مجلة القادسية للعلوم الصرفة المجلد 19 العدد 4 سنة 2014
ISSN 1997-2490 ابتسام ثامر \ ماجد كاظم

*التشخيص الجيني لعفن *Curvularia tuberculata* المعزول من حبوب الرز في مدينة الديوانية

تاريخ الاستلام : 4\2\2013 تاريخ القبول:14\4\2013

ابتسام ثامر جعاز ماجد كاظم عبود
جامعة القادسية /كلية التربية /قسم علوم الحياة
E.Mail : Ebtesam @ yahoo.Com
E.Mail: Ardkdhm@yahoo.Com

الخلاصة

تناولت هذه الدراسة توصيفا لبعض أنواع العفن *Curvularia* spp المعزول من حبوب محصول الرز في مدينة الديوانية وشمل هذا التوصيف الصفات المظهرية والمجهرية والوراثية لهذه العزلات. اذ بينت نتائج العزل والتشخيص بالأعتماد على الصفات المظهرية والمجهرية وجود نوع واحد تابع للجنس *Curvularia* هو العفن *Curvularia tuberculata* وبواقع 9عزلة اذ تم عزل عزلة واحدة فقط من حبوب الرز المعقمة وبنسبة 0.3%، فيما عزل ثمانية عزل من حبوب الرز غير المعقمة وبنسبة 1.3% ،حيث لم يعزل عفن *C.tuberculata* من اي من المحاصيل الاخرى المشمولة بالدراسة.

وأكدت نتائج PCR (Multiplex) أن العزل التسعة لعفن *C.tuberculata* قد احتوى الحامض النووي (DNA) لها على جين *gpd* و هو جين تركيبي وتشخيصي للعفن ، فاشار تواجد الحزم الواضحة عند الزوج القاعديbp 363 الى ان العزل التسعة ذات فوعة وضراوة في انتاج الانزيمات والمواد الايضية السامة .

وبالنسبة لتاثير الدالة الهيدروجينية في نمو عزلات العفن فلقد كان اعلى معدل له في الدالة (7) بمعدل نمو وقدره (7.7) mm ،تلاه الدالة (6) بمعدل (6.8) mm،ثم الدالة (5،8) بمعدل نمو قدره (5.7) mm ، ثم (5.2) mm للدالة (4) ، بعدها انخفض الى (4.2) mm عند الدالة (10) فيما وصل الى (3.9،3.1) mm عند الدالة (3،11) وهذا يدل على ان عفن *C.tuberculata* يكون بافضل حالات النمو عندما تكون البيئة المحيطة متعادلة بينما ينخفض النمو له كلما ازدادت الحامضية والقاعدية فيها .

كما اوضحت النتائج المتعلقة بتاثير ملح Nacl على نمو العفن ان اعلى معدل لنمو هذا العفن كان بتركيز 20 غم/لتر اذ بلغ (8.5) mm ،فيما انخفض معدل النمو له اذ وصل الى (6.4،5.2،4.5) mm مع زيادة التراكيز الملحية (15،10،5) غم /لتر اذ يتوضح من النتائج ان معدلات النمو لهذا العفن تزداد بزيادة التراكيز الملحية وهذا يدل على انه عفن محب للملوحة وبكثرة .

الكلمات المفتاحية : جين ، كيورنيولارييتو بركيولاتا ، الرز

المقدمة

تعد محاصيل الحنطة . *Triticum aestivum L* والرز . *Oryza sativa L* والشعير . *Hordeum vulgare L* والذرة الصفراء . *Zea mays L* وزهرة الشمس .*Helianthus annuus L* من المحاصيل الستراتيجية الاقتصادية المهمة عالميا إذ تعد مصادر غذائية مهمة لما تحتويه للإنسان والحيوان من قيم عالية من البروتين ، الكاربوهيدرات ، السكر ، الزيوت ، السليلوز ، الألياف ، العناصر المعدنية المختلفة والفيتامينات (1،2).

تهدد الافات زراعة وإنتاج المحاصيل عامة ومحاصيل الحبوب خاصة والتي بدورها تعد مصادر غذائية مهمة للإحياء المجهرية خاصة الاعفان في الحقل والمخزن إذ تصاب البذور بأكثر من 28جنسا تؤثر فى حيوية ونوعية البذور وقدرتها على النمو والتطور وإنتاج نباتات جديدة مسببة موت الأجنة وتقليل أو فشل الإنبات (1).

تملك الاعفان التابعة لجنس *Curvularia* اهمية كبيرة إذ يسبب خسائر في المحاصيل الزراعية ومنتجات الغذاء المخزونة إذ يملك هذا الجنس القدرة على تلف الحبوب بسبب امتلاكه الكثير من أنزيمات Amylolytic , Cellulolytic , Pectinolytic كما يسبب أمراض تبقع الورقة leaf spot ،اللفحة leaf blight ، تعفن الجذور root rot ، تشوه الحبوب Demorfation وشحوب أو تلف الحبوب Discolouration إضافة إلى قدرته على إفراز بعض المواد الايضية الثانويةالسامة للانسان والحيوان (3) .

ولأهمية حبوب هذه المحاصيل في الحياة اليومية كغذاء رئيس وأساسي للفرد وحيواناته ولمعرفة مدى تلوثها بالممرضات الفطرية خاصة اعفان جنس *Curvularia* خلال تداولها أثناء الخزن والاستهلاك لذلك تم أجراء هذه الدراسة والتي هدفت إلى:-

***البحث مستل من اطروحة الدكتوراه للباحث الاول**

1– عزل وتشخيص بعض الأنواع التابعة لجنس *Curvularia* الملوثة لحبوب محاصيل الحنطة والشعير والرز والذرة وزهرة الشمس المصابة عن طريق التشخيص المظهري والمجهري.

2– أجراء فحص (PCR) باستخدام العزلات القياسية والبرايمرات (البؤادىء) Primers وذلك لأجراء التشخيص الجيني (التاكيدي) لعزلات أنواع جنس *Curvularia* .

