Determine Anastomosis Group for Different Isolates of *Rhizoctonia Solani* Kuhn by PCR-RFLP Technique

Alaa M.R. **Mohammed A.F** **Taleb A. Ch.**
Agriculture College, AL-Basra University
alaa.abdulamer@stu.edu.iq

ARTICLE INFO
Submission date: 15 / 11 / 2019
Acceptance date: 24 / 12 / 2019
Publication date: 31/ 3 / 2020

Abstract

In this study, isolates of *Rhizoctonia* has been isolated from several host plants belonging to different geographic areas from Basrah and recipes all isolates were identical to the species *R. solani*. Based pathogenicity test the results showed that all isolates were significantly reduced in the percentage of seeds cabbage germination ranged 0 - 66.7%, while BRs15 isolate (96.7%) did not showed significant differences compare with the control treatment (100). The DNA extraction experiments for *R. solani* isolates revealed the efficiency of Lysis buffer procedure to get a high DNA yield and that it's a good quality. The results of restriction fragment length polymorphism technique (RFLP) using RS1 and RS4 primers showed that the bands size for *R. solani* isolates obtained between 500-522 bp, restriction technique results using enzymes *Ava*II, *Hinc*II, *Mse*I and *Mun*I showed that Rs2 isolate belong to the group AG1-IB, while Rs5, Rs16, Rs27, Rs29 and the standard isolate (AG2) belong to the group AG2-2, while Rs9 isolate belongs to group AG11 so Rs30 isolate belongs to group AG3-PT.

Keywords: Anastomosis Group, AGs, *Rhizoctonia Solani*, PCR-RFLP.

© Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences (JUBPAS) by University of Babylon is licensed under a Creative Commons Attribution 4. 0 International License, 2020.

تحديد مجموعة الاندماج السايتوبلازمي لعزلات مختلفة من الفطر Kühn *Rhizoctonia solani* باستعمال تقنية PCR-RFLP.

علاء محمد رشا الرديني محمد عامر فياض طالب أحمد جايد
كلية الزراعة / جامعة البصرة

الخلاصة

في هذه الدراسة عزلت وشخصت عزلات من جنس الفطر *Rhizoctonia* من عوائل نباتية عديدة عائدة لمناطق جغرافية متباينة من محافظة البصرة وأن الصفات لجميع العزلات مطابقة للنوع *R. solani*، بينت نتائج القابلية الامراضية إن جميع عزلات هذا الفطر قد سببت خفضاً معنوياً للنسبة المئوية في إنبات بذور اللهانة التي تراوحت بين 0 – 66.7% عدا العزلة BRs15 (96.7%) اذ لم تُظهر فروق معنوية بالنسبة الى معاملة المقارنة (100%). اشارت نتائج استخلاص DNA عزلات الفطر *R. solani* بطريقة Lysis buffer كفاءتها في الحصول على كمية وفيرة من جينوم الفطر وهو ذو نوعية جيدة، أشارت نتائج تقنية تضخيم تشكلات اطوال القطع (RFLP) باستعمال زوج البادئات RS1 و RS4 إن حجم الحزم لعزلات الفطر *R. solani* التي تم الحصول عليها تتراوح بين 500 – 522 زوجاً قاعدياً. أوضحت نتائج تقنية الهضم باستعمال الإنزيمات *Ava*II و *Hind*II و *Mse*I و *Mun*I أن العزلة Rs2 تنتمي إلى المجموعة AG1–IB بينما العزلات Rs5 و Rs16 و Rs27 و Rs29 والعزلة القياسية AG2 تنتمي إلى المجموعة AG2–2 في حين العزلة Rs9 تعود إلى المجموعة AG11 أما العزلة Rs30 فتنتمي إلى المجموعة AG3–PT.

الكلمات الدالة : عزلات من الفطر *Rhizoctonia solani*، PCR، RFLP، Anastomosis groups، AGs.

المقدمة

يعد الفطر *R. solani* من فطريات التربة والبذور (Soil and seed borne fungi) يصيب عدة محاصيل اقتصادية مسبباً لها أمراضاً خطيرة في الحقول والمشاتل، يتميز الفطر بمداه العائلي الواسع إذ يصيب العديد من الأنواع النباتية التي تنتمي إلى 66 عائلة نباتية منها العائلة الصليبية والنجيلية والبقولية والخبازية والباذنجانية ، وتقدر نسبة الخسائر الناجمة عن الإصابة بهذا الفطر في العالم بـ 55% وفي أستراليا وحدها قدرت الخسارة الناجمة عن الفطر بحوالي 77 مليون دولار سنوياً [24]، [13]، [14]. يسبب الفطر عدة أمراض مثل تعفن البذور وموت البادرات قبل البزوغ وبعده فوق سطح التربة ويسبب اللفحة أو تبقع الأوراق Foliage blight or spots وتسوس الساق في النباتات الصغيرة Seedling stem canker وتقرح الجذور Roots lesions وتعفن الجذور والساق Roots and stem rot والمرض المعروف بخناق القطن Sore shin وغيرها من الأمراض التي تصاب بها النباتات في الحقل، كذلك يهاجم الأجزاء النباتية مسبباً لها التعفن أثناء الخزن مؤدياً الى خسائر كبيرة في المحاصيل [11]. يعد الفطر *R. solani* نوع معقد بسبب الاختلافات الكبيرة في الصفات المزرعية والمدى العائلي والقدرة الإمرضية لذلك يستند التصنيف الحالي إلى تقسيم هذا النوع المعقد إلى مجاميع متباينة وراثياً تسمى مجاميع الاندماج السايتوبلازمي Anastomosis groups (AGs) اعتماداً على خاصية اتحاد الخيوط الفطرية للعزلات المختلفة حيث يتألف من 14 مجموعة تقسم من AG–1 الى AG–13 ومجموعة واحدة تسمى(AG–BI) AG–bridging، وتعد المجاميع من AG–1 إلى AG–4 أكبر مجاميع الفطر *R. solani* في حين تعد المجاميع من AG–5 الى AG–13 و AG–BI أقل المجاميع أهمية كعوامل ممرضة للنبات، وأن نظام مجاميع الأندماج السايتوبلازمي الذي يعتمد على اتحاد الخيوط الفطرية قد قُبل بشكل واسع كأساس للتعرف على المجاميع المتخصصة داخل هذا النوع المعقد [16]،[17]. يعتمد تقسيم هذه المجاميع على وصف

