

دراسة التباين الوراثي لعزلات *Fusarium solani* الذي يصيب جذور خيار القثاء في مدينة البصرة باستخدام تقنية التضخيم العشوائي متعدد الاشكال لقطع DNA

طالب احمد جايد، ضياء سالم الوائلي وعلي نديم المنشي

كلية الزراعة، جامعة البصرة، العراق

taleb1968@yahoo.com

الخلاصة. أجريت هذه الدراسة في مختبر الهندسة الوراثية، كلية الزراعة، جامعة البصرة. تم تحليل اربع وعشرون عينة بوساطة تقنية التضخيم العشوائي متعدد الاشكال لقطع DNA لتحقيق التنوع الوراثي و التشابه بين و داخل ثلاثة عزلات من الفطر *Fusarium solani* في محافظة البصرة. حصل على عزلات الفطر *F. solani* الثلاثة من جذور نبات الخيار المصابة. و قد استعمل 11 بادئ عشوائي في تضخيم الحامض النووي الريبوزي منقوص الاوكسجين لجميع عزلات الفطر *F. solani*. نجحت جميع هذه البادئات في تضخيم DNA من جميع العزلات المختبرة. اعطت جميع هذه البادئات نتائج جيدة لجميع العزلات المختبرة. نجح كل بادئ في التمييز بين العزلات كما ظهرت حزم متعددة الاشكال و وحيدة الشكل. وبلغ عدد الحزم الكلي التي تم الحصول عليها 192 حزمة، كانت 124 حزمة منها متعددة الاشكال. وتم الحصول على الحزم المتعددة الاشكال في جميع العزلات. تم الحصول على اعلى عدد من هذه الحزم في العزلة الثالثة ثم الاولى ثم الثانية (48 و 43 و 33) على التوالي. أظهر البادئ OPA-07 كفاءة عالية في العدد الكلي للحزم (29) في حين اعطت البادئات OPA-04 و OPA-04 اقل كفاءة في عدد الحزم (12). كان معدد عدد الحزم متعدد الاشكال في كل بادئ 11.3. و تراوحت حجم قطع DNA المضخمة بوساطة تقنية RAPD 0.1-2.0 كيلوبايت. حصل على اقل عدد من حزم DNA متماثلة عند التضخيم بالبادئ OPA-03.

1. المقدمة

حتى يصل إلى الأوعية الخشبية، يفرز الفطر العديد من الإنزيمات التي من شأنها تحليل السليلوز والبكتين ومن ثم إعاقاة عملية صعود الماء داخل النبات وكذلك تعمل الابواغ الصغيرة Microconidia داخل أوعية الخشب على انسداد الأوعية الضيقة وتقليل كمية الماء التي تصل إلى الأوراق وأخيرا موت النبات، اعراض الاصابة لهذا الفطر تظهر اما بهيئة تعفن البذور وتعفن الجذور Root Rot وموت البادرات Damping off وتعفن التاج (Brasilerio وآخرون، 2004). يتضمن المدى العائلي للفطر *F. solani* عوائل نباتية عديدة منها القثاء Cucumis والبصل Allium والاقحوان Chrysanthemum والحمضيات Citrus وفول الصويا Glycin والقطن Gossypium والطماطة Lycopersicon.

يعود الفطر *Fusarium solani* الى صف الفطريات الناقصة Deuteromycotina وشبة رتبة Moniliales و شبه عائلة Tuberculariaceae، الغزل الفطري مقسم بحواجز بسيطة (Septate) ويكون الفطر ثلاثة أنواع من الابواغ وهي الابواغ الصغيرة Microconidia بيضوية الشكل غالبا ما تتماسك بهيأة كتل صغيرة و الابواغ الكبيرة Macroconidia هلالية الشكل و الابواغ الكلاميدية Chlamydospores كروية الشكل سميكة الجدران (Pitt و Hocking، 1997). يخترق الفطر النبات مباشرة عن طريق القمم النامية للجذر أو من أماكن تكشف الجذور الثانوية أو من خلال الجروح وينتشر داخليا بين خلايا قشرة الجذر

(Welsh و Mc Clelland، 1990). اكتسبت تقنية RAPD معدلات مقبولة وانتشار وتطبيق واسع وذلك لأنها وفرت أداة بسيطة جينياً في النظام الحيوي ومع ذلك فإن تقنية RAPD تعتبر أفضل طريقة للقياس والفحص عندما لا يعرف تسلسل النيوكليوتيدات بالمقارنة مع طرق أخرى من طرق PCR المستعملة التي تحتاج الى بادئات إثتان في حين أن تقنية RAPD تحتاج بادئ واحد. كما أن هذه التقنية ساهمت في إيجاد أنواع جديدة سجلت لأول مره في العالم وميزت بين العشائر المحلية من أنواع نيماتودا تعقد الجذور (Karajeh وآخرون، 2005).

2. مواد و طرائق العمل

1.2: العزلات المستعملة في الدراسة

2.2: الاوساط الزراعية المستعملة

وسط البطاطا دكستروز اكار (PDA) Potato Dextrose Agar. استعمل هذا الوسط لعزل وتنمية وحفظ عزلات الفطر *F. solani* وسط البطاطا دكستروز السائل (PDB) استعمل هذا الوسط لتنمية عزلات الفطر *F. solani* والاستفادة من النمو الفطري في تجارب استخلاص DNA.

3.2: عزل وتشخيص الفطر *F. solani*

عزلت الفطريات المرافقة للديدان الثعبانية من جذور نباتات خيار القثاء و التي تظهر عليها أعراض الإصابة بالعقد الجذرية من العينات التي جلبت من المزارع التي شملها المسح حيث قطعت جذور النباتات المصابة بطول 1-2 سم / قطعة ثم عقت بمحلول هابيوكلورات الصوديوم (NaOCl) بتركيز 10 % لمدة دقيقتين من المستحضر التجاري ثم رفعت القطع من المحلول وغسلت بماء مقطر معقم لإزالة اثار محلول

والصنوبر *Pinus* والبادنجان *Solanum* و الذرة *Zea* وعوائل نباتية أخرى (Mayer و Nielson، 1979). تعد الأمراض التي يسببها الفطر *F. solani* عالمية الانتشار وتسبب خسائر اقتصادية كبيرة إذ أشار Brust و Rane (2008) الى إن تعفن الجذر والتاج على العائلة القرعية كان المسبب الرئيس له هو الفطر *F. solani*.

