التشخيص الجزيئي للفطر المحاري *Pleurotus ostreatus* *والتحري* عن جين المقاومة للفطريات الممرضة للنبات Osterolysin

أ.م.د عبدالامير سمير سعدون **سولاف حامد تيموز**

كلية العلوم / جامعة القادسية

sulaffungi@yahoo.com

الخلاصة :

نفذت التجربة في مختبر وحدة ابحاث البيئة والوقاية من التلوث كلية العلوم / جامعة القادسية اذ تم زراعة سبورات الفطر المحاري *Pleurotus ostreatus*) على وسط PDA ذو pH٨ ، اختبرت كفاءة الفطر المحاري في تثبيط فطريات التربة من خلال استخدام الراشح الانزيمي للفطر بعد تحضيره واستخدمت التراكيز للراشح (١٠٠،٥٠،٢٥) % واظهرت النتائج تثبيطها للفطريات الممرضة للنبات (*Aspergillus niger*، *Aspergillus flavus* ، *Fusarium solani*، *Stymphillum sp.* ، *Penicillium sp.* واستخدمت تقنيه تفاعل السلسلة المتبلمرPCR ولـ ١٥ عينه من الفطر المحاري وبعد تكثير اللقاح الفطري على وسط الـ PDA ومن ثم اخذت خيوط منه وتم زراعتها على وسط نقيع المخ والدماغ BHI وذلك لتسهيل الحصول على الـ DNA ، اذ اظهرت النتائج ان الفطر المحاري ينمو بصورة جيدة على وسط البطاطا ديكستروز اكار خلال المدة ٤-٧ ايام على درجة حراره ٣٠ م° وعند اطالة فترة الحضن الى ١٠ ايام لوحظ ظهور براعم كبداية للاجسام الثمرية . لوحظ من خلال التطبيق لتقنيه البلمره والمضاعفة للـ DNA احتواء جميع العينات احتواء جميع العزلات على حزمة واحدة ومفردة للـ DNA المستخلص وكانت النتائج موجبه لجميع العينات التي رحلت على هلام الاكاروز وان حزم الـ DNA كانت موجودة في العينات وان لم تكن واضحه بقدرها الكافي ، اما في حالة التضخيم لجينات الفطر للتحري عن الجين المسؤول عن مقاومة الفطر المحاري للفطريات الممرضه للنبات حيث بلغ حجم ناتج التضخيم للحامض النووي المضاعف مع bp ٣٠٣ واحتواء جميع العينات على جين Osterolysin المسؤول عن صفة المقاومة في الفطر المحاري وصفات اخرى كتحطيم الكولسيترول في الدم .

البحث مستل من اطروحة دكتوراه

المقدمة : يعد الفطر المحاري *Pleurotus ostreatus* من الفطريات البازيدية الزراعية المهمة والتي يحتوي جسمها الثمري نسبة عالية من المواد كالبروتينات والكاربوهيدرات ولاتحتوي على الدهون وان احتوت فهي غير مشبعة وبنسب ضئيلة جدا كذلك تحتوي على الاملاح والفيتامينات وغيرها من العناصر الغذائية (Manolea واخرون ، ٢٠٠٦) اذ ذكرت المصادر اهميته في مجالات عديدة كالاقتصادية والطبية باختلاف انواعة والوانه واماكن زراعته فتتراوح مدى كفائتة بأختلاف نوع المدعمات التي تضاف الى الاوساط الزرعية كالخميرة والدبس ونخالة الحنطة وبعض انواع المستخلصات كعرق السوس والتي تساعد على تركز بعض المواد الكيميائية الطبية في الجسم الثمري للفطر المحاري مثل مادة السستاتين والكاليك والبيتاكلوكان .(سعد واخرون ،٢٠١٣ . عبدالهادي ، ٢٠١٠) ، كذلك ان العديد من الدراسات والبحوث اكدت اهميه ذلك الفطر في تثبيط العديد من الفطريات الممرضه والبكتريا وحتى الفايروسات وبينت دوره في تحليل السموم الفطريه مثل السموم التي يفرزها الفطر *Aspergillus fumigatus* وكذلك دوره في تحليل الخثرة الدمويه وتخفيض نسبة الكوليسترول في اجسام الحيوانات.(ابراهيم واخرون ، ٢٠٠٥) ونظرا لاختلاف انواعة وسلالاته بأختلاف مناطق الزراعة وظروفها المناخيه من رطوبة وحراره واختلاف االشركات المستوردة للفطر ولغرض التأكد من كون الفطر المحاري من السلالة البيضاء التي لها اهمية طبية هدفت الدراسة الى :

