

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

عبد الامير سمير سعدون

سولاف حامد تيموز

كلية العلوم / جامعة القادسية

Sulaffungi

@yahoo.com

: □□□□□

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 pH8 ، اختبرت كفاءة الفطر المحاري في تثبيط فطريات التربة من خلال استخدام الراشح الانزيمي للفطر بعد تحضيره واستخدمت التراكيز للراشح (25،50،100) % وظهرت النتائج تثبيطها للفطريات الممرضة للنبات (*Aspergillus* ، *Aspergillus niger*) ، *Penicillium sp.* ، *Stymphyllum sp.* ، *Fusarium solani* ، *flavus* والمتبلر PCR ولا 15 عينة 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 ديكتروز اكار خلال المدة 4-7 ايام على درجة حراره 30 م° وعند اطالة فترة الحضان الى 10 ايام لوحظ ظهور براعم كبدائية 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 واضحة بقدرها الكافي ، اما في حالة التضخيم لجينات الفطر للتحري عن الجين المسؤول عن مقاومة الفطر المحاري للفطريات الممرضة للنبات حيث بلغ حجم ناتج التضخيم للحامض النووي المضاعف مع 303 bp واحتواء جميع العينات على جين Osterolysin المسؤول عن صفة المقاومة في الفطر المحاري وصفات اخرى كتعطيم الكولسيترون 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 والكربوهيدرات ولاحتوي على الدهون وإن احتوت فهي غير مشبعة وينسب ضئيلة جدا كذلك تحتوي على الاملاح والفيتامينات وغيرها من العناصر الغذائية (Manolea وآخرون ، 2006) إذ ذكرت المصادر اهميته في مجالات عديدة كالاقتصادية والطبية باختلاف انواعه والوانه وامكان زراعته فتتراوح مدى كفاءته باختلاف نوع المدعمات التي تضاف الى الاوساط الزرعية كالخميرة والدبس ونخالة الحنطة وبعض انواع المستخلصات كعرق السوس والتي تساعد على تركيز بعض المواد الكيميائية الطبية في الجسم الثمري للفطر المحاري مثل مادة السستاتين والكالليك والبيبتاكلوكان .(سعد وآخرون ، 2013 . عبدالهادي ، 2010) ، كذلك ان العديد من الدراسات والبحوث اكدت اهمية ذلك الفطر في تثبيط العديد من الفطريات الممرضة والبكتريا وحتى الفايروسات وبينت دوره في تحليل السموم الفطرية مثل السموم التي يفرزها الفطر *Aspergillus fumigatus* وكذلك دوره في تحليل الخثرة الدموية وتخفيض نسبة الكوليسترول في اجسام الحيوانات.(ابراهيم وآخرون ، 2005) ونظرا لاختلاف انواعه وسلالاته باختلاف مناطق الزراعة وظروفها المناخية من رطوبة وحرارة واختلاف الشركات المستوردة للفطر ولغرض التأكد من كون الفطر المحاري من السلالة البيضاء التي لها اهمية طبية هدفت الدراسة الى :

1. تشخيص الفطر جزيئيا من خلال زراعة سبوانات spawn الفطر على الوسط الغذائي ثم استخدام تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لتضخيم مادة الـ DNA في العزلات المنتخبة
2. التحري عن جين Ostereolysin المسؤول اعطاء صفة المقاومة للفطر المحاري

المواد وطرائق العمل :

1: زراعة الفطر المحاري على وسط الـ PDA

تم تحضير الاوساط الزرعية كوسط PDA وتعقيمها بالمؤعدة على درجة حرارة 121 م° وتحت ضغط 1 جو ، وترك الوسط ليبرد ثم صب بالاطباق بعد اضافته قطرات من NaOH وذلك لزيادة قاعدية التي تساعد الفطر من النمو بشكل جيد في الاوساط القاعدية وبعدها تركت الاوساط لتتصلب ومن ثم زرعت السبوانات spawn (سبورات الفطر) المحملة على بذور الحنطة في تلك الاطباق ، ثم حضنت هذه الاوساط في الحاضنة تحت درجة حرارة 25 م° لمدة من 7 - 10 ايام وبعد اكتمال نمو الاطباق تم التأكد من الفطر بواسطة الفحص المجهرى للخيوط الفطرية و نوع السبورات.

