التنوع الوراثي لعزلات الفطر *Fusarium oxysporum* f.sp *cucumerinum* المعزول من نباتات الخيار باستعمال تقنية التضخيم العشوائي متعدد الاشكال لقطع DNA

طالب أحمد جايد، ضياء سالم الوائلي وزهراء حيدر عبد الكريم المبارك

كلية الزراعة، جامعة البصرة، العراق
e-mail: taleb1968@yahoo.com

الخلاصة. أجريت هذه الدراسة في مختبر الوراثة الجزيئية، كلية الزراعة، جامعة البصرة التي هدفت الى الكشف عن التنوع الوراثي باستعمال تقنية التضخيم العشوائي متعدد الاشكال لقطع DNA بين عزلات الفطر *Fusarium oxysporum* f.sp *cucumerinum* المعزولة من نباتات الخيار المصابة والتي تم الحصول عليها من مناطق مختلفة من محافظة البصرة. تضمنت مراحل العمل استخلاص DNA من عزلات الفطر *F. o.* f.sp *cucumerinum* بالاعتماد على طريقة CTAB Buffer و استعمال 8 بادئات استوردت من شركة Operon الامريكية لقياس كفاءتها. تشير نتائج استخلاص DNA الذي استخلص بطريقة CTAB Buffer و من جميع عزلات الفطر *F. o.* f.sp *cucumerinum* المدروسة انه كان ذو نوعية جيدة، إذ انه أثبت كفاءته في الاختبارات اللاحقة. اعطت بادئات تقنية RAPD نتائج جيدة من خلال النجاح في عملية تضخيم DNA لجميع عزلات الفطر *F. o.* f.sp *cucumerinum* المعزولة من سيقان نباتات الخيار المصابة، كما نجح كل باديء في التمييز بين العزلات، إذ ظهرت الحزم المتشكلة وراثيا Polymorphic bands و الحزم غير المتشكلة وراثيا Monomorphic bands. أظهرت النتائج وجود التشكل الوراثي (التباين الوراثي) بين كل العزلات المدروسة، إذ اظهر الباديء OPB-08 كفاءة عالية من حيث عدد الحزم الكلية (35) حزمة واقل البادئات كفاءة هو الباديء OPB-14 الذي اعطى اقل عدد من الحزم والبالغة 17 حزمة فقط. تراوح معدل الحزم المتشكلة وراثيا لكل برايمر 18.5 بينما تراوح حجم الحزم المنتجة بتقنية RAPD من 0.1 الى 1.6 كيلو قاعدة. أشارت نتائج هذه الدراسة أن تقنية التضخيم العشوائي متعدد الاشكال لقطع DNA ممكن ان تستخدم للتمييز بين عزلات الفطر *Fusarium oxysporum* f.sp *cucumerinum* المعزولة من نباتات الخيار.

الكلمات المفتاحية: نبات الخيار، التنوع الحيوي، *Fusarium oxysporum* f.sp *cucumerinum*، التضخيم العشوائي متعدد الاشكال لقطع DNA

المقدمة

يعد مرض الذبول الفيوزارمي من الامراض الخطيرة، إذ لوحظ المرض لأول مرة على الخيار في ولاية Florida الامريكية عام 1925 لكن المرض لم يكن شائع، وفي وقت لاحق ظهر المرض في ولاية Sumter الامريكية في خريف عام 1948 وفي ربيع عام 1949 ولقد تبين ان سببه الفطر *Fusarium oxysporum* f.sp *cucumerinum* (16). ينتمي الفطر *F. oxysporum* إلى تحت قسم الفطريات الناقصة Deutromycetes وصف Hyphomycetes ورتبة Moniliales وعائلة Tuberculariaceae (3). يضم الجنس *Fusarium* في الوقت الحاضر حوالي 65 نوعا (6) و يعد الفطر *F. oxysporum* احد هذه الانواع. يصنف الفطر *F. oxysporum* من حيث معيشته واحتياجاته الغذائية بأنه اختياري الترمم Facultative saprophytes أي انه يعيش متطفلاً على عائله وعند عدم توفر العائل المناسب يتحول الى مترمم في التربة (5). يهاجم هذا الفطر عائله من خلال اختراقه لقمة الجذور أو من خلال الجروح في الجذر أو من خلال موقع تكوين الأفرع

جزء من رسالة ماجستير للباحث الثالث

الجانبية و تلعب النيماتودا دورا كبيراً في حدوث الإصابة، يصل الفطر إلى أوعية الخشب حيث يتكاثر فيها وتتراكم المستعمرات الفطرية داخل الأوعية فضلاً عن إنتاجها أعداد هائلة من الابواغ الكونيدية التي تتراكم فيها و تسهم في انسداد الأوعية (7).

يعد هذا الفطر من الفطريات ذات التخصص العالي، إذ يصيب الخيار فقط ولا يصيب النباتات الاخرى كالبطيخ والرقي والقرع (13 ، 16). يتميز الفطر *F. oxysporum* بتعدد سلالاته، إذ تبلغ 76 سلالة (3) ولقد تم تشخيص ثلاثة سلالات (1 ، 2 ، 3) تعود الى الفطر *F. o.* f.sp *cucumerinum* من قبل الباحث Armstrong عام 1978. السلالة 3 مشكوك في تشخيصها (21).

تقنية التضخيم العشوائي متعدد الاشكال لقطع DNA

Random amplified (PCR–RAPD) polymorphism DNA

ان الكائنات الممرضة للنباتات غالبا ما تكون مرتبطة مع كائنات حية دقيقة اخرى وغالبا ما يتم تحديد معقد مرضي من هذه الكائنات تكون مسببة للمرض اضافة الى ذلك ان اتباع الطرق التقليدية في تشخيص المسبب المرضي كالاعتماد على الاعراض المظهرية و استعمال الاختبارات الأمراضية واستعمال الفحص المجهري عادة ما تفتقر الى الدقة المطلوبة اضافة الى كونها تستغرق وقتا طويلا او قد تكون غير مقنعة في بعض الأحيان، لذلك اصبح من الضروري اللجوء الى طرق الوراثة الجزيئية و استعمال تقنيات PCR ومنها تقنية RAPD التي اظهرت قدرتها في التمييز بين انواع المسببات المرضية وتحديد القرابة الوراثية بين العزلات المدروسة (9 ، 12 ، 22). يعتمد مبدأ عمل هذه التقنية على تضخيم قطع من DNA المسبب المرضي باستعمال باديء واحد عشوائي قصير السلسلة النيوكليوتيدية قادر على العثور على التسلسل التكميلي المتميز في الجينوم والحصول على البصمة الوراثية (4 ، 27).

اهم مايميز تقنية PCR–RAPD كونها تقنية سريعة وبسيطة وتكاليفها زهيدة وتنتج عدد كبير من الحزم دون الحاجة المسبقة لمعرفة تكرار النيوكيلوتيدات اضافة الى ذلك يمكن اجراء تقنية PCR–RAPD على اعداد كبيرة من العزلات دون الحاجة الى كميات كبيرة من DNA ومن مساوئ هذه التقنية ان عملية التضخيم اما تحدث او لا تحدث وذلك يعود الى عشوائية التقنية اضافة الى كون هذه التقنية تكشف عن وجود السيادة وعدم وجودها فقط و نتائجها غير قابلة للتكرار أي لا يمكن مقارنة نتائج تحليل تقنية PCR–RAPD لعينة ما وبنفس الشروط في مختبرين أثنين (2، 14 ، 15). وصفت اولى تطبيقات تقنية PCR في علم الفطريات من قبل White وآخرون (26) وذلك عن طريق تضخيم رايبوسوم الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين (Ribosomal) DNA لتحديد الصفات التصنيفية وعلاقة النشوء بين الفطريات، وغالبا ما يستعمل تتابع rDNA لدراسة الصفات التصنيفية ودراسات النشوء لأنها توجد في الخلايا الحية ذات الوظائف المهمة وبالتالي فان تطورها قد ينعكس في تطور الجينوم بأكمله (4). اجريت دراسات عديدة استعمل فيها تقنية RAPD لتشخيص المسببات المرضية وبيان التباين الوراثي بينها، ففي دراسة قام بها Vakalounakis وFragkiadakis (20) لتوضيح التباين الوراثي بين النوع الشكلي *Fusarium oxysporum* f.sp *cucumerinum* و *F. o.* f.sp *radicis–cucumerinum* وباستعمال تقنية RAPD وباستعمال 22 باديء، إذ نجحت 10 بادئات في

تضخيم الجينوم الفطري حيث وجدوا ان هناك تباينا وراثيا كبيرا بين النوعين اضافة الى كون النوعين ينتمون الى مجاميع مختلفة.

