التشخيص الجزيئي لعزلات مختلفة من الفطر *Rhizoctonia solani* Kühn

عقيل نزآل العابدي[1] كريم عبدالحسين الشجيري[2] نعيم عبدالامير الحدراوي[3]

رجاء غازي الجنابي [1]

[1] قسم وقاية النبات-كلية الزراعة-جامعة كربلاء
[2] قسم الانتاج النباتي-المعهد التقني المسيب-جامعة الفرات الاوسط
[3] متوسطة الاصلاح المختلطة- مديرية التربية العامة في محافظة النجف الاشرف
البريد الالكتروني: aqlabedy@yahoo.co.uk

الخلاصة:

نفذت هذه الدراسة في مختبر علم فايروسات النبات التابع لقسم وقاية النبات في كلية الزراعة-جامعة كربلاء بهدف عزل و تشخيص ثلاث عزلات من الفطر *Rhizoctonia solani* باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase chain reaction, PCR) و تحديد التتابع النيوكلوتيدي (Nucleotide sequence) لحزم الحامض النووي المضاعفة باستخدام البواديء ITS1 و ITS4. اثبتت نتائج تحليل التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي المضاعفة و باستخدام برنامج BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ان عزلات الفطريات المشخصة هي عائدة الى الفطر *R. solani*. كما وجد من خلال مقارنة التتابع النيوكلوتيدي (Nucleotide sequence analysis) مع البيانات المتوفرة في قاعدة المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (National Center for Biotechnology Information, NCBI) ان عزلتين من بين العزلات الثلاثة للفطر *R. solani* هي عزلات غير معروفة سابقا و قد تم تسجيلها في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) / امريكا تحت ارقام الادخال (GenBank accession No.) KY05574 و KY283953 .

Molecular identification of different *Rhizoctonia solani* Kühn isolates

Aqeel N. AL-Abedy[1] Kareem A. Al-Shujayri[2] Naeem A. Alhadrawi[3]

Rajaa G. AL-Ganabi[1]

[1] Plant Protection Department-Agriculture College-Karbala University
[2] Department of Plant Production-Technical Institute-Musayyib-AL-Furat Al-Awsat University
[3] Al-Islah Secondary School-The General Directorate of Education in Najaf Province

Corresponding author: aqlabedy@yahoo.co.uk

Summary:

This study was carried out in the Plant Virology Laboratory of Plant Protection Department in the College of Agriculture- Karbala University with the aim of isolating and molecularly identifying three isolates of *Rhizoctonia solani* using the polymerase chain reaction (PCR) technique using the universal primers ITS1 and ITS4 and determining the nucleotide sequence of PCR-amplified products. Results, obtained from the PCR amplification and analysis of nucleotide sequences of PCR-amplified products and using BLAST program (Basic Local Alignment Search Tool), showed that all three isolated fungi were belonged to the fungus *R. solani*.

From the comparison of the nucleotide sequences obtained from the identified fungal isolates with the nucleotide sequences available at the National Center for Biotechnology Information (NCBl), it was revealed that two of the identified fungal isolates of *R. solani* were not previously recorded at NCBI. Therefore; the identified sequences of *R. solani* has been deposited and recorded in GenBank database (NCBI) under the GenBank accession numbers: KX255861and KX555634.

المقدمة

تتواجد الفطريات في كل النظم البيئية من الصحاري الجافة حتى المحيطات و بأعداد قد تصل إلى خمسة أمثال أعداد أنواع النباتات، كما أن معظم البلدان التي تقع جنوب الإقليم العالمي المعتدل تفتقر إلى تعريف الفطريات وهذا يعكس الرأي العام العالمي أن 95 ٪ من أنواع الفطريات لا يزال مجهولا منتظرا الكشف عنه (8 و 11). تعد التربة المستودع الرئيسي لجميع الكائنات الحية المجهرية و منها فطريات التربة الممرضة و منها الفطر *Rizoctonia solani* و الذي يعتبر من اشد و اخطر الفطريات ضررا على المحاصيل الزراعية, اذ انها تتواجد بصورة بعيدة عن منظور الانسان و عادة ما تظهر اعراضها المرضية على النباتات بعد ان تكون قد فتكت تماما بمجموعها الجذري, و مما يزيد من خطورتها اتساع مداها العائلي, كما ان لها القدرة على تحمل الظروف البيئية المتطرفة (4 و 6).

