توصيف شكلي وجزيئي لعزلات من الفطر *Rhizoctonia solani* المسبب لمرض القشرة السوداء على البطاطا في بعض مناطق زراعتها في سورية

سالي أبو عقل[1] ووليد نفاع [2]* ومحمد جمال مندو[1]

(1). إدارة بحوث وقاية النبات في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، دمشق، سورية

(2). جامعة دمشق، كلية الهندسة الزراعية، قسم وقاية النبات، دمشق، سورية

(*للمراسلة الدكتور وليد نفاع، البريد الالكتروني: walid1851966@yahoo.com)

تاريخ الاستلام: 2021/04/14 تاريخ القبول: 2021/05/10

الملخص

تعد البطاطا *Solanum tuberosum* L. أحد أهم المحاصيل الغذائية والصناعية في جميع أنحاء العالم. ويعد مرض القشرة السوداء المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani* Kühn. [طوره الجنسي: *Thanatephorus cucumeris* (A.B. Frank) Donk] من أهم الأمراض التي تصيب البطاطا في معظم بلدان العالم ومنها سورية. تم الحصول على 19 عزلة للفطر *R. solani* من الأجسام الحجرية المتشكلة على درنات بطاطا مصابة، جُمعت من حقول في محافظتي حمص وحلب خلال العروة الربيعية (شباط، وآذار، ونيسان)، وفي محافظتي ريف دمشق (سعسع) ودرعا خلال العروة الصيفية (آب، وأيلول) في عامي 2018– 2019. بينت النتائج تباين العزلات في صفاتها الشكلية (لون المستعمرات ومظهرها)، وقدرتها على تشكيل أجسام حجرية، ولون الأجسام الحجرية ومكان توضعها في الطبق. وأظهرت الدراسة الجزيئية باستخدام زوج البادئات (AG3-1F / ITS4-B) للكشف عن الفطر *R. solani* (المجموعة التشابكية AG3)، وزوج البادئات (Rs2R1/ Rs1F2) للكشف عن تحت المجموعة التشابكية AG-3PT المتخصصة بإصابة البطاطا أن 78.95% من العزلات تنتمي لتحت المجموعة التشابكية AG3-PT، باستثناء أربع عزلات فقط هي Rh4 و Rh12 و Rh14 وRh19 (21.05 %)، والتي قد تتبع لمجموعة / مجموعات تشابكية أخرى قادرة على إصابة البطاطا. تعد هذه الدراسة الأولى في سورية للكشف الجزيئي عن المجموعات التشابكية للفطر *R. solani*.

الكلمات المفتاحية: رايزوكتونيا، مجموعات تشابكية، القشرة السوداء، بطاطا، تعريف جزيئي.

المقدمـــــة:

تعدُّ البطاطا *Solanum tuberosum* L. من المحاصيل الغذائية والصناعية الأساسية الهامة في الوطن العربي، وفي عدد كبير من دول العالم، وتصنف كثالث أهم محصول غذائي بعد القمح والأرز (FAO, 2016). ازداد إنتاج محصول البطاطا بشكل كبير تلبيةً لتزايد متطلبات النمو السكاني (Birch *et al.*, 2012)، حيث بلغت المساحة المزروعة في

العالم أكثر من 19 مليون هكتار بإنتاج نحو 368 مليون طن (FAO, 2018). قُدِّر إنتاج البطاطا في سورية لعام 2019 بحوالي 635519 طناً بمساحة مزروعة 24795 هكتاراً (المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية، 2019).

يسبب الفطر *Rhizoctonia solani* Kühn. (وطوره الجنسي *Thanatephorus cucumeris*) خسائر كبيرة في كمية الانتاج ونوعيته على مستوى العالم (Das *et al.*, 2014)، إذ إن أعراض القشرة السوداء التي تظهر على الدرنات تسبب خسائر اقتصادية كبيرة في أسواق الاستهلاك، وفي برامج إصدار شهادات البذار والتصدير (Hamid *et al.*, 2006). وأثبتت الدراسات انتشار المرض في معظم مناطق زراعة البطاطا في سورية، حيث بلغ المتوسط العام لنسبة الإصابة بالمرض خلال العروة الخريفية 60.46 %، أما في العروة الربيعية فكانت نسبة الإصابة أعلى من الخريفية بمتوسط نسبة إصابة 64.19 % (عبدو وآخرون، 2012). تظهر أعراض المرض في البطاطا على أجزاء النبات فوق وتحت سطح الأرض، حيث يشكل الفطر على سطح الدرنة كتلاً مسطحة بنية داكنة مائلة للسواد وقاسية تدعى الأجسام الحجرية، كما يلاحظ تقرحات بنية على السوق الأرضية (Van den Brink and Wustman, 2014).

تتباين عزلات الفطر *R. solani* في خصائها الشكلية والوراثية، وقد قسمت إلى مجموعات تشابكية Anastomosis Groups (AG) اعتماداً على التحام خيوطها الفطرية (الهيفات) مع بعضها (Anderson, 1982; Carling, 1996; Carling *et al.*, 2002a). وقد تم تعريف 13 مجموعة تشابكية مختلفة حتى الآن (AG-1 حتى AG-13)، والتي قسم العديد منها إلى مجموعات فرعية على أساس الإمراضية أو التباين الوراثي (Carling and Kuninaga, 1990; Carling *et al.* 2002a; Lees *et al.*, 2002; Guleria *et al.*, 2007; Woodhall *et al.*, 2007).

وقد أظهرت الدراسات أن المجموعات التشابكية AG لديها أنواع مضيفة مفضلة، وترتبط بأعراض مرض معينة، إذ ترتبط المجموعة AG-3 في الغالب بمحاصيل الفصيلة الباذنجانية Solanaceae، والتي قسمت إلى تحت مجموعة البطاطا AG3-PT، والتبغ AG3-TB، والبندورة AG3-TM (Bartz *et al.*, 2010). وتعد تحت المجموعة AG3-PT المرتبطة بأمراض البطاطا هي الأكثر انتشاراً على المستوى العالمي، ويمكنها إصابة جميع أجزاء النبات في أي مرحلة من مراحل نموه (Tsror, 2010). ويمكن لبعض المجموعات التشابكية مثل AG-1، و AG-2.1، و AG-4، و AG-5، و AG-7 و AG-8 أن تصيب البطاطا (Sneh *et al.,* 1996; Lees *et al.,*2002; Woodhall *et al.,* 2007; Okubara *et al.,* 2008). وعلى الرغم من الدراسات الشكلية العديدة إلا أنها لم تستطع وضع العزلات ضمن المجموعات بشكل دقيق، لذلك اعتمد مؤخراً على التقانات الحيوية، والتي تتميز بقدرتها على الفصل ما بين المجموعات وتحت المجموعات كونها تعتمد على توصيف مناطق معينة من جينوم الفطر، ولا تتأثر بالظروف البيئية. لذلك ازداد استخدام هذه الطرائق لتعريف ووضع العزلات بشكل دقيق ضمن المجموعات التشابكية للفطر *R. solani* (Ceresini *et al.*, 2002; Justesen *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2005). وتعتمد هذه التقانات الجزيئية عادة على استخدام منطقة الفواصل المنسوخة الداخلية Internal transcribed spacer (ITS) للحمض النووي الريبوزومي rDNA (Kuninaga *et al.*, 2000). إذ يسمح تحديد تتابع النيكليوتيدات في منطقة ITS في التمييز بين مجموعات فرعية محددة مسبقاً داخل بعض المجموعات التشابكية AGs، بما في ذلك مجموعات فرعية داخل AG-1، و AG-2، و AG-3 و AG-4، وبالتالي يمكن تصنيف العزلات الجديدة في مجموعة معينة تبعاً لتسلسل منطقة ITS (Gonzalez *et al.*,

2001; Carling *et al.*, 2002b). استخدم Lees وزملاؤه (2002) منطقة ITS من الـ DNA الريبوزومي من أجل كشف وتحديد المجموعة AG-3 في البطاطا والتربة، وذلك باستخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل الكمي بالزمن الحقيقي Quantitative Real Time-PCR (Qrt-PCR).