استعملت تقنية RAPD لوصف مجموعة من عزلات الفطر *F. oxysporum* وتحديد القرابة بين العزلات المدروسة (22). وفي دراسة قام بها Wang وآخرون (24) و باستعمال تقنية RAPD للتمييز بين انواع الفطر *Fusarium* spp. اذ استعمل 132 بادئ ولكن نجحت سبعة بادئات فقط في تضخيم الجينوم الفطري مع جميع الانواع حيث وجد ان هناك تباينا وراثيا كبيرا بين الانواع المختبرة. اختبرت 34 عزلة من الفطر *F. oxysporum* تم الحصول عليها من نباتات خيار مصابة بالذبول و تعفن الساق والجذر وتم تشخيصها باستخدام تقنية RAPD مع استعمال 8 بادئات، إذ نجحت جميع هذه البادئات في تضخيم الجينوم الفطري حيث وجد ان عزلات الفطر *F. o.* f.sp *cucumerinum* تعود الى ثلاثة مجاميع (23). أوضحت احدى الدراسات الخصائص الوراثية لسلالات الفطر *F. o.* f.sp *vasinfectum* باستعمال تقنية RAPD مع استعمال 10 بادئات حيث وجد ان السلالة رقم 3 و 5 متماثلة وراثيا حيث كانت نسبة التشابه الوراثي 92 % في حين لوحظ انخفاض في مستوى التشابه الوراثي بين السلالة رقم 3 و 1 (1). كما أظهرت نتائج احدى الدراسات ان هناك اختلافات وراثية قليلة بين عزلات الفطر *F. o.* f.sp *ciceris* مسبب مرض الذبول على الحمص باستعمال تقنية RAPD وباستعمال 40 باديء حيث نجحت 4 بادئات فقط في اظهار الاختلافات الوراثية بين العزلات المختبرة (19). استعملت تقنية RAPD لبيان التباين الوراثي بين عزلات من الفطر *F. oxysporum* المعزولة من نباتات القرنفل ونباتات اخرى وكذلك عزلات غير مرضية تم عزلها من التربة وباستعمال 10 بادئات حيث اوضح التحليل ان هناك تباينا وراثيا بين العزلات كما اوضحت نتائج التحليل ان هناك عدة مجموعات متميزة تقع ضمن مجموعة *F. oxysporum* والتي تتوافق مع العزلات الاصلية، كما تمكن هذا التحليل من التمييز بين العزلات الممرضة وغير الممرضة لنباتات القرنفل (25). استعملت تقنية RAPD في تشخيص المسببات المرضية التي تصيب نباتات الخيار (11).

المواد وطرائق العمل

العزلات المستعملة في الدراسة

تم الحصول على عزلات الفطر *F. o.* f.sp *cucumerinum* من مناطق مختلفة من محافظة البصرة وهي عزلة النشوة وعزلة شط العرب وعزلتيين من ابي الخصيب و عزلة من حقل كلية الزراعة، جامعة البصرة وتم العمل عليها في مختبر الوراثة الجزيئية، كلية الزراعة، جامعة البصرة.

الاوساط الزراعية المستعملة في الدراسة

وسط البطاطا دكستروز اكار (PDA) Potato Dextrose Agar. استعمل هذا الوسط لعزل وتنمية وحفظ عزلات الفطر *F.* o. f.sp *cucumerinum*. وسط البطاطا دكستروز السائل (PDB) Potato Dextrose Broth. استعمل هذا الوسط للحصول على الراشح الفطري الذي استعمل فيما بعد في عملية استخلاص DNA.

عزل وتشخيص الفطر الممرض *F. o.* f.sp *cucumerinum*

جلبت عينات عشوائية من نباتات الخيار المصابة بالذبول الى المختبر من المواقع التي تم اجراء المسح الحقلي لها، غسلت الاجزاء المصابة (السيقان) بالماء الجاري ثم بالماء المقطر المعقم ثم قطعت بوساطة مشرط معقم الى اجزاء صغيرة بطول 0.5 – 1 سم ثم عقمت بمحلول هايبوكلورات

الصوديوم (NaOCl) بتركيز 10 % لمدة دقيقتين من المستحضر التجاري ثم رفعت القطع من المحلول وغسلت بماء مقطر معقم لإزالة اثار محلول هايبوكلورات الصوديوم جففت القطع بوساطة ورق ترشيح ثم زرعت في طبق بتري قطره 9 سم حاوي على الوسط الغذائي PDA المعقم والمضاف اليه المضـاد الحيـوي Chloramphenicol (250 ملغم / لتر) بواقع خمسة قطع / طبق بتري وبواقع ثلاثة اطباق ثم حضنت الاطباق في درجة حرارة 25 ± 2 م لمدة ثلاثة ايام. فحصت النموات الفطرية النامية حول القطع المعزولة ثم نقي الفطر المعزول على نفس الوسط وشخص بالاعتماد على صفات الفطر التصنيفية الواردة في Pitt و Hocking (18). ثم حفظ الفطر على وسط غذائي صلب مائل (Slant) في الثلاجة على درجة حرارة 4 م لحين الاستعمال.

التشخيص الجزيئي لعزلات الفطر *F. o.* f.sp *cucumerinum*

تم استعمال ثلاثة طرق لاستخلاص DNA من الفطر *F. o.* f.sp *cucumerinum* وهي كالأتي: طريقة CTAB Buffer، 2.طريقة Lysis Buffer و طريقة الكت (Plant Genomic Kit DNA) المستورد من الولايات المتحدة الامريكية. والجدول (1) يوضح المحاليل المستعملة في الدراسة.

الجدول (1). يوضح المحاليل المستعملة في الدراسة (محلول الاستخلاص CTAB Buffer ومحلول TE ومحلول TBE).

ت	المـــادة	الكـمية	اسـم المـحلول
1	CTAB	2%	CTAB Buffer
2	Tris – HCl	100mM – pH=8	
3	EDTA	20 mM	
4	NaCl	81.8 g	
5	Distilled water	1000 ml	
1	Tris – HCl	200mM	Lysis Buffer
2	EDTA	50mM	
3	NaCl	200mM	
4	n-Lauroyl Sarcosine-Na	1%	
5	Distilled water	1000 ml	
1	Tris- HCl	1 ml – pH= 8	X1TE Buffer
2	EDTA	200 m – 0.5M	
3	Distilled water	100 ml	
1	Tris base	10.8 g	X1TBE Buffer
2	Boric acid	5.5 g	
3	EDTA	4 ml – 0.5 M	
4	Distilled water	1000 ml	

تم تحضير محلول الاستخلاص (CTAB Buffer) وفقا للطريقة الاتية: 1. وضع 10 غم من مادة CTAB في دورق زجاجي ثم اضيف اليها 350 مل ماء مقطر. 2.حرك المحلول لثواني قليلة ثم سخن في المايكروويف لمدة دقيقة واحدة ثم اعيد تحريك المحلول وخلطه لمدة 1–2 دقيقة اضافية ثم اعيد ال المايكروويف لمدة دقيقة واحدة. 3. اضيف 50 مل من مادة Tris – HCl 1 مولاري (pH=8) وسمح لمادة Tris بالذوبان قبل الاستمرار بالخلط بعدها اضيفت 10 مل من مادة EDTA 0.5 مولاري مع الاستمرار بالخلط (يجب ان يكون pH المحلول اقل من 8). 4. اضيف 40.9 غم من NaCl مع الاستمرار بالخلط لحين ذوبان كل مواد المحلول وبعدها نقل المحلول الى انبوبة زجاجية مدرجة ثم أكمل الحجم الى 500 مل ماء مقطر ثم اضيف 1 % من مادة 2– Mercaptoethanol قبل استعمال المحلول للاستخلاص مع مراعاة حفظ المحلول في وعاء محكم الغلق.