3—– دراسة تاثير بعض العوامل الفيزياوية مثل PH، Na Cl في نمو انواع جنس *Curvularia* المعزولة.

<u>الموادو طرائق العمل</u> -:

A– الأوساط الغذائية المستخدمة في العزل

1:وسط اكار مستخلص الشعير

Malt Extract Agar Medium (MEAM)

تم التحضير حسب تعليمات الشركة المنتجة وذلك بأخذ 5 غم من مستخلص الشعير وإضافة 20 غم من مادة اكار -اكار الى لتر واحد من الماء المقطر وعقم بجهاز الاوتوكليف في درجة حرارة 121مْ وضغط 1 جو لمدة 15 دقيقة وأضيف إليه مضاد الكلورومفينيكول بتركيز 250 ملغم /لتر بعد ان برد لدرجة حرارة 45 مْ ، استخدم هذا الوسط لعزل وتنمية الاعفان .

2: وسط اكار مستخلص البطاطا والدكستروز

Potato Dextrose Agar Medium (PDAM)

حضر كما ورد في (4) وذلك باذابة 38 غم من مسحوق الوسط في لتر من الماء المقطر ثم عقم بجهاز الموصدة بدرجة حرارة 121مْ وضغط 1 جو لمدة 15 دقيقة ثم برد لدرجة حرارة 45 مْ واضيف مضاد الكلورامفنيكول بتركيز 250 ملغم / لتر، استخدم هذا الوسط لعزل وتنمية وتشخيص الاعفان .

B—– جمع عينات البذور Seeds Samples Collection

جمعت 500 عينة اختيرت عشوائيا من بذور المحاصيل المشمولة بالدراسة سليمة وطبيعية ظاهريا بواقع 100 عينة لكل محصول بوزن 5 كيلو(50 غم لكل عينة)، وهي الرز صنف ياسمين ، الحنطة صنف اباء 95 ، الشعير صنف فرات 9 ، من سايلو مركز مدينة الديوانية أما بذور محصولي الذرة الصفراء ،زهرة الشمس فلم تتواجد في السايلو فجلبت من الأسواق المحلية لمركز مدينة الديوانية اذ كانت بذور الذرة الصفراء تعود لصنف الصفا ، أما بذور زهرة الشمس فتعود لصنف القدس اما تجارب المقارنة فاستخدمت بذور المحاصيل لنفس الأصناف السابقة وجلبت جميعها من الاسواق المحلية لمراكز الاقضية الحمزة ، عفك ، الشامية ، الدغارة ومركز مدينة الديوانية لموسم حصاد 2010 - 2011 وبعد انتهاء الحصاد بشهر واحد .

C– عزل العفن Identification of Mould

تم وزن العينات ووضعت في اكياس من البولي اثيلين المعقمة وعلمت ، بعدها نقلت الى المختبر لغرض الزرع اذ حفظت بدرجة حرارة 5 مْ في الثلاجة لانجاز الاختبارات اللاحقة ،تم اختيار 200 حبة من كل عينة بصورة عشوائية وقسمت على قسمين قسم تم معاملته بمحلول لهايبوكلوريت الصوديوم Na OCl بتركيز 4% لمدة 3 دقيقة وذلك بوضع البذور في اطباق بتري حاوية عل هذا المحلول ثم نقلت مباشرة الى اطباق تحوي ماء مقطر معقم تركت في الاطباق لمدة 3 دقيقة بعدها نقلت مباشرة الى اطباق بتري حاوية على ورق ترشيح لغرض تجفيف البذور اما القسم الاخر فترك بدون معاملة بالمحلول ثم زرعت كلا العينات في اطباق بتري بقطر 9 ملم حاوية على وسط MEA بواقع اربعة بذور عند محيط الطبق وبذرة خامسة في المركز بعدها حضنت الاطباق بدرجة حرارة 25 مْ +_ 2 لمدة 7 ايام وبعد انتهاء الحضن تم تنقية العزلات للاعفان النامية وذلك بنقل قرص قطره 5 ملم من كل مستعمرة وزرع في طبق جديد ثم كررت العملية عدة مرات للحصول على عزلة نقية للعفن النامي ،من ثم تم التشخيص لهذه العزلات (5) .

D– تشخيص العفن Identification of fungus

1– الصفات المظهرية والمجهرية

تم تشخيص عزلات *العفن C.tuberculata* والتي عزلت من بذور محصول الرز ولم تعزل من اي محصول اخر مشمول في هذه الدراسةاذ لم يعزل اية نوع اخر يعود لجنس *Curvularia* غيره بالاعتماد على الصفات المظهرية والمجهرية والتي وردت في (6).

..2– الكشف عن الحامض النووي (DNA) (التشخيص الجيني):

A– استخلاص وقياس تراكيز (DNA)

تم استخلاص الحامض النووي منقوص الاوكسجين DNA وذلك بعد تشخيص عفن *Curvularia tuberculata* مظهريا ومجهريا من خلال تحطيم الجدران الخلوية للفطر بعد سحقه في هاون خزفي وباستعمال النتروجين السائل ، بعدها تم قياس تراكيز الحامض النووي (DNA) بوساطة استعمال جهاز Nanodrop

Spectrophotometr وبعد التاكد من ملائمة تراكيز الحامض النووي (DNA)للعزلات لاجراء اختبار (PCR) تم حفظه في الثلاجة بدرجة حرارة (- 80) مْ لحين الاستعمال .

