مجلة البصرة للعلوم الزراعية، المجلد 28 (1)،211-222،2015

دراسة النشاط الأنزيمي الخارج خلوي للعزلة البرية Rs2 للفطر *Rhizoctonia solani* و المعاملات المعرضة للإشعاع

يحيى عاشور صالح وسكينة عبد علي عبود وناجي سالم جاسم

قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة البصرة، العراق

المستخلص: اختُبرت قابلية عزلة الفطر *Rhizoctonia solani* Rs2 المعزولة من نبات البطيخ و معاملاتها المعرضة للأشعة فوق البنفسجية (Ultra Violet light) على إنتاج الإنزيمات الخارج خلوية مثل السليليز (Cellulase) و البروتيز (Protease) وألاليبيز(Lipase)، إذ اختُبرت هذه القابلية في الأطباق باستخدام أوساط صلبة، بينت الدراسة بأن التعريض للأشعة فوق البنفسجية أدى الى زيادة في إفراز أنزيمات السليليز و البروتيز في المعاملتين URs5 و URs6 اللتين سجلتا 4.0 و 6.0 ملم للسليليز و 6.0 و 10.0 ملم للبروتيز على التوالي، مقارنة بـ 2.6 و 2.0 ملم للعزلة البرية Rs2 للسليليز والبروتيز على التوالي، وهذا يدل على اختلاف النشاط الإنزيمي للعزلة البرية للفطر *R. solani* و المعاملتين المعرضتين للإشعاع، كما أظهرت العزلة البرية Rs2 و جميعالمعاملات المعرضة للإشعاع كشفاً سالباً لأنزيم اللاييبز.

الكلمات المفتاحية: المعاملات المعرضة للإشعاع، *Rhizoctonia solani*، النشاط الأنزيمي.

المقدمة

تلعب الإنزيمات دوراً أساسياً و مهماً في احداث الإصابة او المرض من قبل الكثير من الممرضات النباتية و خاصة الفطرية، ان معظم الكائنات الممرضة للنبات تفرز إنزيمات طيلة وجودها أو خلال ملامستها للمادة الخاضعة للإنزيم (Substrate) وعادة ان اول إتصال للممرض بالعائل يكون عند سطح النبات (1)، إذ تؤثر الإنزيمات المنتجة من قبل الفطريات كيميائياً في جدار الخلية (Cell wall) (2)، الذي هو عبارة عن بوليمرز معقد التركيب يحيط بالخلية و السايتوبلازم (3)، والذي يتكون في الأساس من السليلوز في البشرة او السليلوز زائد الكيوتين في الأجزاء الهوائية من النبات، كما قد يوجد بكتين و لكنين في جدران البشرة (1). لتحطيم مثل هذا الجدار يجب إفراز إنزيمات خارج خلوية مثل الإنزيمات المحللة للسليلوز وانصاف السليلوز والبكتين والبروتين التي تكون قادرة على مهاجمة المكونات الأساسية في جدار الخلية (4)، كما وجد إن ممرضات النبات تفرز كميات متفاوتة من الإنزيمات قادرة على إذابة مكونات جدار الخلية (5). وتمتاز الفطريات الممرضة للنبات بمقدرتها على إفراز طيف واسع من الإنزيمات المحللة مثل Peroxidase و Tyrosinase و Phenol oxidaseو Amylase و Lipase و Protease و Cellulase. وليست لجميع الفطريات الممرضة المقدرة على إفراز كل هذهالإنزيمات فقد ذكر Hankin and Anagnostakis (6) أن عزلات الفطر *Phytophthora parasitica* ليست لديها المقدرة على إفراز الإنزيم المحلل للبروتينات في حين كان لباقي الفطريات الممرضة مثل *Fusarium oxysporum* المقدرة على إنتاج هذا الإنزيم، كما أشار السعدون (7) في در اسة النشاط الإنزيمي الخارج خلوي لعزلات مختلفة من الفطر *Mauginila scatetae* إلى فشل جميع العزلات المدروسة في إعطاء كشفا موجبا لإنزيم الاميليز، بينما تفاوتت العزلات في درجة نشاطها الإنزيمي لإنزيمات مختلفة.ولبيان أهمية الإنزيمات والدور الذي تلعبه في الإمراضية أجري هذا البحث.

مواد و طرائق العمل

العزل من النبات بطريقة الوسط الزرعي

قُسمت النباتات التي جُلبت من المزارع الى عدة أقسام هي الجذور والسيقان وقواعد السيقان والأوراق والثمار وقطعت الى قطع صغيرة بطول 1سم وغُسلت بالماء الجاري لإزالة الأتربة او الطين منها ثم غُسلت بالماء المقطر ثم عُقمت بواسطة محلول هايبوكلورات الصوديوم التجاري NaOCl بتركيز 10% من المحلول التجاري ذو التركيز 6% ولمدة 2 – 3 دقيقة، بعدها غُسلت بالماء المقطر المعقم لإزالة آثار التعقيم وجففت بواسطة ورق ترشيح معقم لإزالة الماء منها، ثم وضعت في أطباق زجاجية حاوية على الوسط الغذائي المعقم P D A او P C A المضاف له المضاد الحيوي Chloromphencol بتركيز 250 ملغم/لتر والمعدل رقمه الهيدروجيني إلى 5.5 وبواقع 4 قطع/طبق وحضنت الأطباق تحت درجة حرارة 25 ± 2 مْ لمدة 3 – 4 أيام، بعد ذلك فُحصت بشكل دوري للتعرف على الفطريات وقد استخدم 3 مكررات من كل عينة.