استخلاص الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجينExtraction of DNA

استخلص DNA لخمسة عزلات من الفطر *F. o. cucumerinum* f.sp المعزولة من نباتات الخيار المصابة بالذبول الفيوزارمي وتم العمل عليها في مختبر الوراثة الجزيئية في كلية الزراعة، جامعة البصرة، تم استخلاص DNA وفقا لطريقة CTAB Buffer (10) وحسب الخطوات الاتية مع اجراء بعض التعديلات اللازمة :1. وضع محلول الاستخلاص تحت درجة حرارة 65 م في الحاضنة او في الحمام المائي، ويمكن ان يسخن المحلول في المايكروويف قبل الاستعمال بعدها وضع 0.2 غم من الفطر المجفد (تم تجفيد الفطر بواسطة جهاز Freeze Dryer) في انابيب بلاستكية سعة 2 مل. 2. اضيف 700 مايكروليتر من محلول الاستخلاص ثم رجت الانابيب بوساطة جهاز الرجاج (Vortex) لعدة ثواني بعدها حضن المزيج في درجة حرارة 65 م في الحمام المائي لمدة 30 دقيقة مع مراعاة رج الانابيب كل 5 دقائق. 3. اخرجت الانابيب من الحمام المائي ثم أضيف 300 – 400 مايكروليتر من مزيج الكلوروفورم / ايزواميل بنسبة 1:24 اليها ثم رجت الانابيب جيدا بجهاز الرجاج لعدة ثواني ووضعت في جهاز الطرد المركزي على سرعة 5000 دورة لمدة 5 دقائق بعدها نقل الراشح (الطبقة العلوية) بوساطة ماصة دقيقة (Micro pipette) و بهدوء الى انابيب بلاستيكية جديدة. 4. تم اضافة 600 مايكروليتر من كحول الايزوبروبانول مع مراعاة رج الانابيب 4–5 مرات لخلط المزيج جيدا ثم اجري لها طرد مركزي على سرعة 10000 دورة لمدة 5 دقائق، تم استبعاد كحول الايزوبروبانول مع مراعاة الحفاظ على DNA من الفقد (يكون متجمع بقاع الانبوب). 5. اضيف 600 مايكروليتر من محلول 1X TEالى الراسب الحاوي على DNA ثم تم اضافة 200–300 مايكرو لتر من مزيج الفينول/ كلوروفورم/ ايزواميل بنسبة 1:24:25، مزج المحلول جيدا بوساطة جهاز الرجاج لعدة ثواني ثم اجري طرد مركزي على سرعة 5000 دورة لمدة 5 دقائق، بعدها نقل الراشح (الطبقة العلوية) بواسطة ماصة دقيقة (Micro pipette) وبهدوء الى انابيب بلاستيكية جديدة. 6. تم اضافة 500 مايكروليتر من كحول الايزوبروبانول مع مراعاة رج الانابيب لثواني قليلة ثم اجري طرد مركزي على سرعة 10000 دورة لمدة 5 دقائق، بعدها استبعد كحول الايزوبروبانول مع مراعاة الحفاظ على DNA من الفقد. 7. غسل DNA بواسطة كحول الايثانول 70 % المبرد بمقدار 1000 مايكروليتر ثم جمع الراسب عن طريق الطرد المركزي لمدة 5 دقائق على سرعة 10000 دورة / دقيقة، اعادة عملية الغسل مرة ثانية تحت نفس الظروف بعدها استبعد كحول الايثانول بدقة ثم تركت الانابيب بوضع مقلوب على ورق

ترشيح لمدة 3–4 دقائق، وفي الخطوة الاخيرة تم اضافة 50–100 مايكروليتر من محلول 1XTE الى الانابيب و حفظت العينات في درجة حرارة – 20 م لحين الاستعمال. تم قياس كمية الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين (DNA) بجهاز Nano Drop المجهز من شركة Thermo Scientific الأمريكية (الصورة 1) لمعرفة حجم الجينوم (كمية DNA في ng/µl).

الصورة (1) جهاز Nano Drop المجهز من شركة Thermo scientific الامريكية.

الكشف عن الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين (DNA)

قبل اجراء عملية الكشف عن DNA يجب اجراء بعض العمليات قبل البدء بعملية الكشف وهي كلآتي: **تحضير هلام الاكاروز:** بعد تحضير الحوض الخاص بهلام الترحيل وغسله وربط المشط في أحد الاطراف ووضع الربلات على حافتي الحوض، يتم الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز بتركيز 1 % أي اذابة 0.2 غم من مادة الاكاروز في 25 مل من محلول 1X TBE ووضعها في بيكر ثم تسخينها بواسطة المايكروويف لمدة 3 دقائق لحين الحصول على اللون الرائق للمزيج وبعد ذلك يتم اضافة كمية ضئيلة من صبغة Ethidium bromide مع مراعاة رج البيكر بصورة جيدة لتجانس الصبغة مع المزيج بعدها يصب الهلام في حوض الترحيل ويترك لغرض التصلب. **تقنية الترحيل الكهربائي:** يتحدد نجاح استخلاص DNA بوساطة استعمال تقنية الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز (Agaros gel) حيث يغمر حوض هلام الترحيل في الحوض الرئيسي المحتوي على محلول الترحيل 1X TBE بعد تصلب الهلام ورفع المشط والربلات يتم مزج 9 مايكروليتر من ناتج DNA مع 3 مايكروليتر من صبغة Bromophenol blue ثم يحقن المزيج في الحفر وبعد انتهاء عملية الحقن يربط الاقطاب الى مجهز القدرة Power Supply وتثبت قوة التيار الكهربائي على 80 فولت و 65 ملي امبير وترك الهلام لحين سريان صبغة Bromophenol blue من الحفر الى الجانب الأخر وبعد انتهاء عملية الترحيل تم فحص الهلام في جهاز UV لملاحظة حزم DNA المتداخل مع صبغة Ethidium bromide.

تقنية PCR–RAPD

حضرت المواد الخاصة بالتفاعل السلسلي للبوليمريز ووضعت في اناء يحتوي على قطع من الثلج لغرض حمايتها من الحرارة وتم العمل في مكان معقم

ونظيف في كابينة خاصة (PCR Cabinate) التي تحتوي على اشعة UV لتعقيم الماصات الدقيقة والأنابيب والتبات مع مراعاة ارتداء القفازات الطبية المعقمة عند العمل. حضر خليط تفاعل PCR في انبوبة ابندورف سعة 100 مايكروليتر و المكون من 12.5 مايكروليتر من مادة Master Mix و **1** مايكروليتر من الباديء و 5 مايكروليتر DNA و6.5 مايكروليتر ماء مقطر بحيث يصبح التركيز النهائي للمكونات 25 مايكروليتر ثم وضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي الصغير (Snip) لمدة 30 ثانية.و الجدول (2) يوضح البادئات المستعملة في هذه التقنية و الجدول (3) يوضح البرنامج الخاص ببادئات هذه التقنية (20).

