جامعة الموصل
كلية الزراعة والغابات

عزل بعض أنواع فطر *Fusarium* ودراسة إمراضيتها للحنطة وإنتاجها للسموم

إسماعيل ياس صالح إبراهيم

أطروحة الدكتوراه
وقاية نبات (أمراض النبات)

بإشراف
الأستاذ
الدكتور كركز محمد ثلج

1439 هـ 2018 م

الخلاصة

درست إمراضية بعض أنواع الفطر *Fusarium* لبذور وبادرات ونباتات الحنطة وقابليتها في تسبب أمراض تعفن البذور وموت البادرات وتعفن الجذور والتاج والساق ولفحة السنابل لمحصول الحنطة وعلاقة ذلك مع السموم التي تنتجها في الوسط الزرعي وفي الحقل وتأثير السموم المنتجة في المحصول كسموم نباتية (Phytotoxins) في حيوية حيوانات التجربة وفي صفات أعضائها الداخلية وحدوث التغيرات النسجية (Histopathologic) فيها.

أظهر العزل الفطري من حبوب حنطة صنف شام 6 المخزونة لدى مزارعي تلكيف خلال عام 2011 بغية زراعتها في الموسم اللاحق عن سيادة الفطر *Alternaria* spp. بنسبة35.5٪ وأنواع من *Fusarium* بنسبة 26.9% منها *F. graminearum* Schwabe و*F. poae* (Pek) Wollenwber و *F. sporotrichioides* Sherbakoff و*F. acuminatum* Ellis & Everhart و*F.culmorum* (Smith) Saccardo و*F.avenaceum* (Fries) Saccardo و *F. tricinctum* (Cordo) Saccardo و *F. compactum* (Wollenweber)Gordon و *F. equiseti* (Corda) Saccardo و*F.crookwellese* Burgess, Nelsoun & Toussoun . كما أظهر العزل من البادرات تفوق عزل الفطر *Bipolaris* spp. بنسبة 38.3٪ تلته نسبة عزل أنواع الفطر *Fusarium* (31.2٪). أما من النباتات فقد تفوقت نسب عزل أنواع الفطر *Fusarium* (45.3٪) على غيره من الأنواع الفطريه المعزوله لاسيما النوع *F. graminearum* (12.1٪)، وإزداد عزل أنواع الفطر *Fusarium* بشكل كبير من السنابل إذ بلغت 71.4 ٪ وفي مقدمتها النوع *F. graminearum* بنسبة 21.1 ٪ تلاه *F. poae* بنسبة 13٪ ثم *F. sporotrichioides* بنسبة 11.9٪ و *F.culmorum* بنسبة 11.7٪ تلتها الأنواع الأخرى من الفطر. كما تم عزل الفطر *Alternaria* spp. بنسبة عزل كبيره عند (22.6٪). إعتمد التشخيص المظهري للفطريات المعزولة، كما أكد التشخيص الجزيئي للنوعين المستخدمين بالدراسة *F. graminearum* و *F. tricinctum* بأستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل أضافة لتشخيصها المظهري مسبقا.

أظهرت نتائج اختبارات القدرة الأمراضية لأنواع الفطر *Fusarium* أنها تسببت في خفض نسب إنبات البذور لاسيما النوعين *F.culmorum* و *F. tricinctum* إذ بلغت نسبة كل منهما 47.5٪ كذلك في نسبة إحداثها موتاً للبادرات وفي مقدمتها الفطر *F. tricinctum* بنسبة 12.5٪ ثم *F. graminearum* و *F. solani* بنسبة 10٪ لكل منهما. كما أحدثت أنواعه تعفناً لجذور نباتات الحنطة وتيجانها وسيقانها كما أثرت هذه الأنواع في صفات نباتات الحنطة كارتفاع النبات وطول المجموع الجذري وعلى مساحة ورقة العلم وفي عدد أشطاء النبات وعدد السنابل وفي الوزن الجاف للنبات و ووزن مئة حبة خاصةً بالنوع *F. graminearum* الذي كان أعلاها في شدة الإصابة بلفحة سنابل الحنطة . أظهرت الأختبارات السمية لراشح جميع أنواع *Fusarium* حصول نتائج إيجابية في قتل الأنسجة النباتية في أختبار النخرة الموضعية وفي خفض الكلوروفيل بمستويي 50 أو 100٪ من الراشح ، وكان النوع *F. graminearum* أشد الأنواع سميةً في كلا الإختبارين.وفي أختبار تقدير السموم التي تنتجها أنواع من *Fusarium* بأستخدام تقنية أختبار المناعة الممتصة للانزيم المرتبط ELISA وجد أن الفطر *F. graminearum* كان أعلاها إنتاجاً من السم Deoxynivalenol (DON) إذ أنتج 298 ملغم / كغم من جريش الذرة الصفراء تلاه الفطر *F.culmorum* الذي أنتج 270 ملغم / كغم من جريش الذرة الصفراء ، وتفوق الفطر *F. tricinctum* على بقية الأنواع في إنتاج السم Trichothecene-2 toxin (T-2) بأنتاج 1010 ملغم /كغم من جريش الذرة الصفراء تلاه الفطر *F. poae* الذي أنتج 490 ملغم /كغم من جريش الذرة الصفراء . أظهرت السنابل المصابة طبيعياً في الحقل بلفحة السنابل في إحتوائها على السمين DON و T-2 بمعدلات عالية بلغت 12.27 و 4.01 ملغم / كغم, على التوالي, في حين إنخفض مقدار السمين في السنابل المصابة جزئياً إلى 4.57 و 1.74 ملغم / كغم, على التوالي, كما أظهر الأختبار احتواء السنابل السليمة على السمين بتراكيز 1.27 و 0.39 ملغم /كغم,على التوالي, كما تناسبت شدة الإصابة مع كمية كل من السمين .