B ــ استخدام تقنية الـ (PCR):

Multiplex Polymerase Chain Reaction

استخدمت هذه الطريقة لتضخيم جين (*gpd*) المسؤول عن تكوين البروتين التركيبي المشخص للعفن *Curvularia tuberculata* وهو (*gpd*) Glyceral dehyde 3 phosphate dehydrogenase باستخدام زوج واحد من البوادئ

جدول1 : (البوادئ المستخدمة في تنفيذ هذه التجربة

Primer		Sequence	Product Size	Gen Bank Code
gpd	F R	Cagagcaatgctttccatca Ttgacacccatgacgaacat	363bp	1.Jx276445

ونفذ برنامج هذه التقنية حسب ماورد في (7) وكما يلي :

جدول (2) برنامج تقنية ال PCR

ت	الخطوة	درجة الحرارة	الزمن	عدد الدورات
1	Denaturation 1	95مْ	5 Min	1
2	Denaturation 2	95مْ	30 sec	30
3	Annealing	55مْ	30 sec	30
4	Extention 1	72مْ	50 sec	30
5	Extention 2	72مْ	5 Min	1

(علما ان البوادئ التي استخدمت في اختبار (PCR)و Ladder(DNA) جهزت من قبل شركة (Bioneer (Korea).

E ـ تأثير بعض العوامل الكيميائية والفيزيائية على نمو عفن *Curvularia tuberculata*

1 ــ تاثير الـ PH في نمو العفن

وزع 500مل من الماء المقطر المعقم في انابيب اختباركبيرة الحجم لكل انبوبة 50مل بعدها تم اضافة قرص من زرع نقي للعفن بقطر 2مل لكل انبوبة ثم رجت الانابيب في جهاز الهزاز (vortex) لمدة 30 دقيقة ، تم ضبط الاس الهيدروجيني باستعمال مادتي كاربونات الصوديوم و حامض Sulphoric Acid إلى (12، 8، 4، 2) ثم اخذ 1 مل من المزيج ووضع على سطح أطباق تحتوي على اكار PDA وبواقع 10 اطباق لكل عزلة واس هيدروجيني ، حضنت لمدة اسبوع في درجة حرارة 28 مْ ثم تم قياس النمو الشعاعي للعفن وذلك باخذ معدل قطرين متعامدين من ظهر المستعمرة يمران بمركزها (8).

2ــ تأثير إضافة تراكيز مختلفة من مادة Na Cl على نمو العفن

تم استخدام اربعة تراكيز من مادة Na Cl وهي (20،15، 10،5) غم /لتر اذ تم تحضير الوسط الغذائي PDA ووزع في 20 دورق سعة 500 مل وقسمت الدوارق الى خمسة مجاميع كل مجموعة تضم اربعة دوارق بعدها تم إضافة تراكيز Na Cl وبواقع 4 دوارق لكل تركيز اما المجموعة الأخير فتركت كسيطرة ثم عقمت الدوارق في درجة حرارة 12مْ وضغط 1 جو لمدة 15 دقيقة وبعدانتهاء عملية التبريد اضيف اليها المضاد الحياتي Chloramphenicole بتركيز 250 ملغم /لتر ، صب الوسط في اطباق بلاستيكية وبعد التصلب تم التلقيح باقراص من وسط PDA النامية عليها عزلات العفن بعمر اسبوع واحد بدرجة حرارة 25مْ ثم تم حساب نسبة تثبيط النمو وذلك بتطبيق معادلة Abbott كما ورد في (9) وكما يلي :

$$\text{Inhibition} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

إذ أن :
R1 = يمثل أقصى نمو شعاعي لمستعمرة العفن (السيطرة)
R = يمثل اقصى نمو شعاعي لمستعمرة العفن في الاطباق الحاوية على مادة كلوريد الصوديوم

A النتائج والمناقشة Results and Discussion

ـ العزل والتشخيص Isolation and Identification

تم عزل (9) عزلات من عفن *C.tuberculata* من حبوب محصول الرز فقط ولم يعزل من اية محصول اخر شمل في هذه الدراسة كما لم يعزل اية نوع اخر من جنس *Curvularia* خلال هذه الدراسة فكانت حصيلة العزل هي عزلة واحدة من حبوب الرز المعقمة وبنسبة 0.3% ، 8 عزلات من العفن من حبوب الرز الغير معقمة وبنسبة 1.3 % ، اذ جمعت محاصيل الحبوب (الرز،الحنطة ،الشعير،الذرة الصفراء ،زهرة الشمس) من 5 مواقع مختلفة في مدينة الديوانية شملت سايلو مركز مدينة الديوانية، الاسواق المحلية للأقضية (الحمزة –عفك– الشامية –الدغارة) اذ تم تشخيص العزلات بالاعتماد على ما يلي :

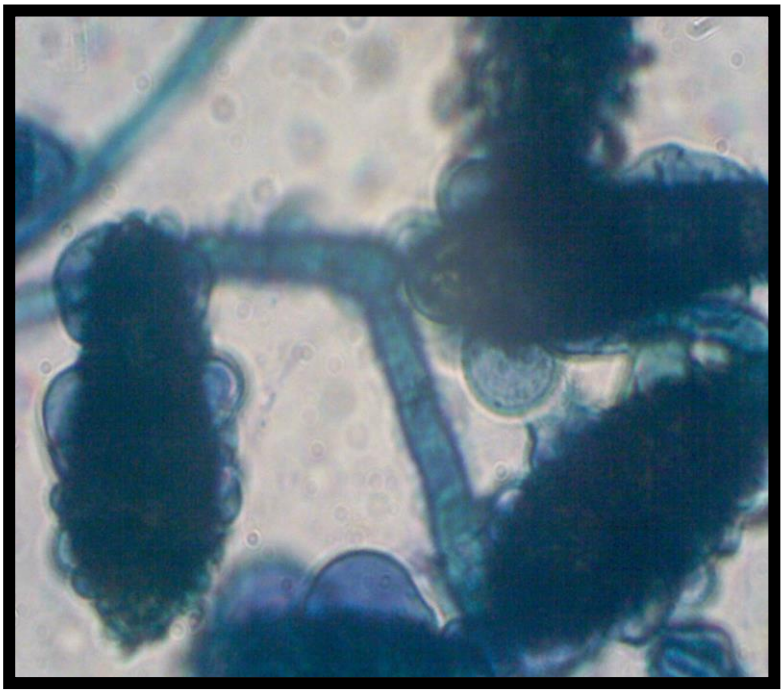
1ـ تشخيص العفن بالاعتماد على الصفات المورفولوجية لمستعمراته
Morphological Characteriztion of Mold Colony