١. تشخيص الفطر جزيئيا من خلال زراعة سباونات spawn الفطر على الوسط الغذائي ثم استخدام تفاعل البلمره المتسلسل PCR لتضخيم مادة الـ DNA في العزلات المنتخبه
٢. التحري عن جين Ostereolysin المسؤول اعطاء صفة المقاومة للفطر المحاري

المواد وطرائق العمل :

١: زراعة الفطر المحاري على وسط الـ PDA

تم تحضير الاوساط الزرعيه كوسط PDA وتعقيمها بالمؤصدة على درجة حراره ١٢١ مْ وتحت ضغط ١ جو ، وترك الوسط ليبرد ثم صب بالاطباق بعد اضافه قطرات من NaOH وذلك لزيادة قاعدية التي تساعدالفطر من النمو بشكل جيد في الاوساط القاعديه وبعدها تركت الاوساط لتتصلب ومن ثم زرعت السباونات spawn (سبورات الفطر) المحمله على بذور الحنطة في تلك الاطباق ، ثم حضنت هذه الاوساط في الحاضنه تحت درجة حراره ٢٥ مْ لمدة من ٧ – ١٠ ايام وبعد اكتمال نمو الاطباق تم التأكد من الفطر بواسطة الفحص المجهري للخيوط الفطرية و نوع السبورات.

٢: اختبار الراشح الانزيمي للاجسام الثمريه في تثبيط فطريات التربه المرضية:

حضرت تراكيز الراشح الانزيمي (٢٥ ،٥٠، ١٠٠)% بأستعمال لتر من وسط مستخلص البطاطا السائل المعقم والذي وزع على ٥ دوارق لكل دورق ٢٠٠مل ولقح بأقراص قطرها ٠.٥ سم بثاقب فليني من مزرعة الفطر المحاري بعمر ٧ ايام . حضنت الدوارق على درجة حراره ٢٥ مْ ولمدة اسبوعين بعدها تم التشريح بأستخدام ورقة الترشيح (Whatman (No.١ بقمع بوخنر وبمساعدة جهاز تفريغ الهواء واعيد الترشيح بأستخدام المرشح الدقيق . ٠.٢٢μ وحضرت وذلك عن طريق التخفيف بالماء المقطر، اذ اضيفت تراكيز الراشح الانزيمي الى الوسط الزرعي الصلب PDA ولكل تركيز ثلاث مكررات وحركت الاطباق حركة رحوية لضمان توزيع الراشح ثم زرعت الاطباق بالفطريات الممرضه بزراعة الفطر اقراص الفطريات في منتصف الاطباق .

٣: البادئات Primers

تم استخدام نوعين من البادئات في هذه الدراسة, النوع الاول صممت من قبل (James واخرون :٢٠٠٤) على اساس جين المقاومة Oly–toxin الذي يستخدم في التحري عن الفطر *Pleurotus ostreatus* والنوع الثاني من البادئات صمم من قبل (James واخرون :٢٠٠٤)

Primer		Sequence	Product size	Accession NO.
ITS١	F	TCGTCAGACTTGGTTTGCTG	٢٣٦bp	AY٥٤٠٣٣٢.١
	R	GGTGCGTTCAAAGATTCGAT		
Oly	F	TCGGATCTCAAGACGTGAAG	٣٠٣bp	KC٠١٢٧١١.١
	R	CGATCATCCACTTGGTGTTG		

تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة PCR master mix :

تم تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمره باستخدام عدة الـ AccuPower® PCR PreMix المجهزه من قبل شركة الـ Bioneer الكورية وحسب تعليمات الشركة حيث تم تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمره في انابيب الـ PCR المجهزه مع العده والحاويه على مكونات تفاعل سلسلة البلمره وضيفت المكونات الاخرى لمزيج تفاعل وحسب تعليمات الشركة كما في ادناه:

PCR master mix		Volume
DNA template		٥μL
Primers	F. primer	١.٥μL
	R. primer	١.٥٥μL
PCR water		١٢μL
Total		٢٠μL

تشخيص الفطر بطريقة تفاعل السلسلة المتبلمر(PCR)

أ- استخلاص الحامض النووي الفطري fungal genomic DNA extraction

تم استخلاص الحامض النووي DNA للفطر المحاري باستعمال عدة خاصة لهذا الغرض هي عدة البايونيرBioneer Kit وباتباع الخطوات التالية (حسب تعليمات الشركة المصنعة):-

١- تم تنشيط عزلات الفطر المختبرة على الاوساط الزرعية السائله PDB واختيرت ١٥ عزله للفطر المحاري التي جلبت من اماكن مختلفه .

