جامعة الموصل

كلية الزراعة والغابات

التشخيص الجزيئي والكشف عن الجين الخاص بافراز السم لمسببات مرض لفحة السنابل الفيوزاريومي على الحنطة ومكافحتها

سالم ابراهيم اكرم حمزة

أطروحة الدكتوراه

وقاية النبات (أمراض نبات)

إشراف

الدكتور علي كريم الطائي
استاذ

الدكتور كركز محمد ثلج
استاذ

1443 هـ

2022 م

الخلاصة

اظهرت نتائج المسح الحقلي الذي اجري في حقول ناحيتي القيارة والشورة في محافظة نينوى وقضاء الشرقاط في محافظة صلاح الدين للاصابة بمرض لفحة السنابل الفيوزاريومي على الحنطة في موعد المسح الاول 2020/4/1 اذ تم تسجيل أعلى معدل للنسبة المئوية للاصابة وشدة الاصابة في القيارة تلتها الشورة ثم الشرقاط اذ كانت معدلات نسب الاصابة للمناطق المذكورة 11.48% و 10.32%و 9.97% على التوالي وبلغت معدلات شدة الإصابة 0.092 و 0.086و 0.086على التوالي ،وارتفعت النسبة المئوية للاصابة وشدة الاصابة في الموعد الثاني للمسح والذي أُجري بدئاً من يوم 2020/4/20 لمنطقة القيارة والشورة والشرقاط 17.11% و16.13% و15.64% على التوالي وبلغت معدلات شدة الإصابة 0.137 و0.136 و0.133على التوالي.

اظهر العزل من السنابل المصابة بلفحة سنابل الحنطة عن ظهور الفطريات *Fusarium graminearum* (Schwabe) و *Fusarium culmorum* (Saccardo) و *Alternaria* spp. و *Aspergillus* spp. و *Trichoderma* spp. و *Cladosporium* spp. و *Stemphylium* spp. وسجل الفطر *Fusarium graminearum* (عزلة الشورة) أعلى نسبة عزل في الشورة 29.64 % كما سجل الفطر *Fusarium graminearum* (عزلة القيارة)اعلى نسبة عزل في القيارة 26.90 % وحل الفطر *Fusarium culmorum* (عزلة الشورة والقيارة) ثانياً وبنسبة عزل 22.94% و26.03% على التوالي، فيما سجل الفطر *Fusarium graminearum* (عزلة الشرقاط) أعلى نسبة عزل في الشرقاط 34.21% وتم تاكيد التشخيص للعزلات الاربعة بالتشخيص الجزيئي وباستخدام تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل، Polymerase Chain Reaction (PCR) وذلك باستخدام زوج البادئات العامة البادئ الأمامي (ITS1 F: 5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′) والبادئ العكسي (ITS4 R: 5 ′ TCCTCCGCTTATTGATGC-3 3) وقد اظهرت نتائج تحليل الترحيل الكهربائي باستعمال هلام الاكاروز 2 % في ظهور اربعة حزم بحجم 544 زوج قاعدي وتم دراسة التتابع النيوكليوتيدي ومطابقتها مع العزلات العالمية وتبين انها *F. graminearum* (عزلة الشورة) و *F. culmorum*(عزلة الشورة والقيارة) و *Fusarium graminearum* (عزلة الشرقاط) و *F. graminearum* (عزلة القيارة) وتم تسجيل العزلات في البنك الوراثي للجينات تحت ارقام الانضمام MW737663.1 و MW737664.1 و MW737661.1 و MW737662.1 على

التوالي وتعد هذه اول دراسة لتشخيص الفطريات بتقانة البلمرة المتسلسل في المناطق المذكورة اعلاه في العراق، أظهرت هذه الفطريات المشخصة القدرة على اصابة الحنطة بمرض لفحة السنابل.