تم عزل عفن *C.tuberculata* في هذه الدراسة بالاعتماد على طريقة صب الاكار Agar Plate Method اما التشخيص فتم بالاعتماد على ماورد في (6) اذ تم عزل (9) عزلات من عفـــــن *Curvularia tuberculata* من حبوب الرز اذ شخصت المستعمرات مظهريا على وسط مستخلص الشعير بكونها سوداء اللون مشعرة (Hairy) ، منتشرة بشكل مرتخي سائب على الوسط الزرعي (Iossley) لفترة حضن (7- 10) ايام وبدرجة حرارة ±28مْ .

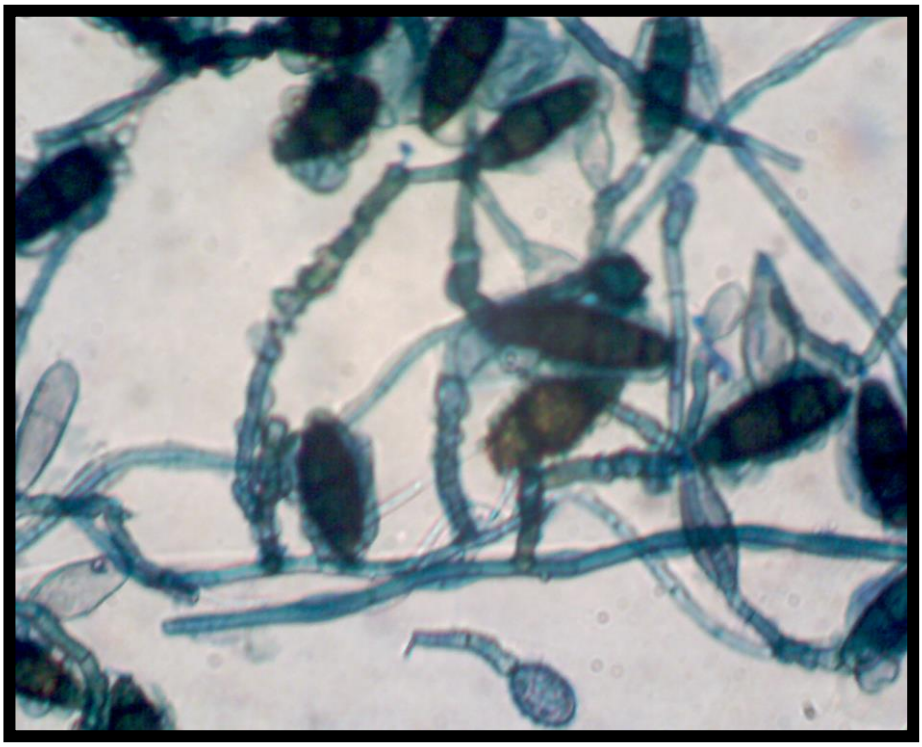
صورة (1) توضح مستعمرة عفن *C.tuberculata* على وسط (MEA)

2ـ التشخيص بالاعتماد على الصفات المجهرية
Microscopic Characterization of Mould

تم التشخيص بالاعتماد على ما ورد(6) فيما يخص عفن *C.tuberculata* ، فتبين من نتائج الفحص المجهري ان العزلات التسعة تملك غزل فطري بلون بني فاتح معتم وحامل الكونيدات مفردا او في مجاميع طرفي او جانبي على الهايفا اما الكونيدات فهي مستقيمة Straight تتكون من اربعة خلايا بثلاث حواجز عرضية ، الخلايا الوسطى ، تتكون ذات لون بني غامق واعرض من الخلايا الطرفية تكون بلون بني شاحب تملك كونيدات جدارا خشنا متعرجا يجعلها مختلفة عن بقية انواع جنس *Curvularia*.



صورة (2) : توضح الصفات المجهرية لعفن *C.tuberculata* اذ يتبين منها الكونيدات المستقيمة المحاطة بالجدار الخشن المتعرج



صورة (3) توضح خلايا عفن *C.tuberculata* المستقيمة والحوامل الكونيدية المقسمة

3ــ التشخيص الجيني للعفن *C.tuberculata* باستخدام طريقة PCR

Genetic charact erization of *C .tuberculata by PCR method*

A ـ قياس تراكيز الحامض النووي DNA لعزلات عفن *C.tuberculata*

تم قياس تراكيز الحامض النووي منقوص الاوكسجين (DNA) لجميع عزلات العفن المعزولة في هذه الدراسة والبالغة (9) عزلات أذ تبين بأن تراكيز الحامض النووي (DNA) في هذه العزلات كما يلي :

جدول رقم (3) يبين تراكيز الحامض النووي (DNA) في عزلات عفن *C.tuberculata*

NO. Sample	Concern ng/m	Purity (260-280) A
1	6.6	1.72
2	7.4	1.76
3	12.3	1.31
4	7.4	1.67
5	4.5	1.70
6	7.0	1.92
7	6.9	1.62
8	10.7	1.95
9	7.7	1.81
Standard	4.8	1.65