ان الحاجة الى التصنيف الدقيق للفطريات تعد من الحاجات الملحة لأهميته في الوصول الى طرق كفؤة لإدارة المرض. لوحظ من نتائج دراسات سابقة بأن الاعتماد على الصفات المظهرية (Morphological characteristics) في تصنيف الفطريات قد يعطي نتائج دقيقة احيانا' الا ان الكثير من الباحثين لا يعول عليها كونها تحتاج الى خبرة كافية في مجال التصنيف و خاصة في المجاميع الفطرية المتقاربة الشبه الى حد كبير اضافة الى احتياجها الى وقت و جهد كبيرين, فضلا عن كونها غير دقيقة بسبب تأثرها بعوامل البيئة التي تؤثر على حجم و اشكال و ألوان الابواغ و المستعمرات الفطرية (10 و 15 و 16 و 17).

اسهمت تقانات التصنيف المعتمدة على البيولوجيا الجزيئية (Molecular biology)بدقتها و حساسيتها وقدرتها على الكشف و دراسة الاختلافات الوراثية و التخلص من سلبيات الطرق التقليدية في تشخيص العديد من الكائنات الحية (7 و 14). تعد تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل للبوليمريز (Polymerase chain reaction, PCR) واحدة من التقنيات الجزيئية المعتمدة على انتخاب و تضخيم منطقة محددة من جينوم الكائن الحي بالاعتماد على الاختلافات الموجودة في تسلسل الحامض النووي (DNA) لتلك المنطقة و بالتالي معرفة العلاقات الوراثية بين انواع الفطريات و دعم التشخيص

المظهري للفطر المدروس (3 و 5). استخدمت هذه التقنية في تشخيص العديد من الاحياء المجهرية و منها الفطريات (1 و 2 و 4 و 12). نظرا لأهمية التصنيف الدقيق للفطريات, فقد هدفت هذه الدراسة الى تشخيص ثلاث عزلات من الفطر *R. solani* جزيئيا باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) و تحديد التتابع النيوكلوتيدي و معرفة أوجه التشابه و الاختلاف الوراثي بين عزلتي الفطر و العزلات الاخرى المعروفة عالميا.

المواد وطرائق العمل

مصدر عزلات الفطر *R. solani*

جمعت عينات من جذور بعض نباتات الطماطة التي ظهرت عليها اعراض اصفرار و ذبول من بعض مزارع المنطقة الصحراوية في محافظتي النجف و كربلاء و كذلك من البيت البلاستيكي التابع لكلية الزراعة-جامعة كربلاء و جلبت الى مختبر فايروسات النبات في قسم وقاية النبات في كلية الزراعة/ جامعة كربلاء لغرض اجراء عملية العزل. وضعت الجذور النباتية تحت ماء الحنفية لمدة 30 دقيقة و بعدها قطعت الى قطع صغيرة و غسلت بالماء الجاري مرة اخرى لإزالة الأتربة العالقة بها ثم عقمت بمحلول هايبوكلورايت الصوديوم (1%) لمدة دقيقتين و بعدها غسلت بماء مقطر معقم ونشفت بورق ترشيح لإزالة الماء الزائد منها. زرعت القطع النباتية في أطباق بتري حاوية على وسط البطاطا سكروز Potato Sucrose Agar, PSA) المضاف إليه المضاد الحيوي كلورام فينكول (Chloramphenicol) بتركيز 200 ملغم/ لتر ثم حضنت في درجة حرارة 25± 2 ْم لمدة اربعة ايام. تم تنقيته عزلات الفطر *R. solani* على نفس الوسط الغذائي (PSA) بإتباع طريقة طرف الهايفا (Hyphal Tip). شخص عزلات الفطر *R. solani* بالاعتماد على تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) و تحديد تسلسل القواعد النيتروجينية (Nucleotide sequence) وفقاً لطريقة العمل الموصوفة لاحقا.

التشخيص الجزيئي للفطر *R. solani*

استخلاص الحامض النووي منقوص الاوكسجين (DNA)

استخلص الحامض النووي (DNA) للعزلات الفطرية و فق الطريقة الموصوفة من قبل شركة Zymo Research -الامريكية و

باستخدام العدة (Cat. No. D6005) المجهزة من قبل الشركة المذكورة.

تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)

اجري اختبار تفاعل البلمرة التسلسلي باستخدام العدة (Maxime PCR PreMix (i-Taq), Cat. No. 25026) المجهزة من قبل شركة iNtRoN الكورية المنشأ. نفذ تفاعل البلمرة المتسلسل بحجم اجمالي 20 مايكروليتر و الحاوي على 1 مايكروليتر من كل البادئ الامامي (TCCGTAGGTGAACCTGCGG :ITS1) و الخلفي (TCCTCCGCTTATTGATATGC :TS4) و1 مايكروليتر من الحامض النووي المستخلص. وضعت جميع المكونات المذكورة اعلاه في الانبوبة المجهزة من قبل الشركة المصنعة و اكمل الحجم بالماء (Nuclease-free water) إلى 20 مايكروليتر. تم مضاعفة الحامض النووي (DNA) للفطريات المعزولة باستخدام خطوات و ظروف تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) المبينة في جدول (1).

جدول1: خطوات و ظروف تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) المستخدمة لمضاعفة الحامض النووي (DNA) للفطريات المعزولة في هذه الدراسة { Zhang و اخرون (17)}.

Table 1: Steps and conditions of polymerase chain reaction (PCR) used for amplifying DNAs of fungi isolated in this study (Zhang *et al.*, 17).

خطوات تفاعل البلمرة المتسلسل	درجة الحرارة (م°)	الوقت	عدد الدورات
مسخ الـ DNA الاولي (Initial denaturation)	94	5 دقائق	1
مسخ الـ DNA النهائي (Final denaturation)	94	40 ثانيه	35
ارتباط البادئ (Primer annealing)	55	40 ثانيه	
استطالة البادئ (Initial extension)	72	1 دقيقة	
استطالة البادئ النهائية (Final extension)	72	5 دقيقة	1
Hold	4	غير محدود	

اضيف 10 مايكروليتر من الحامض النووي المضاعف بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) الى كل حفرة (Well) من حفر طبقة هلام الاكاروز المحضرة سابقا. كما و تم اضافة 5 مايكروليتر من معلم الحامض النووي DNA (1Kbp DNA ladder marker) الى الحفرة الموجودة في الجانب الايسر من العينات المضافة لغرض تحديد احجام الحامض النووي المضاعف. أوصلت أقطاب مجهز الطاقة (Power supply) بالتيار الكهربائي و شغل على 150 ملي امبير و لمدة ساعة واحدة. بعد اكمال عملية ترحيل العينات, فحصت طبقة هلام الاكاروز الحاوية على حزم الحامض النووي تحت الاشعة فوق البنفسجية (UV transillumination) و اخذت صور لها.

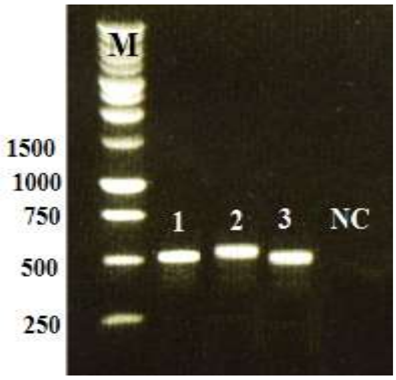
تحليل تسلسل قواعد الحامض النووي (DNA) للفطريات الممرضة

تم ارسال نواتج الحامض النووي (PCR amplicons) المضاعفة من الفطريات المعزولة بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) مع البوادئ (ITS1 و ITS4) الى شركة Macrogen الكورية لغرض تحديد التسلسل النيوكلوتيدي (Nucleotide sequence) و بالاتجاهين الامامي و الخلفي للنواتج المضاعفة من العزلات الفطرية. حللت التتابعات النيوكلوتيدية باستخدام برنامج BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) لمقارنتها مع البيانات المتوفرة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية National Center for (Biotechnology Information, NCBI) و العائدة لنفس العزلات الفطرية و المشخصة عالميا.

النتائج و المناقشة

تشخيص عزلات الفطر *R. solani*

اظهرت النتائج تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) امكانية مضاعفة نواتج من الحامض النووي الـDNA (DNA products) و بأحجام تراوحت بين 500-600 زوج قاعدة نيتروجينية (bp) بعد استخلاص الحامض النووي (DNA) من عزلات الفطر *R. solani* من النباتات المصابة و تعريضه تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) و باستخدام البوادئ الامامية و الخلفية (ITS1 و ITS)(شكل 1).



