عزل وتشخيص الفطر *Rhizoctonia solani* (Kühn) المسبب لمرض القشرة السوداء على البطاطا المحلية والمستوردة ومعرفة التغاير الجزيئي لها وعلاقتها بالامراضية ومقاومتها حيوياً

عامر جاسم طوفان العبيدي
جامعة واسط /كلية الزراعة
amiramir.80.hf@gmail.com

أ. د. مجيد متعب ديوان
جامعة الكوفة /كلية الزراعة

الملخص:

تضمنت هذه الدراسة أجراء مسح وتقدير نسبة وشدة الاصابة لمرض القشرة السوداء على البطاطا المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani* لبعض الحقول الزراعية وبعض المخافر الحدودية في محافظة واسط للموسم الزراعي 2016 - 2017 ، أسفرت نتائج جمع العينات العشوائية من البطاطا المحلية والمستوردة (الإيرانية) المصابة بالمرض ان اعلى نسبة مئوية للإصابة وشدتها كانت للدرنات المحلية المصابة فيما أظهرت نتائج العزل الحصول على 50 عزلة من الفطر *R. solani* ، 25 عزلة فطرية عزلت من الدرنات المحلية المصابة أعطيت الرمز (Rh A) و25 عزلة فطرية عزلت من البطاطا الايرانية المصابة أعطيت الرمز (Rh B) وارقام تسلسل من 1- 25 لكل منهما .

بينت نتائج اختبار القدرة الامراضية للعزلات الفطرية على أنبات بذور وموت بادرات الفجل أن جميع العزلات كانت ممرضة ولكنها اختلفت في مقدرتها الإمراضية ووجد ان العزلات المحلية اشد امراضية واكثر ضرراً من العزلات الايرانية .

أثبتت الدراسة الجزئية للفطر *R. solani* باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل للبولي مريز Polymerase ((Chain Reaction)(PCR)) وتحديد التتابع النيوكلوتيدي لحزم الحامض النووي DNA ان جميع العزلات المشخصة مجهريا عائدة للفطر *R. solani* وأن سبعة من تلك العزلات الفطرية وهي RhA2 وRhA9 وRhA12 و RhB1و RhB8 وRhB17 وRhB23 المشخصة في هذه الدراسة هي عزلات جديدة غير معروفة سابقا في جميع العالم و تم تسجيلها لأول مرة في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) .

استخدمت في الدراسة المقاومة الاحيائية ضد الفطر *R. solani* باستعمال المستخلصات النباتية وقد أوضحت نتائج تأثير تراكيز 0 و 10و 20 و30 و50 و75غم /لتر من مستخلصات القرنفل والدارسين والزنجبيل والنعناع في نمو عزلتين من عزلات الفطر (المحلية RhA6 والايرانية RhB8)الى تفوق مستخلص القرنفل بالتراكيز 30 و 50 و 75غم / لتر و الدارسين بتركيز 75غم / لتر في تثبيطهما بالكامل . **الكلمات المفتاحية :** البطاطا ، مرض القشرة السوداء ،*Rhizoctonia solani* ،المقاومة الحيوية

ISOlATION AND DIAGNOSIS OF FUNGUS *RHIZOCTONIA SOlANI* (KUHN). THAT CAUSES BIACK CRUST DISEASE ON LOCAI AND IMPORTED POTATOES AND MOLECULAR AND PATHOGENICITY DIFFERENCES AND BIO-CONTROL OF THESE ISOLATES

Amer Jassim Tofan AL Obeidi **Prof. Dr. Majeed M. Dewan**

Abstract:

This study included a survey of the black scurf disease on potato caused by the fungus *R. solani* in some potato cultivation fields, border stations in province of Wasit during 2016 – 2017 growing season. local potatoes and imported (Iranian) infected with the disease for each site , the percentage of infection and severity were calculated. Local potatoes showed higher infection percentage.

The seclusion resulted in 50 isolates of *R. solani*, 25 isolates from each site (local and Iranian infected tubers). a Series numbers from 1- 25,for each one local isolates were given the symbol RhA while the Iranian isolates were presented by RhB.

Pathogenicity tests of these fungal isolates on radish seed germination and seedlings death showed that all isolates were pathogenic at various level of pathogenic ability. Local isolates were found to be more virulent than Iranian isolates. .

The molecular study showed that the 13 selected isolates of *R. solani* by using polymerase chain reaction technology (PCR) and to determine the nucleotide sequence of double nucleic acid. All the tested isolates were belong to the *R. solani*. shows that seven of these fungal isolates RhA2, RhA9, RhA12, RhB1, RhB8, RhB17, and RhB23 are new isolates in the world and recorded at the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

The biological resistance trail was studied by using 6 concentrations (0, 10, 20, 30, 50 and 75 g / L) of plant extract for two of the isolated *R. solani* (RhA6 and RhB8).

The clover extract was the most effective at concentrations of (30, 50 , 75 g/ L,) and *cinnamon* at (75 g/ L)to completely in hibited the growth of *R. solani* isolates.

Key words: Potato; Black Scurf Disease; *R. solani*; Biological Control

1. المقدمة Introduction

تعد البطاطا *Solanum tubersum*. L. من محاصيل الخضر المهمة في العراق والوطن العربي وفي عدد كبير من دول العالم وهي محصول درني استراتيجي اقتصادي تنمو درناته تحت سطح التربة (24) تعود الى العائلة الباذنجانية Solanaceae التي تضم نحو 90 جنساً وحوالي 2000 نوع (4)

تحتل البطاطا المرتبة الرابعة من بين محاصيل الغذاء في العالم بعد كل من الحنطة والرز والذرة (24) ، تعتبر مصدراً غذائياً مهما جدا للإنسان ومصدر للطاقة كونها غنية بالكربوهيدرات وتحتوي على العديد من البروتينات والدهون والفيتامينات والاملاح والمعادن والاحماض الامينية (8) يتم انتاج البطاطا في العراق في عروتين ربيعية وخريفية (25) .