2: اختبار الراشح الانزيمي للاجسام الثمريه في تثبيط فطريات التريه المرضية:

حضرت تراكيز الراشح الانزيمي (25، 50، 100)% بأستعمال لتر من وسط مستخلص البطاطا السائل المعقم والذي وزع على 5 دوارق لكل دورق 200مل ولقح بأقراص قطرها 0.5 سم بثاقب فليني من مزرعة الفطر المحاري بعمر 7 ايام . حضنت الدوارق على درجة حرارة 25 م° ولمدة اسبوعين بعدها تم التشريح بأستخدام ورقة الترشيح (No.1) Whatman بقمع بوخنر وبمساعدة جهاز تفريغ الهواء واعيد الترشيح بأستخدام المرشح الدقيق . 0.22 μ وحضرت وذلك عن طريق التخفيف بالماء المقطر، اذ اضيفت تراكيز الراشح الانزيمي الى الوسط الزرعي الصلب PDA ولكل تركيز ثلاث مكررات وحركت الاطباق حركة رحيوية لضمان توزيع الراشح ثم زرعت الاطباق بالفطريات الممرضة بزراعة الفطر اقراص الفطريات في منتصف الاطباق .

3: البادئات Primers

تم استخدام نوعين من البادئات في هذه الدراسة، النوع الاول صممت من قبل (James وآخرون: 2004) على اساس جين المقاومة Oly-toxin الذي يستخدم في التحري عن الفطر *Pleurotus ostreatus* والنوع الثاني من البادئات صمم من قبل (James وآخرون: 2004)

Primer	Sequence	Product size	Accession NO.
ITS1	F TCGTCAGACTTGGTTTGCTG	236bp	AY540332.1
	R GGTGCGTTCAAAGATTCGAT		
Oly	F TCGGATCTCAAGACGTGAAG	303bp	KC012711.1
	R CGATCATCCACTTGGTGTG		

تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة PCR master mix :

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

PCR master mix		Volume
DNA template		5μL
Primers	F. primer	1.5μL
	R. primer	1.55μL
PCR water		12μL
Total		20μL

تشخيص الفطر بطريقة تفاعل السلسلة المتبلر (PCR)