شكل 1: نواتج الـحامض النووي (DNA) المضاعفة بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) من الفطر *R. solani* المعزول من احدى مزارع المنطقة الصحراوية في محافظة كربلاء (1) و الفطر *R. solani* المعزول من احدى المزارع الصحراوية في محافظة النجف (2) و الفطر *R. solani* المعزول من احدى البيوت البلاستيكية في كلية الزراعة-جامعة كربلاء (3). M= 1Kp DNA ladder marker. NC: معاملة مقارنة (Negative control).

Figure 1: PCR products amplified from *R. solani* isolated from a farm in the desert region of Karbala governorate (1) and *R. solani* isolated from a farm located in the desert region of Najaf governorate (2) and the *R. solani* isolate obtained from a greenhouse in the Faculty of Agriculture-University of Karbala (3). M = 1Kp DNA ladder marker. NC: Negative control (no DNA added).

اثبتت نتائج تحليل التتابع النيوكلوتيدي (Nucleotide sequence analysis) (اشكال 2 و 3 و 4) لحزم الحامض النووي المضاعفة من الفطريات المعزولة و باستخدام برنامج BLAST بأن جميع العزلات الفطرية عائدة للفطر *R. solani*.

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        10         20         30         40         50
TTCTGGCACC GGGAAGGACC CCGGGAAAAC CGGTAAGTAA AAGGAAATTC
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        60         70         80         90        100
CAAATTTAGG GAATTACAGA ATTTTTGAAA GCACACTGCG CCCCCTGGTA
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       110        120        130        140        150
TTCCGGGGGG CATGCCTGTT CGAGCGTCAT TTCACCACTC AAGCCTCGCT
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       160        170        180        190        200
TGGTATTGGG CAACGCGGTC CGCCGCGTGC CTCAAATCGT CCGGCTGGGT
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       210        220        230        240        250
CTTCTGTCCC CTAAGCGTTG TGGAAACTAT TCGCTAAAGG GTGTTCGGGA
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|
       260        270        280        290
GGTACGCCGT AAAACAACCC CATTTCTAAG GTGACCTCGA TCAGG
```

شكل 2: التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي (PCR-amplified product) المضاعفة من الفطر *R. solani* المعزول من احدى المزارع في المنطقة الصحراوية في محافظة كربلاء و المشخصة بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR).

Figure 2: The nucleotide sequence of the PCR product amplified from the *R. solani* isolate obtained from a farm in the desert region of Karbala Governorate.

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        10         20         30         40         50
TTGAAGGTGA AGTCGTAACA AGGTCTCCGT AGGTGAACCT GCGGAGGGAT
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        60         70         80         90        100
CATTATAAGT TCACCCAGGC TTGTACAGCT GGGGACTGAC AACCCTTTGA
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       110        120        130        140        150
TTTCCGACTC TGTTGCCTCC GGGGCGACCT TGCCTTCGGG CGGGGGCTCC
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       160        170        180        190        200
GGGTGGACAC TTCAAACTCT TGCGTAACTT TGCAGTCTGA GTAAACTTAA
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       210        220        230        240        250
TTAATAAATT AAAACTTTTA ACAACGGATC TCTTGGTTCT GGCATCGATG
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       260        270        280        290        300
AAGAACGCAG CGAAATGCGA TAAGTAATGT GATTGCAGAA TTCAGTGAAT
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       310        320        330        340        350
CATCGAATCT TTGAACGCAC ATTGCGCCCC CTGGTATTCC GGGGGGCATG
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       360        370        380        390        400
CCTGTTCGAG CGTCATTTCA CCACTCAAGC CTCGCTTGGT ATTGGGCAAC
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       410        420        430        440        450
GCGGTCCGCC GCGTGCCTCA AATCGTCCGG CTGGGTCTTC TGTCCCCTAA
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       460        470        480        490        500
GCGTTGTGGA AACTATTCGC TAAAGGGTGT TCGGGAGGCT ACGCCGTAAA
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ..
       510        520        530        540
ACAACCCCAT AACTAAGGTG ACCTCGATCA GTATGATCCA TC
```

شكل 2: التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي (PCR-amplified product) المضاعفة من الفطر *R. solani* المعزول من احدى المزارع في المنطقة الصحراوية محافظة النجف و المشخصة بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR).

Figure 2: The nucleotide sequence of the PCR product amplified from the *R. solani* isolate obtained from a farm located in the desert region of Najaf Governorate.