أظهرت نتائج غربلة تسعة أصناف من الحنطة للإصابة بلفحة السنابل أن الصنف ابوغريب أكثر الأصناف حساسية و بلغت النسبة المئوية للاصابة وشدة الإصابة بلفحة السنابل65.66%و 0.56 في حين كان أقل الأصناف حساسية الصنف صابربيك بنسبة مئوية للاصابة وشدة اصابة بلغت 21.65%و 0.20 يليه الصنف بركة بمعدلات 30.82%و0.29 وأظهرت نتائج الغربلة ان الفطر *F. culmorum* كان اشد الفطريات تأثيراً في صفات النمو للصنف ابوغريب والمتمثلة بارتفاع النبات وطول ومعدل وزن السنبلة ومساحة ورقة العلم وحاصل البذور والحاصل البايولوجي ودليل الحصاد ووزن 1000 حبة والنسبة المئوية للبذور المجعدة،فيما تباينت بقية الاصناف، وأظهرت نتائج المكافحة تأثير المبيدات في النسبة المئوية للاصابة وشدة الإصابة اذ حقق المبيد راكسيل أعلى خفض للنسبة المئوية للاصابة وشدة إصابة بلغت 15.56% و 0.09 تلاه المبيد فيتافاكس بمعدلات 19.4% و 0.13 وحققا زيادة في معدل بعض معايير نمو النبات للصفات المذكورة آنفاً قياساً بالمقارنة غير المعاملة بالمبيد،كما تفوق المبيد الاحيائي ترايكوزون على المبيد الاحيائي BM-Mega Flu في خفض النسبة المئوية للاصابة وشدة الإصابة وزيادة صفات النمو للنباتات المعاملة به.

وكانت نتائج تقدير كل من سمي Deoxynivalenol (DON) و Zearalenone (ZEA) المفرز من عزلتين للفطر *F. graminearum* (عزلتي القيارة والشرقاط) و *F. culmorum* النامية على جريش الحنطة من الحقول باستعمال تقانة اختبار المناعة الممتصة بالانزيم Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)،فقد تبين من النتائج تفوق الفطر *F. culmorum* في قابليته على انتاج السم DON على جريش الحنطة وكان بتركيز 13.94 مايكروغرام/كغم تلاه في قابلية الانتاج الفطر *F. graminearum*(عزلة القيارة)والذي افرز السم بتركيز 11.42 مايكروغرام/كغم اما اقل الفطريات في قابلية الانتاج للسم هو الفطر *F.graminearum* (عزلة الشرقاط) الذي ظهرت قابلية افرازه للسم بتركيز 6.10 مايكروغرام/كغم.

اما قابلية انواع الفطريات على انتاج السم ZEN فقد تفوق نوع الفطر *F. culmorum* في قابليته على انتاج السم وكانت بتركيز 7.03 مايكروغرام/كغم تلاه الفطر *F. graminearum*(عزلة القيارة) الذي كانت قابلية انتاجه من السم عند تركيز 6.45 مايكروغرام/كغم، وكان الاقل افرازاً للسم

الفطر *F.graminearum*(عزلة الشرقاط) الذي ظهرت قابليته على افراز السم عند تركيز 4.72 مايكروغرام/كغم.

فيما كانت نتائج تقدير كل من السمين (DON) و (ZEA) المفرز من عزلتين للفطر *F. graminearum* (عزلتي القيارة والشرقاط) والفطر *F. culmorum* على اصناف مختلفة من الحنطة في البيت البلاستيكي باستعمال تقانة ELISA، تبين من النتائج تفوق الفطر *F. graminearum*(عزلة القيارة) في قابليته على افراز السم DON في حبوب الصنف ابوغريب بتركيز 17.73 مايكروغرام/كغم، تلاه الفطر *F. culmorum* في قابليته على افراز السم DON على الصنف نفسه الذي بتركيز 17.67 مايكروغرام/كغم ثم تلاه في الافراز الفطر *F. graminearum* (عزلة الشرقاط) بتركيز 15.61 مايكروغرام/كغم.ولم يتم افراز السم DON من الفطر *F. graminearum*(عزلة الشرقاط)على الصنف صابربيك والصنف بركة.

اما قابلية افراز السم ZEA من الفطريات على اصناف الحنطة فقد تفوق الفطر *F. culmorum* في قابليته على افراز السم ZEN على الصنف بحوث10 والصنف ابوغريب عند التركيز 7.61 و 7.32 مايكروغرام/كغم على التوالي تلاه الفطر *F. graminearum* (عزلة القيارة) في قابلية افراز السم على الصنف ابوغريب بتركيز 7.21 مايكروغرام/ كغم، ولم يتم افراز السم من الفطر *F. graminearum* (عزلة الشرقاط) على الصنف صابربيك والصنف بركة والفطر *F. graminearum* (عزلة القيارة)على الصنف صابربيك.