يتعرض نبات البطاطا الى العديد من الآفات الزراعية منها الحشرية وغير الحشرية اضافة الى العديد من الأمراض والتي تتسبب عن كائنات حية دقيقة مختلفة وفي مقدمتها الفايروسات ،الفطريات ،النيماتودا ،البكتريا (24) ، قد آشار (16) ان الامراض الفطرية المهمة التي تصيب البطاطا والتي انتشرت في السنوات الاخيرة في العراق هو مرض تقرح الساق والقشرة السوداء (Black scurf of Potato) المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani* (Kühn) الذي يصيب النبات في جميع مراحل نموه المختلفة ويحدث اضراراً وخسائر اقتصادية كبيره بالمحصول اذ يعتبر الفطر *R. solani* من فطريات التربة الممرضة للنبات ومن أهم مسببات أمراض تعفن البذور وموت البادرات قبل وبعد البزوغ .

يصنف الفطر *R. solani* الى العديد من السلالات التي تختلف مظهرياً وفسلجياً والتي تضم 14 سلاله تسمى مجاميع الاندماج السايتوبلازمي ((Anastomosis (AGs groups)) وتختلف وراثيا حيث وجد ان بعض العزلات عالية الامراضية واخرى غير ممرضة نتيجة حصول الطفرات (19) .

تعد تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل للبولي مريز ((Polymerase Chain Reaction (PCR)) واحدة من التقنيات الجزيئية المعتمدة في انتخاب و تضخيم منطقة محددة من جينوم الكائن الحي بالاعتماد على الاختلافات الموجودة في تسلسل الحامض النووي (DNA) لتلك المنطقة و بالتالي معرفة العلاقة الوراثية بين انواع الفطريات و دعم التشخيص المظهري للفطر المدروس (12).لذا استعملت هذه التقنية في تشخيص العديد من الاحياء المجهرية و منها الفطريات (11)

ظهر استعمال المستخلصات النباتية كرد فعل للاستخدام المكثف وغير الواعي للمبيدات الكيميائية كونها صديقة للبيئة وامنه للإنسان والحيوان ولها دور فعال في تثبيط المسببات المرضية وتشجع على تحفيز نمو النبات (28) .لذلك توجهت اهتمامات الباحثين والمختصين والبحوث الحديثة الى استخدام المقاومة الاحيائية كونها من البدائل النظيفة والوسائل الصديقة للبيئة للتقليل من الاثار الضارة للمواد الكيميائية في الزراعة والتربة (9).فقد أشار

(7) الى استعمال العديد من المستخلصات النباتية في مقاومة الفطر *R. solani*.

نظراً لأهمية مرض القشرة السوداء على البطاطا المتسبب عن الفطر *R. solani* ولقلة الدراسات الخاصة بالتغاير الجزئيي لعزلات الفطر أضافه الى استخدام المستخلصات النباتية في المقاومة أجريت هذه الدراسة .

2. المواد وطرائق العمل Materials and Methods

1.2 المسح الميداني لمرض القشرة السوداء على البطاطا المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani*

اجري مسح لعدد من الحقول الزراعية في قضاء العزيزية والصويرة و النعمانية في محافظة واسط التي تزرع فيها البطاطا ومن بعض المخافر الحدودية مع جمهورية ايران الاسلامية وهي مخفر بدرة في محافظة واسط و مخفر الشيب في محافظة ميسان واماكن بيع الخضر والفواكه بالجملة خلال الموسم 2016 - 2017 من عشر مواقع مختلفة لكل منهما لجمع عينات عشوائية من البطاطا المحلية والايرانية المصابة بمرض القشرة السوداء المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani* وكان حجم العينة الواحدة 10 درنات بحيث جمعت ما يقارب 100 درنة مصابة من البطاطا المحلية ومثلها من البطاطا الايرانية ،وقد لوحظت اعراض المرض في الحقول التي شملها المسح والمتمثلة بضعف عام لنمو النبات واصفرار المجموع الخضري والتفاف الاوراق نتيجة اصابة نموات النبات تحت سطح النبات ويمكن تمييز المرض من خلال ظهور علامات المرض على الدرنات بشكل قشور سوداء على سطح الدرنات والتي يصعب ازالتها عند الغسل بالماء وهي عبارة عن الاجسام الحجرية للفطر ،وضعت العينات في أكياس نايلون ونقلت إلى المختبر لغرض عزل وتشخيص العزلات الفطرية المسببة للمرض .

2.2 تقدير نسبة وشدة الاصابة للدرنات المصابة بمرض القشرة السوداء

حسبت الدرنات المصابة والسليمة واستخرجت النسبة المئوية للإصابة كما في المعادلة التالية :

$$\% \text{ للإصابة} = \frac{\text{عدد الدرنات المصابة}}{\text{العدد الكلي للدرنات المفحوصة}} \times 100$$

أما شدة الإصابة أستخدم المقياس المبين في ادناه بعد تصنيف الدرنات المصابة الى خمس فئات اعتمادا على المساحة التي تغطيها الاجسام الحجرية من مساحة السطح الكلي للدرنة وكما يلي : 0= الدرنات السليمة

1 = أكثر من 0 – 20 % 2 = أكثر من 20 - 40 %

3 = أكثر من 40 - 60 % 4 = أكثر من 60 – 80 %

5 = أكثر من 80 – 100 % من مساحة سطح الدرنة مغطى بالأجسام الحجرية(18) . وحسبت النسبة المئوية لشدة الإصابة وفق معادلة Mckinney (1923) .

$$\text{\% لشدة الإصابة} = \frac{(\text{عدد الدرنات في الدرجة}0 \times 0) + (\text{عدد الدرنات في الدرجة }1\times1) + \ldots\ldots\ldots + (\text{عدد الدرنات في الدرجة }5\times5)}{\text{مجموعة الدرنات المفحوصة} \times 5} \times 100\%$$

3.2 عزل وتشخيص الفطر *R.solani* المسبب لمرض القشرة السوداء على البطاطا المحلية والمستوردة من خارج البلد.

جلبت الدرنات المحلية والايرانية المستوردة من خارج البلد المصابة بمرض القشرة السوداء المتسبب عن الفطر *R. solani* من الحقول الزراعية ومن المنافذ والمخافر الحدودية والاماكن التي شملها المسح الى المختبر ثم غسلت بالماء الجاري لمدة 30 دقيقة لأزالة كتل الطين من سطحها ثم غسلت بالماء المقطر لمدة 5 دقائق وأزيل الماء الحر بورق الترشيح المعقم، وفصلت الأجسام الحجرية من مناطق متباينة من سطح الدرنة بواسطة أبرة معقمة وغسلت بالماء المقطر المعقم ونشفت بورق ترشيح معقم . زرعت 4 أجسام حجرية منها في كل طبق بتري ذو قطر 9 سم يحتوي على وسط البطاطا سكروز اكار Potato Sucrose Agar (PSA) .

