جامعة الموصل
كلية الزراعة والغابات

عزل وتشخيص الفطريات المصاحبة لبعض بذور المحاصيل البقولية ومكافحتها

نايف فهد عسكر الشمري

رسالة ماجستير

وقاية النبات

بإشراف

الدكتور علاء حميد محمد الخفاجي

مدرس دكتور

1444هـ 2023م

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة في البيت البلاستيكي التابع لقسم وقاية النبات / كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل سنة 2021–2022 واستهدفت عزل وتشخيص بعض الفطريات المحمولة على بذور البازلاء والحمص والباقلاء ومكافحتها بعده بطرق كالمكافحة الفيزيائية والمكافحة الحيوية والمكافحة الكيميائية وقد جمعت العينات من مناطق مختلفة من محافظة نينوى: البازلاء من منطقة القبة، والحمص من منطقتي العياضية والفاضلية، والباقلاء من مناطق ربيعة والقبة والفاضلية بواقع كيلوغرام لكل نوع.

أظهرت نتائج العزل والتشخيص مرافقة البذور البازلاء الأجناس الفطرية التالية *Aspergillus niger* و*Rhizoctonia solani* و *Alternaria alternate* وظهر فطر *Rhizoctonia solani* بنسبة تكرار بلغت 20% على بذور البازلاء ورافقة بذور الحمص الأجناس الفطرية التالية *Aspergillus flavus* و *Aspergillus niger* و *Alternaria alternate* و*Penicillium* spp و *Alternaria longipes* وظهر فطر *Alternaria alternate* بنسبة تكرار بلغت 10% على بذور الحمص أما بذور الباقلاء فظهرت الأجناس الفطرية التالية *Aspergillus niger* و*Aspergillus flavus* و *Penicillium* spp و*Alternaria alternate* و*Fusarium culmorum* و*Alternaria stemphlium* و *Alternaria cheiranthi* ظهر فطر *Fusarium culmorum* بنسبة تكرار 7.5% على بذور الباقلاء. وتم تأكيد تشخيص الفطريات الممرضة بالتشخيص الجزيئي وتقانة تفاعل البلمرة المتسلسل، (Polymerase Chain Reaction (PCR وذلك باستخدام زوج البادئات العامة،

البادئ الأمامي (3- TCCGTAGGTGAACCTGCGG -' ITS1 F:5 ')

والبادئ العكسي (ITS4R : 5 ' TCCTCCGCTTATTGATGC-3)

وقد أظهرت نتائج تحليل الترحيل الكهربائي باستعمال هلام الاكاروز 2 % وظهور حزمة بحجم 550 bp زوج قاعدي وهو الحجم المتوقع الذي تنتجه هذه البادئات وبناءً على دراسة التتابع النيوكليوتيدي ومطابقتها مع العزلات العالمية في بنك الجينات الوراثي وتبين أنها عزلة الفطر *R.solani* تحت رقم

الانضمام ID: OP592258.1 وعزلة الفطر *A. alternate* تحت رقم الانضمام ID: OP592262.1 وعزلة الفطر *F.culmorum* تحت رقم الانضمام ID: OP592243.1 وتم تسجيل العزلات في بنك الجينات التابع للمركز الوطني لمعلومات التقانات الاحيائية National Center for Biotechnology Information (NCBI) وتعد هذه أول تسجيل للفطريات المذكورة على البذور في العراق.

في ضوء التجارب المختبرية تبين تأثر البروتين الكلي للبذور بظروف الخزن والمعاملة بالفطريات إذ انخفضت نسبة بروتين الكلي لبذور البازلاء في الشهر الثالث إلى أقل نسبة بلغت 11% وكذلك بذور الحمص أقل نسبة بلغت 12.25% أما بذور الباقلاء بلغت أقل نسبة في الشهر الثالث 13.43%.