2.1: تقنية التضخيم العشوائي متعدد الاشكال لقطع DNA (Random amplified polymorphism DNA)

ان اتباع الطرق التقليدية في تشخيص المسبب المرضي كالاتتماد على الصفات الشكلية والمظهرية او استعمال الاختبارات الأمراضية و استعمال الفحص المجهرى عادة ماتفتقر الى الدقة المطلوبة اضافة لكونها تستغرق وقتا طويلا او قد تكون غير مقنعة في بعض الأحيان، لذلك اصبح من الضروري اللجوء الى طرق أكثر دقة وفعالية في تحديد الأنواع والتمييز بينها ومن هذه الطرق هي طرق الوراثة الجزيئية و استعمال تقنيات PCR و منها تقنية RAPD التي اظهرت قدرتها في التمييز بين انواع المسببات المرضية وتحديد القرابة الوراثية بين العزلات المدروسة (Kelly وآخرون، 1994 و Vakilounakis و Fragkiadakis، 2000 و Mbofung، 2006). ويستند مبدأ تقنية RAPD على تضخيم قطع الحامض النووي باستعمال البادئات القصيرة التي تربط مواقع متعددة على الحامض النووي الجينوم يليه فصل القطع المضخمة أستنادا الى أحجامها باستعمال هلام الترحيل الكهربائي، ويتم تحديد العينات وذلك بمقارنة حزم الحامض النووي على الهلام. وهذه الطريقة أستخدمت بنجاح لتحديد هوية النباتات والكائنات الحية الدقيقة والحيوانات

التصنيفية الواردة في Pitt و Hocking (2007) للجنس *Fusarium*. وقد أكد التشخيص أ.م.د يحيى عاشور الحلو، قسم وقاية النبات، كلية الزراعة.

4.2: التشخيص الجزيئي لعزلات الفطر *F. solani*

استعملت طريقة CTAB Buffer لاستخلاص الحامض النووي للفطر *F. solani* المعزولة من نباتات خيار القثاء و الباميا و البطيخ و الجدول رقم (1) يوضح المحاليل المستعملة في الدراسة.

هايبوكلورات الصوديوم جففت القطع بوساطة ورق ترشيح ثم وضعت القطع في أطباق بتري قطر 9 سم والتي تحتوي على PDA المعقم والمضاف اليه المضاد الحيوي (250 Chloramphenicol ملغم/ لتر) وبقاوع خمسة قطع / طبق وحضنت في درجة حرارة 25 م لمدة ثلاثة أيام وبعد ظهور المستعمرات الفطرية تم تنقيتها على نفس الوسط ثم شخض الفطر *F. solani*. من قبل الدكتور ضياء سالم الوائلي كلية الزراعة، جامعة البصرة بالاعتماد على الصفات

جدول (1). المحاليل المستعملة في الدراسة.

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

حرارة 65 م في الحمام المائي لمدة 30 دقيقة مع مراعاة رج الانابيب كل 5 دقائق. 3. اخرجت الانابيب من الحمام المائي ثم اضيف 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) بواسطة ماصة دقيقة (Micro pipette) و يهدوء 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 TE الى الراسب الحاوي على DNA ثم تم اضافة 200-300 مايكرو لتر من مزيج الفينول / كلوروفورم / ايزواميل بنسبة 1:24:25، مزج المحلول جيدا بواسطة 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) و يهدوء 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

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 المايكرووف لعدة دقيقة واحدة ثم اعيد تحريك المحلول وخلطه لمدة 1-2 دقيقة اضافية ثم اعيد المايكرووف 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 انبوية 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.

5.2: استخلاص الحامض النووي الريبوزي منقوص الاوكسجين Extraction of DNA

تم استخلاص DNA وفقا لطريقة CTAB Buffer وحسب الخطوات الاتية مع اجراء بعض التعديلات اللازمة (Kerenyi وآخرون، 1999): 1. وضع محلول الاستخلاص تحت درجة حرارة 65 م في الحاضنة او في الحمام المائي، ويمكن ان يسخن المحلول في المايكرووف قبل الاستعمال بعدها وضع 0.2 غم من الفطر المجفد (تم تجفيد الفطر بواسطة جهاز Freeze Dryer) في انابيب بلاستيكية سعة 2 مل. 2. اضيف 700 مايكروليتر من محلول الاستخلاص ثم رجت الانابيب بواسطة جهاز الرجاج (Vortex) لعدة ثواني بعدها حضن المزيج في درجة

وأضيف 64 مايكروليتر ثم وضعت العينات في الحمام المائي وعلى درجة 65 م ولمدة 10 دقائق. 5. أضيف مزيج الكلوروفورم:أيزوأميل ونسبة 1:24 بمقدار 750 مايكروليتر لكل عينة ثم أجري طرد مركزي باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد وعلى سرعة 14000 دورة ولمدة 10 دقائق. ثم نقل الراشح (الطبقة العلوية) بواسطة ماصة دقيقة (Micropipette) وبهدوء الى انابيب بلاستيكية جديدة وأضيف 600 مايكروليتر من كحول الايزوبروبانول المبرد. 6. أضيف 100 مايكروليتر من خلات الصوديوم 3 مولاري وحفظت العينات في درجة -20 م ولمدة ساعة واحدة فقط ثم اجري طرد مركزي للعينات وعلى سرعة 12000 دورة ولمدة 5 دقائق ثم تم التخلص من الخليط والاحتفاظ بالراسب. 7. غسل DNA بواسطة كحول الايثانول 70 % المبرد بمقدار 500 مايكروليتر ثم جمع الراسب عن طريق الطرد المركزي لمدة 5 دقائق على سرعة 01200 دورة / دقيقة، إعادة عملية الغسل مرة ثانية تحت نفس الظروف، استبعد كحول الايثانول بدقة ثم تركت الانابيب بوضع مقلوب على ورق ترشيح لمدة 3-4 دقائق. 8. تم اضافة 50-100 مايكروليتر من محلول 1XTE الى الانابيب وحفظ العينات في درجة حرارة -20 م لحين الاستعمال. تم قياس كمية الحامض النووي الريبوزي منقوص الاوكسجين (DNA) بجهاز Nano Drop المجهز من شركة Thermo Scientific الأمريكية (الصورة 1) لمعرفة حجم الجينوم (كمية DNA في μg).

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 الريبوزي منقوص الاوكسجين (DNA) بجهاز Nano Drop المجهز من شركة Thermo Scientific الأمريكية (الصورة 1) لمعرفة حجم الجينوم (كمية DNA في μg).

