثبيطي للنمو القطري لمستعمرة الفطر Forl المسبب لمرض الذبول الوعائي و عفن جذور الطماطه وبنسة 39 %.

تؤثر المخلفات النباتية في كثافة بروتوبلازم و طبيعة الخلايا الفطرية فقد وجد **(4)** ان المركبات المتعددة الفينولية المتحررة من المستخلصات العضوية المتحللة لاشجار الاكسيا *Cassia fistula* قد تسببت بتثبيط نمو

الفطر *Rhizoctonia solani* من خلال تراكم واختزال البروتوبلازم في خلايا الفطر في حين ان المستخلص العضوي لاوراق النبات الغير متحللة لم يكن لها تأثير في تثبيط نمو الفطر. كما ان المستخلص العضوي المتحرر من تحلل نبات الرغيلة *Chenopodium ambrosioides* يعمل على تثبيط تكوين جدران الخلايا في فطر *Neurospora crassa* وكون هالة باهتة اللون ما بين البروتوبلازم و جدران الخلايا الفطرية **(18)**

دلت النتائج ان المستخلصات العضوية لمخلفات نبات الطماطه غير المتحللة و المتحللة و المجهزة لوسط نمو العزلات لها تأثير واضح في التركيب الوراثي للاحماض النووية المنقوصة الاوكسجين من خلال تفاعل البادئ الجزيئ P1 مع جنيومات العزلات F4و F8 و F17 والتي تعد اشارة واضحه في تأثر الاحماض النووية في هذه المستخلصات وما ينعكس على طبيعة بروتينات الانزيمات المنتجة من قبل خلايا هذه العزلات الفطرية و بالتالي على المقدرة الامراضية عند تعرضها الى هذه المستخلصات العضوية. قد يعزى السبب للتباين في استجابة الاحماض النووية للعزلات الفطرية المدروسة الى المستخلصات العضوية للمخلفات الزراعية تحتوي على طائفة واسعة من المجاميع الايونية و وهي تؤثر في مستقبلات محددة في الخلية الفطرية **(16)**. تعمل المخلفات الخضراء على زيادة نمو الكتلة الحية للمسبب المرضي بينما المخلفات المتحللة لها دور مهم في تثبيط نمو وانحسار في بروتوبلازم الخلايا الفطرية المسبب. دلت نتائج الدراسة ان المخلفات العضوية لنبات الطماطه كان لها تأثير واضح في المحتوى الجيني لعزلات الفطر F.o.l.

References:

1. **Asiama, Y.O. and Yeboah, M.O. (2003)** Survey of the incidence and severity of root-knot and *Fusarium* wilt diseases in some tomato-growing areas in the Central Region of Ghana. *Ghana Journal Agriculture*, 36: 79 – 85.
2. **Amaral, D. O. J.; Almeida, C. M.; AMalafaia, C. B. and De Silva, M. L. R. (2013)** Identification of race 1, 2 and race 3 of Fusarium oxysporium f. sp. lycopersici by molecular markers. *African Journal of Microbiology Research*, 7(20): 2324 – 2331.
3. **Borrero, C.; Trillas, M. I.; Ordovás, J.; Tello, J. C. and Avilés, M. (2004)** Predictive factors for the suppression of Fusarium wilt of tomato in plant growth media. *Phytopathology*, *94*(10), 1094-1101.
4. **Dave, H., & Ledwani, L. (2012)** A review on anthraquinones isolated from Cassia species and their applications.
5. **El-Masry, M. H.; Khalil, A. I.; Hassouna, M. S.; and Ibrahim ,H. A.H.(2002)** In situ and in vitro suppressive effect of agriculture composts and their water extracts on som phytopathogenic fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18 : 551 – 558.