عزلات الفطر *Rhizoctonia solani*

فُحصت العزلات المعزولة باستعمال المجهر المركب نوع Optika B –182 وذلك بعد تنقيتها وتحضير شرائح زجاجية منها باستعمال مادة اللاكتوفينول المضاف إليها صبغة القطن الزرقاء. ثم شُخصت الفطريات المعزولة بالاعتماد على ما ذكره Watanabe و Shiyomi (8).

اختبار القدرة الأمراضية لعزلات الفطر *Rhizoctonia solani* باستخدام بذور الرشاد

زُرعت بذور الرشاد المعقمة سطحيا بمحلول هايبوكلورات الصوديوم بنسبة 10% لمدة دقيقتين على أطباق بتري معقمة حاوية ورق ترشيح بمعدل 25 بذرة/طبق و أضيف المعلق الفطري الى عزلات الفطر *R.solani* كلا على انفراد و بمعدل 5 مل/طبق، كررت كل عزلة ثلاث مرات، اخذين بنظر الاعتبار تنفيذ معاملة مقارنة بزراعة بذور الرشاد على ورق الترشيح بالطريقة نفسها من دون إضافة إي معلق فطري، و إنما إضافة 5 مل من ماء مقطر معقم، حضنت الأطباق في درجة حرارة 25 ± 2 مْ، و بعد 4 أيام حُسبت النسبة المئوية لإنبات البذور و موت البادرات بعد الإنبات في كل معاملة ومعدل أطوال ثلاث بادرات أُختيرت عشوائيا في كل طبق لعزلات الفطر *R. solani*.

دراسة تأثير الأشعة فوق البنفسجية U.V Light(Ultra violet light) في العزلة البرية RS2 للفطر *R. solani*

عُرضت العزلة البرية للأشعة فوق البنفسجية (UV light) في كابينة خاصة نوع VILBER LOURMAT فرنسية الصنع بأبعاد خارجية: 30.5سم ارتفاع وعرض 35 سم وعمق 36 سم مُزوده بـ 5 مصابيح UV light و مُثبتة على شدة 254نانوميتر، وكانت العينات على بعد 14.5سم من مصدر الإضاءة، و كانت فترات التعريض (10، 20، 30، 40، 50، 60) دقيقة (9، 10،11) سُميت المعاملات المعرضة للإشعاع URs1 و URs2 و URs3 و URs4 و URs5 و URs6 على التوالي.

دراسة النشاط الأنزيمي الخارج خلوي للعزلة البرية RS2 للفطر *R.solani* والمعاملات المعرضة للإشعاع

أُستخدمت أوساط زراعية خاصة للكشف النوعي (Qualitative)عن قابلية العزلة البرية Rs2 للفطر *R. solani* والمعاملات المعرضة للإشعاع لإنتاج ألأنزيمات، أُخذت أقراص بأقطار متساوية من المعاملات المعرضة للإشعاع URs1 و URs2 و URs5 و URs6 المنماة على وسط P. D. A بعمر 72 ساعة ولُقحت الأطباق الحاوية الأوساط الزرعية الخاصة بالاختبارات الأنزيمية المختلفة وبثلاثة مكررات لكل معاملة من كل اختبار، ثُم حُضنت الأطباق تحت درجة حرارة 25 ± 2مْ و قبل وصول النمو الفطري الى حافة الطبق أجري الكشف عن الأنزيمات المختلفة، و الأنزيمات المختبرة هي

فعالية أنزيم السليليز Cellulase activity

أُتبعت الطريقة التي وصفها Reese و Mandels (12) لاختبار قابلية العزلة البرية Rs2 للفطر *R.solani* و

العزلات المعرضة للإشعاع URs1 و URs2 و URs5 و URs6 على استغلال السيليلوز الذائب(Soluble cellulose) عُقم الوسط بجهاز التعقيم البخاري (المؤصدة) في ما عدا اليوريا التي حُضرت بشكل محلول مع الماء المقطر المعقم، عُقيمت بإمرار المحلول عبر مرشح غشائي دقيق قطرهُ 0.45 مايكرون بواسطة جهاز التفريغ الهوائي، و بعد أن بُرد الوسط أضيف إليه راشح اليوريا، قبل وصول النمو الفطري لحافة الطبق تم إضافة كاشف السليليز وهو محلول آيودين حامض الهيدروكلوريك (HCl-Iodine Solution Cellulose) المحضر من مزج 100مل من حامض الهيدروكلوريك (HCl) 1 عياري و 500مل من 1% يود (I) و يوديد البوتاسيوم (KI) 2% بدلالة وزن : حجم (13)، إذ أضيف محلول الصبغة بمعدل 4مل/طبق ولمدة 3 – 5 دقائق، ثُم سكب المحلول من الأطباق وتم الاستدلال على قابلية العزلة البرية و مُعاملات التعريض للأشعة فوق البنفسجية على إفراز إنزيم السليليز بتكوين هالة صفراء حول المستعمرة ،و قيسَ قطر الهالة وحُسبَ معدل الفعالية الأنزيمية بحساب الفرق بين قطر نمو المستعمرة و قطر الهالة مقاسه بـ ملم. و أُستخدم قياس السعدون (7) بتحديد كفاءة المعاملات المختبرة (0، 10، 20، 50، 60) دقيقة في إفراز إنزيم السليليز.