6.2: استخلاص الحامض النووي الريبوزي منقوص الاوكسجين بطريقة Lysis Buffer

استخلص DNA من الفطر *F. solani* بطريقة Lysis Buffer مع اجراء بعض التعديلات و حسب الخطوات الاتية (Niu وآخرون، 2008): 1. وضع 0.2 غم من الفطر المجفد (تم تجفيد الفطر بواسطة جهاز Freeze Dryer) في انابيب بلاستيكية سعة 2 مل واضيف 700 مايكروليتر من محلول الاستخلاص ثم رج الانابيب بواسطة جهاز الرجاج (Vortex) لعدة ثواني. 2. اضيف 500 مل من محلول التحلل ثم اضيف 5 مايكروليتر من مادة Protinase K وتستخدم هذه المادة لتحطيم البروتينات. 3. أجريت عملية رج باستخدام جهاز الرج الكهربي (Vortex) ولمدة دقيقة ووضعت العينات في الحمام المائي ولمدة ساعة وعلى درجة 60 م ثم أضيفت مادة كلوريدالصوديوم 5 مولاري وبمقدار 140 مايكروليتر. 4. أضيفت مادة CTAB وبمقدار 10% وحضرت بأخذ 0.5 غم وأضيف لها 4.5 مل ماء مقطر



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

محلول الترحيل 1X TBE بعد تصلب الهلام ورفع المشط والريبات 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 جهاز 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 الآخر وبعد انتهاء عملية الترحيل تم فحص الهلام في جهاز UV لملاحظة حزم DNA

لمتداخل مع صبغة Ethidium bromide.

8.2: تقنية PCR-RAPD حضرت المواد الخاصة بالتفاعل السلسلي للبوليميريز ووضعت في اناء يحتوي على قطع من الثلج لغرض حمايتها من الحرارة وتم العمل في مكان معقم ونظيف في كابينة خاصة (PCR Cabinete) التي تحتوي على اشعة UV لتعقيم الماصات الدقيقة والأنابيب والتبابت مع مراعاة ارتداء القفازات الطبية المعقمة عند العمل. حضر

7.2: الكشف عن الحامض النووي الريبوزي منقوص الاوكسجين (DNA)

قبل اجراء عملية الكشف عن DNA يجب اجراء بعض العمليات قبل البدء بعملية الكشف وهي كالتالي: تحضير هلام الاكاروز: بعد تحضير الحوض الخاص بهلام الترحيل وغسله وربط المشط في أحد الاطراف ووضع الريبات 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 بواسطة استعمال تقنية الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز (Agaros gel) حيث يغمر حوض هلام الترحيل في الحوض الرئيسي المحتوي على

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 و 6.5 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 (Welsh و Mc Clelland، 1999).

جدول (2). البادئات المستعملة في الدراسة.

البادئ	تتابعات البادئات (3-5)	درجة حرارة الاستطالة (م)
OPA-01	5'CAGGCCCTTC 3'	43.6
OPA-02	5'TGCCGAGCTG 3'	43.6
OPA-03	5'AGTCAGCCAC 3'	39.5
OPA-04	5'AATCGGGCTG 3'	39.5
OPA-05	5'AGGGGTCTTG 3'	39.5
OPA-06	5'GCTCCCTGAC 3'	43.6
OPA-07	5'GAAACGGGTG 3'	39.5
OPA-08	5'GTGACGTAGG 3'	39.5
OPA-09	5'GGGTAACGCC 3'	43.6
OPA-10	5'GTGATCGCAG 3'	39.5
OPA-11	5'CAATCGCCGT 3'	39.5

جدول (3). البرنامج الخاص بالبادئات المستعملة في الدراسة.

المرحل	درجة الحرارة (مئوي)	الزمن (دقائق)	عدد الدورات
الذنترة الاولى	94	5:00	1
الذنترة	94	1:00	45
التلدين	*(43.6 - 39.5)	1:00	
الاستطالة	72	2:00	
الاستطالة النهائي	72	5:00	1

9.2: تقنية الترحيل الكهربائي لمنتج التضخيم لتحديد نجاح عملية تضخيم DNA استعملت تقنية الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز (Agaros PCR product)

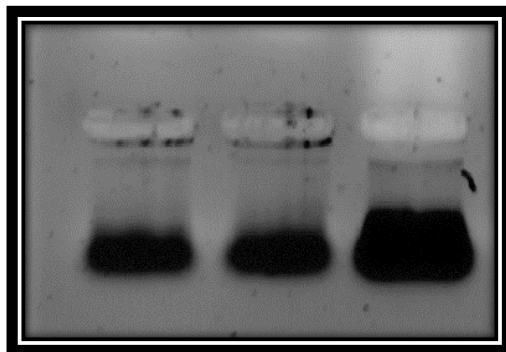
موضح في الشكل (1). كما أثبتت طريقة الاستخلاص المستعملة كفاءتها في الحصول على كمية وفيرة من الجينوم (Genome) للفطر *F. solani* اضافة الى كونها طريقة اقتصادية غير مكلفة وتعطي نتائج جيدة جداً. واتفقت هذه النتائج مع كثير من الدراسات التي اكدت مدى كفاءة طريقة Lysis Buffer في استخلاص DNA من الفطريات (Al-Samarrai و Schamid، 2000 و Niu وآخرون، 2008). كما إن كمية DNA المستخلص بطريقة CTAB Buffer كان ذو نوعية جيدة أيضاً" واتفقت هذه النتائج مع كثير من الدراسات (Kerenyi وآخرون، 1999 و Wilson وآخرون، 2004 و Pant وآخرون، 2009 و Karthikeyan وآخرون، 2010).

2.3: تقدير كمية DNA أظهرت نتائج الدراسة ان كمية DNA المستخلصة من جميع عزلات الفطر والتي تم قياسها على الطولين الموجيين 260 و 280 نانومول كانت ذات كمية جيدة ولجميع العزلات حيث بلغ التركيز (17.1- 232.1) نانوغرام / مايكروليتر للجميع (الجدول 4) يبين تركيز DNA للفطر *F. solani*

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 الحزم فـي الهـلام.

3. النتائج و المناقشة

1.3: استخلاص DNA تشير نتائج تجربة استخلاص DNA المستخلص بطريقة Lysis Buffer لعزلات الفطر *F. solani* المدروسة انه كان ذو نوعية جيدة، أثبت كفاءته في تقنية RAPD، حيث تلاحظ حزم واضحة للمادة الوراثية باستعمال تقنية الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز (2%) كما



شكل (1). يمثل نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز 2% لجينوم الفطر *F. solani* لجميع العزلات المدروسة.

جدول (4). يوضح كمية الجينوم لجميع عزلات الفطر *F. solani*.