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        10         20         30         40         50
ACACCTGTGC ACTTGTGAGC CAGCTTGGAG GACTTTATTG GACTCCTTTT
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        60         70         80         90        100
GTCTACTTAA TCCACACAAA CTCAATTTAT TTTAAACTGA ATGTATTTTG
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       110        120        130        140        150
ATGTAACGCA TCTAATACTA AGTTTCAACA ACGGATCTCT TGGCTCTCGC
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       160        170        180        190        200
ATCGATGAAG AACGCAGACT CGAAATGCGA TAAGGAATGT GAATTGCAGA
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       210        220        230        240        250
ATTCAGTGAA TCATCGAGGA TCTTTGAACG CACCTTGCGC TCCTTGGTAT
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       260        270        280        290        300
TCCTTGGAGC ATGTAATCTG TATTGAGTAT CATGAAATCT TCAAAGTTAA
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       310        320        330        340        350
AATCTTTTGT TAACTCAATT GGTTTCTACT TTGGTATTGG AGGTCTTTGC
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       360        370        380        390        400
ATTGCTTCAC ACCTGCTCCT CTTTGTTCAT TAGCTGGATC TCCGTGTTAT
....|....| ....|..
       410
TGCTTGGTTC CACTAGG
```

شكل 3: التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي (PCR-amplified product) المضاعفة من الفطر *R. solani* المعزول من احدى البيوت البلاستيكية التابعة لكلية الزراعة/ جامعة كربلاء و المشخصة بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR).

Figure 3: The nucleotide sequence of the PCR product amplified from the *R. solani* isolate obtained from a greenhouse belonging to the Faculty of Agriculture/ University of Karbala.

لوحظ من خلال مقارنة التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي للفطر *R. solani* المعزول من احدى مزارع محافظة كربلاء مع البيانات المتوفرة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) ان اعلى نسبه تشابه وراثي بلغت 99% مع عزلات الفطر *R. solani* المعزولة من الهند (EU622927وJX535004) و العراق (EU622927, KF372645 and

KF372646), في حين كانت اكثرها تباعدا وراثيا عن عزلات الفطر *R. solani* المعزولة من الهند (JF701717) و العراق (KY055374) و كندا (EU730814) وامريكا (FJ492073) و التي اعطت نسبة تشابه بلغت 91%. كما اعطت العزلات الاخرى تشابها وراثياً تراوح بين 93-98% (جدول 2).

جدول 2: مقارنة بين نسب التشابه النيوكلوتيدي للفطر *R. solani* المعزول في هذه الدراسة من احدى المزارع في المنطقة الصحراوية في محافظة كربلاء و العزلات الاخرى لنفس التابعة لنفس الفطر و المسجلة عالمياً في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI).

Table 2: Comparison between the nucleotide sequence similarity percentages of *R. solani* isolated in this study from a farm in the desert region of Karbala governorate with the other isolates belonging to the same fungus and registered in the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Fungus	Isolate or strain name	Origin	The most similar sequences in GenBank database	
			GenBank Accession Number	Sequence similarity (%)
R. solani	Babylon*	Iraq	KY283953	100
R. solani	RsolTeaIN1	India	KJ466117	99
R. solani	IQ49	Iraq	KF372653	99
R. solani	IQ23	Iraq	KF372645	99
R. solani	MML4001	India	JX535004	99
R. solani	IQ35	Iraq	KF372646	99
R. solani	AYSDIN 18S	Mexico	KX592586	99
R. solani	SPM1	Malaysia	KX674533	98
R. solani	IQ30	Iraq	KF372657	98
R. solani	IQ40	Iraq	KF372662	98

R. solani	Rae354	Taiwan	AY684921	97
R. solani	RUPP93	India	JF701784	95
R. solani	BPRhi 01	India	KM434130	95
R. solani	RKLC1	India	JF701742	95
R. solani	IQ34	Iraq	KF372660	95