فعالية أنزيم البروتيز Protoase activity

استخدم الوسط الحاوي على الجلاتين الذي وصوفه Society of American Bacteriologists (14) إذ أُستخدم الوسط الغذائي المكون من الأكار المغذي (Nutrient Agar) (الذي حُضر بحسب الطريقة المُثبتة على العلبة) 8% جلاتين (Gelatine)، ثم عقم وسط الأكار المغذي و الجلاتين بجهاز التعقيم البخاري كلاً على حدة، و أُضيف محلول الجلاتين بواقع 5مل لكل 100مل من وسط الأكار المغذي، وصب الوسط في أطباق بتري معقمة ولقحت الأطباق بالمعاملات المعرضة للإشعاع URs1 و URs2 و URs5 و URs6 كلاً على حدة، و حُضنت كما في الفقرة السابقة، استخدم كاشف فرايزر (Frazier's reagent) الموصوف من قبل Capelli , Bisson (15) أضيف الكاشف الى الأطباق و ترك لمدة 5دقائق ثُم سكب من الأطباق، و استُدِلَ على فعالية الفطر على إنتاج أنزيم البروتيز بتكوين هالة شفافة حول المستعمرة، قيس قطر الهالة و حُسب معدل الفعالية الأنزيمية كما في الفقرة السابقة.

فعالية أنزيم اللايبيز Lipase activity

لاختبار فعالية العزلة البرية Rs2 و المعاملات المعرضة للإشعاع URs1 و URs2 و URs5 و URs6على إنتاج إنزيم اللايبيز إستخدمت طريقتان:

الطريقة الأولى: أستعمل الوسط الذي وصفهُ Sierra (16) عقم Tween 80 وحده في قنينة زجاجية في الفرن (oven) تحت درجة حرارة 60 مْ لمدة 15 دقيقة إما بقية مكونات الوسط فقد عُقمت في جهاز التعقيم البخاري ثم أضيف Tween 80 إلى بقية مكونات الوسط المعقم وبعد انخفاض درجة حرارته تم الكشف عن إنزيم اللايبيز بتكوين راسب ابيض تحت الغزل الفطري أو بلورات بيضاء مغمورة في الوسط الزرعي تحيط به المستعمرة الفطرية.

الطريقة الثانية: الوسط الحاوي على زيت الزيتون والموصوف من قبل Ahmad *et al.* (17) عُقم زيت الزيتون كما في الفقرة السابقة، تم الكشف عن إنزيم اللايبيز بتكوين هالة شفافة حول الغزل الفطري.

التحليل الأحصائي

نفذت جميع التجارب حسب التصميم العشوائي الكامل C. R. D بالتجارب وحيدة العامل، حللت النسبة المئوية للبيانات بعد تحويلها زاويا Arcsine transformation وقورنت المتوسطات بطريقة اقل فرق معنوي المعدل (R.L.S D) تحت مستوى احتمالي 1%