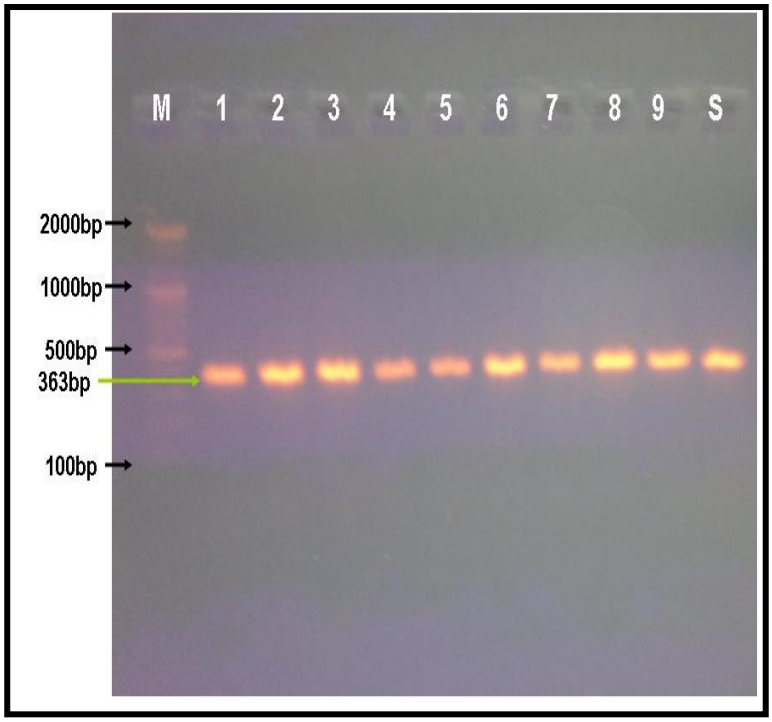
وكانت النتائج مناسبة لأجراء اختبار PCR

B ــ نتائج اختبار PCR

ان طريقة تضخيم الجينات بوساطة تقنية (PCR) هي طريقة لتحديد الفطريات اذ استخدمت في تضخيم جين (*gpd*) للعديد من الفطريات الكيسيةوالبازيدية (10) .اذ اشارت نتائج هذا الاختبار بوضوح الى تواجد جين (*gpd*) في الحامض النووي (DNA) لعفن *C.tuberculata* وهو بروتين بنائي تركيبي وتشخيصي مهم للعفن على المستوى الجيني عند الزوج القاعدي 363 Pb .فذكر (11) ان جين (*gpd*) يملك دورا في الانقسام الخلوي وانتقال الحامض النووي (RNA) كذلك عملية الاستنساخ (Transcription) .

ويعد واحدا من الانزيمات المهمة في مسار (glycolysis) وهو ضروري للحفاظ على الفعاليات الحيوية من خلال اشتراكه في طريق تكوين ATP وانتاج الطاقة الاضافية للخلية بواسطة اختزال NADH الى NAD + 9 H كما يمتلك وظيفة تحمل الجهد الحيوي(12) .كما وذكر (13) ان لهذا الجين دورا متميزا (معنويا) في تطور الاجسام الثمرية واشتراك مباشر في تكوينها . وله دور مهم في فعالية الارتباط لبروتينات سطح الخلية فيساعد بذلك على التصاق الممرض الى نسيج العائل (14) .كما ان النتائج بينت ان جميع عزلات العفن كانت بحزم ذات وضوح عالي عند الزوج القاعدي 363pb اذ يتوضح ذلك من الصورة (4) .

اذ ذكر (15) ان حزم (*gpd*) الاكثر وضوحا هي دلالة على ان العزلات الخاضعة للاختبار هي ذات فوعة مهمة مقارنة بالعزلات الضعيفة التي تمتلك حزما غير واضحة وخفيفة اذ حددت في الانواع ضعيفة الفوعة ، اذ ان بعض البروتينات المشخصة هي مرتبطة مع تميز الفوعة ، المواد الايضية للطاقة ، تطور الفطريات ، تنظيم الجينات ، اذ ان فهم ميكانيكية الفوعة للـ *C. lunata* فيما يخص جين (*gpd*) الطول الموجي والحزم الواقعة على الطول الموجي pb 500 فالترحيل الكهربائي لنواتج (PCR) في هذا العفن على اساس ان تسلسل الاحماض الامينية لبروتين التبقع (16 Form) من عزلة CX -3 ميزت كبروتين متعلق بالبناء الحيوي للميلانين والذي يعد مقترنا مع الفوعة المباشرة للممرض والجين هو واحد من الجينات التي تسيطر على بروتينات البناء الحيوي في اختبار الفوعة على مرض blast في الرز. ولم تتواجد اية دراسة محلية او عربية او اجنبية تناولت دراسة التشخيص الجيني لعفن *C. tuberculata* عن طريق الانزيم التركيبي (*gpd*) ليتم المقارنة بها.



الصورة (4) يتبين منها تواجد حزم (*gpd*) بشكل واضح جدا لجميع العزلات المختبرة عند الزوج القاعدي 363pb .

B- عزل عفن *C.tuberculata* من حبوب محصول الرز Isolation of Mould from Rice Crop grains

تعد الاعفان جزءا من الإنبات الفقير للبذور واختزال حيوية محصول الرز في الحقول فتكون مصدر عدوى للمحصول الجديد وسبب لإنتاج بادرات غير طبيعية (16) .

وتم عزل عفن *Curvularia tuberculata* بنسبة 0.3% للحبوب المعقمة ، 1.3% غير المعقمة وبواقع (9) عزلات اذ يتوضح ذلك من الجدول (4) . إذ ذكر (17) أن هذا العفن يعد سبب لاسوداد الحبوب أو السنابل في الرز ، وأن أعفان *Curvularia* تعد مستوطنات للبذور إذ تستطيع أن تسبب فشل الإنبات فيها . ولقد عزل (18) عفن *C. tuber* من حبوب الرز بنسبة 23% ، كما وعزلت (19) العفن بنسبة 21% .