تركيز DNA (ng/μl)	اسم العزلة
123.3	<i>F. solani</i> عزلة الفطر 1
109.2	<i>F. solani</i> عزلة الفطر 2
232.1	<i>F. solani</i> عزلة الفطر 3

عزلة بينما اقل عدد من الحزم المتشكلة سجلت عند عزلة 2 (حزمة واحدة) و سجلت اكبر حزمة عند عزلة 1 (700 زوج قاعدي) بينما اصغر حزمة سجلت عند عزلة 1 وعزلة 3 (100 زوج قاعدي). اتفقت هذه النتائج مع **Chavan** (2007) فيما يتعلق بالتضخيم الناجح للباديء في تشخيص الفطر *F. solani* في حين لم تتفق دراسته من حيث عدد الحزم الكلية إذ تفوقت دراستنا عليهم بمقدار الضعف تقريبا" وقد يعود السبب في ذلك الى التنوع الوراثي للعزلات التي عملنا عليها مقارنة مع العزلات التي عملوا عليها او تطور عزلاتنا وراثيا بسبب هذه المدة الطويلة وأختلاف الموقع الجغرافي والبيئة المعيشية في حين تفوقت نتائجه على نتائجنا من حيث عدد الحزم المتشكلة الوراثية إذ حصل على 71.4% لهذا الباديء مقارنة" بالنسبة المئوية المتكونة عندنا وهي 58.33% ويعود السبب في ذلك الى الاختلاف في العدد الكلي في دراستنا بالمقارنة من الحزم الكلية عند الباحث وهي 7حزم فقط.

3.3: التفاعل السلسلي للبوليميريز لتقنية -PCR RAPD استعملت البادئات المذكورة في جدول (2)، إذ اعطت نتائج ايجابية من خلال النجاح في عملية التضخيم مع جميع عزلات الفطر *F. solani* المعزولة من جذور خيار الفتاء المصابة بالمعقد المرضي كما نجح كل باديء في التمييز بين العزلات، إذ ظهرت الحزم المتشكلة وراثيا Polymorphic bands والحزم غير المتشكلة وراثيا Monomorphic bands.

الباديء 01-OPA أظهرت نتائج الدراسة ان عدد الحزم الكلية التي تم الحصول عليها بأستعمال هذا الباديء كانت 12 كما مبين في الشكل (2). أعطت عزلة 1 اكثر عدد من الحزم (6) حزم بينما سجلت عزلة 2 و3 اقل عدد من الحزم (3). تم الحصول على 7 حزم تشكلت وراثيا وبنسبة تباين وراثي وصلت الى 58.33%. سجلت عزلة 1 وعزلة 3 اكثر عدد من الحزم المتشكلة وراثيا" والبالغ عددها (3) لكل

بينما اصغر حزمة وجدت عند عزلة 2 (150 زوج قاعدي). اتفقت نتائج هذه الدراسة مع Chavan (2007) و Gupta وآخرون (2009) فيما يتعلق بالتضخيم الناجح للباديء في تشخيص الفطر *F.solani* لكن تفوقت نتائج دراستنا بعدد الحزم الكلية إذ بلغت حزم الباحث Chavan (2007) الكلية 9. كما تفوقت نتائجنا من حيث النسبة المئوية حيث بلغت عنده 100% مقارنةً بالنسبة المتكونة في دراستنا وهي 56.25%، كما أشار الباحث Gupta وآخرون (2009) أن هذا البادئ أعطى أفضل تباين وراثي بالمقارنة مع البادئات الأخرى.

البادئ 04 - OPA أظهرت نتائج دراستنا أن عدد الحزم الكلية التي تم الحصول عليها باستعمال هذا البادئ كانت 12 كما موضح في الشكل (5). إذ أعطت عزلة 1 أكثر عدد من الحزم 6 بينما أعطت عزلة 3 عدد من الحزم والبالغة 4 وأعطت عزلة 2 أقل عدد من الحزم والبالغة حزمة واحدة فقط. في حين بلغ عدد الحزم المتشكلة وراثياً 8 و بنسبة تباين وراثي 66.66%. كان أكبر عدد من الحزم المتشكلة وراثياً في عزلة 3 وبلغ عددها 4 أما عزلة 1 أعطت 3 حزم متشكلة وراثياً. كما أعطت عزلة 3 أكبر حزمة (1700 زوج قاعدي) بينما اصغر حزمة وجدت عند عزلة 2 (100 زوج قاعدي). اتفقت نتائج هذه الدراسة مع Chavan (2007) فيما يتعلق بالتضخيم الناجح للباديء في تشخيص الفطر *F.solani* لكن تفوقت نتائج دراستنا بعدد الحزم الكلية، إذ بلغت حزم الباحث الكلية 8. كما تفوقت نتائج الباحث من حيث النسبة المئوية حيث بلغت عنده 100%.

البادئ 02 - OPA أظهرت النتائج إن عدد الحزم الكلية التي تم الحصول عليها باستعمال هذا البادئ كانت 16 كما موضح في الشكل (3) أعطت عزلة 3 أكثر عدد من الحزم (6) بينما أعطت عزلة 1 أقل عدد من الحزم (4) وبلغ عدد الحزم المتشكلة وراثياً 10 حزمة و بنسبة تباين وراثي 62.5%. تساوت العزلتان 1 و 2 في عدد الحزم المتشكلة وراثياً 3 حزم في حين أعطت عزلة 3 (4) حزم متشكلة وراثياً. وأعطت عزلة 3 أكبر حزمة (1700 زوج قاعدي) بينما اصغر حزمة وجدت عند عزلة 1 (100 زوج قاعدي). اتفقت نتائج هذه الدراسة Chavan (2007) فيما يتعلق بالتضخيم الناجح للباديء في تشخيص الفطر *F.solani* في حين لم تتفق دراسته من حيث عدد الحزم الكلية إذ تفوقت دراستنا عليهم بمقدار الضعف تقريباً حيث بلغت حزمه الكلية 7. كما تفوقت نتائج الباحث Chavan (2007) من حيث النسبة المئوية حيث بلغت عنده 85.7% مقارنةً بالنسبة المتكونة عندنا وهي 62.5%.