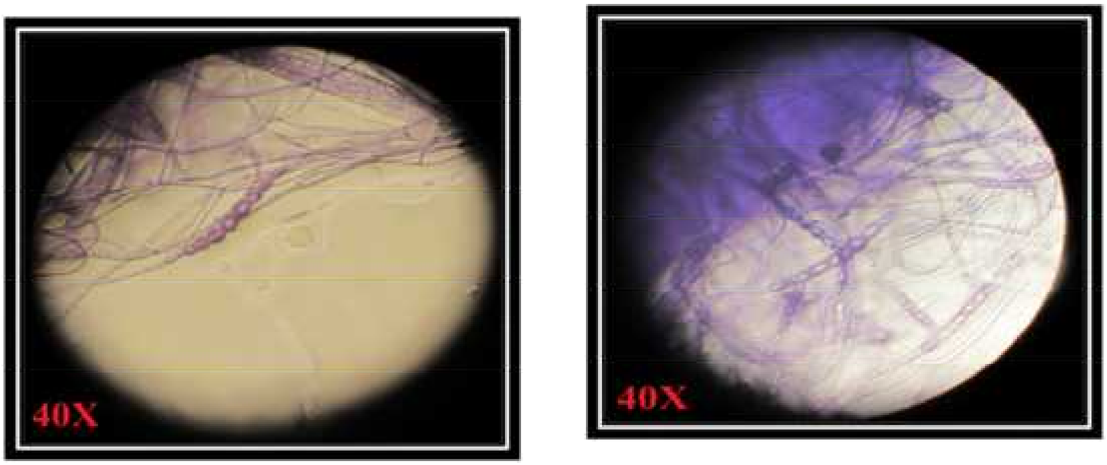
النتائج و المناقشة

عزلات الفطر Rhizoctonia solani

حُصلَ على عزلات مختلفة من الفطر *R . solani* وذلك بعزلها من عوائل نباتية متعددة من مناطق مختلفة في محافظة البصرة (جدول 1)، كما أظهرت نتائج الفحص المُختبري أن هنالك صفات مُشتركة في الشكل المظهري للفطر بين جميع العزلات وفق ما ذكره Parmeter و أخرون (18، 19، 20) وهذه الصفات هي : 1 – التفرع قرب الحاجز الطرفي للخلايا في الغزل الفطري الحديث 2 – تخصر الفروع وتكوين حواجز قرب نقطة نشوء الفرع 3 – ظهور درجة من اللون البني. في حين أظهرت نتائج الفحص وجود بعض الإختلافات بين العزلات في الشكل الخارجي للخيط الفطري، إذ كان الحاجز العرضي في الخيط الفطري الرئيسي (الأصل) أقرب الى نقطة التفرع من الحاجز العرضي للفرع القائم للغزل الفطري للعزلة Rs1، بينما كان الحاجز العرضي في الأصل يبعد نفس المسافة التي يبعدها الحاجز العرضي للفرع القائم عن نقطة تفرع العزلة Rs2، كما كان الحاجز العرضي في الأصل أبعد عن نقطة التفرع من الحاجز العرضي للفرع القائم للعزلة Rs3، في حين أن العزلتين Rs4 و Rs5 قد كونت تراكيب دائرية مُنتفخة يُطلق عليها Monilioid cells بشكل سلاسل طويلة أو قصيرة كما هو موضح في صورة (1) كما أظهرت النتائج وجود تغاير في لون المستعمرات (صورة 2)، إذ كانت بعض المستعمرات ذات لون بني فاتح في حين أن مُستعمرات أخرى ذات لون ابيض في المراحل الاولى من النمو تحولت بعدها الى اللون البني الفاتح، كما ختلفت العزلات في تكوينها للأجسام الحجرية (Sclerotia) إذ كانت العزلة Rs2 مُنتجة للأجسام الحجرية ذات لون بني ومُتباينة بالشكل والحجم بشكل واسع جاءت جميع النتائج متفقة مع Watanabe و Shiyomi (8).

جدول (1): عزلات الفطر *R. solani* والعوائل النباتية التي أُخذت منها العزلة ومنطقة الجمع.

رقم العزلة	رمزها	النبات العائل	منطقة الجمع
1	Rs1	البامية	حقول كلية الزراعة
2	Rs2	البطيخ	الزبير (الرميلة الجنوبية)
3	Rs3	جذر قثاء الماء	التنومه (شط العرب)
4	Rs4	ثمرة قثاء الماء	التنومه (شط العرب)
5	Rs5	قرع	الزبير (الرميلة الجنوبية)



صورة (1): سلاسل Monilioid cells في العزلات RS4 و RS5 بقوة تكبير X 400.

صورة (2): عزلات الفطر *R. solani* المعزولة من عوائل نباتية مختلفة A = RS1 عزلة *R. solani* من نبات الباميا B = RS2 عزلة *R. solani* من البطيخ C = RS3 عزلة *R. solani* من جذر قثاء الماء D = RS4 عزلة *R. solani* من ثمرة قثاء الماء E = RS5 عزلة *R. solani* من القرع.

اختبار القدرة الأمراضية لعزلات الفطر *Rhizoctonia solani* باستخدام بذور الرشاد

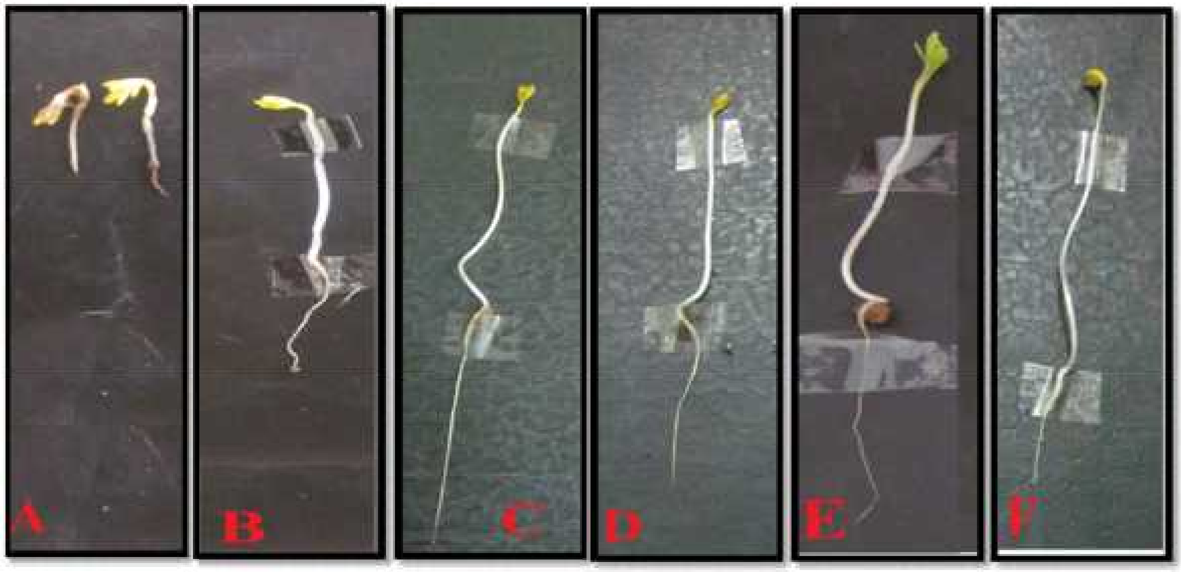
أظهرت نتائج هذه التجربة تبايناً كبيراً في تأثير عزلات الفطر *R. solani* في إنبات بذور الرشاد ونمو وأطوال بادراته (جدول 2)، إذ بينت نتائج التحليل الإحصائي تبايناً كبيرا في النسبة المئوية لإنبات بذور الرشاد وموت بادراته، و كانت العزلة Rs2 أكثر العزلات تأثيراً في النسبة المئوية للأنبات وموت البادرات و اختزال أطوالها إذ بلغت النسبة المئوية للإنبات وموت البادرات 0 و 100 % على التوالي. ,وقد إتفقت هذه النتيجة مع ماتوصل اليه Mirmajlessi و آخرون (21) أن عزلتي فطر *R . solani*من أصل ثلاثة و المعزولة من نبات البطيخ كانت شديدة الإمراضية HV (High virulence) سجلتا نسبة مئوية للأصابة بلغت 83.3 و 75 % على التوالي. تلتها من ناحية التأثير العزلات Rs1 و Rs4 و Rs3 إذ بلغت النسبة المئوية للأنبات 70.6 و 73.3 و 76 % على التوالي وموت البادرات 42.6 و 36.6 و 31.3 %على التو الي، ولم تختلف نتائج العزلة Rs5 عن معاملة المقارنة إذ كانت النسبة المئوية لإنبات و موت البادرات فيها 96 % و 4 % على التوالي، تتفق هذه النتائج مع ماوجده البلداوي (22) و Castro واخرون (23) من إختلاف عزلات الفطر *R . solani* في شدة إمراضيتها وماأثبتته الدراسات الاخرى على عوائل نباتية مختلفة (24 ، 25 ،26)، .وقد يعود هذا الاختلاف بين العزلات في تأثيرها في النسبة المئوية لانبات بذور الرشاد وموت بادراته الى الاختلاف الوراثي بين عزلات الفطر التي عزلت من عوائل نباتية مختلفة، وتباين العزلات في مقدرتها على افراز الانزيمات المحللة للبكتين و السليلوز في المراحل الاولى من الاصابة والتي تلعب دوراً مهماً في اختراق العائل، إذ ذكر بعض الباحثين أن إنزيم Protease له دور كبير في تحديد القدرة الامراضية للفطر *R.solani* (27، 28، 29).