يسبب الفطر *R. solani* مشكلة حقيقية في سورية على الفصيلة الباذنجانية، ونظراً لأهمية نباتات هذه الفصيلة والمساحة الواسعة المزروعة بها، وقلة أو عدم وجود دراسات محلية حول الكشف عن المجموعات التشابكية لهذا الفطر بالطرائق الجزيئية، فقد هدف البحث إلى التوصيف الشكلي والجزيئي للفطر المسبب لمرض القشرة السوداء على البطاطا في بعض مناطق سورية.

المواد والطرائق:

1- جمع العينات: تم القيام بالعديد من الجولات في حقول مزروعة بمحصول البطاطا في محافظتي حمص وحلب خلال العروة الربيعية (شباط، وآذار، ونيسان)، وفي محافظتي ريف دمشق (سعسع) ودرعا خلال العروة الصيفية (آب، وأيلول) في عامي 2018- 2019. جُمعت درنات تظهر على سطحها أجسام حجرية للفطر *R. solani*، وذلك من نباتات تبدي أعراضاً مرضية واضحة، حيث تم أخذ العينات بشكل عشوائي، ودوّن على كل عينة اسم المنطقة وتاريخ الجمع.

2- عزل الفطر: غُسلت الدرنات المصابة عدة مرات بماء الصنبور، طُهّرت سطحياً بهيبوكلوريت الصوديوم 1% لمدة 5 دقائق، غُسلت مرتين بالماء المقطر والمعقم، جُففت وقُطعت الى قطع صغيرة بطول 3-5 مم تحتوي على أجسام حجرية، وزعت في أطباق بتري تحوي على الوسط المغذي بطاطا ديكستروز آغار PDA المضاف إليه المضاد الحيوي ستربيتومايسين (120 mg l^{-1}) streptomycin sulfate لتثبيط نمو البكتيريا، وحضّنت عند درجة حرارة 25 °س لمدة أسبوع. ثم تمت تنقية الفطر بطريقة أخذ خزعة من حافة المستعمرة النامية من جسم حجري، ونقلها إلى طبق بتري جديد. تم تأكيد تعريف العزلات بالاعتماد على الصفات الشكلية، وخاصة التخصر أو التضيق في نقطة تفرع الخيط الفطري (Ogoshi, 1987; Desvani *et al.*, 2018)، ثم تم توصيفها شكلياً (شكل المستعمرات، اللون، تشكل الأجسام الحجرية وطريقة توضعها). كما تم حساب متوسط سرعة النمو اليومية (سم / اليوم) عن طريق قياس الزيادة في قطر مستعمرات العزلات على الوسط المغذي PDA خلال الأربعة أيام الأولى بعد الزرع.

3- الدراسة الجزيئية

1.3- استخلاص DNA (DNA extraction):

عُزل الحمض النووي الريبي منقوص الأكسجين DNA لكامل الجينوم من الميسيليوم لجميع العزلات المدروسة بطريقة Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB). جُمعت مشيجة الفطر النامية على الوسط المغذي PDA لمستعمرات بعمر 7 أيام، طُحنت على شكل بودرة ناعمة باستخدام الآزوت السائل، أخذ حوالي 150 ملغ من بودرة مشيجة الفطر، وضعت في أنبوب إبندورف سعة 2 مل، أضيف 850 µl من محلول الاستخلاص الدافئ CTAB [1.4 M NaCl, 0.1M Tris HCl (pH8), 20 mM EDTA (pH 8), 2% CTAB, 1% PVP polyvinyl pyrrolidon, 3% β-mercapto-ethanol] إلى الأنبوب وتم مزجها بلطف، حُضّنت العينة في حمام مائي درجة حرارته 65 °س لمدة 30 دقيقة، حُرّكت دورانياً بلطف كل 10 دقائق للمساعدة في تحرير الأحماض النووية، أضيف 700 µl من مزيج

الكلوروفورم وكحول ايزوميل بنسبة (1:24) إلى الأنبوب ومزجت بلطف، ثُقّل المزيج لمدة 10 دقائق عند 10000 دورة/دقيقة ودرجة حرارة 4°س، أخذ 500 µl من الطبقة العلوية (الرائق) ووضعت في أنبوب جديد، ثُقّلت العينة مرة ثانية كما في الخطوة السابقة بعد إضافة 500 µl من مزيج الكلوروفورم وكحول ايزوميل بنسبة (1:24)، أخذ 500 µl من الرائق ووضعت في أنبوب جديد وتركت على الجليد مدة 30–20 دقيقة. تم ترسيب DNA بضعفي الحجم من الإيثانول النقي، وثُقّل الأنبوب لمدة 10 دقائق عند 10000 دورة/دقيقة ودرجة حرارة 4 °س، استبعد السائل مع المحافظة على DNA، وجفف الأنبوب تحت ساحبة الهواء عند درجة حرارة الغرفة. غُسل DNA بإضافة 1 مل إيثانول 70%، ثم ثُقل لمدة 3 دقائق عند 10000 دورة/دقيقة ودرجة حرارة 4 °س. استبعد السائل، وجفف الأنبوب تحت ساحبة الهواء عند درجة حرارة الغرفة لفترة تكفي للتخلص بشكل كامل من الإيثانول، وتمت اذابة DNA في 100 µl من محلول TE 10mM Tris HCl, 1mM EDTA] [(PH8.0) (Naffaa *et al.*, 2017).

قدر تركيز الحمض النووي DNA المستخلص من جميع العزلات باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer، وحُددت نقاوته بقياس الامتصاصية (OD) عند طولي موجة 260 و280 نانومتر وحسبت النسبة ($OD_{280}\backslash OD_{260}$). إذ تعتبر نوعية DNA جيدة إذا تراوحت هذه النسبة في العينات النقية ما بين 1.8– 2.0 (Sambrook and Russel, 2001). حُضرت العينات للقياس بأخذ 10 µl من محلول DNA المستخلص وإكمال الحجم إلى 200 µl من المحلول TE. حفظت العينات عند درجة حرارة –20 °س لحين الاستخدام.