R. solani	RKNG9	India	JF701745	94
R. solani	RKNM3	India	KC997793	94
R. solani	RKNM8	India	JF701744	93
R. solani	RDLM6	India	JF701717	92
R. solani	AQNOAH	Iraq	KY055374	92
R. solani	R43	Canada	EU730814	92
R. solani	F14	USA	FJ492073	92

***عزلة الفطر *R. solani* المعزولة في هذه الدراسة من احدى مزارع المنطقة الصحراوية في محافظة كربلاء.**

كما بينت النتائج المعروضة في جدول (3) ان اعلى نسبة تشابه وراثي (99 و 98%)لعزلة الفطر *R. solani* المعزولة من احدى مزارع محافظة النجف كانت مع عزلات الفطر *R. solani* المعزولة من الهند (JF701744 وJF70174 , على التوالي), في حين كانت ابعدها وراثيا عن عزلتي الفطر *R. solani* المعزولة من امريكا (KX118337 و EU591790 و KX118335 و FJ746915وFJ746906 و KX118359 و KX118351) و بنسبة اختلاف بلغت 90%. كما اظهرت عزلة الفطر *R. solani* المعزولة في هذه الدراسة نسبة اختلاف وراثي مع العزلات الاخرى تراوحت بين 91-96%. يتضح من خلال النتائج ان عزلات الفطر *R. solani* (Babylon و AQNOAH) المشخصة في هذه الدراسة هي عزلات جديدة غير معروفة سابقا و تم تسجيلها في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) تحت ارقام الادخال (GenBank accession number) KY283953 و KY055374.

جدول 3: مقارنة بين نسب التشابه النيوكلوتيدي للفطر *R. solani* المعزول في هذه الدراسة من احدى المزارع في المنطقة الصحراوية في محافظة النجف و العزلات الاخرى لنفس التابعة لنفس الفطر و المسجلة عالمياً في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI).

Table 3: Comparison between nucleotide sequence similarity percentages of *R. solani* isolated in this study from a farm located in the desert region of Najaf governorate with the other isolates belonging to the same fungus and registered in the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Fungus	Isolate name	Origin	The most similar sequences in GenBank database	
			Gen Bank Accession Number	Sequence similarity (%)
R. solani	AQNOAH	Iraq	KY055374	100
R. solani	RKNM8	India	JF701744	99
R. solani	RKNG9	India	JF701745	98
R. solani	RUPP93	India	JF701784	96
R. solani	RKLC1	India	JF701742	95
R. solani	Rae354	Taiwan	AY684921	94
R. solani	RKNM3	India	KC997793	94
R. solani	AG-Fa	Malaysia	KX674533	94

R. solani	IQ40	Iraq	KF372662	94
R. solani	AYSDIN	Mexico	KX592586	94
R. solani	IQ49	Iraq	KF372653	94
R. solani	IQ23	Iraq	KF372645	94
R. solani	RDLM6	India	JF701717	94
R. solani	MML4001	India	JX535004	94
R. solani	RsolTeaIN1	India	KJ466117	94
R. solani	IQ30	Iraq	KF372657	93
R. solani	RMHM3	India	JF701753	93
R. solani	BPRhi	India	KM434130	92
R. solani	Babylon	Iraq	KY283953	92
R. solani	RT 5-3	USA	FJ746908	91
R. solani	RUPC95	India	JF701771	91
R. solani	EV_7	USA	KX118354	91
R. solani	CHR09-19	China	HQ270173	91
R. solani	RT 8-2	USA	FJ746916	91

R. solani	KARS02_2_5	USA	KX118362	91
R. solani	KARS02_1_9	USA	KX118361	91
R. solani	KARS02_1_8	USA	KX118360	91
R. solani	IQ34	Iraq	KF372660	91
R. solani	CR 8	Brazil	KT362074	91
R. solani	RT 8-3	USA	FJ746917	91
R. solani	RS35	Poland	KU574260	91
R. solani	G14	Costa Rica	JX294349	91
R. solani	BVT_20	USA	KX118337	90
R. solani	R77	USA	EU591790	90
R. solani	BVT_16	USA	KX118335	90
R. solani	RT 8-1	USA	FJ746915	90
R. solani	RT 5-1	USA	FJ746906	90
R. solani	KARS02_1_6	USA	KX118359	90
R. solani	EV_19	USA	KX118351	90

***عزلة الفطر *R. solani* المعزولة في هذه الدراسة من احدى مزارع المنطقة الصحراوية في محافظة النجف.**

كما اظهرت عزلة الفطر *R. solani* المعزولة من احدى البيوت البلاستيكية التابعة لكلية الزراعة/ جامعة كربلاء تماثلاً وراثياً بلغ 100% مع عزلة الفطر *R. solani* العراقية (KX828173) و 99% مع العزلة العراقية IQ34 (KF372660.1), بينما كانت اقل تشابها وراثياً بلغ 88% مع عزلات الفطر المعزولة من الصين و امريكا (HQ270173.1 وFJ746908.1 و FJ746916.1و FJ746917.1 و FJ746906.1). كما و تراوحت نسبة التشابه