4.2 اختبار القدرة الامراضية لعزلات الفطر *Rhizoctonia solani* على أنبات بذور وموت بادرات نباتات الفجل في الاصص البلاستيكية

تم اختبار القدرة الامراضية لجميع العزلات الفطرية للفطر *R.solani* والبالغ عددها 50 عزلة منها 25 عزله فطرية عزلت من البطاطا المحلية المصابة و25 عزلة فطرية عزلت من البطاطا الايرانية المصابة ، نفذت هذه التجربة في أصص بلاستيكية سعة 300 غم ، عقمت التربة المستخدمة للزراعة بالكحول الاثيلي تركيز 70% بنسبة 2 مل/كيلو. عبأت في أكياس البولي اثلين تم تقليب التربة مع الكحول ثم أغلقت الاكياس لمدة ثلاثة أيام و بعدها عرضت التربة للشمس لمدة ثلاثة أيام ايضا بعد ذلك وزعت التربة في أصص بلاستيكية بواقع 200غم تربه معقمة لكل اصيص ، لوثت التربة بلقاح عزلات الفطر *R.solani* المنمى على بذور الدخن وبنسبة 1% (وزن/وزن) ورطبت بالماء المقطر المعقم تركت ثلاثة أيام وزرعت التربة الملوثة بـ 20 بذرة من بذور الفجل لكل اصيص وبثلاث مكررات مع معاملة مقارنة تحوي تربة معقمة فقط بدون فطر زرعت فيها البذور ، سقيت الأصص بعد الزراعة وغطيت بأكياس نايلون وبعد الإنبات رفع الغطاء البلاستيكي وحسبت النسبة المئوية لانبات البذور بعد سبعة أيام من الزراعة حسب المعادلة التالية : (15)

$$\text{\% للإنبات} = \frac{\text{عدد البذور النابتة}}{} \times 100$$

عدد البذور الكلي

وبعد اسبوعين من الزراعة حسبت النسبة المئوية للبادرات الساقطة وفق المعادلة التالية :

$$\text{\% لموت البادرات} = \frac{\text{عدد البادرات الساقطة}}{\text{عدد البادرات الكلي}} \times 100$$

5.2التشخيص الجزيئي لعزلات الفطر *Rhizoctonia solani*

1.5.2 استخلاص الحامض النووي منقوص الاوكسجين (DNA) من عزلات الفطر *R. solani*

اجريت عملية تشخيص عزلات الفطر *R.solani* في مختبر علم فايروسات النبات التابع لقسم وقاية النبات/ كلية الزراعة/ جامعة كربلاء. استخلص الحامض النووي (DNA) من 13 عزلة من عزلات الفطر *R. solani* المعزولة في هذه الدراسة من درنات البطاطا المحلية و الايرانية المصابة بمرض القشرة السوداء, اختبرت القدرة الامراضية لها على بذور الفجل تم استخلاص الحامض النووي باستخدام العدة (Cat. No FAPGK100)المجهزة من قبل شركة (Favorgen) تايوان- الصين.

6.2 استخدام تقنيه تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)

7.2 تحليل تسلسل قواعد الحامض النووي (DNA) لعزلات الفطر *R.solani*

اجري اختبار تفاعل البلمرة التسلسلي باستخدام العدة (PCR PreMix, Cat. No. K-2012) المجهزة من قبل شركة Bioneer الكورية المنشأ. نفذ تفاعل البلمرة المتسلسل بحجم 20 مايكروليتر و الحاوية على 1 مايكروليتر (10pomol) من كل من البادئ الامامي (5’- TCCGTAGGTGAACCTGCGG- 3’:ITS1) و الخلفي (5’- TCCTCCGCTTATTG ATATGCI- 3’:ITS4) (27).

اضيف 1 مايكروليتر من الحامض النووي (30 mg / ml). بعد وضع جميع المكونات المطلوبة للتفاعل في الانبوبة المجهزة من قبل الشركة المصنعة و اكمال الحجم بالماء (Nuclease free water) إلى 20 مايكروليتر, تم مضاعفة الحامض النووي للفطر المعزول باستخدام خطوات التفاعل وحسب تعليمات الشركة

تم مضاعفة حزم الحامض النووي DNA المستخلص من الفطريات المعزولة و بشكل منفرد و ارسال نواتج تفاعل (PCR amplicons) البلمرة المتسلسل مع البوادئ الامامية و الخلفية التي استخدمت لمضاعفة حزم الحامض النووي الى شركة Macrogen الكورية لغرض تحديد تسلسل القواعد النايتروجينية للحوامض النووية المضاعفة من العزلات الفطرية لتشخيص الفطر المعزول, ادخل تسلسل الحامض النووي لكل عزلة في قاعدة البيانات المتوفرة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (National Center for Biotechnology Information, NCBl) بأستخدام برنامج BLAST(29).

8.2 تحضير المستخلصات النباتية بطريقة المستخلص المائى الحار

استخدمت المستخلصات النباتية الزنجبيل و القرنفل و القرفة(الدارسين) و النعناع و الزعتر و عرق السوس و البابونج واختبرت فعاليتها بطريقة الاستخلاص المائي الحار عن طريق أضافتها الى الوسط الغذائي بالتراكيز 10 و20 و30 و 50 و 75غم من المادة الجافة المطحونة للنباتات لكل لتر من الماء المقطر بالإضافة الى معاملة المقارنة التي كانت بدون مستخلص وذلك بمزجها مع 200 غم بطاطا مقشرة ومقطعة الى قطع صغيرة و غليت بالماء المقطر بحجم 500 مل لمدة 20 دقيقة في دورق زجاجي وبعد انتهاء مدة الغليان رشح المخلوط في دورق اخر بوساطة قطعة من القماش الشاش (الململ) لفصل العوالق الكبيرة وللحصول على المستخلص الذي يحتوي على مستخلص نباتي ومستخلص البطاطا. اذيب 20 غم من سكر السكروز و 17 غم من الاكار في 500 مل اخرى ثم اضيف اليه مستخلص النبات والبطاطا واكمل الحجم الى 1 لتر , وزع في دوارق زجاجية بحسب الحاجة واغلقت فوهاتها بسداد قطن وعقمت بجهاز المؤصدة بدرجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند /انج 2 لمدة 20 دقيقة وبعد انتهاء مدة التعقيم تركت الدوارق لتبرد ، قبل التصلب اضيف اليها 250ملغم / لتر من المضاد الحيوي Chloramphinicol (23) وصبت الاوساط في اطباق بتري قطر 9 سم بحسب نوع التجربة.

