



الكشف عن الفطريات المرافقة لنبات الحامول ومكافحته ببعض المواد الصديقة للبيئة

رسالة تقدم بها

احمد طارق هاشم

بإشراف

أ.د.حرية حسين شهاب

المقدمة



ينتمي نبات الريحان (*Ocimum sp.*) الى العائلة الشفوية (Lamiaceae) وهو من النباتات العطرية والطبية والاقتصادية، تزداد الأهمية الاقتصادية لنبات الريحان باستخدامه على نطاق واسع في المجالات الطبية المختلفة وتحضير الأدوية .



يتعرض نبات الريحان
للاصابة بعدد من
المسببات المرضية ومنها
المتطفلات الزهرية التي
تؤدي إلى إلحاق الضرر
بأوراقه والتقليل من قيمتها
التسويقية من هذه
المتطفلات الحامول



يعد الحامول **Dodders** (*Cuscuta spp*) من النباتات الزهرية كاملة التطفل يعود الى العائلة **Convolvulaceae** صنف سابقا الى العائلة **Cuscutaceae**، يتطفل على سيقان وأوراق النباتات الاقتصادية



إن عملية التطفل تتم عن طريق ارسال ممصات خاصة تسمى (**Haustorium**) على طول سيقان الحامول الى انسجة النبات المضيف وتصل الى الاوعية الناقلة للحصول على الماء والمغذيات،

اجريت دارسات عديده لمكافحته وكان اكثرها تركيزا على ايجاد طرائق بديلة للمكافحة الكيميائية ، استعملت المكافحة الاحيائية باستعمال الفطريات اذ وجد منها مرافق للحامول وقد تم عزلها وتشخيصها واستعمال عدد منها كمبيدات احيايه .



اهداف الرسالة

نظرا لانتشار الحامول على عوائل نباتية متعددة ومايسببه من اضرار اقتصادية على عوائله تضمنت هذه الدراسة الي :

- عزل وتشخيص المسببات المرافقة للحامول وامكانية استعمالها في مكافحة الحامول.

- التشخيص الجزيئي للحامول المتطفل على العوائل النباتية.

- تقويم كفاءة استعمال بعض المواد الكيميائية في تعزيز نمو نبات الريحان ومكافحة الحامول.