الجدول (2). يوضح البادئات المستعملة في الدراسة

تتـــــابع البـــادئات	اسم الباديء	درجة حرارة الباديء (الاستطالة)
5-CAGGCCCTTC-3	OPA-01	43.6
5-GGTGACGCAG-3	OPB-07	43.6
5-GTCCACACGG-3	OPB-08	43.6
5-TCCGCTCTGG-3	OPB-14	43.6
5-GTTTCGCTCC-3	OPB-01	39.5
5-CCGAATTCCC-3	OPF-05	39.5
5-GGACTGGAGT-3	OPB-04	39.5
5-GGACCCTTAC-3	OPB-20	39.5

الجدول (3). يوضح البرنامج الخاص بالبادئات OPA-01 و OPB-07 و OPB-8 و OPB-14

المراحل	درجة الحرارة (مئوي)	الزمن (دقائق)	عدد الدورات
الدنترة الاولية	94	5:00	1
الدنترة	94	2:00	45
التلدين	*43.6	1:00	
الاستطالة	72	2:00	
الاستطالة النهائي	72	15:00	1

* تغير درجة الحرارة التلدين الى 39.5 باستعمال البادئات OPB-01 و OPB-04 و OPB-20 و OPF-05

تقنية الترحيل الكهربائي لمنتج التضخيم (PCR product)

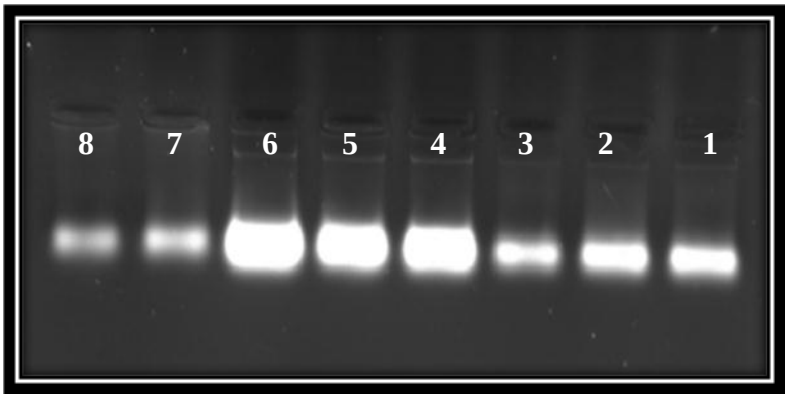
لتحديد نجاح عملية تضخيم DNA استعملت تقنية الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز (Agaros gel)، إذ يوضع في الحفرة الاولى والأخيرة مؤشر

الوزن الجزيئي DNA Marker (100 bp) وذلك بمزج 1.5 مايكروليتر من المؤشر الوزن الجزيئي مع 3.5 مايكروليتر من صبغة المثيل البرتقالي اما بقية الحفر فيوضع بها منتج PCR وبمقدار 5 مايكروليتر ثم مرر منتج PCR على هلام الاكاروز بتركيز 2 %، أي اذابة 0.5 غم من مادة الاكاروز في 25 مل من محلول 1X TBE مع اضافة كمية ضئيلة جدا من صبغة Ethidium bromide ثم تثبت قوة التيار الكهربائي على 85 فولت و 65 ملي امبير لمدة 30 دقيقة، وبعد انتهاء الترحيل يتم فحص الهلام بجهاز UV ليتم معرفة نوعية الحـــــــــزم فـــــــــي الهـــــــــلام.

النتائج والمناقشة

استخلاص DNA تشير نتائج تجارب استخلاص DNA الذي تم استخلاصه بطريقة CTAB Buffer و من جميع عزلات الفطر *F. o.* f.sp *cucumerinum* المدروسة انه كان ذو نوعية جيدة، إذ انه أثبت كفاءته في الاختبارات اللاحقة، إذ يلاحظ حزم DNA واضحة باستعمال تقنية الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز (2 %) كما موضح في الشكل (1). كما أثبتت طريقة الاستخلاص المستعملة كفاءتها في الحصول على كمية وفيرة من الجينوم (Genome) للفطر *F. o.* f.sp *cucumerinum* اذا ما قورنت بالطرق الاخرى مثل استعمال طريقة الكت و طريقة Lysis Buffer اضافة الى كونها طريقة اقتصادية غير مكلفة وتعطي نتائج جيدة جداً. واتفقت هذه النتائج مع كثير من الدراسات التي اكدت مدى كفاءة طريقة CTAB Buffer في استخلاص DNA من الفطريات (8 ، 10 ، 17 ، 28).

تقدير كمية DNA أظهرت نتائج الدراسة ان كمية DNA المستخلصة من جميع عزلات الفطر *F. o.* f.sp *cucumerinum* والتي تم قياسها على الطولين الموجبين 260 و 280 نانومول كانت ذو كمية جيدة ولجميع العزلات حيث بلغ تركيز DNA75.1 -314.7 نانوغرام / مايكرومول لجميع العزلات (الجدول 4).



شكل (1). يمثل نتائج تقنية الترحيل الكهربائي لجينوم الفطر *F. o.* f.sp *cucumerinum* لجميع العزلات المدروسة.

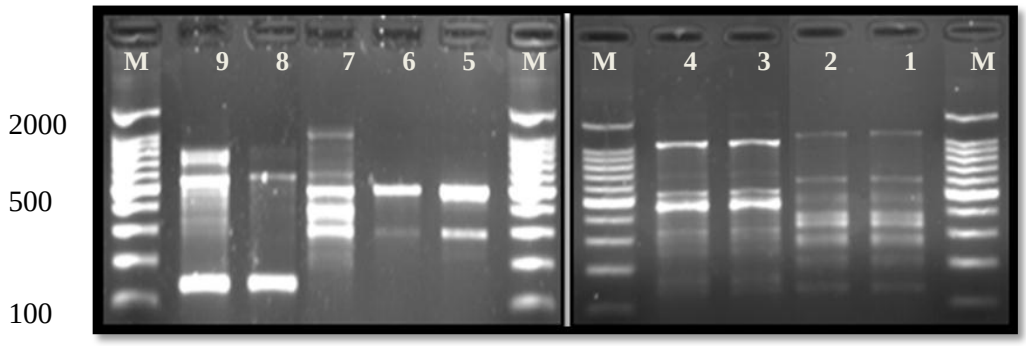
الجدول (4). يوضح كمية الجينوم لجميع عزلات الفطر *F. o.* f.sp *cucumerinum*.

اسم العزلة	تركيز DNA (ng/µl)
النشوة	285.3
ابي الخصيب 1	75.1
ابي الخصيب 2	95.2
شط العرب	314.7
حقل كلية الزراعة	287.2

التفاعل السلسلي للبوليمريز لتقنية PCR– RAPD

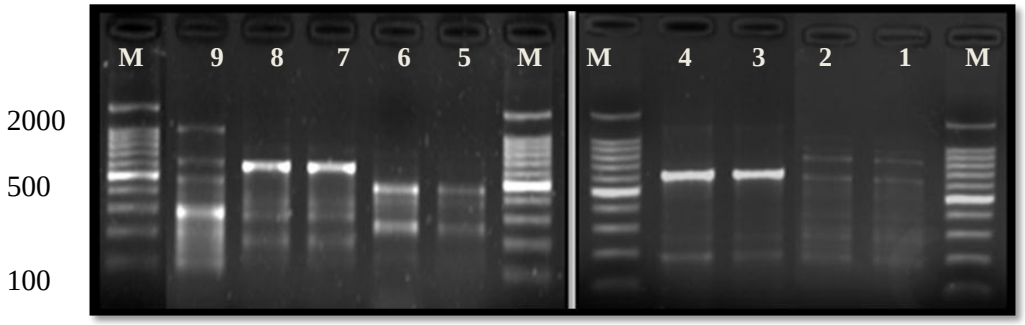
ان استعمال البادئات المذكورة في الجدول 3 قد اعطت نتائج أجابية من خلال النجاح في عملية التضخيم مع جميع عزلات الفطر *F. o.* f.sp *cucumerinum* المعزولة من سيقان نباتات الخيار المصابة كما نجح كل باديء في التمييز بين العزلات، إذ ظهرت الحزم المتشكلة وراثيا Polymorphic bands و الحزم غير المتشكلة وراثيا Monomorphic bands.