تفاعلات اندماج الخيوط الفطرية في المزرعة إلا إن هذه الطريقة تستغرق وقتاً طويلاً ويصعب أحياناً تفسيرها وغير قادرة على تحديد العزلات التي تعود الى مجاميع فرعية مختلفة ضمن مجاميع الأندماج السايتوبلازمي الرئيسة لذلك يتزايد استعمال الطرق التي تعتمد على الحامض النووي الرايبوزي منقصوص الأوكسجين Deoxyribo nucleic acid (DNA) لتشخيص هذه المجاميع [19]، [18]، [12]. تعد Restriction fragment length polymorphism (RFLP) واحدة من التقنيات الجزيئية التي يتزايد استخدامها لتوصيف الفطر *Rhizoctonia* التي تتميز بقدرتها على تشخيص أعداد كبيرة من الفطر حتى مستوى مجاميع الاندماج السايتوبلازمي (AGs)، إذ استعملت هذه التقنية للتحقق من الاختلافات الوراثية بين وداخل مجاميع AGs لعزلات الفطر *R. solani* مما أدى إلى زيادة القدرة في تمييز كل المجاميع تقريباً وبعض المجاميع الفرعية الخاصة بها. تعد هذه التقنية مفيدة جداً للتشخيص نظراً لبساطتها واحتياجها إلى كميات صغيرة من الحامض النووي DNA [25]، [20]. جاءت هذه الدراسة لتحديد مجموعة الاندماج السايتوبلازمي لعزلات الفطر *R. solani* المعزولة من نباتات مختلفة من جنوب العراق باستعمال تقنية تضخيم تشكلات أطوال القطع المهضومة (PCR–RFLP).

المواد وطرائق العمل

عزل وتشخيص الفطر *R. solani*:

جمعت العينات من التربة والنباتات المصابة من خمس مناطق جغرافية مختلفة من محافظة البصرة (أبو الخصيب– القرنة –المدينة– حقول كلية الزراعة – الزبير)، تم عزل الفطر *R. solani* من عينات التربة بأتباع طريقة التخافيف وذلك بأخذ 1غم من كل عينة على أساس الوزن الجاف لها وأضافته الى 9 مل ماء مقطر معقم في أنبوبة اختبار والذي يعد التخفيف الأول 10^{-1}, ثم أخذ 1مل من التخفيف الأول وأضيف الى 9 مل ماء مقطر معقم في أنبوبة اختبار ثانية للحصول على التخفيف الثاني 10^{-2} وكررت هذه العملية للوصول الى التخفيف السادس 10^{-6}، بعد ذلك أخذ 1مل من التخفيف السادس وأضيف الى طبق بتري حاوي على وسط PDA معقم مع مراعاة تحريك الطبق بصورة رحوية وذلك لتوزيع العالق بصورة متجانسة. حضنت الأطباق في الحاضنة تحت درجة حرارة 25 ± 2 مْ لحين ظهور نمو فطري في الأطباق، ثم نقيت النموات الفطرية على أطباق بتري حاوية وسط PDA. جُلبت عينات من عدة نباتات تبدو عليها أعراض الأصابة بالفطر *R. solani*، غسلت الأجزاء المصابة (جذور – سيقان – ثمار – قرنات) بالماء الجاري لإزالة الأتربة أو الطين منها ثم قطعت الى قطع صغيرة بمساحة 0.5 – 1 سم^2 ثم عقمت بمحلول هايبوكلورات الصوديوم NaOCl بتركيز 10% من المستحضر التجاري لمدة دقيقتين، بعدها غسلت بالماء المقطر المعقم لإزالة آثار التعقيم ونشفت القطع بوساطة ورق ترشيح ثم وضعت في طبق بتري حاوي على الوسط الغذائي PDA المعقم والحاوي على المضاد الحيوي Chloromphencol بتركيز 250 ملغم/لتر بواقع 5 قطع/طبق وحضنت الأطباق في درجة حرارة 25 ± 2 مْ لمدة 3 – 4 أيام. فحصت النموات الفطرية النامية حول القطع المعزولة ثم نقي الفطر في أطباق بتري حاوية على وسط PDA. شخص الفطر *R. solani* بعد ظهور النموات الفطرية في الفقرتين السابقتين وذلك بالأعتماد على الصفات التصنيفية التي ذكرها Parmeter و Whitney [24] والتي تتضمن لون المستعمرة الفطرية وطبيعة تفرع الغزل الفطري الحديث ووجود التخصر في منطقة التفرع وتكوين الأجسام الحجرية وشكل الخلايا وعدد الأنوية ووجود الحواجز ذات الثقوب المزدوجة.

أختبار القابلية الأمراضية:

تم اختبار أمراضية 32 عزلة للفطر *R. solani* بحسب طريقة Bolkan و Butler [15] وذلك بتلقيح أطباق بتري قطر 9 سم حاوية على 15–20 مل من وسط الاكار والماء الحاوي على 2% اكار باقراص قطر 0.5 سم من مزارع عزلات

الفطر *R. solani* المنماة على الوسط الزرعي PDA بعمر 5 ايام كلٍ على انفراد. وبعد مرور ثلاثة أيام تم زراعة بذور اللهانة المعقمة سطحياً بمحلول هايبوكلورات الصوديوم 10% لمدة دقيقة واحدة بصورة دائرية قرب حافة الطبق. كررت المعاملة بثلاثة اطباق لكل عزلة مع معاملة المقارنة التي تتضمن زراعة بذور اللهانة من دون فطر. حضنت الاطباق عند درجة 25 ± 2 مْ. سجلت النتائج بعد 7 أيام من الزراعة وذلك بحساب النسبة المئوية للأنبات من المعادلة (النسبة المئوية للأنبات = عدد البذور النابتة / عدد البذور الكلية × 100) وعلى ضوء نتائج هذا الاختبار تم اختيار سبع عزلات للدراسات اللاحقة ذات أعلى قابلية أمراضية تعود الى عوائل نباتية مختلفة.