9.2 اختبار تأثير المستخلصات النباتية في نمو الفطر الممرض على الوسط الزرعي PSA

اختبرت فعالية تأثير مستخلصات نباتات الزنجبيل ، القرنفل ، القرفة (الدارسين) ، النعناع ، الزعتر ، البابونج ، عرق السوس كل على انفراد على نمو عزلات الفطر *R. solani* بطريقة الوسط الغذائي المضاف اليه مستخلص النباتات والمحضرة سابقا والتي احتوت على الوسط الزرعي PSA الممزوج بالمستخلص النباتي بعد التعقيم والتبريد صب الوسط الغذائي في أطباق معقمة قطرها 9 سم واستعملت ثلاثة أطباق لكل معاملة كمكررات بالإضافة لمعاملة المقارنة والتي احتوت على الوسط الزرعي PSA فقط بدون مستخلص نباتي وبعد تصلب الوسط لقحت الأطباق في مركزها بقرص قطره 0.5 سم من الوسط الزرعي الحاوي على نموات الفطر *R. solani* الممرض للعزلتين RhB8 و

RhA6وبعمر 5 أيام (17) حضنت الأطباق على درجة حرارة 25+ 2 مْ ونفذت التجربة وفق التصميم العشوائي الكامل واخذت النتائج بعد وصول قطر المزرعة الفطرية لمعاملة المقارنة الى حافة الطبق وذلك بحساب معدل قياس قطرين متعامدين من نمو كل مستعمرة(6) وحسبت النسبة المئوية للتثبيط بأتباع معادلة Abbot الواردة في (3) وكما يلي :

$$\% \text{ للتثبيط} = \frac{\text{معدل قطر مستعمرة المقارنة} - \text{معدل قطر مستعمرة المعاملة}}{\text{معدل قطر مستعمرة المقارنة}} \times 100$$

10.2 تصميم التجارب وتحليلها احصائياً

حللت النتائج باستعمال تجربة عاملية في تصميم عشوائي كامل Factorial Experiment conducted in Complete Randomized Design (بحسب التجربة) بالنسبة لتجارب المستخلصات والمصائد في المختبر , اما بقية التجارب المختبرية فأستخدم التصميم العشوائي(C.R.D) , وقورنت المعدلات على اختبار اقل فرق معنوي L.S.D)(Least Significant)) Difference)) وتحت مستوى احتمالية 0.05 (1).

3. النتائج والمناقشة Results and Discussion

1.3 تقدير نسبة وشدة الاصابة للدرنات المصابة بمرض القشرة السوداء

أظهرت نتائج حساب نسبة الاصابة وشدتها للدرنات المصابة بمرض القشرة السوداء في الجدول 1 ان اعلى نسبة وشدة للأصابة كانت للدرنات المحلية المصابة أذ بلغت 80 و 45.8 %على التوالي بينما كانت للدرنات الايرانية المصابة 70 و41.6 % على التوالي . وربما يعود السبب في ظهور الاصابة المتكرره الى اعادة زراعة المحصول في نفس الارض مما ادى الى زيادة كمية اللقاح الفطري في الحقول المزروعة بالبطاطا (2).

جدول (1) النسبة المئوية للإصابة وشدتها للدرنات المحلية والايرانية المصابة بمرض القشرة السوداء المتسبب عن الفطر *R .solani*

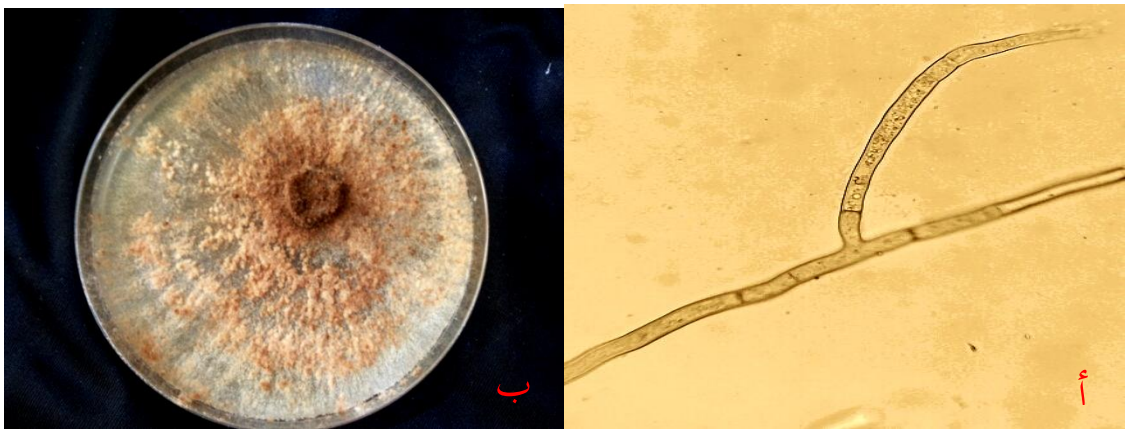
نوع العينة	نسبة الاصابة (%)	شدة الاصابة (%)
الدرنات المحلية	80	45.8
الدرنات الايرانية	70	41.6

2.3 عزل الفطر *Rhizoctonia solani* المسبب لمرض القشرة السوداء على البطاطا المحلية والايرانية .

بينت نتائج العزل من البطاطا المحلية والايرانية المصابة بمرض القشرة السوداء الحصول على 50 عزلة من الفطر *R .solani* والتي نميت على الوسط الزرعي PSA ،حيث وزعت الى 25 عزلة فطرية معزولة من البطاطا المحلية المصابة بمرض القشرة السوداء واعطيت الرمز(RhA) وحسب أولوية العزلات المحلية فقد اعطيت الأرقام التالية من 1-25وهي RhA1، RhA2، RhA3، RhA4، RhA5، RhA6، RhA7، RhA8، RhA9، RhA10، RhA11، RhA12، RhA13، RhA14، RhA15، RhA16، RhA17، RhA18، RhA19، RhA20، RhA21، RhA22، RhA23، RhA24، RhA25 و25عزلة فطرية عزلت من البطاطا الايرانية المصابة بمرض القشرة السوداء واعطيت الرمز (RhB) وحسب أولوية العزلات الايرانية فقد اعطيت الأرقام 1-25وهي RhB1، RhB2، RhB3، RhB4، RhB5، RhB6، RhB7، RhB8، RhB9، RhB10، RhB11، RhB12، RhB13، RhB14، RhB15، RhB16، RhB17، RhB18، RhB19، RhB20، RhB21، RhB22، RhB23، RhB24، RhB25 .