٢- جمعت الخيوط الفطرية والسبورات بوزن ١٠٠-٥٠٠ ملغم في انبوبة اختبار دقيقة وعوملت بالنتروجين السائل وسحقت بوساطة مطرقة خاصة.

٣- اضيف ١٨٠ مايكروليتر من Universal Digestion Buffer و٢٠ مايكروليتر من Proteinase K الى كل انبوبة ومزجت باستخدام المازج وحضنت بدرجة حرارة ٥٦م لمدة ٣٠-٦٠ دقيقة.

٤- اضيف للانابيب ١٠٠ مايكروليتر من Universal Buffer PF ومزج بالتقليب وحضنت بدرجة حرارة ٢٠ تحت الصفر لمدة ٥ دقائق.

٥- نبذ المزيج بسرعة ١٢٠٠٠ دورة/دقيقة بدرجة حرارة الغرفة ونقل الطافي الى انبوبة جديدة سعة ١.٥ مل.

٦- اضيف للمزيج ٢٠٠ مايكروليترUniversal Buffer BD ومزج بالمازج.

٧- اضيف ٢٠٠ مايكروليتر من الكحول المطلق ومزج بالمازج.

٨- نقل المزيج من الخطوة ٧ الى EZ-١٠ tube ونبذ بسرعة ١٢٠٠٠ دورة/دقيقة ثم تم التخلص من المزيج ونقل انبوب الترشيح الحاوي على الحامض النووي الى انبوبة اختبار أخرى.

٩- اضيف ٥٠٠ مايكروليتر من Universal PW Solution الى الانبوبة ونبذت بسرعة ١٢٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة دقيقة واحدة ونقل انبوب الترشيح الى انبوبة جمع جديدة.

١٠- اضيف ٥٠٠ مايكروليتر من Universal Wash Solution الى الانبوبة الجديدة ونبذ بسرعة ١٢٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة دقيقة واحدة ونقل انبوب الترشيح الى انبوبة جمع جديدة ونبذت مرة اخرى السرعة نفسها لمدة دقيقتين لتجفيف غشاء الـ EZ-١٠ Tube ونقل الاخير الى انبوبة جديدة سعة ١.٥ مل.

١١- اضيف ٥٠-١٠٠ مايكروليتر من TE Buffer مباشرة الى مركز غشاء الـEZ-١٠ Tube وحضن بدرجة حرارة الغرفة لمدة دقيقة واحدة بعدها نبذ بسرعة ١٢٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة دقيقة لتركيز الحامض النووي.

١٢- استخدم جهاز النانودروب Nanodrop :وهو عباره عن جهاز يستخدم لتشخيص كميه DNA في الانابيب المختبريه وذلك بوضع كمية قليله من كل عزله في الجهاز ومن ثم تقرأ الشاشه الالكترونيه التي تبين كميه الدنا الموجود في كل عزله .وحسب الجدول (١) :

جدول(١) كمية الـ ng/L DNA في عزلات الفطر المحاري مقاسة بجهاز النانودروب

العينه	الكميه ng/L
١	٣٩.٩
٢	٣٧.٧
٣	٢٢.٣
٤	٤١.٠
٥	٤٤.٢
٦	٢٢.٦
٧	٢٣.٧
٨	٢٤.٩
٩	٢٨.٤
١٠	٦٩.٠
١١	٢٨.٠
١٢	٣٦.٧
١٣	٣٢.٠
١٤	٢٤.٢
١٥	١٥.٢

ب- مضاعفة الحامض النووي المستخلص Amplification DNA

تم تحضير AccuPower ® TLA PCR PreMix tube الخاص بتفاعل الـ PCR باضافة ٥µl من الحامض النووي المستخلص و(٢µl forward and ٢µ reverse) ٤µl الى كل AccuPower® TLA PCR PreMix tube وتم اكمال الحجم الى ٢٠µl باضافة الماء المقطر ثم مزجت المكونات جيدا باستعمال المازج Vortex . وكما في الجدول (٢)