أما عن تأثير عزلات الفطر *R.solani* في أطوال البادرات فقد كانت العزلة Rs2 أشد العزلات إختزالاً للطول إذ بلغ الطول 1.5 سم تلتها العزلات Rs1 و Rs3 و Rs4 إذ كانت أطوال البادرات 4.1 و 8.2 و 7.8 سم على التوالي، في حين تختلف العزلة Rs5 بفروقات معنوية عن معاملة المقارنة إذ كان الطول فيها 8.8 سم مقارنة بمعاملة المقارنة التي كان الطول فيها 6.4 سم و لوحظ أن هذه العزلة تشجع النمو (صورة 3). إن سبب التقزم الحاصل في أطوال البادرات قد يعود الى إفرازات عزلات الفطر*R.solani* من السموم أو المركبات الكيميائية مثل Phosphon – D و Maleic hydrazide وAcetosyringone التي تؤثر في المواقع الفعالة في إنتاج مُنظمات النمو أو تمنع تكوينها مايؤدي الى التقليل من الكميات المنتجة من مُنظمات النمو المسؤولة عن استطالة النبات وبالتالي تقزمه (30، 31، 32)، أما عن قدرة بعض عزلات الفطر *R.solani* غير المُمرضة على تشجيع النمو فربما يُعزى الى قدرتها على إفراز بعض مُنظمات النمو مثل أندول حامض الخليك I.A.A (Indol acetic acid) او استحثاث النبات على إنتاج كميات أكبر من مُنظمات النمو مثل الأوكسينات (Auxin) أو السايتوكاينينات (Cytokinin) او الجبيرلينات (Gibberrellin) التي تؤثر في جينات التقزم ما يؤدي الى إستطالة النبات (33، 34، 31، 32).

جدول (2): تأثير عزلات الفطر *R . solani* في النسبة المئوية لإنبات بذور الرشاد وموت بادراته وفي أطوال البادرات بعمر 4 أيام.

ت	رمز العزلة	% الإنبات	% موت البادرات	أطوال البادرات (سم)
1	Rs1	*70 . 6	42 . 6	4 . 1
2	Rs2	0	100	1 . 5
3	Rs3	76	31 . 3	8 . 2
4	Rs4	73 . 3	36 . 6	7 . 8
5	Rs5	96	4	8 . 8
المقارنة		100	0	4 . 6
R.L. S. D%1		11 . 3	15 . 1	1 . 9

* كل رقم داخل الجدول يمثل معدل ثلاثة مكررات



صورة (3): أطوال بادرات الرشاد المُعاملة بعزلات الفطر *R.solani*، RS1=عزلة *R. solani* من نبات البامية ، RS2 =عزلة *R. solani* من البطيخ ، RS3 =عزلة *R. solani* من جذر قثاء الماء ، RS4 =عزلة *R.* solani من ثمرة قثاء الماء ، RS5 = عزلة *R. solani* من القرع (A= بادرة معاملة بالعزلة RS2، B = بادرة معاملة بـ RS1 ، C = بادرة معاملة بـ RS3، D: = بادرة معاملة بـ RS4 ، E = بادرة معاملة بـ RS5 ، F = معاملة مقارنة).