2.3– التفاعل المتسلسل للبوليميراز Polymerase Chain Reaction (PCR) :

استخدم زوج البادئات ITS4–B (CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG) وAG3–1F (CAGGAGACTTGTA CACGGTCCAG) للكشف عن الفطر *R. solani* (المجموعة التشابكية AG3) (Gardes and Bruns, 1993)، وزوج البادئات Rs1F2 (TTGGTTGTAGCTGGTCTATTT) وRs2R1 (TATCACGCTGAGTGGAACCA) للكشف عن تحت المجموعة AG3–PT المتخصصة بإصابة البطاطا (Kuninaga, 1997).

أجري التفاعل ضمن أنبوب سعة 200 ميكروليتر بحجم تفاعل كلي 20 ميكرولتر (10 µl 2x Kapa TAQ Ready mix PCR KIT، و 4 µl ماء، و 2 µl من كل بادئة 10 µM مباشرة وعكسية، 2 µl DNA)، واستخدم أنزيم Polymerase (0.75 U) من شركة Kapa Biosystem. نفذت عملية التدوير الحراري في جهاز من نوع (Eppendorf Thermocycler, Germany) وفق برنامج تدوير حراري تضمن عملية فصل أولي عند درجة حرارة 95 °س لثلاث دقائق، تلتها 35 دورة تضمنت كل دورة منها: مرحلة فصل ثانوية Denaturation عند درجة حرارة 95 °س لمدة 30 ثانية، ومرحلة التحام البادئة Annealing عند درجة حرارة 55 °س لمدة 30 ثانية، ومرحلة الامتداد Extension عند حرارة 72 °س لمدة 30 ثانية، وبعد انتهاء الدورات المحددة أُجريت عملية استطالة نهائية لدورة واحدة فقط عند حرارة 72 °س لمدة 5 دقائق.

بعد انتهاء تفاعل الـ PCR، أُضيف لكل عينة 1 ميكروليتر من محلول التحميل 10 x loading dye، ثم فصلت نواتج التفاعل على هلامة أغاروز تركيز 1.5% حُضرت باستخدام محلول TAE (1 X Tris–acetate buffer)، وأضيف لها

صيغة Gel Red بتركيز 1:10000. تمت عملية الترحيل باستخدام نفس المحلول السابق لمدة ساعة ونصف، عند جهد كهربائي 110 فولط. أُخذت صورة رقمية للهلامة باستخدام جهاز توثيق الهلام المزود بمصدر للأشعة فوق البنفسجية UV لتحليل النتائج، تمت مقارنة حجوم القطع الناتجة مع مؤشر قياس للوزن الجزيئي 1500 زوج نكليوتيدي (molecular weight 1500 bp). تنتمي العزلة للمجموعة AG3 إذا ظهرت الحزمة المميزة (669 زوج نيكليوتيدي)، ولتحت المجموعة AG3-PT إذا ظهرت الحزمة المميزة بحدود 500 زوج نيكليوتيدي (Gardes and Bruns, 1993; Kuninaga, 1997).

4- التحليل الاحصائي:

حللت نتائج سرعة النمو باستخدام البرنامج Spss ver 17، وقورن بين المتوسطات باستخدام اختبار أقل فرق معنوي LSD عند مستوى 1%.

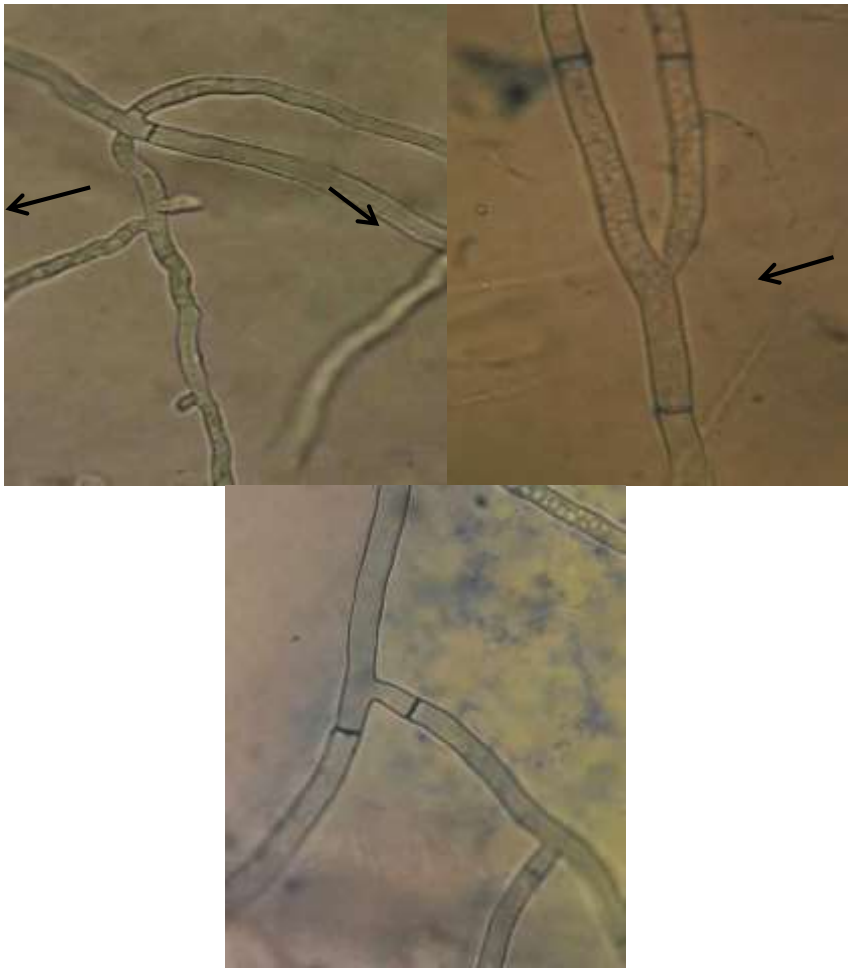
النتائج والمناقشة:

تم الحصول على 19 عزلة للفطر *R. solani* من الأجسام الحجرية المتشكلة على درنات مصابة، والتي جُمعت من حقول البطاطا للعروتين الربيعية والصيفية في محافظات (حمص، وحلب، وريف دمشق، ودرعا) خلال 2018-2019(الجدول 1)، إذ عزلت خمس عشرة عزلة من حقول العروة الربيعية، وأربع عزلات من العروة الصيفية. من ناحية أخرى، تباين عدد العزلات التي حُصل عليها تبعا لمصدرها، إذ تم الحصول على 13 عزلة من حمص، و6 عزلات فقط من باقي المحافظات، وذلك حسب إمكانية الحصول على العينات.