منهجية البحث

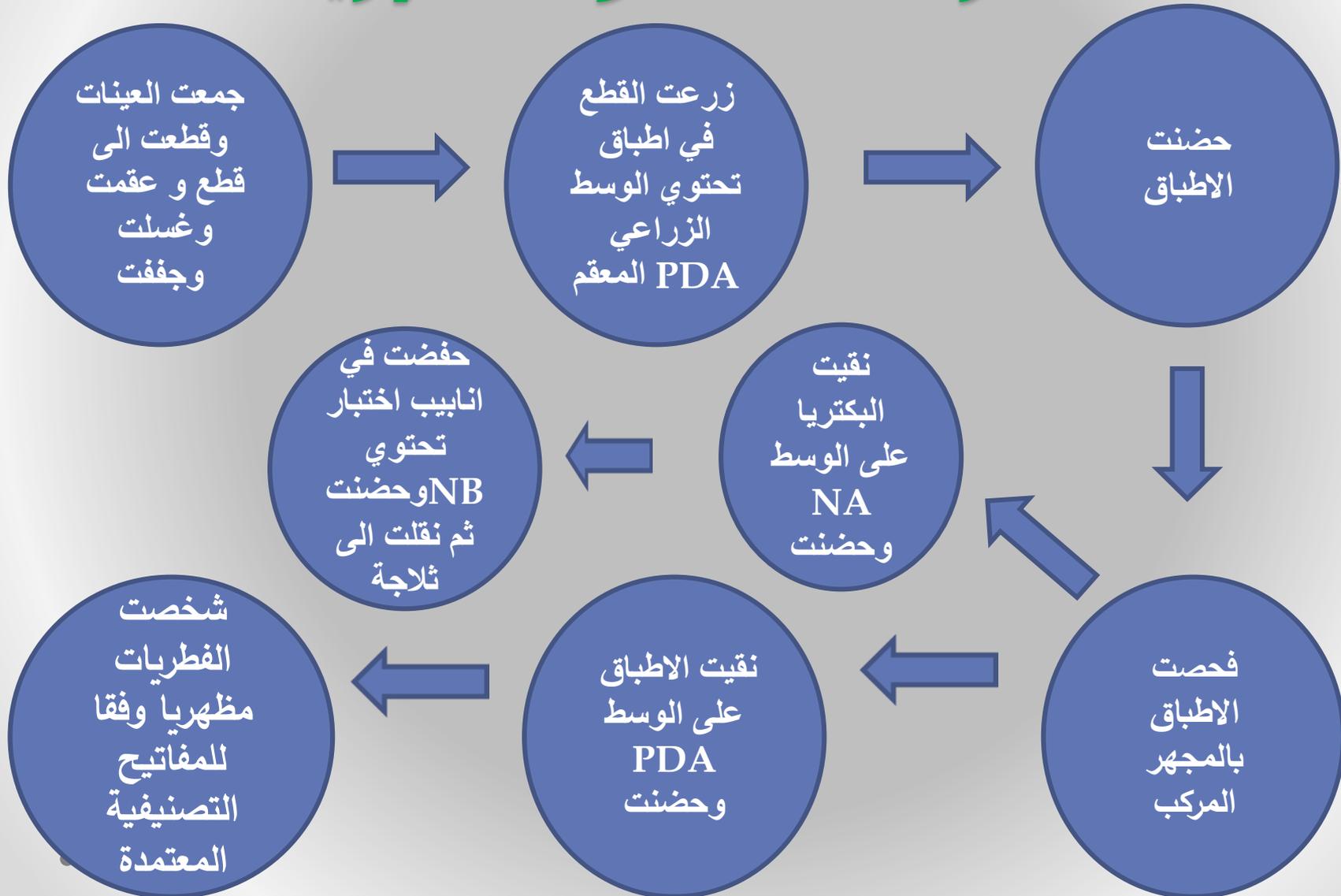
✓ جمع عينات الحامول

العائل	المحافظة / المنطقة	تاريخ الجمع
طماطة	بغداد / جامعة بغداد	2021 / 5 / 21
طماطة	بغداد / جامعة بغداد	2021 / 5 / 23
ام الحليب	بغداد / جامعة بغداد	2021 / 5 / 21
ريحان	بغداد / جامعة بغداد	2021 / 5 / 21
كينوكاريس	بغداد / جامعة بغداد	2021 / 5 / 23
كينوكاريس	بغداد / جامعة بغداد	2021 / 5 / 23
ام الحليب	ديالى / بعقوبة	2021 / 3 / 19
رغيلة	ديالى / بعقوبة	2021 / 3 / 19
طماطة	ديالى / خان بني سعد	2021 / 5 / 17
ريحان	ديالى / خان بني سعد	2021 / 5 / 17
عاقول	ديالى / خان بني سعد	2021 / 5 / 17
عاقول	ديالى / خان بني سعد	2021 / 5 / 17
كينوكاريس	بغداد / جامعة بغداد	2021 / 5 / 21
رغيلة	ديالى / بعقوبة	2021 / 3 / 19
المديد	ديالى / خان بني سعد	2021 / 5 / 17