تم استعمال تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل بالزمن اللحظي Real Time Polymerase Chain Reaction في الكشف عن الجين المسؤول عن افراز الفطريات للسم DON من خلال استعمال الباديء المتخصص للفطر *F. graminearum* المسؤول عن افراز السم مع عزلات الفطر *F. graminearum* الثلاثة والبادئ المتخصص للفطر *F. culmorum* مع عزلة الفطر *F. culmorum* وقد لوحظت دقة نتائج التضخيم لمنتج الجين من السم DON من خلال قيمة عتبة الدورة Cycle Threshold (CT).

ان البيانات المستحصل عليها للفطر *F.graminearum* (29.4 و 27.7 و 29.0) والفطر *F. culmorum* (28.1) مقارنةً بمنحني المقارنة (21.1) تشير الى زيادة اشارة التألق(الفلورسنت) فوق الخط الأساس وهذا مايسمى قيمة عتبة الدورة Cycle Threshold (CT). مما يدل على وجود جين السم DON في جميع العينات الفطرية حيث ان شدة اشارة الفلورسنت تشير الى قدرة التعبير عن الجينات المقابلة في العينة المستهدفة.

Summary

The results of the field survey that was conducted in the fields of Qayyarahh and Shura districts in Nineveh and Shirqat district in Salah al-Din governorate showed the incidence and severity with Fusarium Head Blight on wheat at the date of the first survey 1/4/2020, as the highest rate of percentage of incidence and severity was recorded in Qayyarahh, followed by Shura Then Al-Shirqat, as the rates of infection rates for the mentioned areas were 11.48 %, 10.32 %, and 9.97 %, respectively, and the infection severity rates were 0.092, 0.086, and 0.086, respectively, and the percentage of incidence and severity increased on the second date of the survey, which was conducted starting from the day 20/4/ 2020 for the Qayyarahh, Shura and Shirqat region 17.11%, 16.13 % and 15.64 %, respectively, and the incidence and severity rates were 0.137, 0.136 and 0.133, respectively.

Isolation of spikes infected with Fusarium Head Blight showed the appearance of the fungus *Fusarium graminearum* (Schwabe) and *Fusarium culmorum* (Smith) Saccardo, *Alternaria* spp, *Aspergillus* spp., *Trichoderma* spp., *Cladosporium* spp., *Stemphylium* spp.) and *Fusarium graminearum* (AL-Shura isolate) recorded the highest isolation rate in Al-Shura 29.64% and also *Fusarium graminearum* (AL-Qayyarah isolate) recorded the highest isolation in AL-Qayyarah with an rate 26.90%, and *Fusarium culmorum* (AL-Shura and Qayyarah isolate) secondly, with an isolate rate of 22.94% and 26.03%, respectively. *Fusarium graminearum* (AL-Shirqat isolate) had the highest isolate rate of 34.21%, and the diagnosis of the four isolates was confirmed by molecular diagnosis and using polymerase chain reaction (PCR) technology using the universal primer pair forward primer (ITS1 F: 5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3). ′) and the reverse primer (ITS4 R: 5′ TCCTCCGCTTATTGATGC-3 3) The results of the electrophoresis analysis using 2% agarose gel showed the appearance of four bands of size 544 base pairs.),T he nucleotide sequences were studied and matched with global isolates, and it was found that they are *F. graminearum* (AL-Shura isolate), *F. culmorum* (AL-Shura and Qayyarah isolate), *Fusarium graminearum* (AL-Shirqat isolate) and *F. graminearum* (AL-Qayyarah isolate). The isolates were recorded in the gene bank under Accession numbers MW737663.1, MW737664.1, MW737661.1 and MW737662.1, respectively. This is the first study to diagnose fungi by polymerase chain technology in the above-

mentioned areas in Iraq. These diagnosed fungi showed the ability to infect wheat with Fusarium Head Blight(FHB).

The results of screening nine cultivars of wheat for FHB showed that Abu Ghraib was the most sensitive cultivar, with the percentage of incidence and severity reaching 65.66% and 0.56, while the least sensitive cultivar Saberbek had a percentage of incidence and severity of 21.65% and 0.20, followed by the cultivar Baraka with rates of 30.82% and 0.29. The results of the screening showed that F. culmorum had the most effect on the growth characteristics of the Abu Ghraib cultivar, represented by plant height, length and average spike weight, flag leaf area, seed yield, biological yield, harvest index, weight of 1000 grains, and percentage of wrinkled seeds, while the rest of the varieties varied, and the results of the control showed the effect of The pesticides in the percentage of incidence and severity as the pesticide Raxil achieved the highest reduction in the percentage of infestation and severity amounting to 15.56% and 0.09, followed by Vitavax with rates of 19.4% and 0.13 and they achieved an increase in the rate of some plant growth characteristics for the aforementioned traits compared to the non-treated control. Trichozone biocidal on BM-Mega Flu in reducing the percentage of incidence and severity and increasing growth characteristics of plants treated with it.