3.3 تشخيص الفطر *Rhizoctonia solani*

شخص الفطر *R.solani* بالاعتماد على المظهر الخارجي والتشخيص المجهري ،اذ بينت نتائج الفحص المجهري لعزلات الفطر التي تم الحصول عليها وجود غزل فطري شفاف ومقسم ذي لون ابيض ثم تحول بعدها الى اللون البني ومن ثم الى اللون البني الداكن, وللغزل الفطري تفرعات كثيرة وذات خلايا قصيرة ، كما يوجد تخصر للفروع الفطرية عند منطقة تفرعها من الاصل وتشكل مع الفرع الرئيسي زاوية قائمة اي تكون بشكل حرف T, وتكوين حواجز في الفروع قرب منطقة التفرع يحتوي على نواة او نواتينكما موضح في الصورة (1- أ) , وقد كونت بعض العزلات التي تم الحصول عليها أجساما حجرية بنية اللون داكنة ذات شكل مستدير وحجم صغير, كما لوحظ تكون خلايا برميلية الشكل وبهيئة سلاسل أو تجمعات في أماكن تكوين الأجسام الحجرية. إن كل هذه الصفات التي أمكن مشاهدتها عند الفحص تحت المجهر تنطبق على خواص وصفات الفطر *R. solani* (22) كما موضح في الصورة (1- ب).



صورة (1) بعض الصفات التشخيصية المميزة للفطر
أ. الغزل الفطري للفطر *R. solani* ب .مستعمرة الفطر نميت على الوسط الزرعي PSA

4.3 تـاثير عـزلات الفطـر *Rhizoctonia solani* على أنبات بذور وموت بادرات نباتات الفجل في الاصص البلاستيكية

تشـيرنتائج اختبـار القـدرة الامراضـية لجميـع العـزلات الفطريـة المعزولـة مـن درنـات البطاطـا المحليـة والايرانيـة المصـابة البـالغ عـددها 50 عزلـة المذكورة فـي الفقره 2.3 باستعمال بذور الفجل كما موضح في جدول 2 على وجود فروق معنوية بين معظم عزلات الفطر *R.solani* في اختبـار النسبة المئويـة لانبـات بـذور الفجـل قياسـا بمعاملة المقارنة والتي بلغت 95%، فبالنسبة الـى عـزلات الفطـر المعزولـة مـن البطاطـا المحليـة المصابة فقد تراوحت النسبة المئوية للإنبات بين 56.67- 98.33 % ووجد هنـاك فروقـات معنويـة للعـزلات RhA1، RhA4، RhA5، RhA6، RhA7، RhA9، RhA14، RhA15 ، RhA17وRhA19 أمـا بقيـة العزلات لم تظهر فروقـات معنويـة قياسـا بمعاملـة المقارنـة. فقـد تفوقـت العـزلتين RhA4،RhA6 علـى جميـع العزلات المختبرة فكانت اكثرها تأثيرا في خفض النسـبة المئويـة للإنبـات حيـث بلغـت 56.67 و 65% علـى التـوالي بينمـا العزلـة RhA2 حققت زيـادة فـي نسـبة الانبـات بلغـت 98.33 % قياسـا بمعاملـة المقارنـة التـي بلغت 95 % ،امـا بالنسـبة الى عزلات الفطر المعزولة من البطاطا الايرانية المصابة فقد تراوحت النسبة المئوية للإنبات بين 78.33- 96.67% . اظهرت النتائج ايضاً وجود فروقـات معنويـة لعـزلات RhB1،RhB5، RhB8، RhB9، RhB11، RhB12 ، RhB15، RhB16 وRhB25 أمـا بقيـة العزلات لم تظهر فروقات معنوية قياسا بمعاملة المقارنـة التـي بلغـت95 %.اذ تبـين إن العـزلات RhB5،RhB9 وRhB16 مـن اشـد العـزلات تأثيراً فـي خفض النسبة المئوية للإنبات أذ بلغت 80 ، 80، 78.33 % علـى التـوالي مقارنـة بالعزلـة RhB21 التـي شـجعت نسـبة الانبـات اذ بلغت 96.67 % قياسا بمعاملة المقارنة.

أوضـحت النتـائج وجـود فروقـات معنويـة لمعظم العزلات الفطرية المتداخلة و المعزولة من البطاطا المحلية والايرانية في انبات بذور الفجل حيـث أن العزلـة المحليـة RhA6 كانـت أكثرهـا قدرة في خفض عدد بذور الفجل النابتة إذ بلغت

النسبة المئوية لإنبات البذور56.67 % بينما كانت العزلة المحلية RhA2 أقل العزلات الفطرية تأثيرا في انبات بذور الفجل إذ بلغت النسبة المئوية لإنبات البذور98.33% ، وتتفق هذه النتائج مع دراسات عديدة أشارت إلى قدرة الفطر *R. solani* على خفض النسبة المئوية لإنبات بذور الفجل (20). إنَ قدرة الفطر *R. solani* على قتل بذور الفجل قد يعود إلى غزو هايفات الفطر لأغلفة البذور والنمو بين حبيبات النشا وإفراز أنزيمات amylases وبالتالي قتل الخلايا وتحول البذور إلى لون بني غامق (21) . ذكر (13) قدرة الفطر*R.solani* على افراز السموم النباتية والتي تعتبر نواتج الايض الثانوية مثل الاحماض الدهنية والاحماض الكاربوكسيلية والفينولية التي تمنع نمو البذور و تسبب موت البادرات

اما فيما يخص تأثير عزلات الفطر *R.solani* في النسبة المئوية لموت البادرات كما موضح في الجدول (2) فقد أظهرت النتائج وجود فروقات معنوية واضحة بين فئتي العزلات الفطرية المحلية RhA والايرانية RhB في النسبة المئوية لموت البادرات قياسا بمعاملة المقارنة التي لم يحدث فيها موت ، فبالنسبة الى عزلات الفطر المعزولة من البطاطا المحلية المصابة فقد كانت النسبة المئوية لموت البادرات قد تراوحت بين 15.2-93.3% ووجد هناك فروقات معنوية بين عزلات الفطر باستثناء العزلة RhA2 لم تظهر فروقات معنوية لها فقد اعطت اقل نسبة موت في البادرات حيث بلغت 15.2% في حين تفوقت العزلة RhA6 على بقية العزلات في مقدرتها الامراضية أذ بلغت النسبة المئوية لموت البادرات 93.3% قياسا بمعاملة المقارنة .