أ- استخلاص الحامض النووي الفطري fungal genomic DNA extraction

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

- 1- تم تنشيط عزلات الفطر المختبرة على الاوساط الزرعية السائلة PDB واختيرت 15 عزلة للفطر المحاري التي جلبت من اماكن مختلفة .
- 2- جمعت الخيوط الفطرية والسبورات بوزن 100-500 ملغم في انبوبة اختبار دقيقة وعولمت بالنتروجين السائل وسحقت بوساطة مطرقة خاصة.
- 3- اضيف 180 مايكروليتر من Universal Digestion Buffer و 20 مايكروليتر من Proteinase K الى كل انبوبة ومزجت باستخدام المازج وحضنت بدرجة حرارة 56م لمدة 30-60 دقيقة.
- 4- اضيف للانابيب 100 مايكروليتر من Universal Buffer PF ومزج بالتقليب وحضنت بدرجة حرارة 20 تحت الصفر لمدة 5 دقائق.
- 5- نبذ المزيج بسرعة 12000 دورة/دقيقة بدرجة حرارة الغرفة ونقل الطافي الى انبوبة جديدة سعة 1.5 مل.
- 6- اضيف للمزيج 200 مايكروليتر Universal Buffer BD ومزج بالمازج.
- 7- اضيف 200 مايكروليتر من الكحول المطلق ومزج بالمازج.
- 8- نقل المزيج من الخطوة 7 الى EZ-10 tube ونبذ بسرعة 12000 دورة/دقيقة ثم تم التخلص من المزيج ونقل انبوب الترشيح الحاوي على الحامض النووي الى انبوبة اختبار أخرى.
- 9- اضيف 500 مايكروليتر من Universal PW Solution الى الانبوبة ونبذت بسرعة 12000 دورة/دقيقة لمدة دقيقة واحدة ونقل انبوب الترشيح الى انبوبة جمع جديدة.
- 10- اضيف 500 مايكروليتر من Universal Wash Solution الى الانبوبة الجديدة ونبذ بسرعة 12000 دورة/دقيقة لمدة دقيقة واحدة ونقل انبوب الترشيح الى انبوبة جمع جديدة ونبذت مرة اخرى السرعة نفسها لمدة دقيقتين لتجفيف غشاء ال EZ-10 Tube ونقل الاخير الى انبوبة جديدة سعة 1.5 مل.
- 11- اضيف 100-50 مايكروليتر من TE Buffer مباشرة الى مركز غشاء ال EZ-10 Tube وحضن بدرجة حرارة الغرفة لمدة دقيقة واحدة بعدها نبذ بسرعة 12000 دورة/دقيقة لمدة دقيقة لتركيز الحامض النووي.
- 12- استخدم جهاز النانودروب Nanodrop :وهو عبارة عن جهاز يستخدم لتشخيص كمية DNA في الانابيب المختبرية وذلك بوضع كمية قليلة من كل عزله في الجهاز ومن ثم تقرأ الشاشة الالكترونية التي تبين كمية الدنا الموجود في كل عزله .وحسب الجدول (1) :

جدول (1) كمية الـ DNA ng/L في عزلات الفطر المحاري مقاسة بجهاز النانودروب

الكمية ng/L	العينة
39.9	1
37.7	2
22.3	3
41.0	4
44.2	5
22.6	6
23.7	7
24.9	8
28.4	9
69.0	10
28.0	11
36.7	12
32.0	13
24.2	14
15.2	15

ب- مضاعفة الحامض النووي المستخلص Amplification DNA

تم تحضير AccuPower® TLA PCR PreMix tube الخاص بتفاعل الـ PCR بإضافة 5µl من الحامض النووي المستخلص و (2µl forward and 2µl reverse) إلى كل AccuPower® TLA PCR PreMix tube وتم اكمال الحجم إلى 20µl بإضافة الماء المقطر ثم مزجت المكونات جيداً باستعمال المازج Vortex . وكما في الجدول (2)

جدول (2) الدورات الحرارية المستخدمة في ظروف تفاعل السلسلة المتبلر

الظروف المستخدمة في جهاز الدورات الحرارية					البادئات
الاستطالة النهائية (دورة واحدة)	(دورة)30			المسخ الأولي (دورة واحدة)	
	الاستطالة	التثبيت	المسخ		
72 م° / 8 دقيقة	72م°/1دقيقة	57 م° / 1.5 دقيقة	95 م°/30 ثانية	م°94 / 3 دقيقة	ITS
72 م° / 5 دقيقة	م° 72 / 40 ثانية	م° 57 / 30 ثانية	95 م°/30 ثانية	م°95 / 2 دقيقة	AA
72 م° / 5 دقيقة	م° 72 / 40 ثانية	م° 57 / 30 ثانية	95 م°/30 ثانية	م°95 / 2 دقيقة	PDMT المصمم

ج- الترحيل الكهربائي الهلام Gel electrophoresis:

تم اجراء الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكروز بنسبة 1.5% وذلك قراءة نتيجة تفاعل سلسلة البلمره PCR product analysis وحسب طريقة Townsend وجماعته (2001) كما يأتي:

1- تم اذابة 1.5 جم مت هلام الاكروز Agarose gel في 100 مل من محلول الـ TBE buffer الدارى بتركيز 1X وباستخدام الصفيحة الحرارية الهزازة الممغنطة Magnetic hot plate stirrer لمدة 15 دقيقة.

2- ترك الهلام ليبرد بدرجة حرارة 50م وبعدها تم إضافة صبغة الحامض النووي المشعة Ethidium bromide ومزجت جيدا مع الهلام.