بينت نتائج تأثير الإختبارات الحيوية للسمين DON و T-2 على معدلات نمو الأرانب أن كلا السمين تسببا في خفض أوزان الأرانب المتغذية على الغذاء الملوث بهما لاسيما عند التركيز الأعلى 4 ملغم /كغم لكل من السمين وكذلك كان التأثير في زيادة أوزان الأعضاء الداخلية

كالكبد والكلى والقلب عدا الطحال، كما سبب السمين في خفض أعداد كريات الدم الحمر وفي أعداد الصفائح الدموية وفي أعداد خلايا الدم البيض والخلايا اللمفاوية لاسيما عند التركيز الأعلى 4 ملغم /كغم مما أدى الى تأثيرهما في زيادة أعداد الهلاكات في حيوانات التجربة. وقد اكدت التاثيرات السلبية السابقة ما بينته نتائج الدراسة النسيجية لكبد الأرانب المغذاة على السم DON بالمستوى 2 ملغم /كغم من حصول تفجي في خلاياه في حين حصل تفجياً كاملاً لجميع خلايا الكبد عند المستوى 4 ملغم /كغم، أما في حالة المعامله بالسم T-2 بالمستوى 2 ملغم /كغم فقد حدثت تغيرات نسجية منها توسع الجبيينات وارتشاح الخلايا اللمفاوية وتفجي بعض خلايا الكبد في حين حدث تحطم نسجيي واضح للفصيصات الكبدية وتنخر الأوردة المركزية وتوسع الجبيينات وحدوث إرتشاح شديد في الخلايا اللمفاوية عند تغذيتها بالمستوى 4 ملغم /كغم. اما تأثير نوعي السم على الأمعاء الدقيقة فقد أحدث السم DON عند امستوى 2 ملغم / كغم تحللاً في النسيج الطلائي للزغابات وغياب الخلايا المخاطية الكأسية بالكامل وإرتشاح الخلايا اللمفاوية داخل الزغابات وفي المنطقة تحت المخاطية كذلك وموت بعض الخلايا الطلائية للزغابات، أما عند التغذية بالمستوى 4 ملغم /كغم فقد حدث إختزالاً في حجم الزغابات مع وجود تفجي كبير في نسيج الزغابات وإختفاء ملامح الخلايا العمودية وحدوث تغيرٍ في الأنسجة العضلية الخارجية أما السم T-2 بالمستوى2 ملغم /كغم فقد تسبب بحدوث تغيرات في النسيج الطلائي للزغابات بتحلل خلاياه وإرتشاح الخلايا اللمفاوية في نسيج الزغابات أما المستوى 4 ملغم /كغم فقد تسبب في تكسر واضح في النسيج الطلائي للزغابات وتحلل أغلب الخلايا الطلائية وظهور الخلايا اللمفاوية داخل الصفيحة الأصلية للزغابات .

Summary

This study was aimed to detect the virulent of some *Fusarium* species in causing seed rot, damping of crown , root rot and ear blight diseases for the first strategic important crop (wheat). In relation *Fusarium* species toxins product in culture media and on the seeds as phytotoxins and on biological effects on laboratory animals as mycotoxins, including their alternation effects in internal organs and on histopathology.