اما عزلات الفطر المعزولة من البطاطا الايرانية المصابة وجد هناك فروقات معنوية عالية بين العزلات في النسبة المئوية لموت البادرات ،حيث تراوحت النسبة المئوية لموت البادرات بين 25 - 87.6 % وتبين إن العزلة RhB8 كانت اكثر العزلات تاثيراً في موت البادرات فقد تفوقت في مقدرتها الامراضية حيث بلغت 87.6% قياسا بمعاملة المقارنة التي لم يحدث فيها موت اما العزلة RhB3 فقد حققت اقل نسبة مئوية في موت البادرات حيث بلغت 25%. وهذا يؤكد ان عزلات الفطر *R.solani* المعزولة من البطاطا المحلية المصابة اشد تاثيراً واكثر امراضية من تلك العزلات التي عزلت من البطاطا الايرانية المصابة وهذا يعود الى الظروف البيئية التي زرعت فيها البطاطا إذ ان الظروف البيئية في العراق اكثر حرارة مما اعطاها صفة تحمل اكثر من العزلات الايرانية .

جدول (2) تأثير عزلات الفطر *R.solani* على أنبات بذور وموت بادرات نباتات الفجل *Raphanus sativus*

رقم العزلة	%انبات البذور		معدل انبات البذور	رقم العزلة	%موت البادرات		معدل موت البادرات
	العزلة المحلية A	العزلة الايرانية B			العزلة المحلية A	العزلة الايرانية B	
Rh1	76.67	81.67	79.17	Rh1	42.2	82.7	62.4
Rh2	98.33	90	94.17	Rh2	15.2	55.3	35.3
Rh3	93.33	91.67	92.50	Rh3	56.7	25	40.8
Rh4	65	88.33	76.67	Rh4	59	59.7	59.3
Rh5	75	80	77.50	Rh5	31.3	50.3	40.8
Rh6	56.67	93.33	75.00	Rh6	93.3	35.3	64.3
Rh7	83.33	90	86.67	Rh7	54.8	52.2	53.5
Rh8	90	81.67	85.83	Rh8	57.2	87.6	72.4
Rh9	81.67	80	80.83	Rh9	65.5	58.7	62.1
Rh10	96.67	86.67	91.67	Rh10	36.2	61.7	48.9
Rh11	91.67	81.67	86.67	Rh11	61.8	51.5	56.7
Rh12	91.67	83.33	87.50	Rh12	63.7	46.3	55.0
Rh13	88.33	91.67	90.00	Rh13	26.3	29	27.7
Rh14	83.33	93.33	88.33	Rh14	28.3	28	28.2
Rh15	80	83.33	81.67	Rh15	48	66.2	57.1
Rh16	85	78.33	81.67	Rh16	35	48.5	41.8
Rh17	68.67	91.67	80.00	Rh17	41	27	34.0
Rh18	90	90	90.00	Rh18	41	39.7	40.3
Rh19	83.33	91.67	87.50	Rh19	37.5	49.7	43.6
Rh20	88.33	91.67	90.00	Rh20	29.3	34.3	31.8
Rh21	85	96.67	90.83	Rh21	68.2	42	55.1
Rh22	86.67	93.33	90.00	Rh22	29	75.9	52.5
Rh23	90	85	87.50	Rh23	23.8	55	39.4
Rh24	88.33	91.67	90.00	Rh24	18.7	54.7	36.7
Rh25	91.67	83.33	87.50	Rh25	50.7	76.3	63.5
Control	95	95		Control	0	0	
المعدل	84.74	87.88		المعدل	42.8	49.7	
L.S.D(0.05) للفطر	3.22			L.S.D(0.05) للفطر	4.77		
L.S.D(0.05) للعزلات	11.61			L.S.D(0.05) للعزلات	17.19		
L.S.D(0.05) للتداخل	16.42			L.S.D(0.05) للتداخل	24.31		

5.3 اختبار تأثير المستخلصات النباتية في نمو الفطر الممرض *R. solani* على الوسط الزرعي PSA

تشير النتائج الموضحة في جدول (3) الى وجود تباينا واضحا بين المستخلصات النباتية في مدى تأثيرها التثبيطي على نمو عزلتي الفطر فقد أظهرت نتائج الدراسة تفوق مستخلص القرنفل بالتراكيز 30 و 50 و 75غم / لتر في تثبيط عزلتي الفطرRhA6 وRhB8 بالكامل حيث بلغت 100%مقارنة ببقية المستخلصات النباتية وقياسا بمعاملة المقارنة ، ويأتي بعدها مستخلص القرفة (الدارسين) بالتركيز 75غم / لتر، اذ حقق اعلى فعالية تثبيطية في نمو العزلتين RhA6 وRhB8 حيث بلغت النسبة المئوية للتثبيط 100 % وبفروقات معنوية عالية قياسا بمعاملة المقارنة، أما مستخلصي الزنجبيل و النعناع فقد حققا اقل فعالية تثبيطية لعزلتي الفطرRhA6 وRhB8 اذ انهما لم تسجلاً تثبيطاً لعزلات الفطر لجميع التراكيز ماعدا التركيز 75غم / لتر ،أما مستخلصات عرق السوس والزعتر والبابونج فلم تحقق اي فعالية تثبيطية اطلاقا وبجميع التراكيز .

بينت كثير من الابحاث والدراسات ان الفعالية التثبيطية لهذه المستخلصات النباتية ضد العديد من الاحياء المجهرية والمسببات المرضية ومنها الفطريات جاءت لكون هذه المستخلصات تحتوي على المواد الفعالة مثل الكلايكوسيدات ،الراتنجات ،الفينولات ،الصابونيات ،والتانينات والقلويدات ،التربينات والستيرولات (5).وقد فسر (26) على ان التأثير المثبط لهذه المستخلصات قد يكون ناجماً عن تأثيرها في تغير نفاذية جدران الخلية او تأثيرها في منع نمو الخيط الفطري في مراحله المبكرة مما يؤدي الى تثبيط نمو هذه الفطريات.