الجدول 1: مصدر عزلات الفطر *Rhizoctonia solani* المتحصل عليها والعروة التي جمعت منها

عزلات الفطر *R. solani*	مصادر العزلات Isolates sources		
	عدد العينات	العروة Season	المنطقة Area
Rh1, Rh2, Rh3, Rh4, Rh6, Rh7, Rh9, Rh11, Rh12, Rh13, Rh15, Rh17, Rh18	13	الربيعية/ شباط، آذار، نيسان	**حمص**
Rh5, Rh19	2	الربيعية/ شباط، آذار، نيسان	**حلب**
Rh10, Rh16	2	الصيفية/ آب، أيلول	**سعسع**
Rh8, Rh14	2	الصيفية/ آب، أيلول	**درعا**

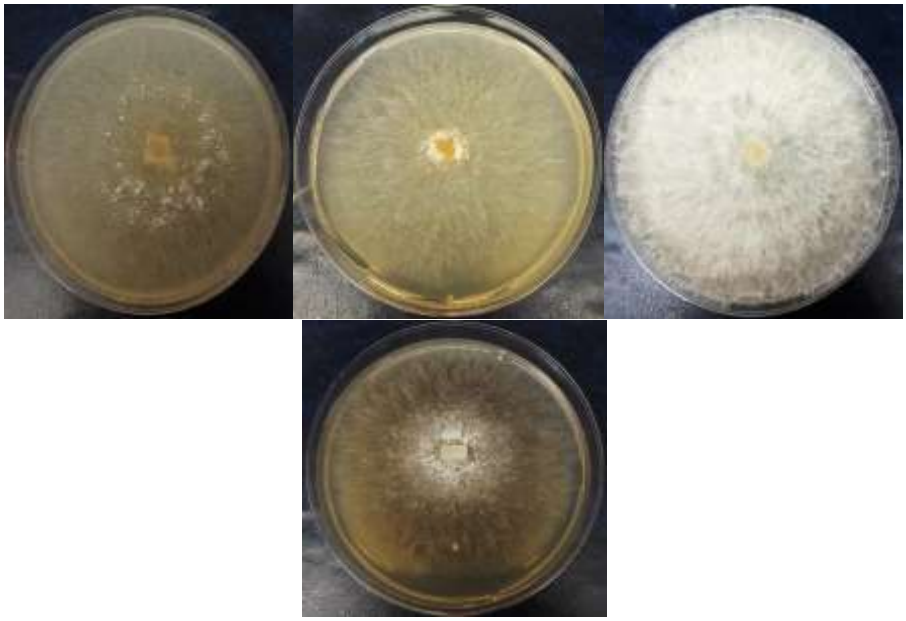
تم تأكيد تعريف العزلات المتحصل عليها من خلال الفحص المجهري، إذ ظهرت الخيوط الفطرية متفرعة بزوايا من 40 – 90 °، مقسمة إلى خلايا كبيرة الحجم نسبياً، مع وجود تخصر أو خاصرة في الخيط الفطري بالقرب من الحواجز عند منطقة التفرع (الشكل 1)، وهذه من أهم الصفات الشكلية المميزة للفطر *R. solani* (Desvani *et al.*, 2018).



الشكل (1): هيفات الفطر *R. solani* إذ يلاحظ تخصر الخيط الفطرية بالقرب من الحاجز في منطقة التفرع (السهم)

الصفات الشكلية للعزلات المدروسة من الفطر *R. solani*

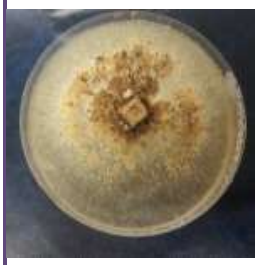
تباينت العزلات في صفاتها الشكلية (الجدول 2)، إذ كان لون معظم المستعمرات بنياً فاتحاً، بينما كان لون المستعمرات أبيض في العزلتين Rh3 وRh13، وأبيض مسمر في العزلتين Rh10 وRh14، وبني داكن في العزلتين Rh4 وRh11 (الشكل 2).

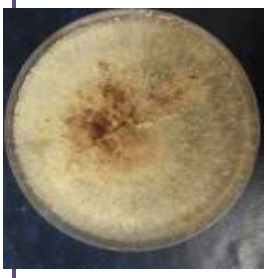


الشكل 2: تدرج لون مستعمرات الفطر *R. solani* من الأبيض إلى البني الداكن على الوسط المغذي PDA

كما تباينت العزلات في مظهرها، إذ كانت كثافة المشيجة خفيفة عند بعض العزلات وكثيفة عند بعضها الآخر، مستوية، شعاعية أو في حلقات متحدة المركز، ملساء، قطنية أو محببة. شكّلت كل العزلات أجساماً حجرية على الوسط المغذي باستثناء خمس عزلات Rh4 وRh10 وRh13 وRh14 وRh18. كما تباينت العزلات في مكان توضع الأجسام الحجرية في الوسط، إذ توضعت الأجسام الحجرية في الوسط مع وجود أجسام حجرية مبعثرة عند معظم العزلات، بينما توضعت في المركز تماماً عند العزلات Rh1 وRh7 و R15، وبشكل حلقة عند العزلة Rh16، أو مركزية وفي حلقة أيضاً عند العزلة Rh16. وتباين لون الأجسام الحجرية من بني فاتح إلى بني غامق أو أحياناً بني مسود. ولوحظ وجود مفرزات لمّاعة بشكل قطرات في الوسط عند العزلات Rh2 وRh7 وRh8 وRh11 وRh17. وقد أشار العديد من الدراسات إلى وجود تباين شكلي كبير بين عزلات الفطر *R. solani* ليس فقط بين المجموعات التشابكية المختلفة، وإنما أيضاً ضمن نفس المجموعة التشابكية (Desvani *et al.*, 2018; Bintang *et al.*, 2017). كما أشار Başbağcı وآخرون (2019) إلى وجود تباين كبير في شكل ولون المستعمرات، وكذلك في لون وطريقة توضع الأجسام الحجرية في حال تشكلها عند عزلات من المجموعة التشابكية AG-4. تتباين عزلات الفطر *R. solani* في طريقة توضع الأجسام الحجرية على الوسط المغذي، حيث توزعت العزلات المتحصل عليها من المجموعة التشابكية AG1-IA المسببة لموت بادرات الرز في خمس مجموعات تبعاً لطريقة توضع الأجسام الحجرية (Goswami *et al.*, 2019). وقد يعتمد على الصفات الشكلية ليس فقط في تقسيم عزلات الفطر *R. solani* إلى مجموعات مختلفة، وإنما أيضاً إلى تحت مجموعات ضمن المجموعة الواحدة (Rabie *et al.*, 2019).