جدول (4) أجناس وأنواع الاعفان المعزولة من حبوب محصل الرز

الاعفان المعزول	حبوب الرز المعقمة		حبوب الرز الغير معقمة	
	عدد العزلات	%	عدد العزلات	%
Aspergillus niger	*65	21	124	20
A. flavus	*43	14	79	13
A. tamarii	-	-	4	0.6
A. clavatus	-	-	3	0.4
A. terreus	-	-	1	0.1
A. fumigatus	-	-	2	0.3
A. restrictum	-	-	3	0.4
Curvularia tuberculata	*1	0.3	8	1.3
Bipolaris oryzae	*1	0.3	4	0.6
Alternaria padwickii	-	-	1	0.1
Helminthosporium oryzae	-	-	2	0.3
Fusarium moniliforme	*1	0.3	5	0.8
F. graminearum	*1	0.3	4	0.6
Rhizopus stalonifer	*41	13	75	12.1
R. oryzae	*32	10.1	61	10
R. microspourus	*37	12	60	10
Rhizomucor fusillus	8	3	10	2
R. mehei	*48	15.2	61	10
R. tanricus	-	-	2	0.3
Rhizoctonia solani	*2	0.6	6	0.9
Mucor indicus	*22	7	42	7
M. circinelloides	*1	0.3	4	0.6
M. racemosus	*1	0.3	2	0.3
M. hiemalis	-	-	4	1
Absidia corymbifera	*10	3.1	47	8
Epidermophyton floccosum	-	-	1	0.1
Total	314		617	

LSD : 7.51 ($P \leq 0.05$)

* تعني تواجد فرق معنوي بين مجموعتي الحبوب المعقمة وغير المعقمة.

C- دراسة تأثير الدالة الهيدروجينية على نمو جرثومة عفن *C. tuberculata*

Effect Ph on *C. tuberculata* growth

ذكر (20) أن التحكم في نظام الحياة يعد عاملا معنويا للسيطرة على المجتمعات المايكروبية , إذ أظهرت النتائج الموضحة في الجدول (5) أن الاعفان المدروسة ابدت تبايناً في قابليتها على النمو في مديات مختلفة من الدالة الهيدروجينية تراوحت بين (3 – 11) إذ كان أعلى معدل لنمو العفن *C. tuberculata* هو (7.7) mm عند الدالة الهيدروجينية (7) و(6.8) mm عند الدالة الهيدروجينية (6) و(5.7) mm عند الدالة الهيدروجينية (8,5) , (5.2) mm عند الدالة الهيدروجينية (4) ، (4.2) mm عند الدالة الهيدروجينية (10) فيما كانت (3.9) mm عند الدالة الهيدروجينية (3) .

أي أن أفضل نمو لعزلات *C. tuberculata* حدث عند الدالة الهيدروجينية (7) وأن هناك انخفاض في النمو بارتفاع القاعدية والحامضية للوسط الذي ينمو فيه هذا العفن .

واتفقت نتيجة دراستنا نسبياً مع (21) إذ ذكر أن الدالة الأمثل لنمو عفن *C. tuberculata* هي 7.5 وأن هناك انخفاضاً في النمو في الترب القاعدية العالية إذ وصل في الدالة الهيدروجينية (12) إلى 0% .فيما ذكر (22) أن الدالة الهيدروجينية الملائمة لنمو عفن *C. tuberculata* في التربة هي 4.7 .

جدول (5) تأثير قيم الدالة الهيدروجينية في نمو عزلات عفن *C. tuberculata*

عزلات عفن *C. tuberculata*	قيم الدالة الهيدروجينية / قطر المستعمرة(CM)								
	3	4	5	6	7	8	9	10	11
C1	* 0.07±4.3	0.07±5.3	0.15±6.2	0.15±6.6	0.1±7.6	0.07±6.1	0.12±5.3	0.13 ± 4	0.1±3.2
C2	0.2±3.8	0.12±5.3	0.07±6.1	0.14±6.8	0.1±7.7	0.15±5.4	0.11±5.2	0.13±4	0.1±3.1
C3	0.2±3.7	0.15±5.4	0.07±6	0.15±7	0.1±7.8	0.11±5.2	0.10±5	0.14±4.1	0.1±3.3
C4	0.26±4.1	0.11±5.2	0.11±5.2	0.15±6.9	0.2±8	0.11±5.1	0.11±5	0.07±4.3	0.1±3
C5	0.07±4.2	0.11±5.1	0.15±5.4	0.15±7	0.1±7.6	0.12±5.3	0.11±5	0.15±4.2	0.1±3
C6	0.26±4	0.11±5	0.1±5.6	0.15±7.2	0.1±7.7	0.15±6	0.11±5.1	0.28±4.5	0.1±3
C7	0.3±3.8	0.12±5.3	0.15±5.5	0.1±6.5	0.1±7.8	0.12±6.2	0.07±5.3	0.12±4.4	0.1±3.2
C8	0.2±3.7	0.1±5.5	0.07±6.1	0.84±6.7	0.2±8	0.15±6.3	0.15±5.4	0.07±4.4	0.1±3.4
C9	0.2±3.6	0.15±5.4	0.1±5.7	0.15±7	0.1±7.6	0.07±6	0.13±4.5	0.13±4	0.2±3.5
Average	0.2±3.9	0.11±5.2	0.07±5.7	0.3±6.8	0.1±7.7	0.07±5.7	0.11±5	0.1±4.2	0.1±3.1

* تعني أن الأرقام هي حصيلة ثلاثة مكررات للعزلة الواحدة .

D- دراسة تأثير مادة NaCl على نمو عزلات عفن *C. tuberculata*

Effect NaCl Salt on *C. tuberculata* growth

أظهرت نتائج هذه التجربة عدم قدرة التراكيز المستخدمة لمادة NaCl فيها على تثبيط النمو لعزلات عفن *C. tuberculata* بل على العكس ازدادت قابلية النمو لهذه العزلات بازدياد ملح NaCl إذ كان معدل النمو في تركيز 5 غم / لتر هو (4.5) mm ، وفي تركيز 10 غم / لتر (5.2) mm فيما كان معدل النمو في تركيز 15 غم / لتر (6.4) mm بينما كان معدل النمو في التركيز 20 غم ، لتر قد وصل إلى (8.5) mm , اذ يظهر ذلك من الجدول (6).