جدول (٢) الدورات الحراريه المستخدمه في ظروف تفاعل السلسله المتبلمر

البادءات	الظروف المستخدمة في جهاز الدورات الحرارية				
	المسخ الأولي (دورة واحدة)	(دورة)٣٠			الاستطالة النهائية (دورة واحدة)
		المسخ	التثبيت	الاستطالة	
ITS	مْ٩٤ /٣ دقيقة	٩٥ مْ/٣٠ ثانية	٥٧ مْ /١.٥ دقيقة	٧٢مْ/١دقيقة	٧٢ مْ /٨ دقيقة
AA	مْ٩٥/٢ دقيقة	٩٥ مْ/٣٠ ثانية	مْ٥٧ / ٣٠ ثانية	مْ ٧٢ /٤٠ ثانية	٧٢ مْ /٥ دقيقة
PDMT المصمم	مْ٩٥/٢ دقيقة	٩٥ مْ/٣٠ ثانية	مْ٥٧ / ٣٠ ثانية	مْ ٧٢ /٤٠ ثانية	٧٢ مْ /٥ دقيقة

ج- الترحيل الكهربائي الهلام Gel electrophoresis:

تم اجراء الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكروز بنسبة ١.٥% وذلك قراءة نتيجة تفاعل سلسلة البلمره PCR product analysis وحسب طريقة Townsend وجماعتة (٢٠٠١) كما يأتي:

١- تم اذابة ١.٥ جم مت هلام الاكروز Agarose gel في ١٠٠ مل من محلول الـ TBE buffer الدارئ بتركيز 1X وباستخدام الصفيحة الحرارية الهزازة الممغنطة Magnetic hot plate stirrer لمدة ١٥ دقيقة.

٢- ترك الهلام ليبرد بدرجة حرارة ٥٠م وبعدها تم إضافة صبغة الحامض النووي المشعة Ethidium bromide ومزجت جيدا مع الهلام.

٣- تم صب هلام الاكروز في قالب الترحيل Tray الحاوي على المشط Comb لتحديد اماكن عينات البي سي ار, وبعدها ترك الهلام ليتصلب في درجة حرارة الغرفة لمدة ١٥ دقيقة ومن ثم ازيل المشط من الهلام بعناية.

٤- تم عملية تحميل العينات باستخدام صبغة التحميل Loading dye على ورق البارافلم Parafilm paper وذلك باضافة ١حجم من صبغة التحميل لكل اربعة حجوم من ناتج البي سي ار PCR product ووضعت في حفر الهلام.

٥- تم استخدام سلم القياس DNA ladder ١٠٠ لقياس ناتج البي سي ار الذي يتكون من (٢٤٣bp) ووضع في الحفره الاولى.

٦- بعد اكتمال عملية التحميل تم جمر هلام الاكروز باستخدام محلول TBE Buffer الدارئ بتركيز 1X وغلق غطاء الترحيل وبعدها تم تشغيل جهاز الترحيل باستخدام تيار ١٠٠فولت وامبير ٨٠ لمدة ساعة واحده.

٧- بعد انتهاء عملية الترحيل تم فحص الهلام الحاوي على ناتج البي سي ار باستخدام مصدر الاشعة فوق البنفسجية U.V light source لتحديد ناتج مع وحدة القياس.

النتائج والمناقشة :

١: زراعة الفطر المحاري على وسط الـ PDA

من الملاحظ انه عند زراعة الفطر المحاري على وسط الـPDA ينمو بشكل جيد وبوقت قصير يصل من (٤-٧) ايام اذ يكتمل نمو الفطر نلاحظ تكون الغزل الفطري الكثيف في الاطباق بمجرد اكتمال النمو وذلك لان وسط البطاطا ديكستروز اكار يوفر بيئه غذائيه مناسبة لنمو الفطر من عناصر الكاربون والهيدروجين بالاضافه الى ان الماده السكريه الموجوده في الوسط تساعد على تسريع النمو وكثافة الغزل الفطري كما لوحظ انه عند زياده مده الحضن تتكون رؤوس الاجسام الثمرية وهذا يتفق مع ماجاء به (جبر واخرون ، ٢٠٠٨) و(عبدالهادي ٢٠١٢:) اللذان فسرا سرعة نمو الفطر في الاوساط الحاويه على ماده كاربوهيدراتيه سكريه .