النشاط الأنزيمي الخارج خلوي للعزلة البريةRS2 للفطر *R. solani* والمعاملات المعرضة للإشعاع

لوحظ من خلال الدراسة (جدول 3 وصورة 4) وجود فروقات عالية المعنوية في النشاط الأنزيمي بين العزلة البرية للفطر *R. solani* وأغلب المعاملات المعرضة للإشعاع، إذ بينت نتائج كشف إنزيم السليليز بأن المعاملة URs6 سجلت أعلى حيز نشاط بلغ 6.0 ملم كما هو مبين من الهالة الصفراء المتكونة و الموضحة في الصورة (4)، تلتها المعاملتان URs1 و URs5 إذ بلغ حيز النشاط في كل واحدة منهما 4.6 و 4.0 ملم على التوالي مقارنة بالعزلة البرية Rs2 التي بلغ حيز النشاط فيها 2.6 ملم، اما المعاملةURs2 فقد شابهت العزلة البرية في حيز النشاط . كما بينت نتائج كشف إنزيم البروتيز أن المعاملة URs6 سجلت أعلى حيز نشاط بلغ 10.6 ملم كما بينته الهالة البيضاء المتكونة و الموضحة في صورة (4)، تلتها المعاملة URs5 إذ بلغ حيز النشاط فيها 6.0 ملم بفروقات عالية المعنوية عن العزلة البرية التي بلغ حيز النشاط فيها 2.0 ملم، اما المعاملتان URs1 و URs 2 فقد سجلتا أقل حيز للنشاط الإنزيمي بلغ 1.6ملم و هو أقل مما سُجل في العزلة البرية. أما نتائج كشف إنزيم اللاييبز فقد بينت طريقتا الكشف أن العزلة البرية 2 للفطر *R. solani* غيرمُنتجة لإنزيم اللاييبز، كما أن أشعة. UV لم تستطع إستحثاث طفرة قادرة على إنتاج هذا الإنزيم، إتفقت هذه النتيجة مع ماذكرتهُ Ahmad وآخرون (17) أن السلالتين المُختبرتين للفطر *R. solani* و هما st.1 . *R solani* st. 2 *R . solani* كانتا غير قادرتين على إنتاج إنزيم اللاييبز

جدول (3): النشاط الإنزيمي الخارج خلوي للعزلة البرية Rs2 و المعاملات المعرضة للإشعاع.

ت	المعاملات	النشاط الأنزيمي (ملم)			
		السليليز	البروتيز	اللاييبز	
				طريقة 1	طريقة 2
1	URs1	4.6	1.6 *	0	0
2	URs2	2.6	1.6	0	0
3	URs5	4.0	6.0	0	0
4	URs6	6.0	10.6	0	0
5	Rs2	2.6	2.0	0	0
R.L.S.D %1		1.1	1.1	0	0

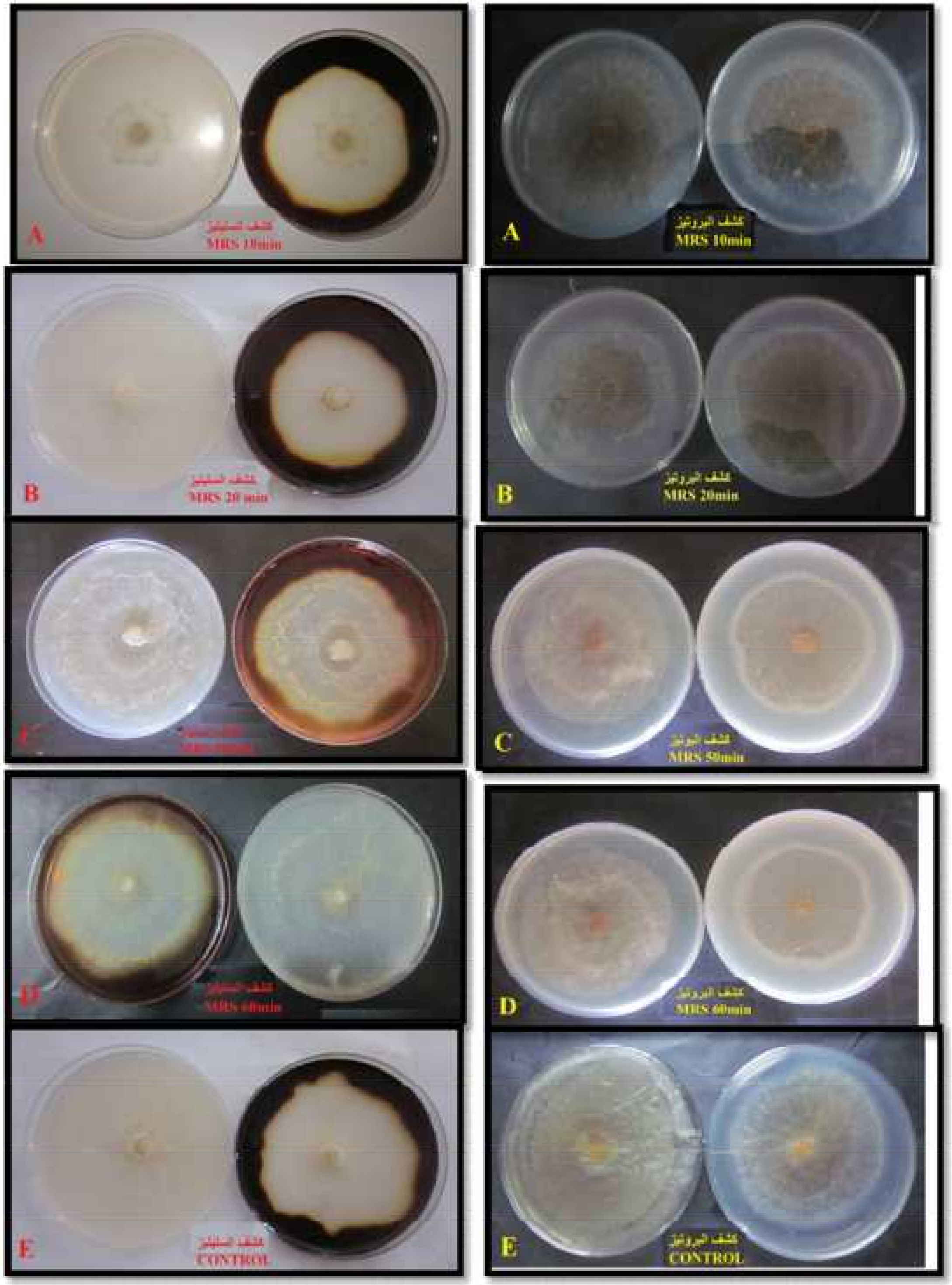
* كل رقم داخل الجدول يمثل معدل ثلاثة مكررات