3- 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 15 دقيقة ومن ثم ازيل المشط من الهلام بعناية.

4- تم عملية تحميل العينات باستخدام صبغة التحميل Loading dye على ورق البارافلم Parafilm paper وذلك باضافة 1 حجم من صبغة التحميل لكل اربعة حجوم من ناتج البي سي ار PCR product ووضعت في حفر الهلام.

5- تم استخدام سلم القياس 100 DNA ladder لقياس ناتج البي سي ار الذي يتكون من (243bp) ووضع في الحفرة الاولى.

6- بعد اكتمال عملية التحميل تم جمر هلام الاكروز باستخدام محلول TBE Buffer الدارى بتركيز 1X وغلق غطاء الترحيل وبعدها تم تشغيل جهاز الترحيل باستخدام تيار 100 فولت وامبير 80 لمدة ساعة واحده.

7- 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.

: □□□□□□□□□□

1: زراعة الفطر المحاري على وسط الـ PDA

من الملاحظ انه عند زراعة الفطر المحاري على وسط الـ PDA ينمو بشكل جيد ويوقت قصير يصل من (4-7) ايام اذ يكتمل نمو الفطر نلاحظ تكون الغزل الفطري الكثيف في الاطباق بمجرد اكتمال النمو وذلك لان وسط البطاطا ديكستروز اكار يوفر بيئه غذائية مناسبة لنمو الفطر من عناصر الكربون والهيدروجين بالاضافة الى ان المادة السكريه الموجوده في الوسط تساعد على تسريع النمو وكثافة الغزل الفطري كما لوحظ انه عند زياده مده الحضان تتكون رؤوس الاجسام الثمرية وهذا يتفق مع ما جاء به (جبر واخرون ، 2008) و(عبدالهادي :2012) اللذان فسرا سرعة نمو الفطر في الاوساط الحاويه على ماده كاربوهيدراتيه سكريه .

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

يتضح من الجدول (3) كفاءة استخدام التراكيز (25،50،100)% من الراشح الانزيمي للفطر المحاري على بعض فطريات التربة المرضية المنتخبة المتواجدة في التربة والتي تسبب عدة امراض للنباتات ، اذ سجلت المعاملة بتركيز 25% راشح انزيمي فروقات معنويه بين معاملة السيطره للفطريات والتي كان قطر النمو الشعاعي فيها 9 سم الفطر *Aspergillus niger* : 1.47 سم و *Fusarium solani* : 2.93 سم وكانت النتائج للفطر *Stymphyllium sp.* : 0.00 سم بعدم وجود اي نمو فطري شعاعي للفطر ، اما الفطر *Aspergillus flavus* : 6.84 سم وقد كان من الفطريات المقاومة للراشح الانزيمي لكن رغم ذلك لوحظ ان هناك تثبيط في الاطباق اما في حالة الفطر *Pencillium sp.* : 3.42 سم فلو حظ ان هناك تثبيط في الاطباق . اما في حالة استخدام تركيز 50% فلو حظ ان هناك فروقا معنويه بين الفطريات في عملية التثبيط للفطر وتأثيرها على النمو الشعاعي اذ كانت عملية التثبيط كالتالي الفطر *Aspergillus niger* : 0.00 سم والفطر *Fusarium solani* : 2.93 سم اما في حالة الفطر *Stymphyllium sp.* : 0.00 سم والفطر *Aspergillus flavus* : 6.82 سم والفطر *Pencillium sp.* : 2.05 سم اما عند استعمال تركيز الراشح الانزيمي 100% فنلاحظ وجود فروقات معنويه بين الفطريات اذ كان الفطر *Aspergillus niger* : 0.00 سم اي عدم وجود اي نمو في الاطباق ، اما في الفطر *Fusarium solani* : 1.95 سم والفطر *Stymphyllium sp.* : 0.00 سم اما الفطر *Aspergillus flavus* : 4.88 سم المفرز للسموم ايضاً أظهر مقاومة ولو قليلة الا انه نوعاً ما نبط بالتركيز المستعمل والفطر *Penicillium sp.* : 1.95 سم . وجميع تلك النتائج التي سجلت ضمن التجربة تتفق مع ما وجدته (Stamets: 1993 ، Koch & Buchalo :2002) 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 ما يعطيه الاهمية الطبية ، ايضا ممكن تفسير تلك النتائج في ضوء ما جاء به (Wood وجماعته :2000 ، Stamets :2001 ، Chase وجماعته :2003) في كون الفطر المحاري يتميز بأحتوائه على مواد مضاده للميكروبات والفطريات.