بين عزلة الفطر المعزولة في هذه الدراسة و العزلات الاخرى 90-96 % (جدول 4).

جدول (4) : مقارنة بين نسب التشابه النيوكلوتيدي للفطر *R. solani* المعزول في هذه الدراسة و العزلات الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالمياً في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI).

Table 4: Comparison between nucleotide sequence similarity percentages of *R. solani* isolated in this study with the other isolates belonging to the same fungus and registered in the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Fungus	Isolate name	Origin	The most similar sequences in GenBank database	
			Gen Bank Accession Number	Sequence similarity (%)
R. solani	-*	Iraq	-	100
R. solani	Muntadher	Iraq	KX828173	100
R. solani	IQ34	Iraq	KF372660.1	99
R. solani	IQ40	Iraq	KF372662.1	96
R. solani	IQ35	Iraq	KF372646.1	95
R. solani	IQ49	Iraq	KF372653.1	95
R. solani	IQ23	Iraq	KF372645.1	95
R. solani	IQ30	Iraq	KF372657.1	95
R. solani	MML4001	India	JX535004.1	95
R. solani	RsolTeaIN1	India	KJ466117.1	95
R. solani	Rae354 18S	Taiwa	AY684921.1	93

		n		
R. solani	BPRhi 01	India	KM434130.1	93
R. solani	RUPP93 18S	India	JF701784.1	93
R. solani	RKNG9	India	JF701745.1	91
R. solani	RKLC1	India	JF701742.1	91
R. solani	RKNM3 18S	India	KC997793.1	91
R. solani	RKNM8	India	JF701744.1	90
R. solani	RDLM6	India	JF701717.1	90
R. solani	RS35	India	KU574260.1	90
R. solani	RT 5-3 18S	USA	FJ746908.1	88
R. solani	CHR09-19 18S	China	HQ270173.1	88
R. solani	RT 8-2 18S	USA	FJ746916.1	88
R. solani	RT 8-3 18S	USA	FJ746917.1	88
R. solani	RT 5-1 18S	USA	FJ746906.1	88

***عزلة الفطر *R. solani* المعزولة في هذه الدراسة من احدى البيوت البلاستيكية التابعة لكلية الزراعة/ جامعة كربلاء.**

استخدم في هذه الدراسة تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) في تشخيص عزلات من الفطر *R. solani* و المعروفة بدقتها العالية في تشخيص العديد من الكائنات الحية و منها الفطريات مثل الفطريات *Fusarium* spp. و *Aspergillus* spp. و غيرها (10) للتخلص من مشاكل التشخيص المعتمدة على الصفات المظهرية (Morphological characters). رغم فائدة التشخيص المظهري في حصر الفطريات قيد البحث في مجاميع اصغر قبل الشروع باستخدام طرائق اخرى في التشخيص فأن هناك العديد من المشاكل التي تصاحب التشخيص المظهري للفطريات منا حاجة القائم بعملية التشخيص الى خبرة عالية خاصة في الانواع الفطرية القريبة التشابه فيما بينها مثل بعض انواع الفطر *Fusarium*

.spp, فضلا عن احتياجها الى وقت و جهد كبيرين (9 و 15 و 16 و 17). كما ان هناك بعض العوامل الاخرى التي تؤثر على تلك الصفات المظهرية و منها نوع و طبيعة وسط النمو و الرطوبة و الاضاءة التي من الممكن ان تؤثر على لون و اشكال و احجام الابواغ و المستعمرات الفطرية النامية. وجد بعض الباحثين ان هناك خطأ في التصنيف المظهري للعديد من الفطريات المشخصة في دراسات سابقة و منها انواع تابعة للفطر *Fusarium* spp. مثل *Fusarium verticillioides* و *Fuarium subglutinans* عند اعادة تشخيصها مرة اخرى باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) (7 و 11) .

اسهمت طريقة التشخيص الجزيئي بالاعتماد على الاختلافات الموجودة في تتابع الحامض النووي لمنطقة الـ ITS (Internal transcribed spacer) كفاءته عالية في تشخيص العديد من الفطريات مثل *Fusarium* spp. و *Cladosporium* spp. و *Fusarium verticillioides* (2 و 4 و 5 و 9). يعد التشخيص الدقيق للفطر الممرض من الحاجات الضرورية من اجل الوصول الى طريقة او طرائق فعالة في أداراه المرض, عمليات الحجر الزراعي (Quarantine purposes) لحماية المحاصيل الزراعية و كذلك المصادر الطبيعية الاخرى (13 و 17).

المصادر

1- **Alaei, H.; Amir, H.M. and Ali, D. (2012)** Molecular characterization of the rDNA-ITS sequence and a PCR diagnostic technique for *Pileolaria terebinthi*, the cause of pistachio rust. *Phytopathologia Mediterranea*, 51, 3, 488-495.