ظهرت التجارب المختبرية في ضوء عوامل المكافحة الحيوية تأثير واضح في خفض نسبة الفطريات بينت النتائج أن المقاوم الحيوي *T. harzianum* ذات كفاءة تضادية عالية ضد الفطريات الممرضة الثلاثة *A. alternate* و *F. culmorum* والفطر *R. solani* إذ وصلت درجة التطفل في الفطرين *A. alternate* و *F. culmorum* رقم (1) من مقياس Bell والنسبة المئوية للتثبيط بلغت 79%، 71.67%، على التوالي، أما فطر *R. solani* وصلت درجة التطفل رقم (2) حسب مقياس Bell إذ بلغت النسبة المئوية للتثبيط 59.33%. أما مستخلص نبات الدارسين فكانت أعلى نسبة تثبيط من نمو مستعمرة الفطر *R. solani* عند التركيز 5 مل إذ بلغت 51.67% وكانت نسبة تثبيط نمو مستعمرة الفطر *A. alternate* و مستعمرة الفطر *F. culmorum* 48.33% و 43.67% على التوالي. أما لفطر الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* فإن أعلى نسبة تثبيط للفطر *R. solani* باستخدام الخميرة كان عند التركيز 4 غم/ لتر حيث بلغت نسبة التثبيط 71.33% وأن نسبة تثبيط للفطر *A. alternate* و الفطر *F. culmorum* باستخدام الخميرة عند التركيز 4 غم/ لتر إذ بلغت 51.33% و 45% على التوالي. أما بالنسبة للمكافحة الكيميائية أظهرت التجارب المختبرية تفوق واضح للمبيد بلتانول حيث أعطى نسبة تثبيط 100% في جميع التراكيز (0.5 و1 و1.5) مل على الفطريات الممرضة والفطر *R. solani* و *A. alternate* و *F. culmorum*.

أما الصفات الحقلية فإن أعلى نسبة مئوية لإنبات بذور البازلاء كانت للمعاملة الملوثة بالفطر الممرض *R.solani* بعد المعاملة بمستخلص دارسين بلغت 94.33% إن أقل نسبة مئوية للإصابة كانت مع معاملة البذور بالفطر *R.solani* المعرضة لأشعة الميكروويف لمدة 60 ثانية إذ بلغت 64.33% إن أقل شدة الإصابة كانت في المعاملة بالفطر *R.solani* المعرضة لأشعة الميكروويف 40 ثانية. ومعاملة البذور بالفطر *R.solani* ومن ثم معاملتها بالمبيد بلتانول ولم تختلف عن بعضهما معنوياً بشدة إصابة بلغت 0.22 و0.24 على التوالي. أما بالنسبة لنبات الحمص فإن أعلى نسبة مئوية للإنبات كانت لمعاملة البذور بالفطر *A.alternata* وبعدها المعاملة بالمبيد بلتانول بلغت 77.33% ومعاملة البذور بالفطر *T. harzianum* وبعدها معاملة البذور بالفطر الممرض *A.alternata* إذ بلغت النسبة المئوية للإنبات 77.33% إن أدنى نسبة مئوية للإصابة لمعاملة البذور بالفطر *A.alternata* ومن ثم معاملتها بالمبيد بلتانول إذ بلغت النسبة المئوية للإصابة 33.33% إن أدنى مستوى لشدة الإصابة كانت في معاملة البذور بالفطر *A.alternata* ثم معاملتها بالمبيد بلتانول بلغت شدة الإصابة 0.19. أما بالنسبة لنبات الباقلاء كانت أعلى نسبة إنبات للبذور الملوثة بالفطر *F.culmorum* ومعاملتها بالماء حار 50م° ومعاملة البذور بالفطر *F.culmorum* معامله قبلها بالمبيد بلتانول ومعاملة البذور بالفطر *F.culmorum* وبعدها بالمبيد بلتانول إذ بلغت النسبة المئوية للإنبات 100% لجميع المعاملات وإن أدنى نسبة مئوية للإصابة كانت بمعاملة البذور بالفطر *F.culmorum* وبعدها بالمبيد بلتانول إذ بلغت النسبة المئوية للإصابة 25% وان ادنى مستوى لشدة الإصابة كانت في معاملة البذور بالفطر *F.culmorum* وبعدها بالمبيد بلتانول بلغت شدة الإصابة 0.05.