تحضير عزلات الفطر *R. solani* لعملية استخلاص DNA:

نُميت عزلات الفطر *R. solani* على وسط PDA لمدة أربعة أيام تحت درجة حرارة 25 ± 2 مْ، ثم أخذت ثلاثة أقراص من كل عزلة قطرها 0.5 سم ووضعت في دوراق زجاجية سعة 250 مل حاوية على 70 مل من الوسط الغذائي PDB وحضنت الدوارق الزجاجية على درجة حرارة 25 ± 2 مْ لمدة 4–6 أيام، حُصد الغزل الفطري بوساطة جهاز السحب Vacuum pump باستعمال ورق ترشيح معقم نوع Belgam paper ash < 0.20، ثم غُسل بالماء المقطر المعقم وحُفظ في المجمدة تحت درجة حرارة – 20 مْ لحين الاستعمال. تم تجفيد الغزل الفطري باستعمال النتروجين السائل وسُحق أثناء عملية التجفيد بوساطة هاون خزفي مع مراعاة التعقيم بعد كل عملية سحق، حفظ مسحوق الغزل الفطري لجميع العزلات في أطباق بتري معقمة في المجمدة تحت درجة حرارة – 20 مْ لحين عملية الاستخلاص.

استخلاص DNA الفطر *R. solani* :

نُفذت جميع التجارب المتعلقة بالاحياء الجزيئية في مختبر الهندسة الوراثية، كلية الزراعة، جامعة البصرة. تم استخلاص DNA بطريقة Lysis buffer (جدول 1) لسبعة عزلات من الفطر *R. solani* المعزول من عوائل نباتية مختلفة تعود إلى مناطق جغرافية مختلفة من محافظة البصرة وهي Rs2 و Rs5 و Rs9 وRs16 وRs27 و Rs29 وRs30 فضلاً عن العزلة القياسية المشخصة على انها تابعة الى مجموعة AG2.

جدول (1) المحاليل المستعملة في أستخلاص DNA الفطر *R. solani* (Lysis buffer و Clean-up solution ومحلول TE).

المحلول	المـــادة	الكـمية
Lysis buffer	Tris – HCl [pH 8.0]	20 ملي مولاري
	EDTA	10 ملي مولاري
	NaCl	100 ملي مولاري
	2-Mercaptoethanol	%0.2
	PVP	%2
	Distilled water	100 مل
Clean-up solution	CTAB	%2
	Tris – HCl [pH 8.0]	10 ملي مولاري
	EDTA	10 ملي مولاري
	NaCl	70 ملي مولاري
	Phenanthroline	%0.02
	Distilled water	100 مل
1X-TE buffe	Tris- HCl [pH 8.0]	1 مل
	EDTA [0.5M]	200 مايكرولتر
	Distilled water	100 مل

أستخلاص DNA الفطر *R. solani* باستعمال محلول Lysis Buffer:

تم تحضير محلول الاستخلاص Lysis buffer ومحلول التنظيف Clean-up solution وأستخلاص DNA الفطر بحسب طريقة Niu وآخرون [23]، تمثلت عملية الاستخلاص بوضع 0.1 غم من مسحوق الفطر المجفد باستعمال النتروجين السائل في أنابيب سعة 2 مل، ثم أُضيف 800 مايكرولتر من محلول الاستخلاص Lysis buffer و50 مايكروغرام من RNase A إلى كل أنبوبة وخُلط المزيج جيداً بجهاز الرج لعدة ثواني، بعدها تم أضافة 100 مايكرولتر من مادة SDS 20% وخُلط المزيج جيداً، بعدها حُضنت الأنابيب على درجة حرارة 65 مْ لمدة 15 دقيقة لتحلل الخلايا. بعد التحضين أضيف 225 مايكرولتر من مادة 2M Potassium acetate وخُلطت جيداً بجهاز الرج لعدة ثوانٍ. أجريت عملية طرد مركزي لمدة 10 دقائق وعلى سرعة 11000 دورة/دقيقة تحت درجة حرارة الغرفة ونُقلت الطبقة العلوية بدقة إلى أنابيب جديدة سعة 1.5 مل ثم أضيف أليها حجم مساوي من كحول الآيزوبوبانول، وأجري طرد مركزي تحت الظروف السابقة نفسها.ةأستُبعد الراشح مع الحفاظ على DNA المتجمع في قاع الأنبوبة وأجريت عملية غسل لـ DNA وذلك بأضافة 500 مايكرولتر من كحول الإثانول تركيز 70% وأجراء طرد مركزي تحت الظروف السابقة نفسها. عُلق DNA في 300 مايكرولتر من محلول 1X-TE buffer أو الماء المقطر (يمكن أستعمال DNA في هذه المرحلة لبعض تفاعلات PCR التي لا تحتاج إلى نقاوة عالية من DNA). لتنقية DNA أضيف 500 مايكرولتر من محلول التنظيف Clean-up solution ووضعت على جهاز الهزاز لمدة 30 – 60 دقيقة

وعلى سرعة 100 دورة/دقيقة تحت درجة حرارة الغرفة. أستبُعدت الشوائب عن طريق أجراء عملية طرد مركزي لمدة 5 دقائق وعلى سرعة 9000 دورة/دقيقة لتجميع DNA في قعر الأنبوبة. تم أضافة 90 مايكرولتر من الماء المقطر و 10 مايكرولتر من مادة 3M Sodium acetate و 400 مايكرولتر من كحول الإيثانول تركيز 95%. تم ترسيب DNA عن طريق الطرد مركزي على سرعة 10000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق تحت درجة حرارة الغرفة. أستبعد الراشح وأجراء عملية الغسل بأضافة 500 مايكرولتر من كحول الإثانول تركيز 70% وأجري طرد مركزي لمدة 10 دقائق وعلى سرعة 11000 دورة/دقيقة تحت درجة حرارة الغرفة. تم استبعاد كحول الأيثانول بحذر ثم تُركت الأنابيب مفتوحة لتتعرض للهواء لبضع دقائق، بعدها أُضيف 50- 200 مايكرولتر من محلول 1X-TE إلى الأنابيب وحُفظت العينات في المجمدة تحت درجة حرارة – 20 مْ لحين الاستعمال.