6. **Erlich, H. A. (1989**)Polymerase chain reaction. *Journal of clinical immunology* , 9 (6) , 437-447.
7. **Facfish/statistic.(2013**)http://www.factfish.com/statistic/country/iraq/tomatoes,+area+harvested.
8. **Gali, F. S.; J.K.; Abaas A. K. (1986)** The effect of *Fusarium oxysporum* f.sp.*lycopersici*, type of soil and salinity of wells water growth and productivity in Basrah city. *Journal of Agriculture Reasrch and Water Rescuers*. 5(2) 197 – 212.
9. **Hibar, K., Daami-Remadi, M., Jabnoun-Khiareddine, H., Znaïdi, I. E. A., & El Mahjoub, M. (2006)** Effet des extraits de compost sur la croissance mycélienne et l'agressivité du *Fusarium oxysporum* f. sp. radicis-lycopersici. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*, 10(2), 101-108.
10. **Kerkeni, A.; Daami-Remadi, M.; Tarchoun, N. and Khedher, M. B. (2007**) In vitro assessment of the antifungal activity of several compost extracts obtained from composted animal manure mixtures. *International Journal of agricultural research*, 2(9), 786-794.
11. **Larkin, R. P., and Fravel, D. R. (1999)** Mechanisms of action and dose-response relationships governing biological control of Fusarium wilt of tomato by nonpathogenic Fusarium spp. Phytopathology, 89(12), 1152-1161.
12. **Lewis, J. (2003)** Tomato Yards and Resources. 9 (8) :123 – 127.notes. Missouri Environment and Garden. News for Missouri Garden.
13. **Mathur, S. B. and Kongsdal, O. (2003)** Common laboratory seed health testing methods for detecting fungi.
14. **Merjan,A. F.and Aljenabi J. K.. (2015)** Molecular identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* strains the causes of vascular wilt to tomato plant *Lycoperscon esculantum* Mill .*Journal Babylon University*. 23(3). 1222 – 1235.
15. **Orita, M.;Iwahana, H.; Kanazawa, H.; Hayashi, K. and Sekiya, T. (1989)** Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(8), 2766-2770.
16. **Peters, S.; Koschinsky, S.; Schwieger, F. and Tebbe, C. C. (2000)** Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR–single-strand-Chenopodium ambrosioides Lineu and Kielmeyera neglecta Saddi. *Annals of clinical Microbiology and antimicrobials*, 11(1), 20.
17. **Segarra, G.; Reis, M.; Casanova, E.and Trillas, M. I. (2009)** Control of powdery mildew (Erysiphe polygoni) in tomato by foliar applications of compost tea. *Journal of Plant Pathology*, 683-689.

18. **Sousa, Z. L.; de Oliveira, F. F.; da Conceição, A. O.; Silva, L. A. M.; Rossi, M. H.; Santos, J. S. and Andrioli, J. L. (2012)** Biological activities of extracts from.conformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. *Applied and*
19. **Stover, R. H. (1958)** Studies on Fusarium wilt of bananas: III. Influence of soil fungitoxins on behavior of F. oxysporum f. cubense in soil extracts and diffusates. *Canadian Journal of Botany*, 36(4), 439-453.
20. **Summerell, B. A.; Leslie, J. F.;Liew, E. C.; Laurence, M. H.; Bullock, S., Petrovic, T.; ... and Burgess, L. W. (2011)** Fusarium species associated with plants in Australia. *Fungal Diversity*, 46(1), 1-27.
21. **Vibha, K. and Nidhi, R .(2014)**Mangrment of *Fusarium* wilt of tomato by weeds and mycroflora processed weed compost. The bioscan. *An International Quarterly Journal of Life science*. 9 (1) : 197 – 202.
22. **Yogev, A.; Raviv, M.; Hadar, Y.;Cohen, R. and Katan, J. (2006)** Plant waste-based composts suppressive to diseases caused by pathogenic *Fusarium xysporum*. *European Journal of Plant Pathology*, 116(4), 267-278.
23. **Zhang, W.; Han, D. Y.; Dick, W. A.; Davis, K. R. and Hoitink, H. A. J. (1998)** Compost and compost water extract-induced systemic acquired resistance in cucumber and Arabidopsis. *Phytopathology*, 88(5), 450-455.