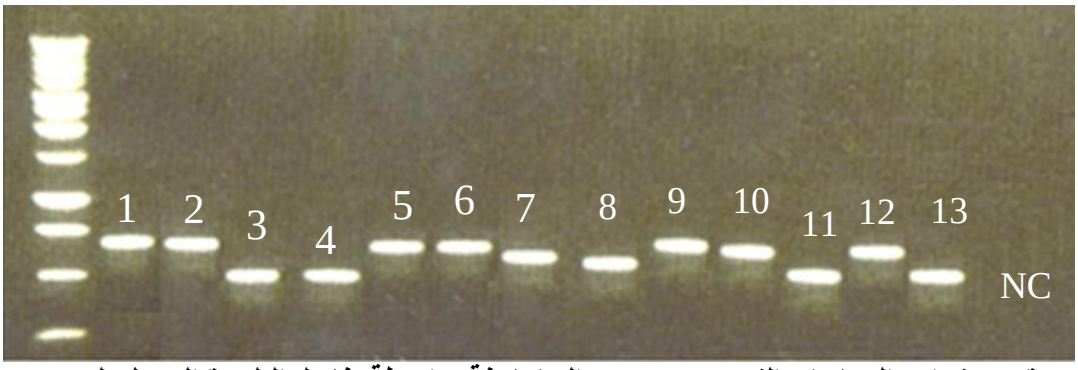
يعزى تأثير المستخلص المائي الحار للقرنفل في نمو الفطر الممرض *R. solani* الى وجود القلويدات والتانينات ذات الخاصية المطهرة في المستخلص المائي الحار للقرنفل مثل البينين و فانيلين والاوجينول (14) ، اما مستخلص القرفة (الدارسين) فان الفعالية التثبيطية له على نمو الفطر*R. solani* تعود الى المحتويات الفعالة من المواد التي يحتويها المستخلص اذ ان القرفة (الدارسين) غني بالكلايكوسيدات والتانينات والصابونيات والراتنجات والفينولات الفعالة ضد الاحياء المجهرية سواء كانت فطرية او بكتيرية (10) .

جدول (3) تأثير تراكيز مختلفة من المستخلصات النباتية على نمو عزلتي الفطر *R. solani*

المستخلص	التركيز غم/ لتر	العزلة المحلية RhA6	العزلة الايرانية RhB8	المعدل
القرنفل	0	0	0	0
	10	7.33	100	53.67
	20	77.77	100	88.88
	30	100	100	100
	50	100	100	100
	75	100	100	100
	المعدل	64.81	83.33	
الدارسين	0	0	0	0
	10	0	29.33	14.67
	20	0	56	28
	30	19.67	81.20	50.43
	50	41.60	90	65.80
	75	100	100	100
	المعدل	26.88	59.42	
الزنجبيل	0	0	0	0
	10	0	0	0
	20	0	0	0
	30	0	0	0
	50	0	0	0
	75	5	9.20	7.10
	المعدل	0.83	1.53	
النعناع	0	0	0	0
	10	0	0	0
	20	0	0	0
	30	0	0	0
	50	0	0	0
	75	5	24.3	14.52
	المعدل	0.83	4.01	
LSD(0.05)	للمستخلص	4.86		
LSD(0.05)	للتركيز	5.95		
LSD(0.05)	للفطر	3.43		
LSD(0.05)	للتداخل	16.84		

6.3 التشخيص الجزيئي لعزلات الفطر *R.solani* باستعمال تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي Polymerase chain (reaction)(PCR))

اظهرت نتائج استخلاص الحامض النووي (DNA) من عزلات مختلفة تابعة للفطر *R. solani* و تعريضه الى تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) امكانية مضاعفة نواتج الحامض النووي DNA (PCR-amplified products) و باحجام تراوحت بين 500-800 قاعدة نايتروجينية (bp) و باستخدام البوادئ الامامية و الخلفية (ITS1 و ITS4) (صوره 2)



صورة (2) نواتج الحامض النووي (DNA) المضاعفة بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) من عزلات الفطر *R. solani*; (1) RhA9 و (2)RhA12 و (3)RhA13 و (4)RhA21 و (5) RhA23 و (6)RhB22 و (7)RhB13 و (8)RhB17 و (9)RhA24 و (10)RhB1 و (11) RhB8 و (12)RhB23 و (13) RhA2 : M= marker; 1Kp DNA ladder :NC: معاملة مقارنة (Negative control).

كما بينت نتائج تحليل تسلسل القواعد النايتروجينية (Nucleotide sequence analysis) لنواتج الحامض النووي المضاعفة من العزلات الفطرية وباستخدام برنامج BLAST لمقارنتها مع البيانات المتوفرة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) أن جميع العزلات الفطرية هي عائدة الى الفطر *R. solani*.

اظهرت النتائج ان عزلات الفطر RhA13، RhA21، RhA23، RhB22 ، RhB13 وRhA24 كانت الاقرب تشابها وراثيا و بنسبة 100% مع العديد من العزلات المسجلة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) كما اثبتت نتائج البحث وجود اختلافات وراثية بين عزلات الفطر RhA9 ، RhA12، RhB17، RhB1 ، RhB8، RhB23 و RhA2 مع العزلات المسجلة في المركز المذكور. لوحظ من خلال المقارنة بين التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي لعزلات الفطر *R. solani* المعزولة من درنات البطاطا المحلية والايرانية المصابة بمرض القشرة السوداء ان اعلى نسبة تشابه وراثي بلغت 99% مع العزلات الاخرى التابعة لنفس الفطر و المسجلة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI). وتعتبر العزلات المشخصة في هذه الدراسة هي عزلات جديدة غير معروفة سابقا في العالم و تم تسجيلها لأول مره في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) تحت ارقام الادخال (GenBank Accession Numbers) MF497738)

وMF497739 وMF497740 وMF497741 و MF497742 وMF497743 وMF497744) على التوالي

4 . المصادر References

1. الراوي ، خاشع محمود وعبد العزيز محمد خلف الله . (2000) . تصميم وتحليل التجارب الزراعية. كلية الزراعة. الطبعة الثانية . جامعة الموصل.. جمهورية العراق. 487 صفحة

2. خليل ,أبراهيم حسون. 2005. المكافحة البايلوجية و الكيميائية لمسبب مرض تقرح ساق البطاطا *Rhizoctonia solani* أطروحة دكتوراه. كلية الزراعة. جامعة بغداد ص 45.