٢:اختبار كفاءة الراشح الانزيمي على معدل اقطار النمو الشعاعي للفطريات الممرضية للنبات

يتضح من الجدول (٣) كفاءة استخدام التراكيز (١٠٠،٥٠،٢٥)% من الراشح الانزيمي للفطر المحاري على بعض فطريات التربة المرضية المنتخبة المتواجدة في التربة والتي تسبب عدة امراض للنباتات ، اذ سجلت المعاملة بتركيز ٢٥% راشح انزيمي فروقات معنويه بين معاملة السيطره للفطريات والتي كان قطر النمو الشعاعي فيها ٩ سم الفطر *Aspergillus niger* : ١.٤٧سم و *Fusarium solani* : ٢.٩٣ سم وكانت النتائج للفطر *Stymphyllium sp.*: ٠.٠٠ سم بعدم وجود اي نمو فطري شعاعي للفطر ، اما الفطر *Aspergillus flavus*: ٦.٨٤ سم وقد كان من الفطريات المقاومة للراشح الانزيمي لكن رغم ذلك لوحظ ان هناك تثبيط في الاطباق اما في حالة الفطر *Pencillium sp.:* ٣.٤٢سم فلوحظ ان هناك تثبيط في الاطباق . اما في حالة استخدام تركيز ٥٠% فلوحظ ان هناك فروقا معنوية بين الفطريات في عملية التثبيط للفطر وتأثيرها على النمو الشعاعي اذ كانت عملية التثبيط كالتالي الفطر *Aspergillus niger* : ٠.٠٠ سم والفطر *Fusarium solani* : ٢.٩٣ سم اما في حالة الفطر *Stymphyllium sp.*: ٠.٠٠ سم والفطر *Aspergillus flavus*: ٦.٨٢ سم والفطر *Pencillium sp.*: ٢.٠٥ سم اما عند استعمال تركيز الراشح الانزيمي ١٠٠% فنلاحظ وجود فروقات معنوية بين الفطريات اذ كان الفطر *Aspergillus niger* : ٠.٠٠ سم اي عدم وجود اي نمو في الاطباق ، اما في الفطر *Fusarium solani* : ١.٩٥ سم والفطر *Stymphyllium sp.*: ٠.٠٠ سم اما الفطر *Aspergillus flavus*: ٤.٨٨ سم المفرز للسموم ايضاً اظهر مقاومة ولو قليله الا انه نوعاً ماثبط بالتركيز المستعمل والفطر *Penicillium sp.:* ١.٩٥سم . وجميع تلك النتائج التي سجلت ضمن التجربة تتفق مع ماوجده (Stamets:١٩٩٣ ، Koch & Buchalo :٢٠٠٢) التي تؤكد على ان الراشح الانزيمي للفطر المحاري يحتوي على مركبات فعالة ومستخلصات انزيمية لها الدور الفعال الذي من الممكن ان يحدث التأثير الوظيفي على الغزول الفطرية للفطريات المرضية وهذا مايعطيه الاهمية الطبية ، ايضا ممكن تفسير تلك النتائج في ضوء ماجاء به (Wood وجماعته :٢٠٠٠ ، Stamets :٢٠٠١ ، Chase وجماعته :٢٠٠٣) في كون الفطر المحاري يتميز بأحتوائه على مواد مضاده للميكروبات والفطريات.

جدول (٣): تأثير التراكيز المختلفة من الراشح الإنزيمي للفطر المحاري على معدل النمو الشعاعي للفطريات المرضية.

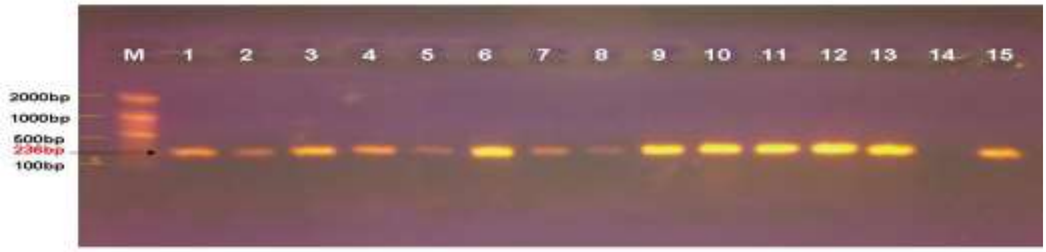
الفطر الممرض	معدل النمو الشعاعي للفطريات (سم)			
	تراكيز الراشح الإنزيمي%			
	%٠.٠٠ Con.	%٢٥	%٥٠	%١٠٠
Aspergillus niger	٩	١.٤٧	٠.٠٠	٠.٠٠
Fusarium solani	٩	٢.٩٣	٢.٩٣	١.٩٥
Stymphllium sp.	٩	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠
Aspergillus flavus	٩	٦.٨٤	٦.٨٤	٤.٨٨
Penicillium sp.	٩	٣.٤٢	٢.٠٥	١.٩٥
LSD ٠.٠٥	٢.٢٩	٠.١٢	٠.١١	٠.٠٨