جدول (3): تأثير التراكيز المختلفة من الراشح الإنزيمي للفطر المحاري على معدل النمو الشعاعي للفطريات المرضية.

معدل النمو الشعاعي للفطريات (سم)				الفطر الممرض
تراكيز الراشح الإنزيمي%				
%100	%50	%25	%0.00 Con.	
0.00	0.00	1.47	9	<i>Aspergillus niger</i>
1.95	2.93	2.93	9	<i>Fusarium solani</i>
0.00	0.00	0.00	9	<i>Stymphllium sp.</i>
4.88	6.84	6.84	9	<i>Aspergillus flavus</i>
1.95	2.05	3.42	9	<i>Penicillium sp.</i>
0.08	0.11	0.12	2.29	LSD 0.05

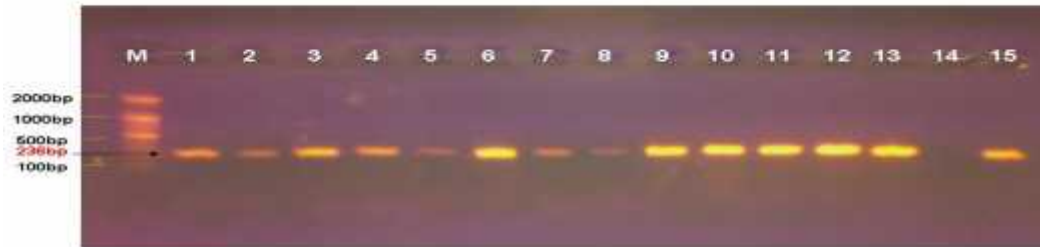
*كل رقم يمثل معدل ثلاث مكررات

3: التشخيص باستخدام تفاعل السلسلة المتبلر PCR Diagnosis by

أظهرت نتائج استخلاص الـ DNA لعزلات الفطر *Pleurotus ostreatus* باستعمال العدة المستعملة لهذا الغرض وترحيله كهربائياً في هلام الأكاروز (1.5 %) والكشف عنه باستعمال صبغة الأثيديوم برومايد وفحصه تحت الأشعة فوق البنفسجية (UV) Ultra violate احتواء جميع العزلات على حزمة واحدة ومفردة للـ DNA المستخلص فقد كانت النتائج موجبه لجميع العينات التي رحلت على هلام الاكاروز وان حزم الـ DNA كانت موجودة في العينات وان لم تكن واضحة بقدرها الكافي ، وكما مبين في الشكل (1) .تم تشخيص الفطر *Pleurotus ostreatus* بوساطة الطرائق الروتينية

والتي كانت من اماكن مختلفة وللصعوبات التي يواجهها الباحثون في 15 تشخيص بعض الفطريات المستعملة كغذاء وخصوصا الفطريات البازيديه والتي تحتاج الى خبره لمعرفة ماهو سام منها وماهو صالح للاكل والتي تحتاج الى اوساط خاصة لتنميتها والتي تحوي ماده السيليلوز واللكتين أي من الصعب تنميتها على الاوساط الزراعية الصناعية لذلك يمكن تشخيصها بالاعتماد على الحامض النووي بتقنية الـ PCR.