البادئ 03 - OPA بلغ عدد الحزم الكلية التي تم الحصول عليها باستعمال هذا البادئ 16 كما موضح في الشكل (4) إذ أعطت عزلة 3 أكثر عدد من الحزم والبالغ عددها 8 بينما أعطت عزلة 1 عدد من الحزم 5 وأعطت عزلة 2 أقل عدد من الحزم والبالغة 4 حزم أما من ناحية عدد الحزم المتشكلة وراثياً الكلي 9 وبنسبة تباين وراثي 56.25%. إذ تساوت العزلتان 1 و 2 في عدد الحزم المتشكلة وراثياً وبلغ عددها حزمتين أما عزلة 3 أعطت 5 حزم متشكلة وراثياً. وأعطت عزلة 3 أكبر حزمة (1500 زوج قاعدي)

3 وبلغت (100 زوج قاعدي). اتفقت النتائج مع Chavan (2007) فيما يتعلق بالتضخيم الناجح للباديء في تشخيص الفطر *F. solani* لكن تفوقت نتائج دراستنا بعدد الحزم الكلية إذ كان عدد الحزم المتكونة في دراسته 7 وعدد الحزم المتشكلة وراثيا 6 وهو اقل من عدد الحزم المتكونة عندنا وهذا يدل على ان دراستنا تفوقت عليهم بعدد الحزم الكلية وبلغت النسبة المئوية عند الباحث 85.7%.

الباديء 07 - OPA: أظهرت نتائج الدراسة ان عدد الحزم الكلية التي تم الحصول عليها بأستعمال هذا الباديء كانت 29. إذ أعطت عزلة 1 وعزلة 2 اكثر عدد من الحزم (10) بينما سجلت عزلة 3 عدد من الحزم والبالغة 9. من هذا العدد تم الحصول على 23 حزمة تشكلت وراثيا" وبنسبة تباين وراثي وصلت الى 79.31%. سجلت عزلة 2 اكثر عدد من الحزم المتشكلة وراثيا" والبالغ عددها 9 بينما اقل عدد من الحزم المتشكلة سجلت عند عزلة 3 (8 حزم) وسجلت اكبر حزمة عند عزلة 3 (2100 زوج قاعدي) بينما اصغر حزمة سجلت عند عزلة 1 وبلغت (50 زوج قاعدي). اتفقت النتائج مع Chavan (2007) فيما يتعلق بالتضخيم الناجح للباديء في تشخيص الفطر *F. solani* في حين كان عدد الحزم الكلي المتكونة في دراسته 8 وعدد الحزم المتشكلة وراثيا" 6 وهو اقل من عدد الحزم المتكونة عندنا وهذا يدل على ان دراستنا تفوقت عليهم بعدد الحزم الكلية، وبلغت النسبة المئوية عند الباحث 100% لهذا الباديء وكما مبين في الشكل (8) ويعود سبب الاختلاف في النسبة المئوية الى التباين بين عدد

الباديء 05 - OPA أظهرت نتائج الدراسة ان عدد الحزم الكلية التي تم الحصول عليها بأستعمال هذا الباديء كانت 15 كما مبين في الشكل (6). أعطت عزلة 3 اكثر عدد من الحزم و البالغة 7 بينما سجلت عزلة 2 اقل عدد من الحزم 5. تم الحصول بأستعمال هذا الباديء على 10 حزم تشكلت وراثيا" وبنسبة تباين وراثي وصلت الى 66.66%. إذ سجلت عزلة 1 اكثر عدد من الحزم المتشكلة وراثيا" وبلغ عددها 5 بينما اقل عدد من الحزم المتشكلة سجلت عند عزلة 2 (حزمتان) كما سجلت اكبر حزمة عند عزلة 3 (2000 زوج قاعدي) بينما اصغر حزمة سجلت عند عزلة 3 ايضا" وبلغت 100 زوج قاعدي. اتفقت النتائج مع Chavan (2007) بالتضخيم الناجح للباديء في تشخيص الفطر *F. solani* لكن تفوقت نتائج دراستنا بعدد الحزم الكلية إذ كان عدد الحزم المتكونة في دراسته 8 وعدد الحزم المتشكلة وراثيا" 7 وهو اقل من عدد الحزم المتكونة عندنا وهذا يدل على ان دراستنا تفوقت عليهم بعدد الحزم الكلية ، ولكن الملفت للنظر هو النسبة المئوية المرتفعة جدا عند الباحث و البالغة 87.5% لهذا الباديء مقارنة بالنسبة المئوية المتكونة عندنا وهي 66.66%.

الباديء 06 - OPA بأستعمل هذا الباديء أظهرت نتائج الدراسة ان عدد الحزم الكلية التي تم الحصول عليها كانت 16 كما مبين في الشكل (7). أعطت عزلة 1 اكثر عدد من الحزم 8 بينما سجلت عزلة 2 اقل عدد من الحزم والبالغة 3. تم الحصول بأستعمال هذا الباديء على 12 حزمة متشكلة وراثيا" وبنسبة تباين وراثي وصلت الى 75%. سجلت عزلة 1 اكثر عدد من الحزم المتشكلة وراثيا" وبلغ عددها 7 بينما اقل عدد من الحزم المتشكلة سجلت عند عزلة 2 (حزمتان) و سجلت اكبر حزمة عند عزلة 3 (1500 زوج قاعدي) بينما اصغر حزمة سجلت عند عزلة 1 و

سجلت اكبر حزمة عند عزلة 3 (1500 زوج قاعدي) بينما اصغر حزمة سجلت عند عزلة 2 وبلغت 100 زوج قاعدي. اتفقت النتائج مع Chavan (2007) فيما يتعلق بالتضخيم الناجح للباديء في تشخيص الفطر *F.solani* في حين كان عدد الحزم الكلي المتكونة في دراسته 9 وعدد الحزم المتشكلة وراثيا 7 وهو اقل من عدد الحزم المتكونة عندنا وهذا الفارق القليل في عدد الحزم المتكونة وراثيا يدل على ان دراستنا تفوقت عليهم بعدد الحزم الكلية ولكن تفوق الباحث على نتائجنا من حيث النسبة المئوية، إذ بلغت عند الباحث 77.7% لهذا الباديء وكما مبين في الشكل (10).

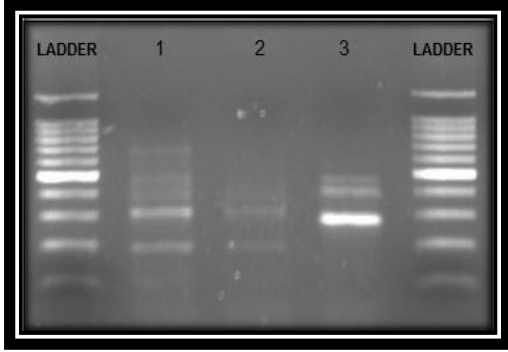
الباديء OPA-10 أظهرت نتائج الدراسة ان عدد الحزم الكلية التي تم الحصول عليها باستعمال هذا الباديء كانت 20، أعطت عزلة 1 اكثر عدد من الحزم و البالغة 9 تليها عزلة 3 بلغت 7 حزم بينما سجلت عزلة 2 أقل عدد من الحزم 4 من هذا العدد تم الحصول على 11 حزمة تشكلت وراثيا وبنسبة تباين وراثي وصلت الى 55%. سجلت عزلة 3 اكثر عدد من الحزم المتشكلة وراثيا" والبالغ عددها 5 بينما اقل عدد من الحزم المتشكلة سجلت عند عزلة 2 سجلت حزمتان فقط و سجلت اكبر حزمة عند عزلة 1 (700 زوج قاعدي) بينما اصغر حزمة سجلت عند عزلة 3 وبلغت (100 زوج قاعدي). اتفقت النتائج مع Chavan (2007) فيما يتعلق بالتضخيم الناجح لهذا الباديء في تشخيص الفطر *F.solani* في حين كان عدد الحزم الكلي المتكونة في دراسته 12 وعدد الحزم المتشكلة وراثيا 12 وهو اقل من عدد الحزم المتكونة

الحزم المتكونة في دراستنا وعدد الحزم المتكونة في دراسة الباحث.