*كل رقم يمثل معدل ثلاثات مكررات

٣: التشخيص باستخدام تفاعل السلسلة المتبلمر Diagnosis by PCR

أظهرت نتائج استخلاص الـ DNA لعزلات الفطر ***Pleurotus ostreatus*** بأستعمال العدة المستعملة لهذا الغرض وترحيله كهربائياً في هلام الأكاروز(١.٥ %) والكشف عنه بأستعمال صبغة الأثيديوم برومايد وفحصه تحت الأشعة فوق البنفسجية (Ultra violate (UV احتواء جميع العزلات على حزمة واحدة ومفردة للـ DNAالمستخلص فقد كانت النتائج موجبه لجميع العينات التي رحلت على هلام الاكاروز وان حزم الـ DNA كانت موجودة في العينات وان لم تكن واضحه بقدرها الكافي ، وكما مبين في الشكل (١) .تم تشخيص الفطر ***Pleurotus ostreatus*** بوساطة الطرائق الروتينية والمتمثلة باستخدام المفاتيح التصنيفية كما مبين سابقا وتم اختيار ١٥عينه من الفطر المحاري والتي كانت من اماكن مختلفه وللصعوبات التي يواجهها الباحثون في تشخيص بعض الفطريات المستخدمه كغذاء وخصوصا الفطريات البازيديه والتي تحتاج الى خبره لمعرفه ماهو سام منها وماهو صالح للاكل والتي تحتاج الى اوساط خاصة لتنميتها والتي تحوي ماده السيليلوز واللكنين أي من الصعب تنميتها على الاوساط الزرعية الصناعية لذلك يمكن تشخيصها بالاعتماد على الحامض النووي بتقنية الـ PCR.

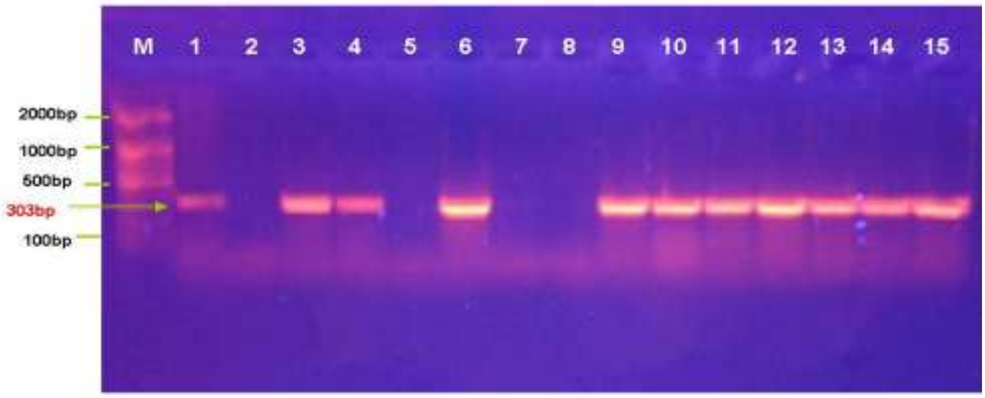
اذ تم في هذه الدراسة استخدام بادئات ITS١ (Internal Transcripted Spacer region) في الفطر ***Pleurotus ostreatus*** حيث بلغ حجم ناتج التضخيم لهذه المنطقة هو٢٠٠٠bp كما موضح في الشكل (١) وهذه النتيجة تتفق مع (James واخرون :٢٠٠٤)،(Moue واخرون :٢٠٠٢)