Fungal isolated from wheat seeds cultivar sham – 6 which stored by the farmers to be replanted next season in Telkeif region, Nineveh province, have apparently shown superiority of *Alternaria* spp. at the percentage 35.5 %, *Fusarium* species was 26.9% as: *F. graminearum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. avenaceum*, *F. crookwellese*, *F. acuminatum*, *F. culmorum*, *F. tricinactum*. The isolation of seedlings showed a domain for *Boipolaris* spp. which was 38.3%, then 31.2% for *Fusarium* spp. As for the plants, *Fusarium* spp. was 45.3% especially *F. graminearum* was 21.1%, and for the blighted spikes *F. avenaceum* spp. was highest in isolation percentage which had reached 71.4% with priority to *F. graminearum* followed by *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. culmorum* respectively. *Alterniea* spp. also has recorded 22.6 %. The isolated fungi were identified morphologically include *F. graminearum* and *F. tricinctum* confirmed with molecular diagnosis by using polymerase chain reaction (PCR).

Pathogenisty tests has showed that *Fusarium* species had ability of reducing the rates of seeds germination esp. in the *F. culumorum* and *F. tricinactum* species being the ratio reached 47.5% while seedling were at percentage 12.5% by the fungus *F. tricinctum* and 10% by each of *F.*

graminearum , and *F. solani* as well as all of *Fusarium* species caused rot for roots, crowns, stems, of wheat plants, additionally it affected some plants characters by decreasing leaf width area, plant tillers, spikes number, dry weight for the plant and the hundred grains weight level, esp. that with highest rate in *F. graminearum* which caused more head blight disease than others .

The toxicity test for *Fusarium* species metabolites gave a positive results in damaging plant tissues in necrosis local lesion, and decreasing chlorophyll rate levels 50% or 100% of filtrate, consequently , *F. graminearum* has recorded the highest levels of toxicity in both tests. Purifying toxins from *Fusarium* species culture media using ELISA technique affirmed that *F. graminearum* species was the more productivite or DON toxin the reached 298 mg/kg in crushed maize medium, while *F. culmorum* as production 270 mg/kg of crushed maize culture and *F. tricinactum* recorded the highest level in producing T-2 toxin by 1010 mg/kg in crushed maize medium, followed by *F. poae* of 490 mg/kg. In the field natural infected spikes with head blight disease had high levels DON and T-2 toxins reached to 12.27 and 4,01 mg/kg ,respectively, and the levels of toxins showed low rates in partially infected spikes to 4.57 and 1,74 mg/kg, respectively. The healthy spikes also showed even contamination by toxins at the rates 1.27 and o,39 mg/kg respectively, and affinity between disease severity and containing the seeds with the toxins.

The biological tests of toxins DON and T-2 on rabbit's weight nourishing on contaminated food with toxins showed decreasing in their weight esp. at the level of 4 mg/kg for each toxin. The result shows increasing in internal organs weight like liver, kidney, heart,except spleen,other wise

decreasing in total red blood corpuscular (erythrocytes), thrombocytes (platelets) and white blood cells and lymphocytes esp. at the level of 4 mg/kg as well as it affected in increasing animals' death.

Histopathological effects on hepatic tissues rabbits, nourished with DON toxin at the level of 2 mg/kg showed an increasing of gaps in his hepatic cells and a full gap appeared at 4 mg/kg level. While T-2 toxin at 2 mg/kg level was resulted alternation changes happened in tissues like over weighed sinusoids , infiltration of lymphocytes, gaps of hepatocytes then clear appearing damaging in portal lobules, a piercing for central veins, an enlarged of sinusoids, full infiltration of lymphocytes all that happened when it nourished at 4mg /kg level . These toxins affected on small intestines at 2 mg/kg level of DON poison which made analysis for pigmental villi tissues with full absence of goblet cells, and infiltration of lymphocytes in villi beneath mucus. But at 4 mg/kg level of DON poison There was a reduction of villi size, increasing gaps, in addition to disappearance of absorptive columnar cells, a total change in tunica muscilaris externa. The T-2 test at 2mg/kg level, was caused changes in pigmental villi tissues by lysing cells and infiltrating lymphocytes cells in villi tissues while at 4 mg/kg level the results were caused a clear destruction in pigmental villi tissues, damage of most of pigmental cells besides an appearance of lymphocytes inside laminae propria for villi .

University of Mosul

College of Agriculture and Forestry

Isolation some of Fusarium species and study their pathogenicity and toxins prodaction on wheat

Ismael Yaas Saleh Ibraheem

PhD. Thesis
Plant diseases

Supervised by
Dr. Karkaz Mohammed Thalij
Professor

2018 A.D. **1439A.H.**