تقنية تضخيم الحامض النووي الـDNA (PCR):

استعمل زوج البادئات RS1 و RS4 المجهزة من شركة Operon الأمريكية (جدول 2) لتضخيم منطقة Internal transcribed speacer (ITS) ، حضر خليط تفاعل PCR في أنبوبة سعة 200 مايكرولتر وكان الحجم النهائي للخليط 50 مايكرولتر (جدول 3) ووضعت العينات في جهاز المدور الحراري Thermal cycles وأدخل البرنامج الخاص بتفاعل PCR (جدول 4)، وتم ترحيل ناتج التفاعل بتقنية الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز 1.5%. استعملت الانزيمات القاطعة *Ava*II و *Hind*II و *Mse*I و *Mun*I لهضم منتج PCR بحسب توصيات الشركة المصنعة (Thermo scientific) ورحل كهربائيا على هلام الاكاروز 1.5%.

جدول (2) البادئات المستعملة في تقنية PCR.

ت	اسم البادىء	تتـــابع البـــادئات	درجة حرارة البادىء (الاستطالة)	الطول
1	RS1	5-CCTGTGCACCTGTGAGACAG-3	50.6	20
2	RS4	5-TGTCCAAGTCAATGGACTAT-3	43.6	20

جدول (3) كميات المواد المستعملة في تقنية PCR تبعاً لـ Moussa وآخرون [22].

المادة الكيمائية	Master mix	RS1	RS4	قالب DNA	ماء مقطر	الحجم النهائي
الحجم (مايكرولتر)	25	1	1	5	18	50

جدول (4) البرنامج الخاص بزوج البادئات RS1 و RS4 حسب Guillemaut وآخرون [20].

المراحل	درجة الحرارة (مئوي)	الزمن (دقائق)	الخطوة	عدد الدورات	المرحلة
الدنترة الاولية	94	5:00	1	1	1
الدنترة	94	1:00	1	35	2
التلدين	56	1:00	2		
الاستطالة	72	1:00	3		
الاستطالة النهائي	72	5:00	1	1	3

الترحيل الكهربائي لمنتج PCR وناتج الهضم بالأنزيمات القاطعة:

تم ترحيل منتج التفاعل السلسلي للبولمريز على هلام الأكاروز بتركيز 1.5% إذ وضع في الحفرة الأولى 4 مايكرولتر من مؤشر الوزن الجزيئي DNA ladder 25/2000bp المجهز من شركة Thermo scientific الأمريكية ووضع في بقية الحفر منتج PCR بمقدار 4 مايكرولتر وبعد أنتهاء عملية الحقن رُبطت الأقطاب بمجهز الطاقة وشُغل بعد ضبط قوة التيار على 85 فولت و 65 ملي أمبير لمدة 30 دقيقة، بعد أنتهاء عملية الترحيل الكهربائي تم فحص الهلام في جهاز توثيق البيانات Gel Documentation لمعرفة عدد وحجم الحزم، وحُللت النتائج الخاصة بالتفاعل والهضم بالأنزيمات القاطعة التي تم اعتمادها بناءً على وجود او عدم وجود الحزمة في الخطوط المختلفة بإستعمال برنامج Photo–CaptMw.

النتائج والمناقشة

عزل وتشخيص الفطر *R. solani*:

تم عزل وتشخيص 32 عزلة من الفطر *Rhizoctonia* (جدول 5) من عدة عوائل نباتية تعود لمناطق جغرافية مختلفة من محافظة البصرة، وقد تم التشخيص على ضوء الصفات التي ذكرها Parmeter و Whitney [24] وأن صفات جميع العزلات مطابقة للنوع *R. solani* (صورة 1).

جدول (5) عزلات الفطر *R. solani* والعوائل النباتية التي عَزلت منها ومنطقة الجمع.

ت	رمز العزلة	النبات العائل	منطقة الجمع	ت	رمز العزلة	النبات العائل	منطقة الجمع
1	Rs1	جذور طماطة	گرمة علي/حقول كلية الزراعة	17	Rs17	جذور طماطة	الزبير
2	Rs2	جذور بطيخ	الزبير	18	Rs18	تاج بامية	گرمة علي/حقول كلية الزراعة
3	Rs3	جذور حلفا	أبو الخصيب	19	Rs19	قرنات لوبيا	گرمة علي/حقول كلية الزراعة
4	Rs4	جذور خيار القثاء	التنومة	20	Rs20	جذور باذنجان	المدينة
5	Rs5	جذور بامية	المدينة	21	Rs21	تربة حنطة	المدينة
6	Rs6	جذور باذنجان	گرمة علي/حقول كلية الزراعة	22	Rs22	تربة شعير	القرنة
7	Rs7	جذور حنطة	المدينة	23	Rs23	تربة بامية	گرمة علي/حقول كلية الزراعة
8	Rs8	جذور شعير	المدينة	24	Rs24	جذور شعير	القرنة
9	Rs9	جذور حنطة	القرنة	25	Rs25	جذور حنطة	القرنة
10	Rs10	جذور عرق السوس	أبو الخصيب	26	Rs26	جذور خيار القثاء	المدينة
11	Rs11	جذور لوبيا	گرمة علي/حقول كلية الزراعة	27	Rs27	جذور قطن	گرمة علي/حقول كلية الزراعة
12	Rs12	جذور حندگوك	أبو الخصيب	28	Rs28	تربة خيار القثاء	المدينة
13	Rs13	ثمرة خيار القثاء	التنومة	29	Rs29	جذور باذنجان	أبو الخصيب
14	Rs14	درنة بطاطا	الأسواق المحلية	30	Rs30	درنة بطاطا	الأسواق المحلية
15	BRs15	ثمرة قرع	الزبير	31	Rs31	ثمرة رقي	أبو الخصيب
16	Rs16	جذور لوبيا	المدينة	32	Rs32	تربة رقي	أبو الخصيب

صورة (1) لون وشكل مستعمرات بعض عزلات الفطر *R. solani* على الوسط الزرعي PDA بعد أسبوع من الحضن في درجة حرارة 25 ± 2 م.