الشكل (١) : نواتج استخلاص الـ DNA بالترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز (١.٥%) وفولتية (١٠٠) ولمدة ساعة لعزلات الفطر *Pleurotus ostreatus* باستعمال العدة الجاهزة Genomic DNA Mini Kit .
حيث أن M = (١٠٠-٢٠٠٠bp) DNA Ladder , SA = *Pleurotus ostreatus* , base pair = bp زوج قاعدي . (ITS١ gene PCR of of *Pleurotus ostreatus*)

٤: التحري عن جين المقاومه في الفطر المحاري :

للتحري عن جين المقاومة في الفطر المحاري استخدم البادئ AA حيث بلغ حجم ناتج التضخيم للحامض النووي المضاعف مع bp ٣٠٣ كما مبينة في الشكل (٢) ، فقد تم تصميم بادئ PDMT لهذا الفطر لعدم توفر البادئات اللازمة للاعتماد عليها في التشخيص اذ بلغ حجم ناتج التضخيم bp ٢٠٠٠ كما مبينة في الشكل (٢) حسب برنامج التصميم (Primer٣ Plus). اذ من الملاحظ انها اظهرت نتيجه موجبة للعزلات (١ ،٣ ، ٤، ٦، ٩، ١٠، ١١، ١٢، ١٣، ١٤ ، ١٥) دلالة على تواجد الجين Osterolysin الخاص بمقاومة الفطر والذي يمنح الفطر المحاري صفة مقاومته للفطريات الممرضه وبعض الكائنات المجهريه . وكانت النتيجة سالبه للعزلات (٢ ، ٥ ، ٧، ٨) اي لم يظهر فيها تعبير لجين المقاومه وقد يعلل ذلك الى ان خيوط الـ DNA قد كانت ضعيفه ولم تكن بالقدر الكافي لبيان جين المقاومه ووضوحه تحت الاشعة فوق البنفسجيه . وهذه النتيجة تتفق مع(Paterson واخرون:٢٠٠٦) ،(Marek واخرون :٢٠٠٣).



الشكل (٢) : نواتج تضخيم الجين Oly- gene of *Pleurotus ostreatus* للفطر *Pleurotus ostreatus* والمرحلة كهربائياً على هلام الأكاروز (١.٥٪) وفولتية (١٠٠) ولمدة ساعة بأستعمال تقنية الـ PCR . حيث أن M = (bp ٢٠٠٠-١٠٠) DNA Ladder marker , SA = *Pleurotus ostreatus* , جميع العزلات أظهرت نتيجة موجبة لجين Oly-gene المسؤول عن المقاومة في الفطر ..

المصادر :

- ابراهيم ، ضياء خليل و سنبل جاسم حمودي ومحمد احمد شويل المشهداني (٢٠٠٦). تأثير اضافة الفطر المحاري *Pleurotus ostreatus* الى عليقه ذكور فروج اللحم في بعض الصفات والفسلجية والانتاجيه. قسم الثروة الحيوانيه– كلية الزراعة– جامعة بغداد.. البحث مستل من رسالة ماجستير.. مجلة العلوم الزراعية العراقية ١٩(٣) : ص ٢٠– ٢٩ .

- جبر كامل سلمان ، مصطفى رشيد القيسي ومحمد قاسم الجبوري (٢٠٠٨). كفاءة كسبة فول الصويا وكلوريد الكالسيوم في الانتاجيه والقابلية الخزنيه للفطر الزراعي الابيض . البحث مستل من رسالة ماجستير .قسم وقاية النبات – كلية الزراعة – جامعة بغداد مجلة العلوم الزراعية العراقية ٣٩(١):٣٦-٤٦ .

- سعد، سماح ونضال صوفان وفواز الحاجي عبود (٢٠١٣). تأثير اضافة خميرة الخبز لنوعين من وسط الزراعة في الانتاج وتركيز بعض المركبات الكيميائية للفطر المحاري مجلة العلوم الزراعية العراقية – ٤٤(٣):٣٩٧ –٤٠٣ .

- عبدالهادي ،عبد الاله مخلف (٢٠١٢).استخدام دبس التمر في تحسين الانتاج والقابلية الخزنيه والاهميه الطبية للفطر المحاري .مجلة العلوم الزراعية العراقية.٤٣(١):٧٦–٨٧.

- عبدالهادي ،عبدالاله مخلف وخالد ابراهيم مصطاف (٢٠١٠).تأثير وسط الحلفا ونوع المدعم على الكفاءة الحيوية والقابلية الخزنية للفطر المحاري *Pleurotus ostreatus* مستل من رسالة ماجستير .مجلة ديالى للعلوم الزراعية .٢(١):٢٠٨–٢٣٥.