الجدول 2: الصفات الشكلية لعزلات النوع *R. solani* المتحصل عليها من أجسام حجرية متشكلة على درنات البطاطا

العزلات	المستعمرات			الوصف
	بعمر 5 أيام	بعمر 10 أيام	بعمر 15 يوم	
Rh1				نمو كثيف محبب بلون أبيض كريمي يتحول لحلقة من الأجسام الحجرية بنية داكنة كثيفة بقطر 4.5 سم، يليها نمو ميسليومي كثيف محبب كريمي لنهاية الطبق.
Rh2				نمو كثيف حول خزعة العدوى تتحول لحلقة من الأجسام الحجرية بنية اللون بقطر 3.6 سم، تليها حلقة بعرض 1.5 من الأجسام الحجرية، ثم نمو ميسليومي كثيف كريمي حتى نهاية الطبق مع افرازات لامعة ذات لون بني داكن.
Rh3				نمو شعاعي كثيف كريمي فاتح يتحول إلى حلقة من الأجسام الحجرية كثيفة مكتنزة بنية بعرض 2.6 سم، يليها حلقة ثانية بعرض 1.7 سم وبلون كريمي فاتح مع تكون أجسام حجرية بنية فاتحة مبعثرة قليلة العدد، تليها حلقة ثالثة فيها عدد قليل من الأجسام الحجرية المبعثرة بلون بني فاتح
Rh4				نمو كثيف حول خزعة العدوى، يليه نمو ميسليومي كثيف هوائي محبب دائري بلون ابيض يتحول إلى كريمي غامق أو بني فاتح.
Rh5				يتشكل حول خزعة العدوى حلقة متوسطة الكثافة بلون كريمي تتحول إلى حلقة من الأجسام الحجرية كثيفة بنية داكنة بعرض 3.8 سم مع نمو ميسليومي شعاعي، يليها حلقة من الاجسام الحجرية بنية متفرقة بعرض 1.2 سم، ثم نمو ميسليومي لنهاية الطبق.

حلقة من الأجسام الحجرية بلون كريمي تتحول لحلقة ذات حواف داكنة وداخلها بني زاهي بقطر 3.7 سم، ويليها حلقة ثانية من النمو الميسليومي كريمي اللون مع أجسام حجرية متفرقة قليلة بلون بني فاتح بعرض 2 سم تنتهي بنمو ميسليومي كريمي فاتح لنهاية الطبق.				**Rh6**
يتشكل حول خزعة العدوى حلقة محببة كثيفة بلون أبيض تتحول لحلقة من الأجسام الحجرية داكنة مع نمو ميسليومي هوائي وافرازات لامعة بقطر 4.5 سم، يليها نمو ميسليومي هوائي كريمي داكن لنهاية الطبق.				**Rh7**
حلقة من الأجسام الحجرية محببة شعاعية بلون أبيض تتحول إلى اللون البني الداكن مع افرازات لامعة كالقطرات حول خزعة العدوى، ثم نمو كثيف مع أجسام حجرية داكنة متوسطة الكثافة، ثم حلقة ثالثة مع أجسام حجرية مبعثرة قليلة العدد، لتنتهي بنمو ميسليومي كريمي لنهاية الطبق.				**Rh8**
نمو بلون كريمي فاتح مع حلقة من الأجسام الحجرية حول خزعة العدوى ناعمة بلون بني فاتح بعرض 3 سم، تليها حلقة ثانية بلون كريمي فاتح مع أجسام حجرية متوسطة الكثافة بنية فاتحة بعرض 1 سم، يليها حلقة ثالثة من نمو كثيف مع أجسام حجرية قليلة مبعثرة.				**Rh9**
نمو ميسليومي ناعم هوائي كثيف كريمي حول خزعة العدوى يصل لسطح الطبق العلوي وبقطر 1 سم، يليها حلقة بعرض 3 سم وذات حافة عريضة مميزة 0.5 سم يليها نمو ميسليومي لنهاية الطبق.				**Rh10**

نمو متوسط الكثافة يشكل حلقة من الأجسام الحجرية حول خزعة العدوى بنية داكنة مع افرازات لامعة كثيفة بنية داكنة بعرض3 سم، يليها حلقة بلون كريمي مع أجسام حجرية داكنة مبعثرة بعرض 1.5 سم، ثم حلقة نمو ميسليومي كريمي محبب بعرض 1.7 سم.				**Rh11**
نمو كثيف محبب حول خزعة النمو بلون أبيض يتحول لحلقة من الأجسام الحجرية كثيفة جداً بنية داكنة بعرض 2.2 سم، يليها حلقة من الأجسام الحجرية متوسطة الكثافة بلون بني داكن بعرض 1.2 سم، تليها حلقة من نمو كريمي محبب بعرض 0.7 سم، ثم نمو بني فاتح لنهاية الطبق.				**Rh12**
حلقة نمو ميسليومي بيضاء كثيفة بعرض 4.2 سم يليها حلقة ثانية بيضاء هوائية كثيفة بعرض 2 سم، ثم نمو ميسليومي أبيض كثيف لنهاية الطبق. لم يلاحظ تشكل أجسام حجرية.				**Rh13**
نمو ميسليومي كثيف أبيض اللون يشكل ثلاث حلقات متداخلة، يتحول إلى اللون الكريمي، ولم يلاحظ تشكل أجسام حجرية				**Rh14**
نمو ميسليومي شعاعي بلون كريمي يشكل حلقات متداخلة، تشكلت الأجسام الحجرية بلون بني داكن بعد 10 ايام في وسط الطبق حول قطعة اللقاح.				**Rh15**
يبدأ بنمو أبيض إلى كريمي دقيقي المظهر وشعاعي، يتحول مع العمر إلى اللون الكريمي أو البني الفاتح، وتشكلت أجسام حجرية محببة صغيرة متوسطة الكثافة ذات لون كريمي فاتح تتوضع بشكل				**Rh16**

				حلقة.
Rh17				نمو ميسليومي أبيض إلى كريمي قطني كثيف في الوسط، يحاط بنمو كريمي خفيف. الأجسام الحجرية متوسطة الكثافة بنية فاتحة مع نمو هوائي وافرازات لامعة بلون بني فاتح وعدد قليل.
Rh18				نمو شعاعي محزز منتظم مشكلاً حلقة بلون كريمي بقطر 2 سم يليها نمو ميسليومي منتظم لونه كريمي بعرض 2 سم، ثم نمو ميسليومي محبب كريمي لنهاية الطبق. لم يلاحظ تشكل أجسام حجرية.
Rh19				نمو شعاعي كريمي، تشكلت أجسام حجرية داكنة كثيفة في مركز الطبق، ولوحظ وجود افرازات لامعة بنية داكنة، كما يلاحظ تشكل حلقة من الاجسام الحجرية داكنة متوسطة الكثافة بالقرب من نهاية الطبق.

سرعة نمو عزلات الفطر *R. solani* على الوسط المغذي PDA

تباينت العزلات المدروسة في سرعة نموها، إذ تراوحت بين 1.1 سم / اليوم عند العزلة Rh17 إلى 1.7 سم / اليوم عند العزلة Rh15 (الجدول 3). وعلى الرغم من التباين في سرعة نمو العزلات، إلا أنها غطت الطبق تماماً في اليوم الرابع. وهذا ما أشار إليه العديد من الدراسات، إذ كانت بعض العزلات سريعة النمو وغطت الطبق (9 سم) خلال 48 ساعة (Sharma *et al.*, 2005). وتعد سرعة النمو إحدى الصفات الفيزيولوجية المهمة المستخدمة للتمييز بين النوعين *R. oryzae-sativae* و *R. solani* (Kuiry *et al.*, 2014).