The results of estimation of Deoxynivalenol (DON) and Zearalenone (ZEA) from two isolates of *F. graminearum* and *F. culmorum* grown on wheat groats from fields using Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) technology The results showed the superiority of

F. culmorum in its ability to secretes the toxin DON on wheat groats and it was at a concentration of 13.94 µg/kg followed by the ability to secretes the fungus *F. graminearum* (AL-Qayyarah isolate), which secreted toxin at a concentration of 11.42 µg/kg. The least fungi in the ability to secretes toxin is *F.graminearum* (AL-Shirqat isolate), which showed ability to secrete toxin at a concentration of 6.10 µg/kg.

As for the ability of fungi to secretes ZEA toxin, *F. culmorum* was superior in its ability to secretes toxin with a concentration of 7.03 µg/kg, followed by *F. graminearum*, which secretesd the toxin at a concentration of 6.45 µg/kg, and it was the least secreted of the fungus toxin *F. graminearum* (isolate of Al-Shirqat), whose ability to secrete toxin was shown at a concentration of 4.72 µg/kg, While the results of the estimation of the toxin

(DON) and (ZEA) secreted from two isolates of the fungus were *F. graminearum* (AL-Qayyarah and Shirqat isolates) and *F. culmorum* on different cultivars of wheat in the greenhouse using ELISA technique, the results showed the superiority of *F. graminearum* (AL-Qayyarah isolate) in its ability to secrete DON in the grains of the variety Abu Ghraib at a concentration of 17.73 µg/kg, followed by *F. culmorum* in its ability to secrete DON in the same variety that had a concentration of 17.67 µg/kg, then it was followed by the fungus *F. graminearum* (Al-Shirqat isolate) at a concentration of 15.61 µg/kg. The toxin DON was not secreted from *F. graminearum* (Al-Shirqat isolate) on the cultivar Saberbek and the cultivar Baraka.

As for the ability to secrete ZEA toxin from the fungi on the wheat cultivars, it exceeded that of *F. culmorum* in its ability to excrete the toxin ZEA on the cultivar Bohuth10 and the cultivar Abu Ghraib at a concentration of 7.61 and 7.32 µg/kg respectively, followed *F. graminearum* (AL-Qayyarah Isolate) in the ability to excrete the toxin on the cultivar Abu Ghraib at a concentration of 7.21 µg/kg, and the toxin was not excreted. From F. graminearum (Al-Shirqat isolate) on the cultivar Sabrabek, the cultivar Baraka and *F. graminearum* (AL-Qayyarah isolate) on the cultivar Saberbek.

The technology of Real Time Polymerase Chain Reaction was used to detect the gene responsible for the secretion of the toxin by the fungi DON by using the specific primer of *F. graminearum* responsible for secreting the toxin with isolatesthe three fungi *F. graminearum* and specific primer of F. culmorum with the fungus isolate *F. culmorum* The accuracy of the amplification results for the gene product of DON toxin was observed by the Cycle Threshold (CT) threshold value.

The data obtained for *F. graminearum* (29.4, 27.7 and 29.0) and *F. culmorum* (28.1) compared to the control curve (21.1) indicates an increase in the fluorescence signal above the baseline and this is called the Cycle Threshold (CT) value. This indicates the presence of the DON toxin gene in all fungal samples, as the intensity of the fluorescent signal indicates the ability to express the corresponding genes in the target sample.

University of Mosul

College of Agriculture and Forestry

MOLECULAR IDENTIFICATION AND DETECTION OF THE TOXIN SECRETION SPECIFIC GENE FOR CAUSAL AGENTS OF WHEAT FUSARIUM HEAD BLIGHT AND IT'S CONTROL

Salim Ibrahim Akram Hamza

PhD. Thesis
Plant Pathology

Supervised by

Dr. Ali Kareem Al Taae	**Dr. Karkaz Mohammed Thalij**
Professor	**Professor**

2022 A.D. **1443A.H.**