- Chase.Ch.,M.Garner,D.Graves,H.S. Oliff , R.N.(٢٠٠٣).Schulman and D. Webb.Major Review of health Benefits of Medicinal Mushrooms.Mushrooms Medicinal .www.herbal gram.org.
- James, Timothy Y.,* Shian-Ren Liou,١ and Rytas Vilgalys (٢٠٠٤) .The genetic structure and diversity of the A and B mating-type genes from the tropical oyster mushroom, *Pleurotus djamor*. Fungal Genetics and Biology ٤١:٨١٣–٨٢٥.
- Koch ,J.S.Witt and U.Lindequist.(٢٠٠٢).The Influence of selected Higher Basidiomyceteson the binding of Lipopolysaccharide to CD$^{١٤+}$ cells and on Release of Cytokines. International Journalof medicinal Mushrooms , ٣:٩٤–١٠١.
- Manolea, G., M. Popescu, C. Nedelcut and L. Alboteanu.(٢٠٠٦). The numerical simulation of the culture medium for the *Pleurotus* geneus mushrooms, Ann.Uni.Cariova, Elect.Engin.Seri. ٣٠:٣١٨–٣٢٥.

- Moue,. Manabu. ٢, Yoichi Honda*٢,Takashi Watanane* ٢ and Masaak'I K. Uwahara*٢.(٢٠٠٢).Genetic Transformation of white Rot Fungus *Pleurotus ostreatus* to Carboxin Resistance using Electroporation*I. Wood Research No. ٨٩ (٢٠٠٢).
- Marek R, Thiranavakarasu A.,Venkitanarayan k. (٢٠٠٣) . Detection of *Penicillium expansum* by polymerase chain reaction .Int. J. Food Microbiol . ٨٩:١٣٩-٤٤.
- Paterson., R.Russel M.(٢٠٠٦) .Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR .Process Biotechemistry .٤١:١٤٦٧-١٤٧٤.
- Stamets, P., (٢٠٠١).Novel Antimicrobials from mushrooms .TurkeyTail on Yunzhi.www.fungi.com/ mycomed.html.
- Stamets, P. (١٩٩٣) .Growing gourmet and medicinal mushrooms Berkeley , Califonia.pp.٥٥٤
- Wood, W.F., G.R. Farquar and D.L. Largent.٢٠٠٠. Different Volatile compounds from mycelium and sporocarp of *Pleurotus ostreatus*. Biochemical Systematics and Ecology, ٢٨: ٨٩-٩٠.

Molecular Diagnosis of oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* and screening for resistance gene of plant pathogenic fungi Osterolysin

A. M. Dr. Samir Abdul Amir Saadoun Sulaf Hamid Timosz
College of Science / University of Qadisiyah

Summary:

The experiment in the laboratory of research in the College of Veterinary Medicine /AL- Qadisiya University of identify the innate agricultural White (mushroom oyster *Pleurotus ostreatus*) in terms of molecular using the technique of the interaction of the chain monomer PCR, which was obtained Sporadtha from different places, it has included the results of multiplying the vaccine is innate to the center of the PDA it then took him filaments were grown on the center of the brain and brain infusion BHI so as to facilitate access to the DNA. The results showed that as the oyster mushrooms grow well on the center of the potato dextrose Acar during the period ٤-٧ days at a temperature of ٣٠ M ₀and prolong the period when cuddling to ١٠ days for the appearance of buds was observed as the beginning of fruiting bodies. Then move disks from spinning mildew fungus shellfish to the center of infusion brain and the brain fluid of ١٥ samples for the purpose of preparing for the diagnosis. Observed through the application of the technique polymerization and doubling of DNA and then note the quantity of samples in Nanodrop contain all the samples

contain all isolates on a single package and single of DNA extracted was the results were positive for all the samples left on the gel Alakaros but there is a lack of clarity of some of the samples, but the packages of DNA were present in the samples that were not clear exaggerated enough, either in the case of amplification of genes mushrooms to investigate the gene responsible for resistance mushroom oyster– fungal plant pathogens the volume of output of nucleic acid amplification multiplier with bp ٣٠٣ and all samples contain a gene responsible for a recipe Osterolysin resistance in the oyster mushrooms.