الباديء OPA-08 أظهرت نتائج الدراسة ان عدد الحزم الكلية التي تم الحصول عليها باستعمال هذا الباديء كانت 14 أعطت عزلة 3 اكثر عدد من الحزم و البالغة 6 حزم بينما سجلت عزلة 1 وعزلة 2 أقل عدد من الحزم و البالغة 4 حزم، من هذا العدد تم الحصول على 9 حزم تشكلت وراثيا" وبنسبة تباين وراثي وصلت الى 64.28%. إذ سجلت عزلة 2 اكثر عدد من الحزم المتشكلة وراثيا" والبالغ عددها 4 حزم بينما اقل عدد من الحزم المتشكلة سجلت عند عزلة 1 حزمة واحدة فقط و سجلت اكبر حزمة عند عزلة 3 (1400 زوج قاعدي) بينما اصغر حزمة سجلت عند عزلة 2 وبلغت 100 زوج قاعدي. اتفقت النتائج مع Chavan (2007) فيما يتعلق بالتضخيم الناجح بعمل للباديء في تشخيص الفطر *F.solani* في حين كان عدد الحزم الكلي المتكونة في دراسته هو 9 وعدد الحزم المتشكلة وراثيا 8 وهو اقل من عدد الحزم المتكونة عندنا وهذا يدل على ان دراستنا تفوقت عليهم بعدد الحزم الكلية، وبلغت النسبة المئوية عند الباحث 88.8% لهذا الباديء وكما مبين في الشكل (9).

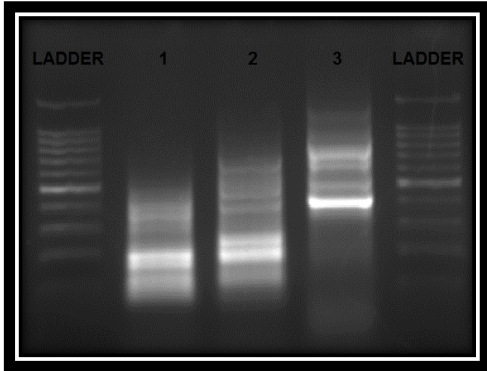
الباديء OPA-09 أظهرت نتائج الدراسة ان عدد الحزم الكلية التي تم الحصول عليها باستعمال هذا الباديء كانت 19 أعطت عزلة 2 وعزلة 3 اكثر عدد من الحزم و البالغة 7 بينما سجلت عزلة 1 أقل عدد من الحزم و البالغة 5، من هذا العدد تم الحصول على 10 حزم تشكلت وراثيا" وبنسبة تباين وراثي وصلت الى 52.63%. سجلت عزلة 3 اكثر عدد من الحزم المتشكلة وراثيا" والبالغ عددها 5 حزم بينما اقل عدد من الحزم المتشكلة سجلت عند عزلة 1 حزمتان فقط و

OPA-01 و OPA-04 وبلغت 12 حزمة، واتفقت دراستنا مع الباحث Chavan (2007)، إذ كانت النسبة المئوية 100% للبادئ في حين بلغت نسبة التباين الوراثي في دراستنا 56.25% لهذا البادئ. وكما مبين في جدول رقم (5).



شكل (2) يوضح نتائج الترحيل الكهربائي بمادة الاكاروز

3 % لمنتج PCR وباستعمال الباديء OPA-01



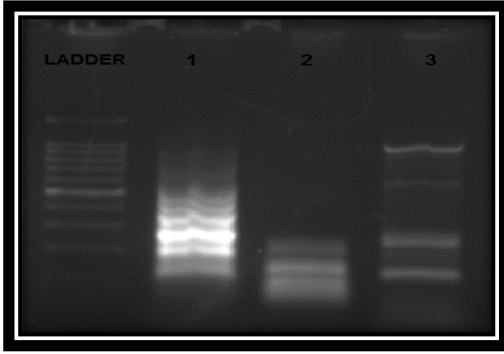
شكل (3) يوضح نتائج الترحيل الكهربائي بمادة الاكاروز

3 % لمنتج PCR وباستعمال الباديء OPA-02

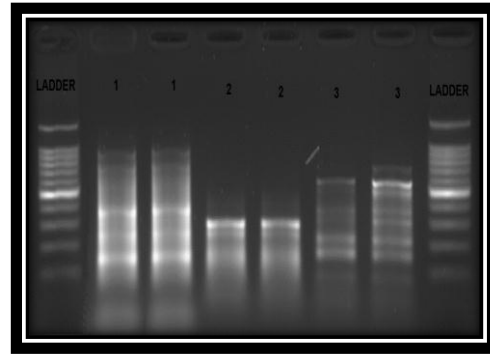
عندنا، وبلغت النسبة المئوية عند الباحث 100 % لهذا الباديء وكما مبين في الشكل (11).

الباديء OPA-11 أظهرت نتائج الدراسة ان عدد الحزم الكلية التي تم الحصول عليها باستعمال هذا الباديء كانت 23 أعطت عزلة 1 أكثر عدد من الحزم و البالغة 9 حزم تليها العزلتان 2 و 3 بلغت 7 حزم، من هذا العدد تم الحصول على 16 حزمة تشكلت وراثيا" وبنسبة تباين وراثي وصلت الى 69.56% وكما مبين في الشكل (12). وسجلت عزلة 3 أكثر عدد من الحزم المتشكلة وراثيا والبالغ عددها 7 حزم بينما اقل عدد من الحزم المتشكلة سجلت عند عزلة 2 سجلت 4 حزم وسجلت عزلة 1 حزم بلغ عددها 5 حزم و سجلت أكبر حزمة عند عزلة 3 (2000 زوج قاعدي) بينما اصغر حزمة سجلت عند عزلة 2 وبلغت (100 زوج قاعدي). اتفقت النتائج مع Chavan (2007) فيما يتعلق بالتضخيم الناجح لهذا الباديء في تشخيص الفطر *F. solani* في حين كان عدد الحزم الكلي المتكونة في دراسته 13 وعدد الحزم المتشكلة وراثيا" 13 وهو اقل من عدد الحزم المتكونة عندنا، وبلغت النسبة المئوية عند الباحث 100% لهذا الباديء.