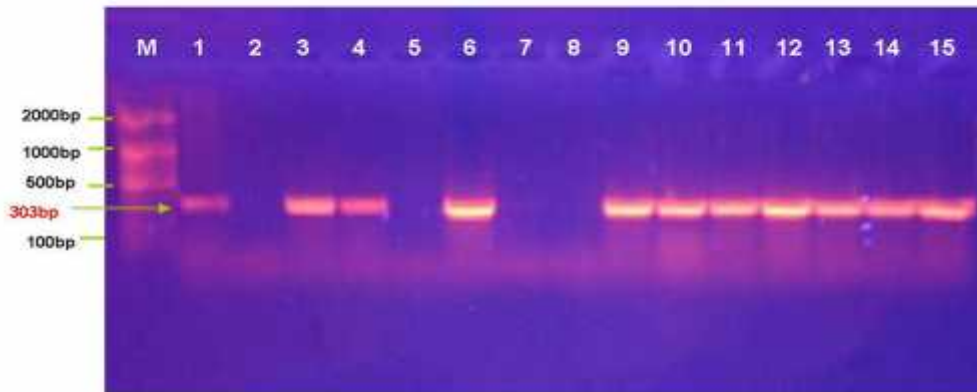
اذ تم في هذه الدراسة استخدام بادئات ITS1 (Internal Transcribed Spacer region) في الفطر *Pleurotus ostreatus* حيث بلغ حجم ناتج التضخيم لهذه المنطقة هو 2000bp كما موضح في الشكل (1) وهذه النتيجة تتفق مع (James وآخرون: 2004)، (Moue وآخرون: 2002)



الشكل (1) : نواتج استخلاص الـ DNA بالترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة لعزلات الفطر *Pleurotus ostreatus* باستعمال العدة الجاهزة Genomic DNA Mini Kit . حيث أن DNA Ladder (100-2000bp) = M ، *Pleurotus ostreatus* = SA ، base pair = bp ، زوج قاعدي . (ITS1 gene PCR of of *Pleurotus ostreatus*)

4: التحري عن جين المقاومة في الفطر المحاري :

للتحري عن جين المقاومة في الفطر المحاري استخدم البادئ AA حيث بلغ حجم ناتج التضخيم للحامض النووي المضاعف مع 303 bp كما مبينة في الشكل (2) ، فقد تم تصميم بادئ PDMT لهذا الفطر لعدم توفر البادئات اللازمة للاعتماد عليها في التشخيص اذ بلغ حجم ناتج التضخيم 2000 bp كما مبينة في الشكل (2) حسب برنامج التصميم (Primer3 Plus). اذ من الملاحظ انها اظهرت نتيجة موجبة للعزلات (1 ، 3 ، 4 ، 6 ، 9 ، 10 ، 11 ، 12 ، 13 ، 14 ، 15) دلالة على تواجد الجين Osterolysin الخاص بمقاومة الفطر والذي يمنح الفطر المحاري صفة مقاومته للفطريات الممرضة وبعض الكائنات المجهرية . وكانت النتيجة سالبة للعزلات (2 ، 5 ، 7 ، 8) اي لم يظهر فيها تعبير لجين المقاومة وقد يعال ذلك الى ان خيوط الـ DNA قد كانت ضعيفة ولم تكن بالقدر الكافي لبيان جين المقاومة ووضوحه تحت الاشعة فوق البنفسجية . وهذه النتيجة تتفق مع (Paterson وآخرون:2006) ، (Marek وآخرون:2003).



الشكل (2) : نواتج تضخيم الجين Oly- gene of *Pleurotus ostreatus* للفطر *Pleurotus ostreatus* والمرحلة كهربائياً على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة بأستعمال تقنية الـ PCR . حيث أن DNA Ladder marker (100-2000 bp) = M ، *Pleurotus* = SA ، *ostreatus* , جميع العزلات اظهرت نتيجة موجبة لجين Oly-gene المسؤول عن المقاومة في الفطر ..