URS1 = *R. solani* Ultra violet light الرقم بجانب الرمز يمثل فترة التعريض للأشعة (10 دقيقة)

RS2 = *R. solani* العزلة البرية 2

الطريقة 1= الوسط الموصوف من قبل Sierra (1957)

الطريقة 2= الموصوف من قبل Ahmad و آخرون (2006)



صورة (4): كاشف إنزيم السليليز (الحروف بلون الأحمر) وإنزيم البروتيز (الحروف بلون الأصفر) للعزلة البرية RS2 للفطر *R. solani* والمعاملات المعرضة للإشعاع A= URS1 B= URS2 C= URS5 D= URS6 E= RS2 برية.

المصادر

1.Agrios, G. N. (2005). Plant Pathology. 5th Ed. Elsevier Inc. USA. 998pp

2.AlbeRsheim, P.; Jones, T.M. and English, P.D. (1969). Biochemistry of cell wall inrelation to infective process. Annu. Rev. Phytopathol., 7: 171-194

3.Karr, A. L. Jr. and. AlbeRsheim, P (1970). Polysaccharide-degrading enzymes are unable to attack plant cell walls without prior action by a cell wall modifying enzyme. Plant Physiol., 46: 69-80

4.Wheeler, H. (1975). Plant pathogenesis. Acad. Press, New York & London. 2-3.

5.Riou, C.; Freyssinet, G. and Fevre, M. (1991). Production of cell wall degrading enzymes by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. Appl. Environ. Microbiol., ??: 1478-1484.

6.Hankin, L. and Anagnostakis, S. L. (1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia 67: 597-607.

7.السعدون، عبد الله حمود (1989). دراسة حول الفطر *Mauginiella scaettae* Cav. المسبب الممرض لخياس طلع النخيل، رسالة ماجستير، كلية العلوم. جامعة البصرة. 140 صفحة.

8.Watanabe, T. and Shiyomi, M. (1975). Hyphal morphology of *Rhizoctonia solani* Kuhn and related fungi isolated from sugarcane in Taiwan. Trans. Mycol. Soc. Japan. 16: 253-263.

9.Babu, S.; Nandukumar, R.; Sriram, S.; Jaisunkar, R.; Shanmugam, V.; Raguchander, T.; Balasubraman, P.; and Samiyappan, R. (2002). Relationship between sheath blight development and phytotoxin production by *Rhizoctonia solani* mutants in rice. Asia Phytopathol. Entomolog. Hunga, 37(1-3): 109 -118.

10.Bapiraju, K.; Sujatha, P.; Ellaah, P. and Ramanu T. (2004). Mutation induced enhanced biosyaldesis of lipase. African J. Biotech., 3 (11) : 618-621.

11.Hassan, A. A. (2011). Improvement antagonism and fungicides tolerance in Iraqi *Trichoderma harizianum* isolates by ultra-violet Irradiation. Aust. J. Basic and Appl.Sci., 5(11): 909- 917.

12.Reese, and Mandels, M. (1963). Enzymic hydrolysis of cellulose and its derivatives Pp: 139 -143. In: Method in Carbohydrate Chemistry. Vol.3 .Whisler, R.L. (Ed.) .Acad. Press, New York, Total pages.

13.Yeoh, H . H ; Khew, E . and Lim, G . (1985). A simple method of screening cellulolytic fungi. Mycologia. 77 (1): 161-162 .

14.Society of American Bacteriologists (1951). Manual of methods for pure culture study of bacteria. McGraw-Hill, New York and London. Total pages.

15.Bisson, J. W. and Cabelli, V. J. (1979). Memberane filter enumeration method for *Clostridium perfringenes.* Appl. Envir. Microb., 37: 55-66.

16.Sierra , G . (1957). A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organism and some between cells an fatty substrate observation on the influence of the contact. Antouic van Leeuwen-hoek, 23: 15-22.