الباديء OPA– 01: أظهرت نتائج الدراسة ان عدد الحزم الكلية التي تم الحصول عليها باستعمال هذا الباديء 30 حزمة كما مبين في الشكل (2). من هذا العدد تم الحصول على 19 حزمة تشكلت وراثيا وبنسبة تباين وراثي وصلت الى 63 %. أعطت عزلة الحقل اكثر عدد من الحزم و البالغة 8 حزم بينما سجلت عزلة ابي الخصيب1 اقل عدد من الحزم والبالغة حزمتان كذلك سجلت عزلة الحقل اكثر عدد من الحزم المتشكلة وراثيا والبالغ عددها 8 حزم بينما اقل عدد من الحزم المتشكلة سجلت عند عزلة ابي الخصيب1 (حزمتان) وسجلت اكبر حزمة عند عزلة الحقل (1600 زوج قاعدي) بينما اصغر حزمة سجلت عند عزلة الحقل و عزلة شط العرب و عزلة النشوة (150 زوج قاعدي). اتفقت النتائج مع Vakalounakis و Fragkiadakis (20) و Vakalounakis وآخرون (23) فيما يتعلق بعمل هذا الباديء في تشخيص الفطر *F. o.* f.sp *cucumerinum* ومن حيث اعطائه اكبر عدد ممكن من الحزم ولكن دراستنا تفوقت عليهم بعدد الحزم الكلية، إذ تفوقت دراستنا عليهم بثلاثة اضعاف وقد يعود السبب في ذلك الى التنوع الوراثي لعزلاتنا مقارنة مع العزلة التي عملوا عليها عام 1999او تطور عزلاتنا وراثيا بسبب هذه المدة الطويلة ولكن الملفت للنظر هو النسبة المئوية المرتفعة جدا عند الباحثان و البالغة 90.9 % لهذا الباديء وقد يعود السبب في ذلك الى قلة العدد الكلي من الحزم الكلية عند الباحثان (11،7) حزمة فقط.



الشكل (2) يمثل نتائج الترحيل الكهربائي بمادة الاكاروز 3 % لمنتج PCR وباستعمال الباديء OPA-01، M مؤشر الوزن الجزيئي (100 bp)، عينة رقم 1 و 2 عزلة الحقل، عينة رقم 3 و 4 عزلة شط العرب، عينة رقم 5 و 6 عزلة ابو الخصيب 1، عينة 7 عزلة ابو الخصيب 2، عينة 8 و9 عزلة النشوة.

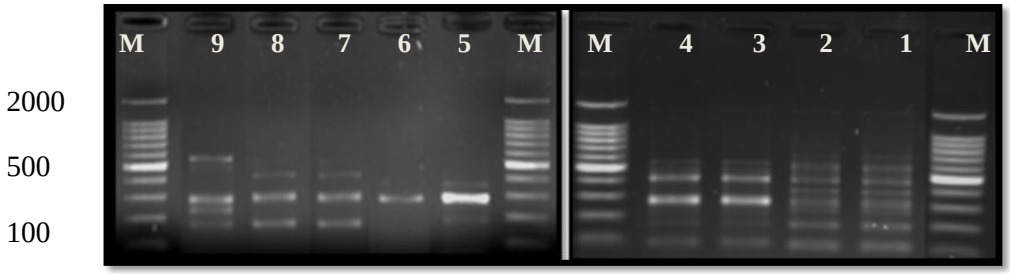
الباديء OPB-01: يتضح من الشكل (3) ان عدد الحزم الكلية التي تم الحصول عليها وباستعمال هذا الباديء 28 حزمة، إذ تم الحصول على 21 حزمة تشكلت وراثيا وبنسبة تباين وراثي 75 % . أعطت عزلة الحقل اكثر عدد من الحزم (7 حزم) بينما سجلت عزلة ابي الخصيب 1 اقل عدد من الحزم (3 حزم) وأكثر عزلة اعطت حزم متشكلة وراثيا هي عزلة الحقل (5 حزم) و اقل عزلة اعطت حزم متشكلة وراثيا عزلة ابي الخصيب1(حزمتان) و سجلت اكبر حزمة عند عزلة شط العرب و عزلة النشوة (1600 زوج قاعدي) بينما سجلت اصغر حزمة عند عزلة النشوة (100 زوج قاعدي). جاءت نتائج هذه الدراسة متفقة مع Vakalounakis و Fragkiadakis (20) من حيث عمل هذا الباديء ولكن تفوقت دراستنا من حيث عدد الحزم الكلية (14) حزمة لكن الملفت للانتباه ارتفاع نسبة التباين الوراثي عند الباحثان و البالغة 100 % لهذا الباديء وقد يعود السبب ربما الى اختلاف الموقع الجغرافي التي جمعت منه العزلات.



الشكل (3) يمثل نتائج الترحيل الكهربائي بمادة الاكاروز 3 % لمنتج PCR وباستعمال الباديء OPB-01، M مؤشر الوزن الجزيئي (100 bp)، العينة رقم 1 و 2 عزلة الحقل، عينة رقم 3 و 4 عزلة شط العرب، عينة رقم 5 و 6 عزلة ابو الخصيب 1، عينة 7 و8 عزلة ابو الخصيب 2، عينة 9 عزلة النشوة.

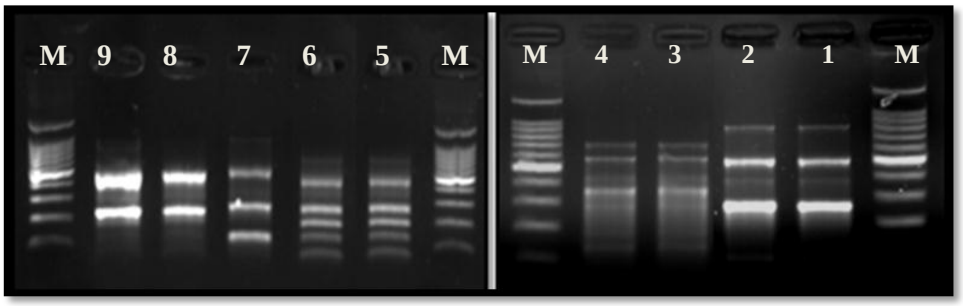
الباديء OPB-20: بلغ عدد الحزم الكلية التي تم الحصول عليها باستعمال هذا الباديء 25 حزمة وبلغ عدد الحزم المتشكلة وراثيا 17 حزمة وبنسبة تباين وراثي وصلت الى 68 % (الشكل 4) اعطت عزلة الحقل اكثر عدد من الحزم اذ بلغ عددها 8 حزم بينما سجلت عزلة ابي الخصيب 1 اقل عدد

من الحزم والبالغ عددها 3 حزم، وسجلت عزلة الحقل اكبر عدد من الحزم المتشكلة وراثيا (5 حزم) بينما بلغ اقل عدد من الحزم المتشكلة وراثيا عند عزلة ابي الخصيب1(حزمتان). وسجلت اكبر حزمة (1700 زوج قاعدي) واصغر حزمة (100 زوج قاعدي) عند عزلة الحقل و شط العرب على التوالي. اتفقت نتائج تضخيم هذا الباديء مع Vakalounakis وآخرون (23) من حيث عمل الباديء ولكن تفوقت دراستنا من حيث عدد الحزم الكلية (8) حزم و اقتربت النسبة المئوية للتباين الوراثي من النسبة المئوية للتباين الوراثي لدراسة الباحث و البالغة 62.5 %.