الجدول 3: سرعة نمو عزلات الفطر *R. solani* على الوسط المغذي PDA

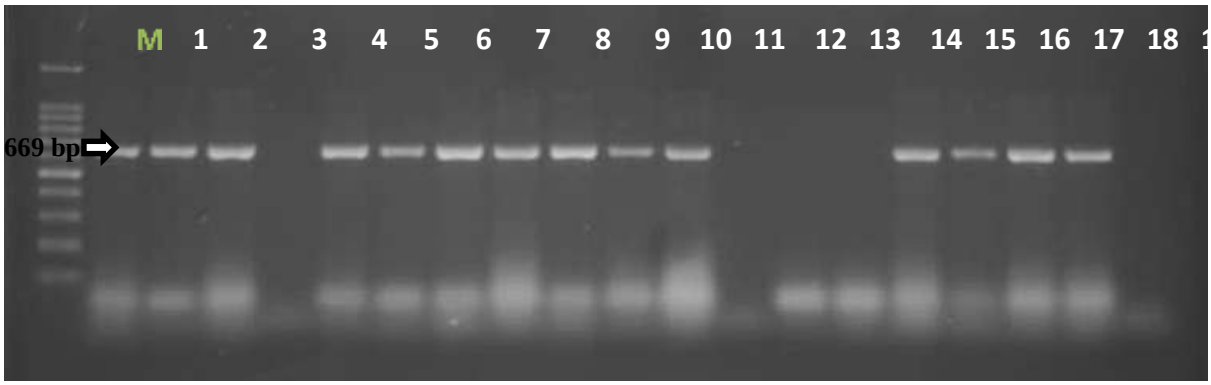
رقم العزلة	الزيادة في نصف قطر المستعمرة (سم) / يوم				متوسط سرعة النمو (سم / اليوم)
	أول يوم	ثاني يوم	ثالث يوم	رابع يوم	
Rh1	0.5	1.4	1.8	2.2	1.5bcd
Rh2	0.3	1.1	1.5	2.3	1.3ab
Rh3	0.5	1.1	1.8	1.9	1.3ab
Rh4	0.7	1.4	1.8	2.2	1.5bcd
Rh5	0.4	1.3	1.5	2.3	1.4bc
Rh6	0.5	1.3	1.8	2.2	1.5bcd
Rh7	0.3	1.3	1.7	2.2	1.4bc
Rh8	0.6	1.4	1.8	2	1.5bcd
Rh9	0.3	1.2	1.5	2.5	1.4bc
Rh10	0.2	1.2	1.4	2.5	1.3ab

1.4bc	2.6	1.4	1.5	0.2	**Rh11**
1.5bcd	2	1.8	1.2	0.8	**Rh12**
1.6cd	2.4	1.8	1.4	0.7	**Rh13**
1.6cd	2.1	2	1.4	0.7	**Rh14**
1.7d	2.2	2.1	1.4	0.9	**Rh15**
1.3ab	1.7	1.7	1.1	0.8	**Rh16**
1.1a	1.9	1.3	0.9	0.2	**Rh17**
1.6cd	2.1	2	1.4	1	**Rh18**
1.6cd	1.8	2.2	1.3	0.9	**Rh19**
0.3					**$LSD_{0>01}$**

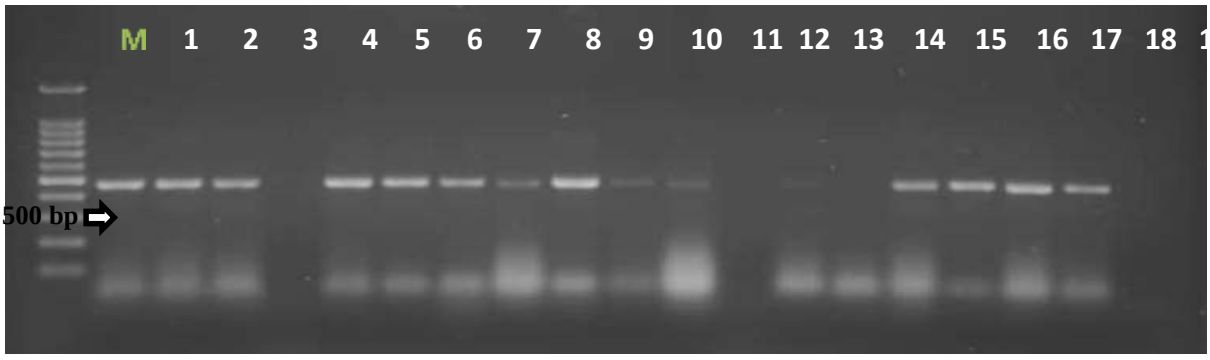
- الأرقام المتبوعة بأحرف مختلفة يوجد بينها فروق معنوية، والأرقام المتبوعة بنفس الحروف لا يوجد بينها فروق معنوي عند مستوى معنوية 1%. تشير الحروف المشتركة لعدم وجود فروق معنوية بين العزلات عند مستوى 1% (LSD = 0.3)

الكشف الجزيئي عن المجموعة AG3 وتحت المجموعة AG3-PT للفطر *R. solani* على البطاطا

أظهرت النتائج أن جميع العزلات المختبرة تنتمي للمجموعة التشابكية AG3، وذلك لظهور الحزمة المميزة لهذه المجموعة (669 زوج نكليوتيدي) (الشكل 3)، ولتحت المجموعة AG3-PT المتخصصة في إصابة البطاطا، أي بنسبة 78.95%، إذ ظهرت الحزمة المميزة لتحت هذه المجموعة بحجم 500 زوج نيكليوتيدي (الشكل 4)، باستثناء العزلات Rh4 و Rh12، وRh14 و Rh19، والتي قد تنتمي لمجموعة أو أكثر من المجموعات التشابكية غير AG3 القادرة على إصابة البطاطا.



الشكل 3: الكشف عن الفطر *R. solani* (المجموعة التشابكية AG3) باستخدام زوج البادئات (AG3-1F/ ITS4-B) على هلامة الأغاروز 1.5%



الشكل 4: الكشف عن تحت المجموعة التشابكية AG3-PT المتخصصة بإصابة البطاطا باستخدام زوج البادئات (Rs1F2 / Rs2R1) على هلامة الأغاروز 1.5%

في الحقيقة اعتمدت معظم الدراسات السابقة لتحديد المجموعات التشابكية على طريقة تقابل الهيفات، وتعد هذه الدراسة الأولى في سورية التي اعتمدت على التقانات الجزيئية للكشف عن المجموعات التشابكية. وتأتي هذه النتائج موافقة لنتائج سابقة أشارت إلى أن المجموعة AG3 هي المجموعة السائدة في حقول البطاطا، فقد أظهرت عبدو وآخرون (2012) أن 85.45% من العزلات انتمت إلى المجموعة التشابكية AG3، وعزلة واحدة فقط (1.81%) انتمت للمجموعة AG-1والتي تم عزلها من جذور البطاطا، بينما لم يتم تحديد المجموعات التشابكية التي تنتمي لها بقية العزلات المدروسة، والتي شكلت نسبة 12.72%. كما أشار Woodhall وآخرون (2007) إلى أن 92.6% من عزلات الفطر *R. solani* المجموعة من حقول بطاطا في بريطانيا تنتمي للمجموعة AG3-PT، و 6.7 % منها تنتمي للمجموعة AG2-1، وانتمت عزلة واحدة فقط (0.7 %) للمجموعة AG5، وذلك باستخدام بادئات متخصصة. وتم الحصول على نتائج مماثلة أيضاً في كل من إيرلندا (Chard and Logan, 1983)، وفي فرنسا (Campion *et al.*, 2003). وفي الباكستان، فمعظم عزلات الفطر *R. solani* المجموعة من مناطق زراعة البطاطا انتمت للمجموعة التشابكية AG3 (81.89 %)، و 8.66% من العزلات انتمت للمجموعة AG5، و 5.5 % للمجموعة AG4، و 1.57 % لكل من المجموعات AG1-1A و AG2-2 و AG9 (Rauf *et al.*, 2007).