أما متوسط صفات نبات البازلاء تبين من نتائج التحليل الاحصائي إن معاملة البذور بالفطر *R. solani* وبعدها الخميرة زاد من متوسط طول المجموع الخضري إذ بلغت 29.81 سم أما مستوى طول المجموع الجذري إذ تفوقت معاملة البذور بالفطر *R. solani* ومن ثم معاملتها بالفطر *T. harzianum* حيث بلغ متوسط المجموع الجذري 26.21 أما متوسط نسبة الكلورفيل إذ تفوق المعاملة بالفطر *R. solani* المعرض لاشعة ميكروويف 30 ثانية إذ بلغ متوسط نسبة الكلورفيل SPAD 23.00 أما التأثير في متوسط وزن المجموع الخضري والجذري الرطب إذ تفوقت المعاملة بالفطر *R. solani* ومعاملة البذور بعدها بالمبيد

بلتانول حيث بلغت 23.36 غم أما متوسط وزن المجموع الخضري والجذري الجاف إذ أظهر تفوق معاملة البذور بالفطر *R. solani* وقبلها معاملة بالمبيد بلتانول بلغت 7.03 غم. أما نبات الحمص فقد كانت أعلى متوسط طول المجموع الخضري لمعاملة البذور بالفطر *A.alternata* ومن ثم معاملتها بالفطر *T. harzianum* إذ بلغت 31.00 سم أما بالنسبة لمتوسط طول المجموع الجذري فقد كانت أعلى قيمة للمعاملتين بالفطر *A.alternata* وبعدها معاملتها بالفطر *T. harzianum* والمعاملة بالفطر *A.alternata* من ثم معاملتها بالمبيد بلتانول إذ بلغت 28.50 و28.42 على التوالي وكانت أعلى قيمة في متوسط نسبة الكلورفيل لمعاملة البذور بالفطر *A.alternata* وبعدها بالمبيد بلتانول حيث بلغت 3.43 SPAD أما متوسط وزن المجموع الخضري والجذري الرطب إذ تفوقت معاملة البذور بالفطر *A.alternata* وقبها كانت معاملة بالدارسين بلغت 33.29 غم أما بالنسبة لمتوسط وزن المجموع الخضري والجذري الجاف أعلى معاملة بالفطر *A.alternata* وقبلها كانت معاملة بالدارسين حيث أعطت 11.83 غم. وقد بينت النتائج متوسط صفات نبات الباقلاء وقد تفوقت المعاملة بالفطر *F.culmorum* ومعاملة البذور بعدها بالمبيد بلتانول إذ بلغ متوسط طول المجموع الخضري 46.46 سم كما بينت المعاملة بالفطر *F.culmorum* ومعاملة البذور بعدها بالفطر *T. harzianum* إذ بلغ متوسط طول المجموع الجذري 34.50 سم أما متوسط نسبة الكلورفيل وكانت أعلى قيمة للمعاملة بالفطر *F.culmorum* المعرضة لأشعة الميكروويف 60 ثانية إذ بلغت 34.13 SPAD إذ تفوقت المعاملة بالفطر *F.culmorum* وبعدها معاملة بالمبيد بلتانول في متوسط وزن المجموع الخضري والجذري الرطب حيث بلغت 105.12 غم أما بالنسبة لمتوسط وزن المجموع الخضري والجذري الجاف إذ نلاحظ إن المعاملة بالفطر *F.culmorum* وبعدها معاملة بالمبيد بلتانول أعطت أعلى قيمة إذ بلغت 38.50 غم.