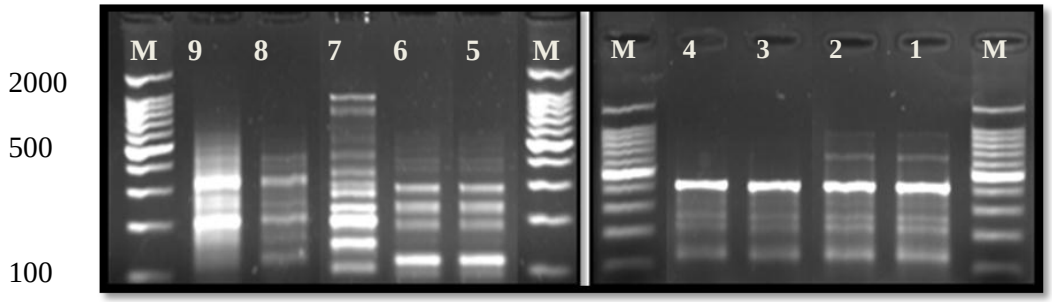
الشكل (4) يمثل نتائج الترحيل الكهربائي بمادة الاكاروز 3 % لمنتج PCR وباستعمال الباديء OPB-20، M مؤشر الوزن الجزيئي (100 bp)، عينة رقم 1 و 2 عزلة الحقل، عينة رقم 3 و 4 عزلة شط العرب، عينة رقم 5 و 6 عزلة ابو الخصيب 1، عينة 7 و 8 عزلة ابو الخصيب 2، عينة 9 عزلة النشوة.

الباديء OPB- 07: تشير نتائج هذا الاختبار والموضحة في الشكل (5) ان عدد الحزم الكلية التي تم الحصول عليها باستعمال هذا الباديء 24 حزمة وبلغ عدد الحزم المتشكلة وراثيا 20 حزمة وبنسبة تباين وراثي 83.3 %. اعطت عزلة شط العرب و عزلة ابي الخصيب1 اكثر عدد من الحزم (7 حزم) بينما سجل اقل عدد من الحزم عند عزلة النشوة (3 حزم) و اعطت عزلة شط العرب وابي الخصيب 1 اكثر عدد من الحزم المتشكلة وراثيا والبالغ عددها 5 بينما سجلت عزلة ابي الخصيب 2 و النشوة اقل عدد من الحزم المتشكلة وراثيا والبالغ عددها 3 حزم و سجلت اكبر حزمة (1000 زوج قاعدي) عند عزلة ابي الخصيب 2 وعزلة النشوة بينما اصغر حزمة (100 زوج قاعدي) سجلت عند عزلة ابي الخصيب 1. اتفقت نتائج دراستنا مع Vakalounakisو Fragkiadakis (20) و Vakalounakis وآخرون (23) من حيث عمل الباديء و لكن تفوقت نتائجنا من حيث العدد الكلي للحزم التي تم الحصول عليها باستعمال هذا الباديء بالمقارنة مع 20 و 23. (9)



الشكل (5). يمثل نتائج الترحيل الكهربائي بمادة الاكاروز 3 % لمنتج PCR وباستعمال البادیء OPB-07، M مؤشر الوزن الجزيئي (100 bp)، العينة رقم 1 و 2 عزلة الحقل، عينة رقم 3 و 4 عزلة شط العرب وعينة رقم 5 و 6 عزلة ابو الخصيب 1، عينة 7 عزلة ابو الخصيب 2، عينة 8 و 9 عزلة النشوة.

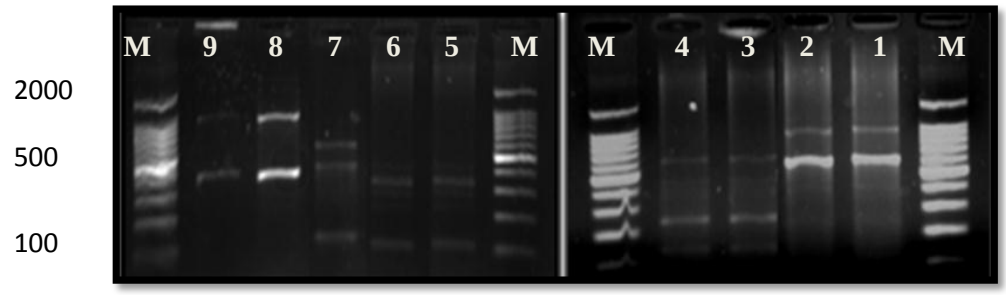
البادیء OPB- 08: بينت نتائج تضخيم المادة الوراثية باستعمال هذا البادیء ان عدد الحزم الكلية المتكونة 35 حزمة وتم الحصول على 22 حزمة متشكلة وراثيا وبنسبة تباين وراثي 62.8 % كما موضح في الشكل (6). اعطت عزلة ابي الخصيب 2 اكثر عدد من الحزم و البالغ عددها 12 حزمة بينما اقل عدد من الحزم سجل عند عزلة شط العرب و البالغ عددها 4 حزم و اعطت عزلة شط العرب وعزلة ابي الخصيب 2 اكثر عدد من الحزم المتشكلة وراثيا و البالغ عددها 4 حزم بينما اقل عدد من الحزم المتشكلة وراثيا سجلت عند عزلة النشوة والبالغ عددها حزمتان و اعطت عزلة ابي الخصيب 2 اكبر واصغر حزمة (1300 زوج قاعدي و 100 زوج قاعدي) على التوالي. اتفقت نتائج هذه الدراسة مع Vakalounakis وآخرون (23) من حيث عمل البادیء و لكن تفوقت نتائج دراستنا من حيث عدد الحزم الكلية (8) حزم فقط. كما جاءت نتائجنا متفقة مع Vakalounakis و Fragkiadakis (20) من حيث عمل البادیء وكذلك تفوقت نتائجنا على نتائج الباحث من حيث عدد الحزم الكلية (12) حزمة.



الشكل (6). يمثل نتائج الترحيل الكهربائي بمادة الاكاروز 3 % لمنتج PCR وباستعمال البادیء OPB-08، M مؤشر الوزن الجزيئي (100 bp)، عينة رقم 1 و 2 عزلة الحقل، عينة رقم 3 و 4 عزلة شط العرب، عينة رقم 5 و 6 عزلة ابو الخصيب 1، عينة 7 عزلة ابو الخصيب 2، عينة 8 و 9 عزلة النشوة.

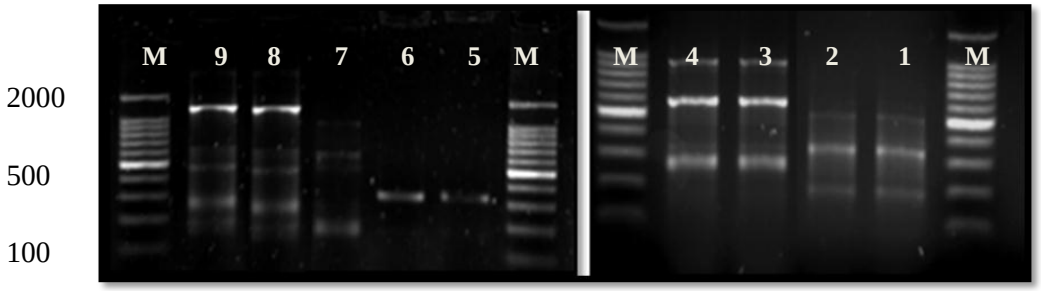
البادیء OPB-14: أظهرت نتائج هذه الدراسة و الموضحة في الشكل (7) ان عدد الحزم الكلية التي تم الحصول عليها باستعمال هذا البادیء 17 حزمة وبلغ عدد الحزم المتشكلة وراثيا 16 حزمة وبنسبة تباين وراثي 94.1 %. اعطت عزلة ابي الخصيب 1 اكثر عدد من الحزم (5 حزم) و اقل عدد من الحزم المتكونة سجلت عند عزلة النشوة (حزمتان) كما وأعطت عزلة شط العرب وعزلة ابي الخصيب1 اكثر عدد من الحزم المتشكلة وراثيا والبالغ عددها 4 حزمة بينما اقل عدد من الحزم المتشكلة وراثيا سجلت عند عزلة النشوة والبالغ عددها حزمتان. وأعطت عزلة الحقل و النشوة اكبر حزمة (1000 زوج قاعدي) بينما اصغر حزمة وجدت عند عزلة شط العرب وابي الخصيب1 (110 زوج قاعدي). اتفقت نتائجنا مع Vakalounakis وآخرون (23) من حيث عمل البادیء لكن نتائجنا تفوقت على نتائج الباحث من حيث عدد الحزم الكلية (10) حزم لكن ارتفعت النسبة المئوية للتباين الوراثي بالنسبة للباحث و البالغة 100 % وقد يعود السبب في ذلك

الى اختلاف العوامل البيئية التي جمعت منها عزلات الباحث.