2- **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.

3- **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.

4- **Arif, M.; Shilpi C.; N.W. Zaidi; J.K. Rayar; M. Variar and Singh, U.S. (2012)** Development of specific primers for genus *Fusarium* and *F. solani* using rDNA sub-unit and transcription elongation

8- **Hawksworth, D.L.; Kirk, P.M.; Sutton, B.C. and Pegler, D.M. (1995)** Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. 8th edition. CAB International Mycology Institute, Egham.

9- **Hsuan, H.M.; Baharuddin, S. and Latiffah, Z. (2011)** Molecular Identification of *Fusarium* Species in *Gibberella fujikuroi* Species Complex from Rice, Sugarcane and Maize from Peninsular Malaysia. *International Journal of Molecular Sciences* (2011) 12, 6722-6732.

10- **Huang, A.; Li, Shen, Z.Q.; Wang, X.W.; Jin, M. (2016)** High-throughput identification of clinical pathogenic fungi by hybridization to an oligonucleotidemicroarray. *Journal Clinic Microbiology*, 44:3299-3305.

11- **Maggi, O.; Tosi, S.; Angelova, M.; Lagostina, E.; Fabbri, A. A.; Lorenzo, P.; Altobelli, E.; Picco, A., M.; Savino E.; Branda, E.; Turchetti, B.; Zotti, M., Vizzini, A. and Buzzini, P. (2013)** Adaptation of fungi, including yeasts, to cold environments, Plant Biosystems. *An International Journal Dealing with all*

factor (TEF-1α) gene. *African Journal of Biotechnology*, 11(2), 444-447.

5- **Chandra, S.N.; Shankar, A.C.U.; Niranjana, S.R. and Prakash, H.S. (2008)** Molecular detection and characterization of *Fusarium verticillioides* in maize (*Zea mays* L.) grown in southern India. *Annals of Microbiology*, 58 (3): 359 - 367.

6- **Erlacher, A.; Cardinale, M., Grosch R.; Grube M. and Gabriele B. (2014**) The impact of the pathogen *Rhizoctonia solani* and its beneficial counterpart *Bacillus amyloliquefaciens* on the indigenous lettuce microbiome. *Frontiers in Microbiology*, 5 (175), 1-8.

7- **Giantsis, I. A.; Chaskopoulou, A. and Bon, M.C. (2017)** Direct Multiplex PCR (dmPCR) for the Identification of Six Phlebotomine Sand Fly Species (Diptera: Psychodidae), including major leishmania vectors of the mediterranean. *Journal of economic Entmology*, 110 (1), 172-182.

Aspects of Plant Biology: Official Journal of the Societa Botanica Italiana, (147)1, 247-258.

12- **Romberg, M.K. and Davis, R.M. (2007)** Host range and phylogeny of *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* from potato and tomato in California. *Plant Diseases*, 91: 585-592.

13- **Schisler, D.A.; Neate, S.M. and Masuhara, G. (2012)** The occurrence and pathogenicity of *Rhizoctonia* fungi in South Australian plant nurseries. *Mycological Research*, 98(1), 77-82.

14- **Stanis, C.S.; Song, B. K.; Chua, T.H.; Lau, Y.L. and Jelip, J. (2016)** Evaluation of new multiplex PCR primers for the identification of Plasmodium species found in Sabah. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 46, 207-218.

15- **Wang, Y.K.; Shi, Y.X.; Li, B.J. and Chen, H.M. (2008)** Studies on identification and expeditious detection of cucumber *Fusarium* wilt. *China Vegetables*, 11**:** 18-22.

16- **Yang, X.H.; Lu, G.Z.; Zhao, Z.H.; Liu, L.L. and Yao, X.M. (2007)** Isolation and identification of *Fusarium* species from cucumber wilt diseased plants in vegetable greenhouses in northeastern China. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 38(3)**:** 308-311.

17- **Zhang, S.; Zhao X., Wang, Y.; Li, J.; Chen, X.; Wang, A. and Li, J. (2012)** Molecular detection of *Fusarium oxysporum* in the infected cucumber plants and soil. *Pakistan Journal of Botany*, 44(4): 1445-1451.