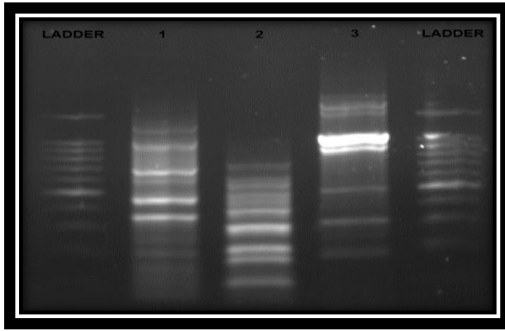
فيما يتعلق بالملخص العام لتقنية RAPD كان عدد الحزم الكلية المتشكلة وراثيا بغض النظر عن العزلات والبادئات هو 124. سجلت أكبر واصغر حزمة في الباديء OPA-07 (50 و 2100) زوج قاعدي وكانت أكبر عدد من الحزم المتشكلة وراثيا في الباديء OPA-07 ايضا" وبلغت 29 في حين كانت أقل عدد من الحزم المتشكلة وراثيا" متواجدة في البادئان



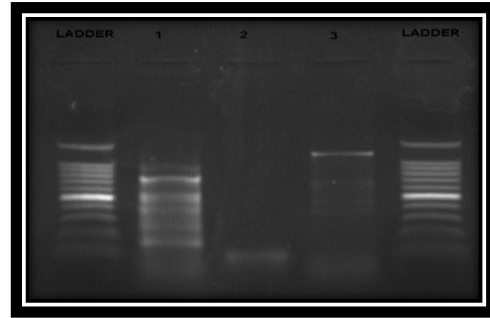
شكل (7). يوضح نتائج الترحيل الكهربائي بمادة الاكاروز 3 % لمننتج PCR وباستعمال الباديء OPA-06



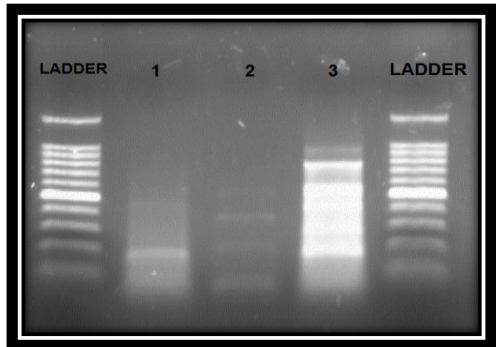
شكل (4). يوضح نتائج الترحيل الكهربائي بمادة الاكاروز 3 % لمننتج PCR وباستعمال الباديء OPA-03



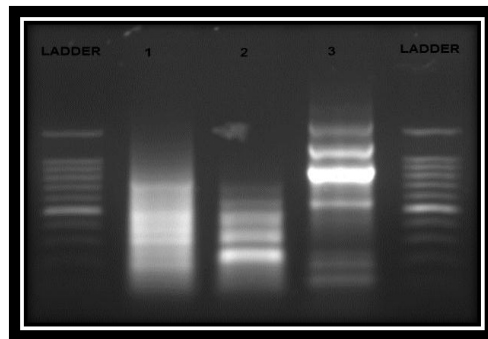
شكل (8). يوضح نتائج الترحيل الكهربائي بمادة الاكاروز 3 % لمننتج PCR وباستعمال الباديء OPA-07



شكل (5). يوضح نتائج الترحيل الكهربائي بمادة الاكاروز 3 % لمننتج PCR وباستعمال الباديء OPA-04

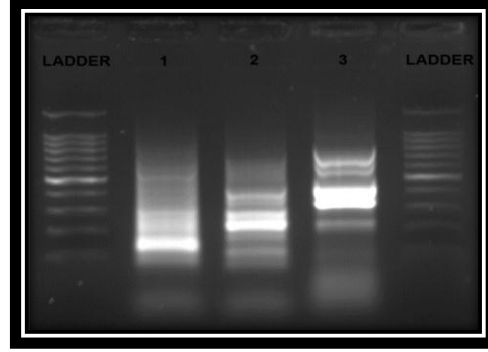


شكل (9). يوضح نتائج الترحيل الكهربائي بمادة الاكاروز 3 % لمننتج PCR وباستعمال الباديء OPA-08

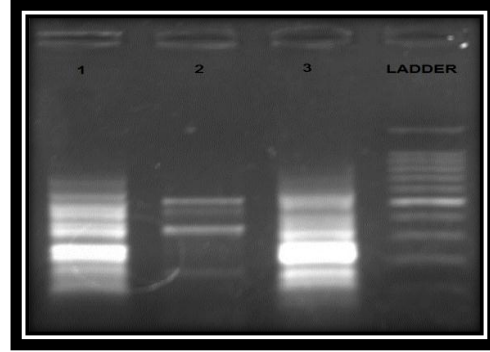


شكل (6) يوضح نتائج الترحيل الكهربائي بمادة الاكاروز 3 % لمننتج PCR وباستعمال الباديء OPA-05

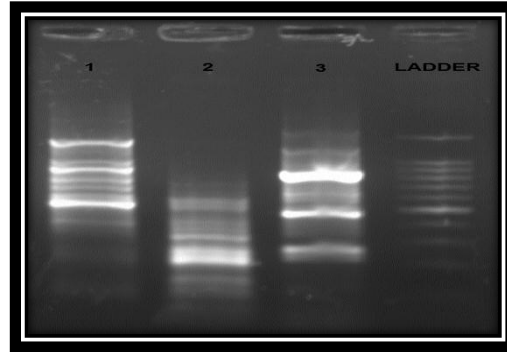
وفيما يتعلق بعدد الحزم المتشكلة وراثيا" لجميع البادئات، تفوقت العزلة 2 على العزلتين 1 و3. وبذلك تكون العزلة 2 تتميز في تباينها الوراثي عن بقية العزلات كما مبين في الشكل (13).