الشكل (7). يمثل نتائج الترحيل الكهربائي بمادة الاكاروز 3 % لمنتج PCR وباستعمال الباديء OPB-14، M مؤشر الوزن الجزيئي (100bp)، العينة رقم 1 و 2 عزلة الحقل، عينة رقم 3 و 4 عزلة شط العرب، عينة رقم 5 و 6 عزلة ابو الخصيب 1، عينة 7 عزلة ابو الخصيب 2، عينة 8 و 9 عزلة النشوة.

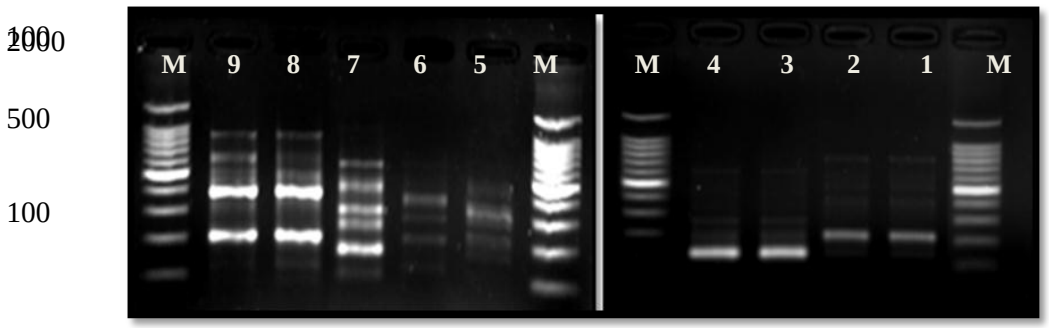
الباديء OPB- 04: بلغ عدد الحزم الكلية التي تم الحصول عليها باستعمال هذا البادئ 18 حزمة كما موضح في الشكل (8) و بلغ عدد الحزم المتشكلة وراثيا 13 حزمة و بنسبة تباين وراثي 72.2 %. اعطت عزلة ابي الخصيب 2 و النشوة اكثر عدد من الحزم والبالغ عددها 5 حزم بينما اعطت عزلة ابي الخصيب1 حزمة واحدة فقط. اما من ناحية عدد الحزم المتشكلة وراثيا فقد تساوت العزلات جميعها في العدد والبالغ عددها 3 حزم ما عدى عزلة ابي الخصيب 1 اعطت حزمة واحدة متشكلة وراثيا. وأعطت عزلة النشوة اكبر حزمة (1500 زوج قاعدي) بينما اصغر حزمة وجدت عند عزلة ابي الخصيب 2 وعزلة النشوة (150 زوج قاعدي). اتفقت نتائج هذه الدراسة مع Vakalounakis وآخرون (23) من حيث عمل الباديء لكن تفوقت نتائج دراستنا بعدد الحزم الكلية (6) حزمة فقط. كما تفوقت نتائجنا بعدد الحزم الكلية على نتائج الباحثان Vakalounakis و Fragkiadakis (20) والبالغة (8) حزم فقط.



الشكل (8) يمثل نتائج الترحيل الكهربائي بمادة الاكاروز 3 % لمنتج PCR وباستعمال الباديء OPB-04، M مؤشر الوزن الجزيئي (100 bp)، العينة رقم 1 و 2 عزلة الحقل، عينة رقم 3 و 4 عزلة شط العرب، عينة رقم 5 و 6 عزلة ابو الخصيب 1، عينة 7 عزلة ابو الخصيب 2، عينة 8 و 9 عزلة النشوة.

البادیء OPF- 05: أشارت نتائج تضخيم المادة الوراثية باستعمال هذا البادیء و الموضح في الشكل (9) ان عدد الحزم الكلية التي تم الحصول عليها 27 حزمة وبلغ عدد الحزم المتشكلة وراثيا 22 حزمة وبنسبة تباين وراثي 81.4 %. واعطت عزلة ابي الخصيب 2 و عزلة النشوة اكثر عدد من الحزم والبالغة 7 حزم بينما سجلت عزلة ابي الخصيب1 اقل عدد من الحزم و البالغة 4 حزم، و اعطت عزلة ابي الخصيب 2 و عزلت النشوة اكثر عدد من الحزم المتشكلة وراثيا والبالغ عددها 6 حزم بينما سجلت عزلة شط العرب اقل عدد من الحزم المتشكلة وراثيا و البالغ عددها حزمتان. وأعطت عزلة ابي الخصيب 2 اكبر حزمة (1000 زوج قاعدي) بينما اصغر حزمة سجلت عند عزلة شط العرب (100 زوج قاعدي). جاءت نتائج دراستنا متفقة مع Vakalounakis و Fragkiadakis (20) من حيث عمل البادیء ومن حيث اعطائه اكبر عدد ممكن من الحزم لكن نتائجنا تفوقت على نتائج الباحث بعدد الحزم الكلية (14) حزمة فقط. و جدول (5) يوضح عدد الحزم الكلية و عدد الحزم المتشكلة وراثيا و النسبة المئوية للتشكل الوراثي لجميع العزلات المدروسة.

.



الشكل (9) يمثل نتائج الترحيل الكهربائي بمادة الاكاروز 3 % لمنتج PCR وباستعمال البادیء OPF- 05، M مؤشر الوزن الجزيئي (100 bp)، العينة رقم 1 و 2 عزلة الحقل، عينة رقم 3 و 4 عزلة شط العرب، عينة رقم 5 و 6 عزلة ابو الخصيب 1، عينة 7 عزلة ابو الخصيب 2، عينة 8 و 9 عزلة النشوة.

الجدول (5). يبين العدد الكلي للحزم وعدد الحزم المتشكلة وراثيا و حجم الحزم لبادئات تقنية RAPD لجميع عزلات الفطر *F. o.* f.sp *cucumerinum*.

ت	البادئات	عدد الحزم الكلي	مدى حجم الحزم	الحزم المتشكلة وراثياً					النسبة المئوية للتشكل الوراثي
				الحقل	شط العرب	ابو الخصيب 1	ابو الخصيب 2	النشوة	
1	OPA-01	30	1600-150	6	3	3	5	4	% 63
2	OPB-01	28	1600-100	5	3	2	3	4	% 75
3	OPB-20	25	1700-100	5	3	2	3	4	% 68
4	OPB-07	24	1000-100	4	5	5	3	3	% 83.3
5	OPB-08	35	1300-100	4	1	4	9	4	% 62.8
6	OPB-14	17	1000-110	3	4	4	3	2	% 94.1
7	OPB-04	18	1500-150	3	3	1	3	3	% 72.2
8	OPF-05	27	1000-100	4	2	4	6	6	% 81.4

المصادر

1. Abd-Elsalam, K.A.; Omar, M.R.; Migheli, Q. and Nirenberg, H.I. (2004). Genetic characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* isolates by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and amplified fragment length polymorphism (AFLP). Plant Dis., 111 (6): 534–544.