Summary

This study was conducted in the laboratory of plant diseases and the greenhouse of the Department of Plant Protection / College of Agriculture and Forestry / University of Mosul in the year 2021-2022. The aim was to isolate and identify some fungi carried on the seeds of peas, chickpeas, and broad beans and to control them in several ways, such as physical, biological and chemical control. Samples of peas were collected from the regions of al-Qubbah and chickpeas from the regions of al-Ayadiyah and al-Fadhiliyya, and broad been from the regions of Rabia al-Qubbah and al-Fadiliyah, at a rate of one kilogram for each type. Isolation and identification results showed the following fungal genera accompanying pea seeds: *Aspergillus niger*, *Rhizoctonia solani* and *Alternaria alternate*. *Rhizoctonia solani* appeared with a frequency of 20% on pea seeds. The following fungal genera accompanied chickpea seeds: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Alternaria alternate*, *Penicillium* spp. and *Alternaria longipes*. *Alternaria alternate* appeared with a frequency of 10% on chickpea seeds. The following fungal genera accompanied broad bean seeds: *Aspergillus niger*, *Aspergillus* flavus, *Penicillium* spp, *Alternaria alternate*, *Fusarium culmorum*, *Alternaria stemphlium* and *Alternaria cheiranthi*. *Fusarium culmorum* appeared with a frequency of 7.5% on the bean seeds. The diagnosis of the pathogenic fungus was confirmed by molecular diagnostics and Polymerase Chain Reaction (PCR) technology, using the pair of universal primers,

Front starter (3- ITS1 F:5 '- TCCGTAGGTGAACCTGCGG ').

and reverse initiator (3-ITS4R: 5' TCCTCCGCTTATTGATGC).

The results of the electrophoresis analysis using 2% agarose gel showing the appearance of a band of 550 bp base pair, which is the expected size produced by these primers, and by studying the nucleotide sequence and matching them with the global isolates in the Genome Bank, and it turned out to be the *R.solani* isolate under the accession number OP592258. 1 ID: It was diagnosed from pea seeds. An isolate of *A. alternata* under accession number OP592262.1 ID: was diagnosed from chickpea seeds. The isolate *F.culmorum* under accession number ID: OP592243.1 was diagnosed from broad bean seeds. The isolates were registered

in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) gene bank, and this is the first record of the mentioned fungi on seeds in Iraq. Through the effect of fungal pathogenicity on cress seeds, it was found that the three fungi were highly pathogenic. *R.solani* had the most influence on the germination rate, reaching 26%. Then came A.alternata, as it affection on the percentage of germination was 33%. At the same time, the pathogenicity of F.culmorum was represented on the seeds of the cress, as the percentage of germination reached 57%, and that was compared with the seeds of the cress in the comparison treatment, as the percentage of germination reached 73%. The total protein of seeds was affected by the conditions of storage and treatment with fungus, as the percentage of total protein of pea seeds decreased in the third month to the lowest percentage of 11%, as well as the seeds of chickpeas protein, decreased to 12.25%. In comparison, the total protein of broad bean seeds decreased to 13.43%. Biological control agents showed an apparent effect in reducing the proportion of fungus. The results showed that *T. harzianum* had a high antagonistic efficiency against the three pathogenic fungus. The degree of parasitism in the two fungus A. alternate. And *F. culmorum* reached No. (1) on the Bell scale, the percentage of inhibition amounted to 79% and 71.67%, respectively, while *R. solani* reached the degree of parasitism No. (2), as the percentage of inhibition reached 59.33%. The cinnamon extract had the highest rate of inhibition of *R. solani* colony growth at a concentration of 5 ml, as it amounted to 51.67%, and the percentage of inhibition of the growth of *A. alternate* and *F. culmorum* were 48.33% and 43.67%, respectively. As for Saccharomyces cerevisiae, the inhibition rate for *R. solani*, A. *alternate* and *F. culmorum* was the inhibition rate was 71.33%, 51.33% and 45%, respectively at a concentration of 4 g/L.