أختبار القابلية الأمراضية:

بينت نتائج هذه التجربة الموضحة في جدول (6) أن جميع عزلات الفطر *R. solani* المختبرة سببت خفضاً معنوياً في النسبة المئوية لإنبات بذور اللهانة التي تراوحت بين 0 – 66.7% قياساً بمعاملة المقارنة التي بلغت النسبة المئوية للإنبات فيها 100% بأستثاء العزلة BRs15 إذ لم تظهر فروق معنوية مع معاملة المقارنة وبلغت النسبة المئوية للإنبات فيها 96.7%. تتفق هذه النتائج مع دراسات عديدة أشارت إلى قدرة الفطر *R. solan* على خفض النسبة المئوية لإنبات بذور اللهانة [7]، [3]، [10]، [1] وتتفق مع دراسات أخرى أشير فيها إلى قدرة عزلات الفطر على خفض النسبة المئوية لإنبات عدة عوائل نباتية كالطماطة واللوبيا البيضاء واللوبيا الحمراء والحنطة والقطن والفجل والرشاد والبطيخ [8]، [5]، [2]، [6]، [9]، [4]، [21].

جدول (6) تأثير عزلات مختلفة من الفطر *R. solani* في النسبة المئوية لإنبات بذور اللهانة.

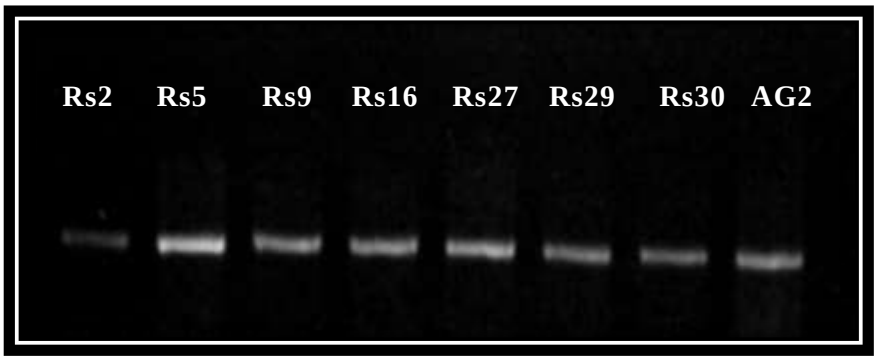
ت	رمز العزلة	% لإنبات بذور اللهانة	ت	رمز العزلة	% لإنبات بذور اللهانة	ت	رمز العزلة	% لإنبات بذور اللهانة
1	المقارنة	100*	12	Rs4	33.3	23	Rs2	13.3
2	BRs15	96.7	13	Rs6	33.3	24	Rs18	13.3
3	Rs13	66.7	14	Rs17	33.3	25	Rs30	13.3
4	Rs32	63.3	15	Rs22	33.3	26	Rs7	6.7
5	Rs23	56.7	16	Rs26	26.7	27	Rs25	6.7
6	Rs1	53.3	17	Rs31	23.3	28	Rs27	6.7
7	Rs21	50.0	18	Rs10	20.0	29	Rs9	3.3
8	Rs28	46.7	19	Rs11	20.0	30	Rs12	3.3
9	Rs20	43.3	20	Rs3	16.7	31	Rs5	0.0
10	Rs14	40.0	21	Rs8	16.7	32	Rs16	0.0
11	Rs24	36.7	22	Rs29	16.7	33	Rs19	0.0
L. S. D. (%1)			**11.31**					

*** كل رقم في الجدول يمثل معدل ثلاثة مكررات.**

استناداً إلى هذه التجربة تم اختيار سبعة عزلات ذات أعلى قابلية أمراضية تعود الى عوائل نباتية مختلفة للدراسة الجزيئية وهذه العزلات كانت Rs2 و Rs5 و Rs9 و Rs16 و Rs27 و Rs29 و Rs30 المعزولة من نبات البطيخ والبامية والحنطة واللوبيا والقطن والباذنجان والبطاطا على التوالي.

أستخلاص DNA عزلات الفطر *R. solani* :

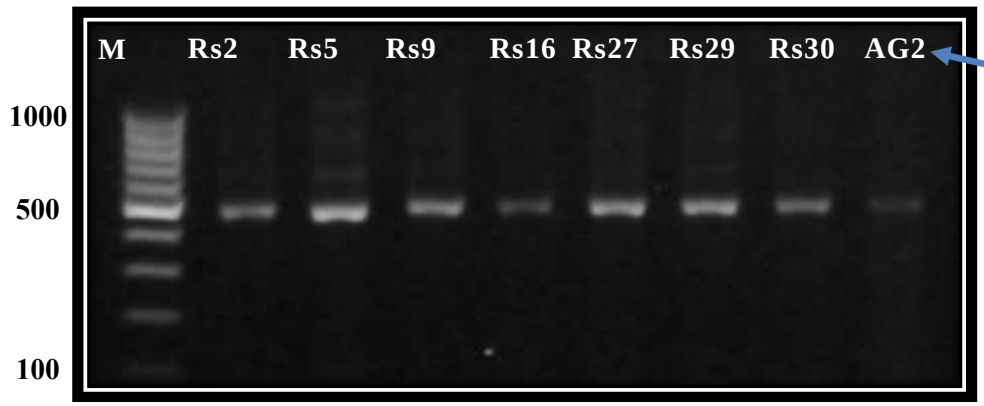
أشارت نتائج استخلاص DNA عزلات الفطر *R. solani* المدروسة بطريقة Lysis buffer إلى انه كان ذا نوعية جيدة وأثبت كفاءته في الاختبارات اللاحقة، إذ لوحظت حزم DNA واضحة عند استعمال تقنية الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز 2% (الشكل 1). كما أثبتت كفاءتها في الحصول على كمية وفيرة من جينوم الفطر *R. solani*.



شكل (1) الترحيل الكهربائي لجينوم عزلات الفطر *R. solani* على هلام الأكاروز 2%.