تم تعريف 26 عزلة من الفطر *R. solani* من المجموعة التشابكية AG3 في المملكة العربية السعودية باستخدام بادئات متخصصة لمنطقة ITS، كما وجد تباين وراثي كبير ضمن نفس المجموعة بدون وجود أية علاقة ارتباط بين هذا التباين الوراثي والقدرة الإمراضية والتوزع الجغرافي للعزلات (El- Zaidy *et al.*, 2018). ودرست 433 عزلة مجموعة من مناطق زراعة البطاطا في كولومبيا باستخدام بادئات متخصصة أيضاً، وقد أظهرت النتائج أن المسبب الرئيس لمرض تقرح الساق والقشرة السوداء على البطاطا هو الفطر *R. solani* من المجموعة AG3-PT بنسبة 88.45% مقابل 2.54% للمجموعة AG2-1 (Ferrucho *et al.*, 2012).

في الحقيقة استخدام البادئات المتخصصة في الكشف عن المجموعات التشابكية للفطر *R. solani* يعتبر طريقة سريعة ودقيقة على الرغم من ارتفاع تكاليفها، في حين أن استخدام الطريقة التقليدية تتطلب الحصول على عزلات مرجعية أو تفريقيه Tester isolates، ومواجهة العزلات المختلفة مع العزلات التفريقية على الوسط المغذي، ثم دراستها مجهرياً لتحديد المجموعة التشابكية التي تنتمي إليها العزلة المختبرة، وذلك بالاعتماد على نقاط الالتحام، إذ يعتبر التحام الهيفات في 3 نقاط أو أكثر في مناطق التشابك دليلاً إيجابياً على أن العزلة المختبرة تنتمي لنفس مجموعة العزلة التفريقية (Homma *et al.*, 1983)، كما أنه من الصعب الاعتماد على الطريقة التقليدية في الكشف عن المجموعات الفرعية أو تحت المجموعات Sub-group.

الإستنتاجات:

- تباينت عزلات الفطر *R. solani* في خصائصها الشكلية وسرعة نموها حتى ضمن المجموعة التشابكية الواحدة، وبغض النظر عن الموقع الجغرافي الذي جمعت منه.
- تعد الطرائق الجزيئية باستخدام بادئات متخصصة، على الرغم من ارتفاع تكاليفها، سريعة ودقيقة وتختصر الكثير من الجهد والوقت في الكشف عن المجموعات التشابكية التي تنتمي لها عزلات الفطر *R. solani*.

- تعد تحت المجموعة التشابكية AG3–PT هي السائدة في حقول البطاطا في مناطق زراعتها المشمولة بالدراسة.

التوصيات:

إجراء المزيد من الدراسات الجزيئية باستخدام عدد أكبر من البادئات المتخصصة للكشف عن المجموعات التشابكية الأخرى التي تنتشر في مناطق زراعة البطاطا في سورية.

المراجع:

المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية. (2019). مديرية الإحصاء الزراعي، وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي،دمشق، سورية.

حاج عبدو، رانيا، بسام بياعة، وعباس عباس. (2012). تحديد المجموعات التشابكية لمجتمع الفطر *Rhizoctonia solani Kühn.* على البطاطا/ البطاطس في سوريا. مجلة وقاية النبات العربية، 30 (1): 1–10.

Anderson, N.A. (1982. The Genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. Annual Review of Phytopathology. 20:329-347.

Bartz, F. E.; M. A. Cubeta; T. Toda; S. Naito; and K. L. Ivors (2010). An in planta method for assessing the role of basidiospores in Rhizoctonia foliar disease of tomato. Plant Diseases. 94:515-520

Başbağcı, G.; F. Unal; A. Uysal; and F. Dolar (2019). Identification and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* AG-4 causing root rot on chickpea in Turkey. Spanish Journal of Agricultural Research. 17 (2), e1007.

Bintang, A.S.; A. Wibowo; A. Priyatmojo; and S. Subandiyah (2017). Morphological and molecular characterization of *Rhizoctonia solani* isolates from two different rice varieties. Journal Perlindungan Tanaman Indonesia. 21:72-79

Birch, P.R.J.; G. Bryan; B. Fenton; E.M. Gilroy; I. Hein; J.T. Jones; A. Prashar; M.A. Taylor; L. Torrance; and I.K. Toth (2012). Crops that feed the world 8: Potato: are trends of increased globa production sustainable? Food Security. 4: 477-508.

Campion, C.; C. Chatot; B. Perraton; and D. Andrivon (2003). Anastomosis groups, pathogenicity and sensitivity to fungicides of *Rhizoctonia solani* isolates collected on potato crops in France. European Journal of Plant Pathology. 109: 983-992.

Carling, D. E.; and S. Kuninaga (1990). DNA Base sequence homology in *Rhizoctonia solani* K¨uhn: Inter- and intragroup relatedness of anastomosisgroup-9. Phytopathology. 80:1362-1364.

Carling, D.E. (1996). Grouping in *Rhizoctonia solani* by hyphal anastomosis reaction. Pages: 37-47. [In:] Rhizoctonia species taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease

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

Carling, D.E.; S. Kuninaga; and K.A. Brainard (2002b). Hyphal anastomosis reactions, rDNA-internal transcribed spacers sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* anastomosis group2 (AG-2) and AG BI. Phytopathology.92:43–50.

Ceresini, P.C.; D.H. Shew; J.R. Vilgalys; and A.M. Cubeta (2002). Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* AG-3 from potato and tobacco in North Carolina. Mycologia. 94: 437-449.

Chard, T.; and C. Logan (1983). Cultural and pathogenic variation in potato isolates of *Rhizoctonia solani* in Northern Ireland. Transactions of the British Mycological Society. 81: 585–589.

control. (Sneh, B.; S. Jabaji-Hare; S. Neate and G. Dijst [editor]). Dordrecht, Netherlands. Kluwer Academic Publishers.

Das, S.; F.A. Shah; R.C. Butler; R.E. Falloon; A. Stewart; S. Raikar; and A.R. Pitman (2014). Genetic variability and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* associated with black scurf of potato in New Zealand. Plant Pathology. 63:651-666.

Desvani, S.; I. Lestari; R.S. Wibowo; S. Poromarto; and H. Hadiwiyono (2018). Morphological characteristics and virulence of *Rhizoctonia solani* isolates collected from some rice production areas in some districts of Central Java. AIP Conference Proceedings.

El-Zaidy, M.; M. Mahmoud; A.H. Hatamleh; M.R. Al-Othman; and N.S. Abdelazim (2018). Molecular identification and characterization of *Rhizoctonia solani* AG-3 isolates causing black scurf of potato. Pakistan Journal of Botany. 50. 415-420.