ولقد دلت هذه النتائج على أن عزلات عفن *C. tuberculata* من الاعفان المحبة للملوحة خاصة الملوحة العالية .

فذكرت (23) أن تحمل بعض الاعفان للنمو في التراكيز الملحية العالية ربما يعود لطبيعة الغشاء الخلوي للعفن إذ تتعادل الأيونات السالبة للحوامض المتواجدة فيه مع الايونات الموجبة للملح مما يزيد من ثباتية الغشاء الخلوي اضافة لتواجد المجاميع اللا قطبية النافرة للماء في بروتينات الغشاء والتي تزداد قوتها في التراكيز الملحية العالية ومن ثم قوة البروتينات ودرجة ثباتها مما ينعكس إيجابياً على نمو العفن .

أما (22) فأشار إلى أن الأنواع العائدة لجنس *Curvularia* تكون متحملة للظروف البيئية مثل الاملاح والحرارة العالية خاصة في الماء والتربة ، فيما أوضح (24) إلى أن تواجد أيونات الصوديوم يزيد من فعالية أنواع جنس *Curvularia* إذ كلما زاد تركيزه زادت فعاليتها لإنتاج الانزيمات بقدرة تصل إلى 143% .

جدول (6) تأثير تراكيز ملح NaCl على نمو عزلات عفن *C. tuberculata*

عزلات عفن *C. tuberculata*	معدل اقطار المستعمرات لعزلات عفن *C. tuberculata* (CM)			
	تراكيز ملح NaCl غم / لتر			
	5	10	15	20
C1	4.0±4.8	4.0±4.8	3.5±5.6	4.1±7.8
C2	4.0±4.7	3.3±5.1	3.6±5.7	5.0±8.5
C3	3.3±5	3.3±5	2.3±6.6	5.1±8.8
C4	3.3±5	3.3±5	2.2±6.2	5.1±8.9
C5	3.3±5	3.5±5.3	2.2±6.4	6.0±9
C6	4.0±4.3	3.5±5.4	2.3±6.5	5.0±8.5
C7	4.0±4.2	3.5±5.6	2.3±6.8	5.0±8.4
C8	4.0±4.1	3.6±5.7	3.8±7	5.0±8.5
C9	4.2±4	3.5±5.5	3.8±7.1	5.0±8.5
Average	4.2±4.5	3.6±5.2	2.2±6.4	5.0±8.5

* تعني أن الأرقام هي حصيلة ثلاثة مكررات للعزلة الواحدة .

الاستنتاجات

1. تم عزل عفن *C .tuberculata* من حبوب محصول الرزاذ لم يعزل اية نوع اخر من جنس *Curvularia* غيره فيما لم يعزل هذا العفن من المحاصيل الاخرى المشمولة في الدراسة.
2. اوضحت نتائج اختبار PCR تواجد جين *gpd* في الحامض النووي DNA لجميع عزلات عفن *C. tuberculata* وهو بروتين بنائي مهم لتشخيص العفن على المستوى الجيني.
3. اثبتت النتائج ان البيئة المتعادلة مع PH (7) هي الامثل للنمو الافضل لعفن *C . tuberculata* بينما انخفض نموه في البيئات الحامضية والقاعدية المرتفعة .
4. بينت النتائج ان عفن *C. tuberculata* متحمل للتراكيز الملحية العالية فيما انخفض نموه مع انخفاض هذه التراكيز.

التوصيات

1. اجراء دراسات موسعة حول التشخيص الجيني للفطريات المختلفة و المعزولة من محاصيل الحبوب المختلفة باستخدام الانواع المختلفة من اختبارات (PCR) اذ تعد طرق تشخيصية تاكيدية للعزلات ذات الفوعة والامراضية والمنتجة للانزيمات والمواد الايضية السامة .
2. زيادة الوعي العام خاصة لدى المزارعين ودوائر الدولة ذات العلاقة بمحاصيل الحبوب حول كيفية الوقاية من الاصابة بالفطريات ومن ثم خفض معدلات الخسائر الاقتصادية لهذه المحاصيل.

المصادر:

1. Motlagh , M.R.S.(2011). Evalluation of *C.tuberculata* as an biological control agent in major weeds of rice . Padd . Life . Sci. J. 8(2): 1.
2. FAO .(2006). World wheat market at aglance food out look.N(1).
3. Mishra,A.K.; Mishra ، A. ; Kehri H.K. Sharma، B. and Pandey ، A.K. (2009) . Inhibitory activity of Indian species plant *Cinnamomum zeylanicum* extracts against *Alternaria solani* and *Curvularia lunata* ، the pathogenic dematiaceous moulds .Ann. Clin . Micro . Ant. 8:9.

4— Collee ،J.C.; Fraser، A.G. ; Marmion ، B.P. and Simmon ، A.S.(1996). Practical medical microbiology . 14 th — ed. Churchil Living Stone . New York.

5— Sreensivasa، Y. ; Dass، R. ; Raj ،A.P.C. and Janardhana ، A.(2011). Myccological evalution of maiz grains produced in Karnataka India for post harvest fungal contamination .Wor. Appl.Sci. J.13 (4) : 688 —692.

6 —Navi،S.S. ; Bandyopadhyay ، R.; Hah ، A.J. and Brameleex ، P.J. (1999). Information on bulletin international crops research institute for the semi — arid tropics patanchera ،Andrapradesh ، India. Natural resources institute .Central. Avenne. Chathmmaritime. Kentmenutb،UK.

7— Schoch ، C.; Crous ، D.W. ; Groeuewald ، Burgess ، T.I. ; Degruyter ، J.; Dehoog ، G; Dixon ، L. ; Grub، M. and Gueidan ، C.(2009). Aclass wide phylogenetic assessment of dothideomycetece .Stud Mycol. 64:1—40.