شكل (10). يوضح نتائج الترحيل الكهربائي بمادة الاكاروز 3 % لمنتج PCR وباستعمال البادي OPA-09



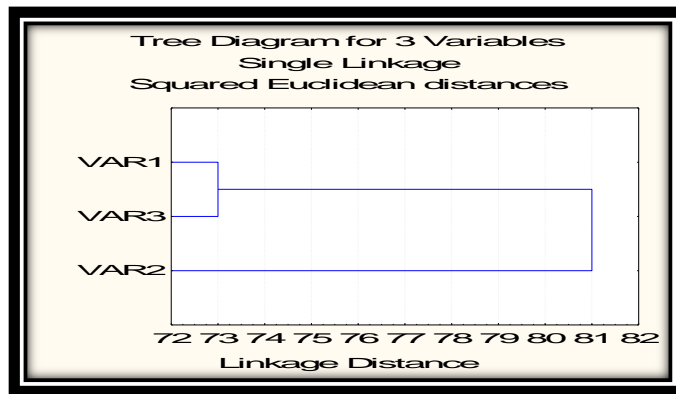
شكل (11). يوضح نتائج الترحيل الكهربائي بمادة الاكاروز 3 % لمنتج PCR وباستعمال البادي OPA-10



شكل (11). يوضح نتائج الترحيل الكهربائي بمادة الاكاروز 3 % لمنتج PCR وباستعمال البادي OPA-10

جدول (5). يوضح العدد الكلي للحزم وعدد الحزم المتشكلة وراثياً و حجم الحزم لبادنات تقنية RAPD لجميع عزلات الفطر *F. solani*.

النسبة المئوية للتشكل الوراثي	الحزم المتشكلة وراثياً				مدى حجم الحزم	عدد الحزم الكلي	البادنات	ت
	عزلة 3	عزلة 2	عزلة 1	مجموع الحزم				
%58.33	3	1	3	7	700-100	12	OPA-01	1
% 62.5	4	3	3	10	1700-100	16	OPA-02	2
% 56.25	5	2	2	9	1500-150	16	OPA-03	3
% 66.66	4	1	3	8	1700-100	12	OPA-04	4
% 66.66	3	2	5	10	2000-100	15	OPA-05	5
%75	3	2	7	12	1500-100	16	OPA-06	6
%79.31	6	9	8	23	2000< -100>	29	OPA-07	7
%57.14	3	4	1	8	1400-100	14	OPA-08	8
%52.63	5	3	2	10	1500-100	19	OPA-09	9
%55	5	2	4	11	700-100	20	OPA-10	10
%69.56	7	4	5	16	2000-100	23	OPA-11	11
	48	33	43	124		192		المجموع



شكل (13). يوضح مخطط الشجرة الوراثية لعزلات الفطر *F. solani* الثلاثة.

- cucumber. OEPP/EPPO Bulletin., 30: 175-177.
- المصادر
1. Pitt, J.I. and Hocking, A. D. (1997). Fungi and food spoilage Blockie academic and professional, Chapman and Hall, second edition. 592pp.
 2. Brasileiro, B.T.R.V.; Coimbra, M.R.M.; Jr and, M.A.M. and Oliveira, N.T . (2004). Genetic variability within *Fusarium solani* species as revealed by PCR-Finger-Printing based on PCR markers. Brazillian Journal of Microbiology. 35 : 205-210.
 3. Nielson, L.W. and Mayer, J. W., (1979), A *Fusarium* root rot of sweet potatoes. Plant Dis. Repr., 63 : 400 – 404.
 4. Brust, J. and Rane, K. (2008). Wilt in watermelon and pumpkin field .Phytopathology. 43: 616-622.
 5. 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 Path types of *Fusarium oxysporum* f.sp *ciceri* infection Chickpea. Phytopathology., 84: 1293-1298.
 6. Vakalounakis, D.J. and Fragkiadakis, G.A. (2000).Genetic variation among *Fusarium oxysporum* isolates from
7. Welsh, J. and McClelland, M. (1990).Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers.Nucl.Acids Res .,18:7213-7218.
 8. 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.
 9. Karajeh, M.R.; Abu-Gharbieh, W.I. and Masoud, S.A. (2005). First Report of the Root-Knot Nematode *Meloidogyne arenaria* Race 2 from Several Vegetable Crops in Jordan. Pl.Dis., 89 (2): 206.
 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. Niu, C.; Kebede,H.; Auld, D.; Woodward, J.; Burow, G. and Wright, R.G. (2008). A safe inexpensive method to isolate high quality plant and fungal DNA in an open laboratory environment. African J. of Biotechnology Vol.7 (16), pp. 2818-2822.

- 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.
16. Chavan, S.S. (2007). Studies on Fungal diseases of patchouli with special reference to wilt caused by *Fusarium solani* (mart.) sacc. dept of plant pathology college of agriculture .dharwad university of agricultural sciences, dharwad. 580 005.
17. Gupta, V.K.; Misra, A.K.; Gaur, R.K. and Chauhan. U.K. (2009). Studies of genetic polymorphism in the isolates of *Fusarium solani*. *Australian Journal of Crop Science*, 3 (2): 101-106.
12. Al-Samarrai, T.H. and Schamid. J. (2000). A simple method for extraction of fungal genomic DNA. *Letters in Applied Microbiology*.30,pp.53–56.
13. 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.
14. 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.
15. Karthikeyan, V.; Patharajan, S.; Palani, P.; Spadaro, D.; Gullino,

Study of genetic variation of *Fusarium solani* isolates infected cucumber plants roots in Basrah city by using RAPD-PCR technique

Talib A. Jaayid, Dhia S. Al-Waily and Ali Nadeem Al-Monshee

College of Agriculture, University of Basrah, Basrah, Iraq
taleb1968@yahoo.com

Abstract. This study was carried out at genetic engineering lab, college of agriculture, Basrah university. Twenty four samples were analyzed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) to investigate genetic similarity and diversity among and within three *Fusarium solani* represented in Basrah. three *Fusarium solani* isolates isolated from infected cucumber plants roots. Ten random primers were used to amplify DNA fragments in isolates. 11 primers (OPA-01 to OPA-11) generated bands and polymorphic DNA fragments in all tested isolates and reproducible bands. RAPD primers gave good results through the successful amplification of DNA for all *Fusarium solani* isolates, each primer succeeded in distinguishing between isolates, as appeared polymorphic and monomorphic bands. A total of 192 bands were obtained, 124 of them were polymorphic. The number of polymorphic bands in each isolate was found to be different and was higher in the third isolate than in first and second (48, 43 and 33) bands, respectively. The primer OPA-07 showed highly efficient in total number of bands (29), while less primers efficiency were OPA-01 and OPA-04 gave the lowest number of bands (12). The number of polymorphic fragments per primer was 11.3. The size of amplification DNA fragments generated with the RAPD primers ranged from 0.1 to 2.0 kb. The probability of obtaining identical fingerprints was observed to be the lowest in primer OPA-03.