تقنية تضخيم الحامض النووي الـDNA (PCR):

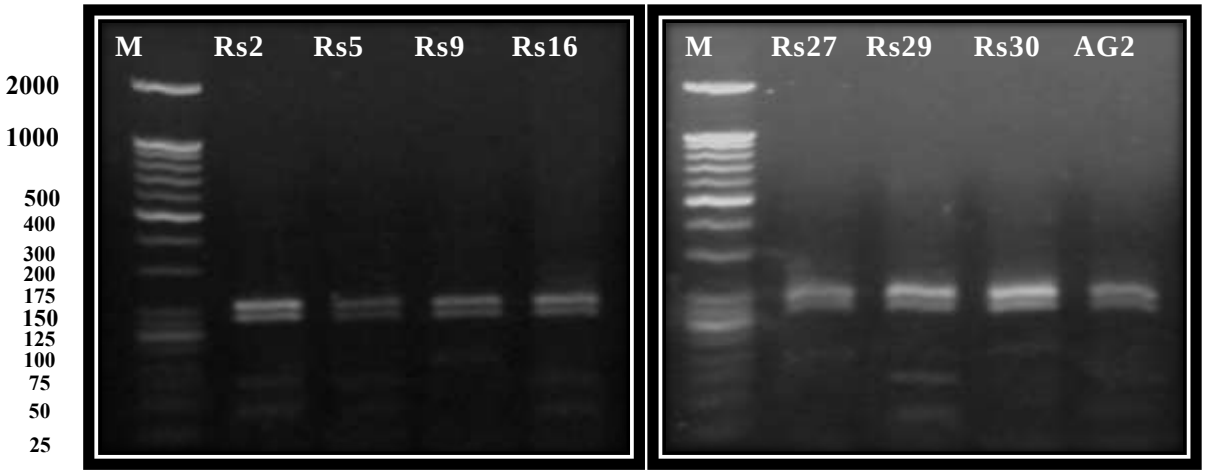
بينت نتائج تضخيم المادة الوراثية لجميع عزلات الفطر *R. silani* باستعمال زوج البادئات RS1 و RS4 أن حجم الحزم التي تم الحصول عليها تتراوح بين 500 – 522 زوج قاعدي، إذ أعطت العزلة Rs30 أكبر حجماً بلغ 522 زوج قاعدي تلتها العزلتان Rs16 و AG2 البالغ حجم حزمتهما 520 زوج قاعدي في حين أنخفض حجم الحزم في العزلات Rs9 و Rs27 و Rs29 ليصل إلى 508 زوج قاعدي بينما أعطت العزلتان Rs2 و Rs5 أقل حجم للحزم والبالغ 500 زوج قاعدي لكل منهما (شكل 2)، جاءت هذه النتيجة متفقة مع ما ذكره Guillemaut وآخرون [20] إذ ذكروا إن حجم ناتج تضخيم المادة الوراثية المستخلصة من الفطر *R. solani* باستعمال زوج البادئات RS1 و RS4 يكون ضمن مدى يتراوح بين 475 – 550 زوج قاعدي، وأشار Taheri وآخرون [27] و Taheri و Pourmahdi [26] إلى إن حجم منتج DNA عزلات الفطر *R. solani* المضخم باستعمال البادئين RS1 و RS4 قد بلغ 550 زوجاً قاعدياً.



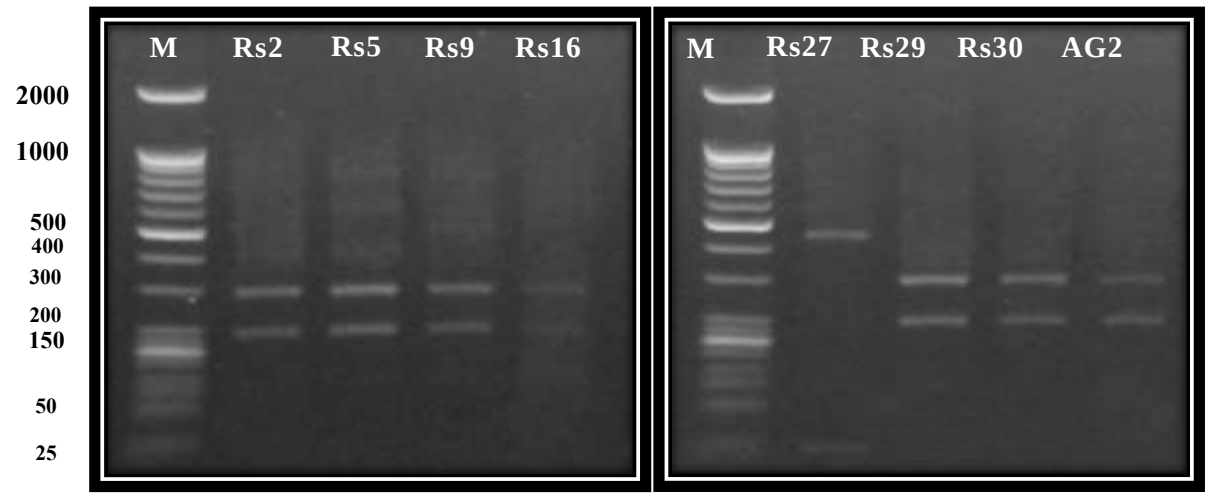
شكل (2) الترحيل الكهربائي بمادة الأكاروز 1.5% لمنتج PCR باستعمال زوج البادئات RS1 و RS4.