8— Horikoshi ،K. and Akiba ، T.(1982). In alkaphilic microorganism . Anew microbial world ،Tokyo . Japan . Sci. Press. Springer .pp:75 — 77.

9ـــ شعبان ،نعواد والملاح ، نزار مصطفى (2012) المبيدات ، دار الكتب للطباعة والنشر،جامعة الموصل

10 — Kreuzinger ، N. ; Podeu ،R. Gruber ،F.; Gobl ، F. and (1996). Identification of some ectomycorrhizal basidiomycetes by PCR amplification of their gpd (Glyceraldehyde — 3— phosphate dehydrogenase) .Gene . J. Micro . 96: 3432 — 3438.

11— Sirover ، M.A.(1999). New in sights into on old protein : The functional diversity of mammalian glycerldehyde —3— phosphate dehydrogenase .Biochem. Biophys. Acta . 1432: 159— 184.

12— Tarze ، A.; Deniad ، A. ; Lebras، M.; Mailier ، E.; Molle ، D.; Larochette ، N.; Zamzami ، N.; Jan ، G.; Kroemer، G. and Brenner ،C.(2007). GAPDH anovel regulator of the proapoptotic mitochondrial membrane permeabilization on cogene 26: 2606 — 2620.

13— Gong، L.; Su ،Y.; Huang ، L.; Lin ، D.; Tang ، K. and Zhou ، X.(2009). Cloning and analysis of glyceraldehydes — 3— phosphate dehydrogenase gene from *Cordyceps militaris* .African. J. Agric. Resea. 4(4): 402 — 408.

14— Jeony ، M.J.; Park ، S.C.; Kwon ، H.B.; Byan ، M.O. (2000). Isolation and characterization of the gene encoding glyceraldehyde — 3— phosphate dehydrogenase . Bioche . Biophys. Res. Commun . 278: 192 — 196.

15— Xu ، S.; Chen ، J.; Liu L.; Wang ،X. ; Hung ، ،X. and Zhai Y.(2007). Proteomics associated with virulence differentiation of *Curvularia lunata*in maiz in China .J. Int. Plant. Bio. 49(4) : 487—496.

16— Roy ، A.K. and Baruah ،P.K. (1972). New records of fungi causing discolouration of rice grains .Sci. Cult. 38: 405 —406.

17 ـ مطوق ،زهراء يوسف خضير(2005) تاثير بعض الفطريات في معايير الدم الفسلجية والتغيرات النسيجية المرضية للجرذ الابيض ودور المبيد الحيوي الفلوراميل في حماية حاصل الرز من الاصابة بها ،اطروحة ماجستير ،كلية العلوم ،جامعة الكوفة .

18— Busi ، S.;Yaseen ، S.I. and Jaraid ، A.(2011). Seed — borne mycoflora of stored rice grains and its chemical control .J. Ani. Plant . Sci. 21(2): 193 — 196.

19— Moubasher ، A.H.; Fattah، H.M.M. and Swelim ،M.A.(1980). Studies on aire — borne fungi at Qena .Mycol. Lab.Bot.Department faculty of science،Assiut University ،Assiut ،Egypt.

20– Saravanakumar ،K. and Kaviyarasan ، S .(2010). Seasonal distribution of soil fungi and chemical properties of montane wet temperate forest types of Tamil Nadu. Africa. J. Plant. Dis. 4(6). 190 — 196.

21— Stars ، A.; South ، J. and Smith ، N.(1993). Influence of maltings microflora on melt quality proceedings of the European brewery convention congress.Oxford .UK. P. 103 — 110.

22— Agarwall S.C. (2010). Studies on variation in the fungal population of Indian alkaline soils.Degree of Doctor.University of Lucknow ،Lucknow، India.

23. السعد، مها رؤوف(1991)النمو في علم الاحياء المجهرية ،لجنة من تدريسي قسم علوم الحياة ،جامعة بغداد

24. Redman ، R.S.; Sheehan ، K.B.; Stout ، R.G.; Rodrignez , R.J. and Henson ، J.M. (2002) . Thermo tolerance conferred to plant host and fungal endophyte during mutalistic .Symbiosil .Sci. 1581.

The genetic characterization of *Curvularia tuberculata* fungus isolates isolated from rice crop grains in Al–Diwania city

Ebtesam thamer jeaz **Majed kadem abod**

University AL -Qadisiya/Education College/Biology Deparetment

Receved : 4\2\2013 **Accepted : 14\4\2013**

E.Mail : Ebtesam @yahoo.Com
E.Mail: Ardkdhm @ yahoo.Com

Abstract

This study characterization of some types of *Curvularia* spp . isolated frome rice seeds in AL Diwaniya city by morphological ،microscopical and genetical characterization of these isolates. The results by morphological and microscopical characteristics showed one type of *Curvularia* spp. Is *C. tuberculata* with(9) isolates، with(1) isolate frome treated rice grains with percentage 0.3% ، while (8) isolates frome untreated rice grains with percentage 1.3% . The results multiplex PCR showed *gpd* gene in DNA of isolates investigated of *C.tuberculata* fungus .PH test showed higher growth rate of *C. tuberculata* fungus with (7.7) mm in ph (7) followed by (6.8) mm in ph (6) , (5.7) mm in ph (5 ، 8) while decrease reach to (4.2) mm in ph (10) ،(3.9، 3.1) mm in ph (3 ، 6) (the higher growth rate of fungus with neutral ecosyst) .

The higher growth rate of fungus with 20 gm / L concentration of Nacl salt reach to (8.5) mm while decrease reach to (6.4 ، 5.2 ، 4.5) mm with (5 ، 10 ، 15) gm / L concentrations (the fungus tolerant to high concentrations of Nacl salt) .

Key Words : Gene .*Curvularia.*Oryza.

***The Research is apart of on Ph.D. dissertation in the case of the second researcher.**