17.Ahmad, Y.; Hmeed, A. and Ghaffar, A. (2006). Enzymatic activity of fungal pathogens in corn. Pak. J. Bot., 38(4): 1305-1316.

18.Parmeter, J. R. Jr. ; Whitney, H.S. and Platt, W. D. (1967). Affinities of some *Rhizoctonia* species that resemble mycelium of *Thanatephorus cucumeris*. Phytopathology, 57: 218- 223. (C. F. Lehtonen, M.J., 2009).

19.Parmeter, J. R. Jr ;Sherwood, and Platt, W. D. (1969). Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. Phytopathol., 59: 1270- 1278. (C. F. Lehtonen M.J., 2009)

20.Parmeter, J. R. Jr. and Whitney, H.S. (1970). Taxonomy and nomenclature of the imperfect state. Pp: 7-19. In: Parmeter, J. R. Jr. (Ed.) *Rhizoctonia*

solani: Biology and Pathology Univ. California Press. Berkley. 255pp. (C.F. Abbas, 1998).

21.Mirmajlessi, S. M.; Safaie, N. ; Mostafavi, H. A. ; Mansouripour, S. M. and Mahmoudy, S. B. (2012). Genetic diveRsity among crown and root rot isolates of *Rhizoctonia solani* isolated from cucurbits using PCR-based techniques. Afric. J. Agric. Res., 7 (4): 583- 590.

22.البلداوي، عبد الستار عبد الحميد وبرهان، خالد وليد (1983). حساسية أصناف القطن للفطر *Rhizoctonia solani* الكتاب السنوي لبحوث وقاية النبات، 3(2): 255-261.

23.Castro, C.; Davis, J.R. and Wiese, M.V. (1988). Quantitative estimation of *Rhizoctonia solani* AG3 in soil. Phytopathology, 78 : 1287- 1292.

24.Rashid, K.Y. and Bermier, C.C. (1993). Genetic diversity among isolates of *Rhizoctonia solani* and sources of resistance in *Vicia faba*. Plant Pathol., 15: 3-38.

25.الجبوري، حرية حسين شهاب (2002). تأثير استخدام معلق النمو كلتار Cultar وبعض المستخلصات النباتية على اصابة نبات الباقلاء بمسببات تعفن الجذور. رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة بغداد. 84صفحة.

26.حسن، محمد صادق (2002). قابلية عزلات من الفطر *Rhizoctonia solani* على اصابة بادرات كل من اللهانة والقرنابيط والفلفل والباذنجان وباعمار مختلفة. مجلة التقني، 15(8): 122- 128.

27.Mehrotra, R.S.; Aneja, K.R. and Aggarwal, A. (1997). Fungal control agents .Environmentally safe approaches to crop disease control. CRC Press. Total pages?

28.Sett, S.; Mishra, A. K. and Siddiqui, K. A. I. (2000). A virulence mutants of *Macrophomina phaseolina* and *Aspergillus fumigatus* initiate infection in *Phaseolus mungo* in the presence of phaseolinone, levamisole gives protection. J. Biosci., 25: 73-80.

29.Ramezani, H. (2008). Biological control of root-rot of eggplant caused by *Marcophomina phaseolina*. American-Eurasian J. Agric.and Environ. Sci., 4: 218-220.

30.Mubarak, H.M. (2003). Control of root rot and damping- off disease of bean. Ph.D. Thesis. Univ. Tanta. Egypt. (C.F. Mahmoud *et al*., 2007).

32.BE4U.(2013).www.mcqbiology.com/2012/11/mcq-on-plant-hormones gibberellin-es.html.

33.Ghisalberti, E.L.; Narbe, M.J.; Dewan, M.M. and Sivasithamparam, K. (1990). Variability among strains of *Trichoderma harzianum* in their ability to reduce take-all and to produce pyrones. Plant & Soil 121: 287-291.

34.Dahm, H.; Pokojska-Burdziej, A.; Strzelcz, K.E. and Manka, M. (1996). Production of B- group vitamins and auxins by *Fusarium oxysporum* Schlecht. and *Rhizoctonia solani* Kuhn. isolates pathogenic to pine (*Pinus sylivestris* L.) seedlings. Phytopathol. Pol., 12: 129-138.

Basrah J. Agric. Sci., 28 (1): 211-222, 2015

Study of Extra Cellular Enzymatic Activity of *Rhizoctonia solani* Rs2 and Treated Isolates with UV. Light

Yehya A. Salih*, Sukaina A. Abood and Naji S. Jasim
Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Basrah, Iraq
*yehyasalih@gmail.com

Abstract: The ability of wild type Rs2 (isolated from melon plants) *Rhizoctonia solani* which isolated from melon and mutant transaction to produce enzymes such as Cellulase, protease and Lipase, was tested on solid media. The study showed that the UV light led to increase the secretion of cellulase and protease in the isolates URs5 and URs6 which showed 4.0, 6.0, 6.0, and 10.0 mm for two enzymes in comparison with 2.6 and 2 mm for wild type Rs2, respectively. The study also showed the variation in the enzymatic activity of wild type *R. solani* and the mutagenis strain, also the wild type of Rs2 and all mutant isolates revealed a negative detection for Lipase activity.
Key words: UV light treatment, *Rhizoctonia solani,* enzymatic activity.