تقنية هضم منتج PCR بالأنزيمات القاطعة:

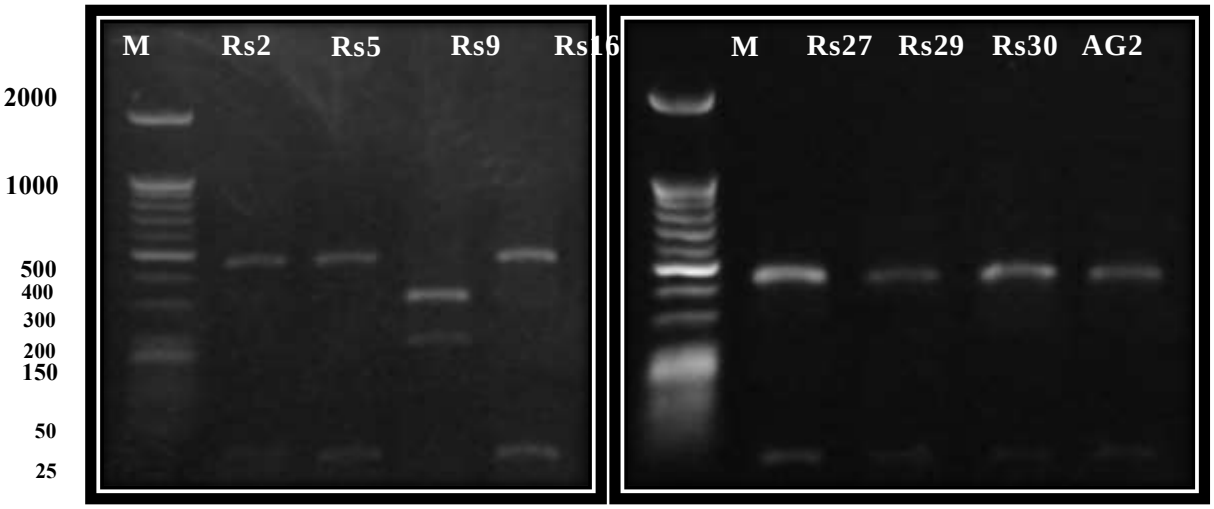
استُعملت تقنية الهضم بالإنزيمات القاطعة لتشخيص مجاميع الاندماج السايتوبلازمي لعزلات الفطر *R. solani* المدروسة وتم هضم منتج التفاعل السلسلي للبوليمريز باستعمال الإنزيمات *Ava*II و *Hind*II و *Mse*I و *Mun*I، أعطى ناتج الهضم بالإنزيم *Mse*I من 3 – 4 حزم مع وجود اختلاف في احجامها إذ بلغ العدد ثلاثة حزم في العزلات Rs2 و Rs9 و Rs30 في حين بلغ العدد أربع حزم في باقي العزلات (شكل 3)، وأستُعمل الإنزيمين *Ava*II و *Hind*II في تفاعل واحد، إذ كان ناتج الهضم حزمتين لجميع العزلات مع وجود اختلاف في حجم الحزم (شكل 4)، بينما أعطى ناتج الهضم بوساطة الإنزيم *Mun*I حزمتين لجميع العزلات مع وجود تباين في حجم الحزم كما موضح في الشكل (5).



شكل (3) الترحيل الكهربائي بمادة الأكاروز 1.5% لمنتج PCR باستعمال الإنزيم *Mse*I.



شكل (4) الترحيل الكهربائي بمادة الأكاروز 1.5% لمنتج PCR باستعمال الإنزيمين *Ava*II و *Hind*III.



شكل (5) الترحيل الكهربائي بمادة الأكاروز 1.5% لمنتج PCR باستعمال الإنزيم *Mun*I.

تشير النتائج الموضحة في جدول (7) وطبقاً للدليل الذي وضعه Guillemaut وآخرون [20] لتشخيص مجاميع الاندماج السايتوبلازمي بالأعتماد على تضخيم المادة الوراثية بوساطة زوج البادئات RS1 و RS4 وهضمها بالإنزيمات القاطعة *Ava*II و *Hind*III و *Mse*I و *Mun*I إلى أن العزلة Rs2 تنتمي إلى المجموعة AG1-IB بينما العزلات Rs5 و Rs16 و Rs27 و Rs29 والعزلة القياسية (AG2) تنتمي إلى المجموعة AG2-2 في حين العزلة Rs9 تعود إلى المجموعة AG11 أما العزلة Rs30 فتنتمي إلى المجموعة AG3-PT. جاءت هذه النتائج متفقة مع Taheri و Pourmahdi [26] فيما يتعلق بالتشخيص الناجح لمجاميع الاندماج السايتوبلازمي لعزلات الفطر *R. solani* بوساطة تقنية RFLP باستعمال الإنزيمات القاطعة *Ava*II و *Hind*III و *Mse*I و *Mun*I إذ تم التمكن من تشخيص مجاميع الاندماج وأظهر تحليل تقنية RFLP إن عزلات الفطر *R. solani* تنتمي إلى المجاميع AG-2-1 و AG-3 PT و AG-4 HGI و AG-4 HGII.

جدول (7) عدد وحجم الحزم الناتجة من الهضم بالإنزيمات القاطعة ومجاميع الاندماج السايتوبلازمي لعزلات الفطر *R. solani*.

ت	رمز العزلة	*Mse*I		*Hind*II + *Ava*II		*Mun*I		مجموعة الاندماج
		العدد	الحجم (bp)	العدد	الحجم (bp)	العدد	الحجم (bp)	
1	Rs2	2	23+477	3	103+184+213	2	26+476	AG1-IB
2	Rs5	2	200+300	4	34+70+184+212	2	280+472	AG2-2
3	Rs9	2	203+305	3	112+184+212	2	25+483	AG11
4	Rs16	2	211+309	4	42+71+190+217	2	28+492	AG2-2
5	Rs27	2	204+304	4	42+71+184+211	2	28+480	AG2-2
6	Rs29	2	206+302	4	40+70+185+213	2	24+484	AG2-2
7	Rs30	2	211+311	3	117+189+216	2	194+328	AG3-PT
8	AG2	2	209+311	4	41+73+189+217	2	28+492	AG2-2

Conflict of Interests.

There are non-conflicts of interest .

المصادر

[1] الربيعي، أفراح عبد علي (2008). تصنيع مبيد أحيائي من لقاح البكتريا *Bacillus circulans* لمكافحة بعض ممرضات جذور الحنطة. رسالة ماجستير. كلية التقنية / المسيب. 111صفحة.

[2] الشيباني، رغد ضياء عبد الجليل (2001). تشخيص بعض الفطريات المسببة لموت شتلات الباذنجان بعد النقل إلى البيوت الزجاجية واختبار مقاومتها للمبيدات الفطرية. رسالة ماجستير. كلية العلوم. الجامعة المستنصرية.