FAO (2016). FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

FAO (2018). FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Ferrucho, R.L.; P.C. Ceresini; U.M. Ramirez-Escobar; B.A. McDonald; M.A. Cubeta; and C. García-Domínguez (2012). The population genetic structure of *Rhizoctonia solani* AG-3PT from potato in the Colombian Andes. Phytopathology. 103:862-869.

Gardes, M.; and D. Bruns (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol Ecol. 2:113—118

Gonzalez, D.; D.E. Carling; S. Kuninaga; R. Vilgalys; and M.A. Cubeta (2001). Ribosomal DNA systematics of *Ceratobasidium* and *Thanathephorus* with *Rhizoctonia* anamorphs. Mycologia. 93: 1138–1150.

Goswami, S.; V. Singh; P. Kashyap; and P. Singh (2019). Morphological characterization and screening for sheath blight resistance using Indian isolates of *Rhizoctonia solani* AG1IA. Indian Phytopathology. 72: 1-18.

Guleria, S.; R. Aggarwal; T.S. Thind; and T.R. Sharma (2007). Morphological and pathological variability in rice isolates of *Rhizoctonia solani* and molecular analysis of their genetic variability. Journal of Phytopathology. 155: 654-661.

Hamid, E.E.H.; Y.E.S. Himeidan; and S.M.E. Hassan (2006). Cultural practices for the management of Rhizoctonia disease in potato. Agricultural Science. 18: 141-148.

Homma, Y.; Y. Ohbi; and T. Katsube (1983). Suppre- sive factors to Japanese radish damping-off in the soil reinoculated with Rhizoctonia solani. Annals of the Phytopathological Society of Japan. 49, 388 (abstract).

Justesen, A.F.; D. Yohalem; A. Bay; and M. Nicolaisen (2003). Genetic diversity in potato field populations of *Thanatephorus cucumeris* AG-3, revealed by ITS polymorphism and RAPD markers. Mycological Research. 107:1323-1331.

Kuiry, S.P.; A. Mondal; S. Banerjee; and S. Dutta (2014). Morphological variability in *Rhizoctonia solani* isolates from different agro-ecological zones of West Bengal, India, Archives of Phytopathology and Plant Protection. 47(6): 728-736.

Kunigana, S.; D.E. Carling; T. Takeuchi; and R. Yokosawa (2000). Comparison of rDNA ITS sequences between potato and tobacco strains in *Rhizoctonia solani* AG-3 J Gen. plant Pathology. 66:2-11.

Kuninaga, S.; T. Natsuaki; T. Takeuchi; and R. Yokosawa (1997). Sequence variation of the rDNA ITS regions within and between anastomosis groups in *Rhizoctonia solani.* Curr. Genet. 32:237– 243.

Lees, A.K.; D.W. Cullen; L. Sullivan; and M.J. Nicolson (2002). Development of conventional and quantitive real-time PCR assays for the detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG-3 in potato and soil. Plant pathology. 51: 293-302.

Naffaa, W.; S. Ibrahim; T. Abou-Alfadil; and A. Dawood (2017). Incidence of the potato late blight pathogen, *Phytophthora infestans*, in Syria and its mating type. Journal of Plant Diseases and Protection. 124 (6): 533-537.

Ogoshi, A. (1987). Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. Annual Review of Phytopathology. 25:125-143.

Okubara, P.A.; K.L. Schroeder; and T.C. Paulitz (2008). Identification and quantification of *Rhizoctonia solani* and *R. oryzae* using real-time polymerase chain reaction. Phytopathology. 98: 837-847.

Rabie, A.; S. El-Shafey; M. Rabab; M. Elamawi; M. Saleh; M. Abdelaziz; A. Amero (2019). Morphological, pathological and molecular characterisation of rice sheath blight disease causal organism *Rhizoctonia solani* AG-1 IA in Egypt, Archives of Phytopathology and Plant Protection. 52:5-6, 507-529.

Rauf, C.A.; A. Iftikhar; and I. Masri (2007). Anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* Kühn isolates from potato in Pakistan. Pakistan Journal of Botany. 39. 1335-1340.

Sambrook, J.; and D. Russell (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sharma, M.; S.K. Gupta; and T.R. Sharma (2005). Characterization of variability in *Rhizoctonia solani* by using morphological and molecular markers. Phytopathology. 153: 449-456.

Sneh, B.; S. Jabaji-Hare; S. Neate; and G. Dijst (1996). *Rhizoctonia* species: Taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Kluwer Academic Publishers, London.

Tsror, L. (2010). Biology, epidemiology and management of *Rhizoctonia solani* on potato. Journal of Phytopathology. 158:649-58.

Van den Brink, L.; and R. Wustman (2014). *Rhizoctonia solani* in potatoes and its control. Wageningen, The Netherlands: Praktijkonderzoek Plant & Omgeving-Wageningen UR Business Unit AGV. PPO no. 3250265500-1-27.

Woodhall, J.H.; A.K. Lees; S.G. Edwards; and P. Jenkinson (2007). Characterization of *Rhizoctonia solani* from potatoes in Great Britain. Plant Pathology. 56: 286-295.

Morphological and Molecular Characterization of *Rhizoctonia Solani* Isolates Causing Black Scurf Disease to Potato in Some Regions of Syria

Sally Abo Akel[(1)], Walid Naffaa[(2)*], and Mohammed Jamal Mando[(1)]

(1). Plant Protection Research Admin., General Commission for Scientific Agricultural Research (GCSAR), Damascus, Syria.

(2). Damascus University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, Damascus, Syria.

(*Corresponding author:Dr. Walid Naffaa. E-mail: walid1851966@yahoo.com)

Received: 14/04/2021 Accepted: 10/05/2021

Abstract

Potato *Solanum tuberosum* L. is one of the most important food and industrial crops worldwide. Black scurf, caused by *Rhizoctonia solani* Kühn. [teleomorph: *Thanatephorus cucumeris* (A.B. Frank) Donk], is an important disease associated with potato cultivation worldwide including Syria. Nineteen isolates of *R. solani* were obtained from sclerotia formed on infected potato tubers, collected from fields in Homs and Aleppo governorates during the spring season (February, March, & April), and from fields in Damascus countryside (Sa`sa) and Daraa governorates during the summer season (August, & September) in 2018-2019. The isolates varied in their morphological characteristics (colony color and appearance), ability to form sclerotia, color of sclerotia and where they were placed on the plate. The molecular study, using a pair of specific primers (ITS4-B / AG3-1F) for *R. solani* (AG3) detection, and another pair of specific primers (Rs2R1 / Rs1F2) for AG3-PT detection, showed that 78.95% of *R. solani* isolates belonged to the sub-group AG3- PT, except the isolates Rh4, Rh12, Rh14, Rh19 (21.05 %) that might belong to one or more of the non-AG3 anastomosis groups infecting potatoes. Up to our knowledge, this is the first study in Syria for the molecular detection of *R. solani* anastomosis groups.

Key words: *Rhizoctonia*, anastomosis groups, black scurf, potato, molecular identification.