3. شعبان، عواد ونزار مصطفى الملاح (1993). المبيدات.دار الكتب للطباعة والنشر . جامعة الموصل 530صفحة

4. العزيز ,فاروق عبد طه. 2007. تأثير السماد البوتاسي وتغطية التربة في ثلاث اصناف من البطاطا المزروعة في محافظة البصرة .اطروحة دكتوراه .كلية الزراعة .جامعة البصرة.

5. حسان ،قبيسي 2007. معجم الاعشاب والنباتات الطبية ، دار الكتب العلمية ،بيروت .لبنان.

6. كريم، طارق عبد السادة (2000). فعالية مستخلصات البراعم الزهرية للقرنفل ضد مسببي مرض سقوط البادرات *Rhizoctonia solani* و *Phytophthora infestans* على الخيار. قسم وقاية النبات. كلية الزراعة- جامعة بغداد.

7. الشطي ، حبيب مالك وصباح رشيد وقيثار مجيد (2005). تأثير الفعالية التضادية لبعض المستخلصات النباتية على نمو بعض الأحياء المجهرية . مجلة التقني . البحوث الزراعية . 18

8. سلامه، محمود محمود (2005). الاستفادة من مخلفات زراعة البطاطس (درنات وعروش) في تغذية حيوانات المزرعة .مجلة الحوار المتمدن .العدد (1289) .القاهره. مصر.

9. العزيز ، محمود عبد السميع .يحيي عبد مصطفى ،هشام عبد الرزاق (2008). التقنية الحيوية (اسس وتطبيقات) كلية الزراعة جامعة الاسكندرية .جمهورية مصر العربية .

10.Abad El-Rahim, M . A. El- Samawaty Mohamed A. Yassin, Mohamed A Moslem and Moawad R. Omar. (2013). Effectiveness of Some Plant Extracts against *Fusarium spp*.Causing Cotton .Seedlings Damping -0ff. Life Science Journal;10(4)

11.Alhussaini, M.S; Moslem, M. A.; Alghonaim, M. I.; Al-Ghanayem, A. A.; AL-Yahya, A. A.I.; Hefny, H. M. and Saadabi, A. M. (2016). Characterization of Cladosporium species by internal transcribed spacer-PCR and microsatellites-PCR. Pakistan Journal of Biological Sciences, 7: 143-157.

12.Al-Sanae, E. A. M.; Afaf I.; Shehata, A. H.; Mohammed A. and Amal A. A. (2016). Molecular Detection and Characterization of *Fusarium sporotrichioides* based on ITS2 rDNA. *Polymorphism. Human Journals*, 2(3): 365-376.

13.Bcling, C; Nature. G.(1961). Phytotoxic Metabolites of *Rhizoctonia solani*. Department of Growth and Development. Institute of Child Health .University of London. Hospital for Sick Children

14.Bowers,J.H. and James,C.L.(2000). Effect of botanical extract on the population density of *Fusarium oxysporum* in soil and control of Fusarium wilt in the green house Journal of the American oil chemists Society .84(3):300-305

15.Bolkan , H.H.; and E.E. Butler. (1974). Studies on Heterokaryosis virulence of Rhizactonia solani. Phytopathology.64: 513-522.

16.Carling, D. E., R. H. Leiner and P. C Westphale . (1989) . symptoms, signs and yield reduction associated with Rhizoctonia disease of Potato induced tuberborne inoculum of R. solani AG3. Potato J. 66 : 693 – 701

17.Dixit , S. N. ; Tripathi , S. C. ; and Upadhyay, R. R. (1976). The antifungal of rose flowers Rosa indica. Economics Botany30: 371–374

18. Hall, B., Davies, K., and Wicks, T., (2001). Biological and Chemical control of *Rhizoctonia solani* Australain plant pathology, 12 : pp49.

19.Hane, J.K, Anderson JP, Williams AH, Sperschneider J, Singh KB .(2014).Genome Sequencing and Comparative Genomics of the Broad Host-Range Pathogen Rhizoctonia solani AG8. Plos Genetics. 2014;10(5). doi: 10.1371/journal.pgen.1004281 .

20.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

21.Mahmoud, Y. G.; Gaafar , R. M. and Mubarak , H. M. (2007). Genetic Diversity among nile delta isolates of Rhizoctonia solani Kuhn based on Pathogenicity, Compatibility, Isozyme Analysis and total protein pattern. Journal Botany. 31: 19-29 .

22.Parmeter, J. R. and Whitney, H. S. (1970). Taxonomy and Nomenclature of the imperfect stage In: Rhizoctonia solani Biology and Pathology. (ed.) J. R. Parmeter. University of California Barkely. Los Angeless PP : 7 – 19.

23.Seema,M.,S.Reenivas,S.S.Rekha.N.D. and N.S.Deraki.(2011). Invitro studies of some plant extracts against Rhizoctonia solani Kuhn Infection FCV tobacco in Karnataka Light Soil,Karnataka,India. Journal of Agricultural Technology vol.7(5):1321-1329.

24.USDA United States Department of Agriculture .(2014). Agriculture Research Service Food Composition Databases Nutrient data laboratory". June.

25.USAID United States Agency International Development .(2011) .info@inma-iraq.com.13

26.Wen-Bao, C. Yuh-Felling, H. Shung, C.J. and Sheno, C.C. (2000). Isolationpurification and characterization of killer protein from Schwanniomyces occidentalis Appl. Environ. Microbiol. 66(12): 5348-5352.

27. White, T. J., T.Bruns, S. Lee and J.Taylor(1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylo genetics. Pages 315-322 in: PCR Protocols. a Guide to Methods Applications. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and J. White, eds. Academic Press, San Diego, CA.

28.Yassin, M.A., Moslem, M.A., El Samawaty,A.M.A., El-Shikh, M.S.(2013). Effectiveness of Allium sativum in Controlling Sorghum Grain Molding Fungi. J. Pure Appl. Microbiol 101:(1)

29.Zheng, Z. X. and Shetty, K. (2000). Enhancement of Pea (Pisum Sativum) Seedling vigor and associated phenolic content by extracts of apple pomace fermented with Trichodema spp Process Biochemistry. 36 (1 - 2): 79 - 84.