[3] العيساوي، ذياب عبد الواحد فرحان (2006). عزل وتشخيص بعض الفطريات المرافقة لمرض موت بادرات وتعفن جذور الرقي ومقاومتها بالطرق الإحيائية والكيميائية. رسالة ماجستير، الكلية التقنية / المسيب، 66 صفحة.

[4] المادح، سكينة عبد علي عبود (2013). تأثير الأشعة فوق البنفسجية في إراضية الفطر *Rhizoctonia solani* Kühn المسبب لمرض موت البادرات ومقاومته إحيائياً وكيميائياً. رسالة ماجستير – كلية الزراعة – جامعة البصرة. 121 صفحة.

[5] الناصري، سارة قحطان سليمان (2001). المقاومة الأحيائية لبعض فطريات تعفن جذور القرنفل وموتها بواسطة أنواع الفطر *Trichoderma*. رسالة ماجستير. كلية التربية للبنات / جامعة بغداد.

[6] حسن، محمد صادق (2002). قابلية عزلات من الفطر *Rhizoctonia solani* على اصابة بادرات كل من اللهانة والقرنابيط والفلفل والباذنجان وبأعمار مختلفة. *مجلة التقني*. 15 (98): 122 – 128 .

[7] حســون، إبراهيم خليل (2005). المكافحة البايلوجية والكيميائية لمســبب مرض تقرح ســاق البطاطا *Rhizoctonia solani* Kühn. اطروحة دكتوراة – كلية الزراعة – جامعة بغداد. 113 صفحة.

[8] سعد، نجاة عدنان (2001). التداخل بين ديدان العقد الجذرية *Meloidogyne javanica* والفطر *Rhizoctonia solani* في الباذنجان ومقاومته أحيائياً. رسالة ماجستير – كلية الزراعة – جامعة بغداد.

[9] علوان، صباح لطيف و رسل علي وناس(2012). اختبار المدى العائلي للفطر *Rhizoctonia solani* المعزول من جذور اللوبياء في إنبات ونمو بعض البذور العائدة إلى عوائل نباتية مختلفة. مجلة جامعة الكوفة لعلوم الحياة. 4(2): 118-122.

[10] مطلوب، عهد عبد علي هادي (2007). تقويم طرائق المكافحة بالعوامل الاحيائية والمستخلصات النباتية لمرض تقرح ساق البطاطا المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani* Kuhn. رسالة ماجستير – كلية التقنية – المسيب. 85 صفحة.

[11] Agrios, G. N. (2005). Plant pathology. 5th edition. Elsevier academic press, USA. 998 pp.

[12] Amaradasa, B. S. (2011). Accurate identification and grouping of *Rhizoctonia* isolates infecting turfgrasses in MD and VA and their sensitivity to selected fungicides in vitro. Ph. D. Thesis. State University, 114pp.

[13] Anderson, N. A.; (1982). The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani. Annual Review of Phytopathology*. 20: 329–47.

[14] Anonymous (2008). What is *Rhizoctonia* bare patch? Grains Research Development Corporation (GRDC). Fat sheet www.gradc.com.

[15] Bolkan, H. H. and Butler, E. E. (1974). Studies on Heterokaryosis Virulence of *Rhizoctonia solani Phytopathology*. 64: 513 – 522.

[16] Carling, D. E. (1996). Grouping *Rhizoctonia solani* by hyphal anastomosis reaction. In. *Rhizoctonia* species: taxanomy, molecular biology, anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* kühn isolated from potatoes. *Transaction of Journal of Agriculture and Forestry*. 22:609-613.

[17] Carling, D. E.; Baird, R. E.; Gitaitis, R. D.; Brainard, K. A. and Kuninaga, S.; (2002a). Characterization of AG-13, a newly reported anastomosis group of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*. 92(1): 893-899.

[18] Carling, D. E.; Kuninaga, S. and Brainard, K. A. (2002b). Hyphal anastomosis reactions, rDNA-internal transcribed spacer sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-2 (AG-2) and AG-BI. *Phytopathology*. 92: 43-50.

[19] Cubeta, M. A.; Echandi, E.; Abernethy, T. and Vilgalys, R. (1991). Characterization of anastomosis groupsof binucleate *Rhizoctonia* species using restriction analysis of an amplified ribosomal RNA gene. *Phytopathology*. 81: 1395-1400.

[20] Guillemaut, C.; Edel-Hermann, V.; Camporota, P.; Alabouvette, C.; Richard-Molard, M. and Steinberg, C. (2003). Typing of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* by restriction analysis of ribosomal DNA. *Canadian Journal of Microbiology*. 49(9): 556-568.

[21] Kareem, T. A. (2014). Genetic variation study of *Rhizoctonia solani* of some vegetable plants in Baghdad. Ph.D. thesis. College of Agriculture – University of Baghdad. 118 pp.

[22] Moussa, T. A. A.; Khalid, M. S.; Gomaa, N. M. and Al-Hazzim, R. A. (2014). Biodiversity of *Rhizoctonia solani* AG3 and AG2-1 associated with potato diseases. *Life Science Journal*. 11(8): 407-417.

[23] 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 Journal of Biotechnology*. 7(16): 2818-2822.

[24] Parmeter, J. R. and Whitney, H. S. (1970). Taxonomy and nomencleature of the imperfect stage In: *Rhizoctonia solani* Biology and Pathology. (ed.) J. R. Parmeter. University of California Barkely. Los Angeless. 7–19 pp.

[25] Pascual, C. B.; Toda, T.; Raymondo, A. D. and Hyakumachi, M. (2000). Characterization by conventionl techniques and PCR of *Rhizoctonia solani* isolates causing banded leaf sheat blight in maize. *Plant Pathology*. 46: 108-118.

[26] Taheri, P. and Pourmahdi, A. (2013). Molecular identification of a destructive phytopathogenic fungus in tomato fields of Iran. Annual International Interdisciplinary Conference. 522-524.

[27] Taheri, P.; Gnanamanickam, S. and Hofte, M. (2007). Characterization and genetic diversity of *Rhizoctonia* spp. Associated with rice sheath diseases in India. *Phytopathology*. 97(3): 373-383.