As for chemical control, Beltanol had a clear superiority, giving 100% inhibition in all concentrations (0.5, 1, and 1.5) ml for *R. solani, A. alternate*, and *F. culmorum*. For field characteristics, the highest percentage of germination of pea seeds was for the treatment contaminated with *R.solani* after treatment with cinnamon extract, which reached 94.33%. The lowest percentage of infection was with *R.solani* + microwave treatment for 60 seconds, reaching 64.33%. Treatment with *R.solani* + microwave for 40 seconds and treating the seeds with R.solani and then with Beltanol did not significantly differ from each other in terms of infection

severity, reaching 0.22 and 0.24, respectively. For chickpea, the highest percentage of germination was for the treatment of seeds with the A.alternata before the treatment with Beltanol, as it reached 77.33%, and for the treatment of seeds with *T. harzianum*, and after the treatment of the seeds with *A.alternata*, as the percentage of germination reached 77.33%. The lowest percentage of infection was for the *A.alternata* and then with beltanol, as the percentage of infection reached 33.33%. The lowest level of infection severity was in treatment with *A.alternata* and then with beltanol, as the severity of infection reached 0.19. For the broad bean, the highest percentage of germination was for seeds contaminated with *F.culmorum* and then treated with hot water at 50 °C, the seeds treated with *F.culmorum* before treatment with Beltanol and the seeds treated with *F.culmorum* and after with Beltanol, as the percentage of germination reached 100% for all treatments. The percentage of infection was when the seeds were treated with *F.culmorum* and then with the Beltanol, as it reached 25%, and the lowest level of infection severity was when the seeds were treated with the *F.culmorum* and then with Beltanol, which reached 0.05. The average characteristics of the pea showed that the treatment of the seeds with the R. solani and then the treatment with the yeast increased the average length of the vegitative part reached 29.81 cm. The average of of the total root was 26.21, while the average percentage of chlorophyll was superior to the treatment with R. solani exposed to microwave radiation for 30 seconds, as the average percentage of chlorophyll was 23.00 SPAD. As for the effect on the average weight of the vegetative and wet roots, the treatment with R. solani and then with beltanol, which amounted to 23.36 gm. As for the average weight of the vegitative and dry roots, it showed the superiority of the treatment of seeds with R. solani, and before that with beltanol reached 7.03 grams. As for the chickpea, it had the highest average vegitative length when the seeds were treated with the A.alternata and then with T. harzianum, as it reached 31.00 cm. for the average length of the root, it was the highest value for the two treatments with the A.alternata and after the treatment with T. harzianum and the treatment with A.alternata, then treated with beltanol, as it reached 28.50 and 28.42, respectively. The highest value of the average percentage of chlorophyll for the treatment of seeds with A.alternata and then with butanol, as it reached 3.43 SPAD. With regard to the average weight of the vegetative and wet root system, the treatment of seeds with A.alternata after treatment with the cinnamon extract

was 33.29 gm. As for the average weight of the vegetative system and dry root, the highest treatment was with A.alternata, and before that the treatment with the extract of the cinnamon, as it gave 11.83 g. The results showed that the average characteristics of the bean plant were higher than the treatment with F.culmorum, and the seeds were then treated with Beltanol, as the average vegitative length reached 46.46 cm. Chlorophyll, and the highest value of F.culmorum treated with microwave radiation for 60 seconds was 34.13 SPAD. The treatment with F.culmorum, after treatment with blantanol, excelled in the average weight of the vegitative and wet root, reaching 105.12 g. As for the average weight of the vegitative and dry root, we note that Treatment with F.culmorum after treatment with the blantanol gave the highest value as it reached 38.50 g.

University of Mosul
College of Agriculture and
Forestry

Isolation and identification some fungi associated with some legume seeds and its control

Naif Fahad Askar Al-Shamary

M.Sc.Thesis
Plant Protection

Supervised by
Dr. Alaa Hameed Mohammed Al-Khafagi

1444 AH. 2023AD.