: □□□□ □□□□

- ابراهيم ، ضياء خليل و سنبل جاسم حمودي ومحمد احمد شويل المشهداني (2006). تأثير اضافة الفطر المحاري *Pleurotus ostreatus* الى عليقه ذكور فروج اللحم في بعض الصفات والفسلجية والانتاجية. قسم الثروة الحيوانية- كلية الزراعة- جامعة بغداد.. البحث مستل من رسالة ماجستير .. مجلة العلوم الزراعية العراقية 19(3) : ص 20- 29 .
- جبر كامل سلمان ، مصطفى رشيد القيسي ومحمد قاسم الجبوري (2008). كفاءة كسبة فول الصويا وكلوريد الكالسيوم في الانتاجية والقابلية الخزنه للفطر الزراعي الابيض . البحث مستل من رسالة ماجستير .قسم وقاية النبات - كلية الزراعة - جامعة بغداد مجلة العلوم الزراعية العراقية 39(1):36-46 .
- سعد، سماح ونضال صوفان وفواز الحاجي عبود (2013). تأثير اضافة خميرة الخبز لنوعين من وسط الزراعة في الانتاج وتركيز بعض المركبات الكيميائية للفطر المحاري مجلة العلوم الزراعية العراقية - 44(3):397-403 .
- عبدالهادي ،عبد الاله مخلف (2012).استخدام دبس التمر في تحسين الانتاج والقابلية الخزنه والاهمية الطبية للفطر المحاري .مجلة العلوم الزراعية العراقية.43(1):76-87.
- عبدالهادي ،عبدالاله مخلف وخالد ابراهيم مصطفى (2010).تأثير وسط الحلفا ونوع المدعم على الكفاءة الحيوية والقابلية الخزنه للفطر المحاري *Pleurotus ostreatus* مستل من رسالة ماجستير .مجلة دبالى للعلوم الزراعية 2(1):208-235.
- Chase.Ch.,M.Garner,D.Graves,H.S. Oliff , R.N.(2003).Schulman and D. Webb.Major Review of health Benefits of Medicinal Mushrooms.Mushrooms Medicinal .www.herbal gram.org.
- James, Timothy Y.,* Shian-Ren Liou,1 and Rytas Vilgalys (2004) .The genetic structure and diversity of the A and B mating-type genes from the tropical oyster mushroom, *Pleurotus djamor*. Fungal Genetics and Biology 41:813-825.
- Koch ,J.S.Witt and U.Lindequist.(2002).The Influence of selected Higher Basidiomycetes on the binding of Lipopolysaccharide to CD¹⁴⁺ cells and on Release of Cytokines. International Journal of medicinal Mushrooms , 3:94-101.
- Manolea, G., M. Popescu, C. Nedelcut and L. Alboteanu.(2006). The numerical simulation of the culture medium for the *Pleurotus* genus mushrooms, Ann.Uni.Cariova, Elect.Engin.Seri. 30:318-325.

- Moue, . Manabu. 2, Yoichi Honda*2, Takashi Watanane* 2 and Masaaki K. Uwahara*2.(2002). Genetic Transformation of white Rot Fungus *Pleurotus ostreatus* to Carboxin Resistance using Electroporation*I. Wood Research No. 89 (2002).
- Marek R, Thirananavakarasu A., Venkitanarayan k. (2003) . Detection of *Penicillium expansum* by polymerase chain reaction .Int. J. Food Microbiol . 89:139-44.
- Paterson., R. Russel M.(2006) .Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR .Process Biotechnology .41:1467-1474.
- Stamets, P., (2001). Novel Antimicrobials from mushrooms .Turkey Tail on Yunzhi. www.fungi.com/mycomed.html.
- Stamets, P. (1993) .Growing gourmet and medicinal mushrooms Berkeley , California. pp.554
- Wood, W.F., G.R. Farquar and D.L. Largent.2000. Different Volatile compounds from mycelium and sporocarp of *Pleurotus ostreatus*. Biochemical Systematics and Ecology, 28: 89-90.

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 4-7 days at a temperature of 30 M and prolong the period when cuddling to 10 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 15 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 303 and all samples contain a gene responsible for a recipe Osterolysin resistance in the oyster mushrooms.