2. Bogale, M.; Wingfield, B.D.; Wingfield, M.J. and Steenkamp, E.T. (2006). Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates from Ethiopia using AFLP, SSR and DNA sequence analyses. Fungal Div., 23: 51-66.

3. Booth, C. (1971). The Genus *Fusarium* Common wealth. Mycological Institue. Kew., surrey., England. 237pp.

4. Bridge, P.D.; Arora, D.K.; Reddy, C.A. and Elander, R.P. (1997). Applications of PCR in Mycology. University Press Cambridge. UK. 357 pp.

5. Farias, G.M. and Griffen, G.J. (1989). Colonization and pathology of *Fusarium oxysporum* and *F. solani* on Essex soybean. Phytopathology. 79: 1146. (Abstract).

6. Fourie, G. (2008). Evolutionary biology of *Fusarium oxysporum* f.sp *cubense*. Magister Scientiae. University of Pretoria. Pretoria., 221 pp.

7. Gonsalves, A.K. and Ferreira, S.R. (1994). *Fusarium* Primer. Plant Pathology., University of Hawaii at Manoa., USA.

8. Karthikeyan, V.; Patharajan, S.; Palani, P.; Spadaro, D.; Gullino, M. and Garbaldi, A. (2010). Modified simple protocol for efficient fungal DNA extraction highly suitable for PCR based molecular methods. Global J. Mol. Sci., 5(1): 37-42.

9. Kelly, A.; Alcala-Jimenez, A.R.; Bainbridge, B.W.; Heal, J.B.; Perez-Artes, E. and Jimenez-Diaz, R.M. (1994). Use of genetic fingerprinting and random amplified polymorphic DNA to Characterize Pathotypes of *Fusarium oxysporum* f.sp *ciceri* infection Chickpea. Phytopathology., 84: 1293-1298.

10. Kerenyi, Z. ; Zeller, K.; Hornok, L. and Leslie, J.F. (1999). Molecular Standardization of Mating Type Terminology in the *Gibberella fujikuroi* Species Complex., Appl. Environ. Microbiol., 65(9): 4071-4076.

11. Lievens, B.; Claes, L.; Vakalounakis, J.D.; Vanachter, A.C.R.C. and Thomma, B.P.H.J. (2007). A robust identification and detection assay to discriminate the cucumber pathogens *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* and f. sp. *radicis-cucumerinum*. Environ. Microbiol., 9(9): 2145–2161.

12. Mbofung, G.Y.C. (2006). Phylogeny, Molecular Detection, and Genetic variation of *Fusarium oxysporum*, vascular wilt pathogen of lettuce. Ph. D. thesis., University of Arizona., 201pp.

13. Mohamed, G.A.A. (2011). Induction Resistance of Cucumber Plants (*Cucumis sativus* L.) Against

isolates from cucumber: Differentiation by pathogenicity, vegetative compatibility, and RAPD fingerprinting. Phytopathology. 89: 161-168.

21. Vakalounakis, D.J. (1990). Alternatives to methyl bromide for control of fungal diseases of greenhouse cucumbers in Greece. N.AG.RE.F., Plant Protection Institute, Heraklio. Crete: 1-5.

22. Vakalounakis, D.J. and Fragkiadakis, G.A. (2000). Genetic variation among *Fusarium oxysporum* isolates from cucumber. OEPP/EPPO Bulletin., 30: 175-177.

23. Vakalounakis, D.J.; Wang, Z.; Fragkiadakis, G.A.; Skaracis, G.N. and Li, D.B. (2004). Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates obtained from cucumber in China by pathogenicity, VCG, and RAPD. Plant Dis., 88: 645-649.

24. Wang, P.H.; Lo, H.S. and Yeh, Y. (2001). Identification of *Fusarium oxysporum* f.sp *cucumerinum* and *Fusarium oxysporum* f.sp *luffae* by RAPD-generated DNA probes. Letters in Applied Microbiology., 33: 397-401.

25. Werner, M. and Irzykowska, L. (2007). The pathogenicity and DNA polymorphism of *Fusarium oxysporum* originating from *Dianthus caryophyllus*, *Gypsophila* spp. and Soil. Phytopathol. Pol., 46: 25–36.

26. White, T. J.; Burns, T.; Lee, S. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Academic Press, San Diego., USA., 315-322 pp.

Fusarium Wilt Disease under Protected Houses Conditions. Ph. D. thesis., Kazakh National Agrarian University., 151 pp.

14. Munthali, M.; Ford-Lloyd, B.V. and Newbury, N.J. (1992). The random amplification of polymorphic DNA for fingerprinting plants. Genome Res., 1: 274-276.

15. Nayaka, S.C.; Wulff, E.G.; Udayashankar, A.C.; Nandini, B.P.; Niranjana, S.R.; Mortensen, C.N. and Prakash, H.S. (2011). Prospects of molecular markers in *Fusarium* species diversity. Appl. Microbiol. Biotechnol., 90: 1625–1639.

16. Owen, J.H. (1959). Fusarium Wilt of Cucumber. Pathology, University of Florida.

17. Pant, M.; Nailwal, T.K.; Tewari, L.M.; Kumar, S.; Kumari, P.; Kholia, H. and Tewari, G. (2009). Molecular Characterization of *Valeriana* Species with PCR, RAPD and SDS PAGE. Nature and Science. 7(7): 41-49.

18. Pitt, J.I. and Hocking, A.D. (1997). Fungi and food spoilage. Blockie Academic and Professional. Chapman and Holl., second edition., 592pp.

19. Singh, B.P.; Saikia, R.; Yadav, M. Singh, R.; Chauhan, V.S. and Arora, D.K. (2006). Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* causing wilt of chickpea. Afr. J. Biotechnol., 5(6): 497-502.

20. Vakalounakis, D. J. and Fragkiadakis, G. A. (1999). Genetic diversity of *Fusarium oxysporum*

28. Wilson, A.; Simpson, D.; Chandler, E.; Jennings, P. and Nicholson, N. (2004). Development of PCR assays for the detection and differentiation of *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae*. Microbiology. 233: 69-76.

27. Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research., 18 (22): 6531-6535.

Genetic Diversity of *Fusarium oxysporum* f.sp *cucumerinum* Isolates from Cucumber: Differentiation by Using Random Amplified Polymorphic DNA

Talib A. Jaayid, Dhia S. Al-Waily and Zahraa H. Abdul Kareem Almubarak

College of Agriculture, University of Basrah, Iraq
e-mail: taleb1968@yahoo.com

Abstract. This study was conducted at the Molecular Genetics laboratory, college of agriculture, university of Basrah (UOB) which is aimed to detect the genetic biodiversity by using random amplified polymorphism DNA markers (PCR-RAPD) between the isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp *cucumerinum* isolated from infected plants stems cucumber which has been obtained from the different regions of Basrah province. Stages of the work included the extraction DNA from isolates *F. o*. f.sp ***cucumerinum*** depending on the CTAB Buffer method and using 8 primers imported from Operon company, U.S.A. to measure their efficiency. The results of DNA extraction, which extracted by using CTAB Buffer method from all isolates of *F. o*. f.sp *cucumerinum* it was good quality, since it has proved its efficiency in the following tests. RAPD primers gave good results through the successful amplification of DNA for all *F. o*.f.sp *cucumerinum* isolated from the infected plants stems cucumber and each primer succeeded in distinguishing between isolates, as appeared polymorphic and monomorphic bands. The primer OPB-08 Showed highly efficient in total number of bands (35) and less primers efficiency is OPB-14 gave the lowest number of bands (17). The number of polymorphic fragments per primer was 18.5. The size of amplification DNA fragments generated with the RAPD primers ranged from 0.1 to 1.6 kb. The results of this study indicated that PCR-based technique could be used to differentiate the *F. o*.f.sp *cucumerinum* isolates from cucumber plants.

Keywords: Cucumber, biodiversity, *Fusarium oxysporum* f.sp *cucumerinum* RAPD.