✓ عزل وتشخيص المسببات المرضية

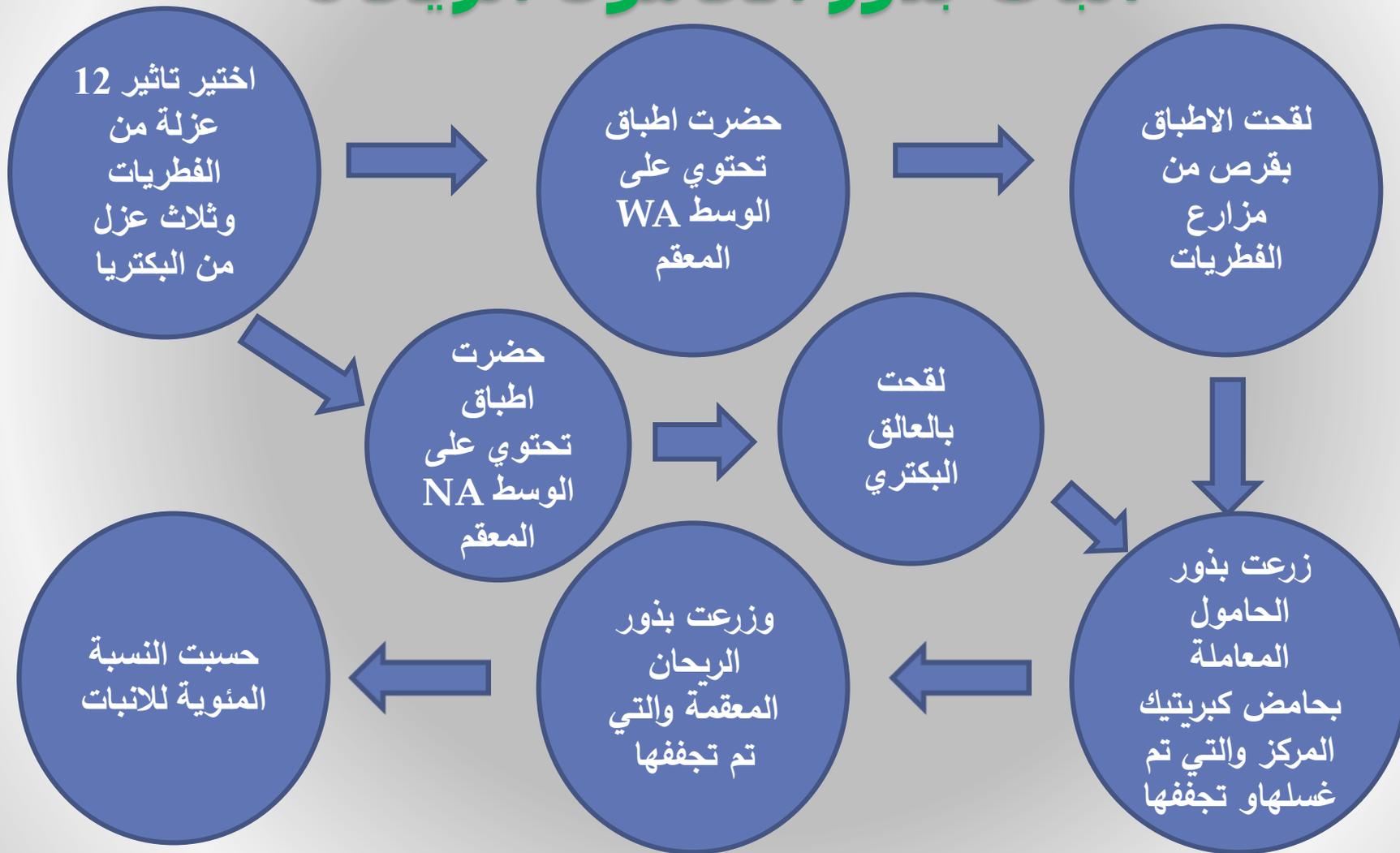
المرافقة للحامول مظهريا

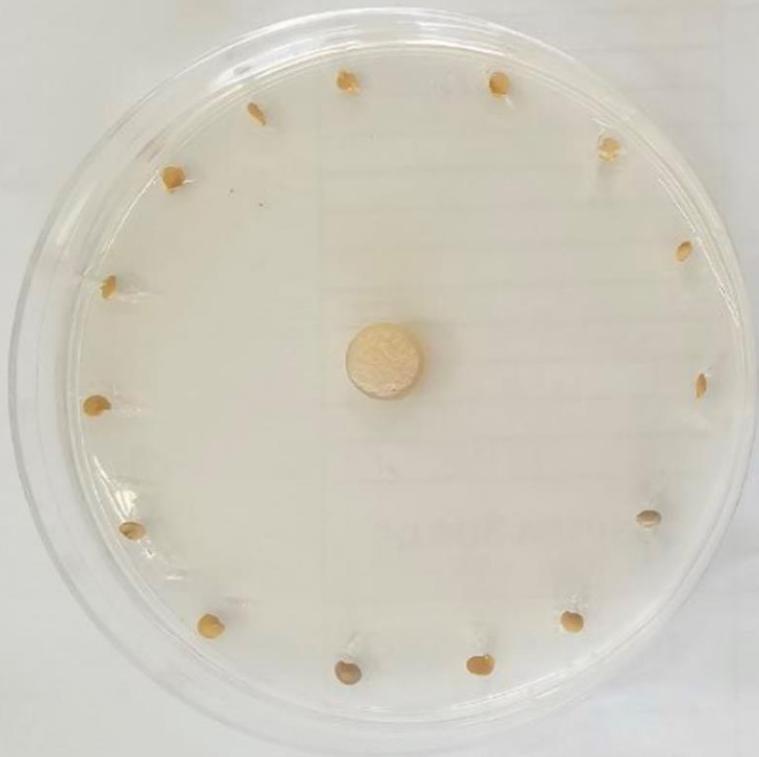




✓ تأثير المسسبات المرافقة للحامول على

انبات بذور الحامول الريحان





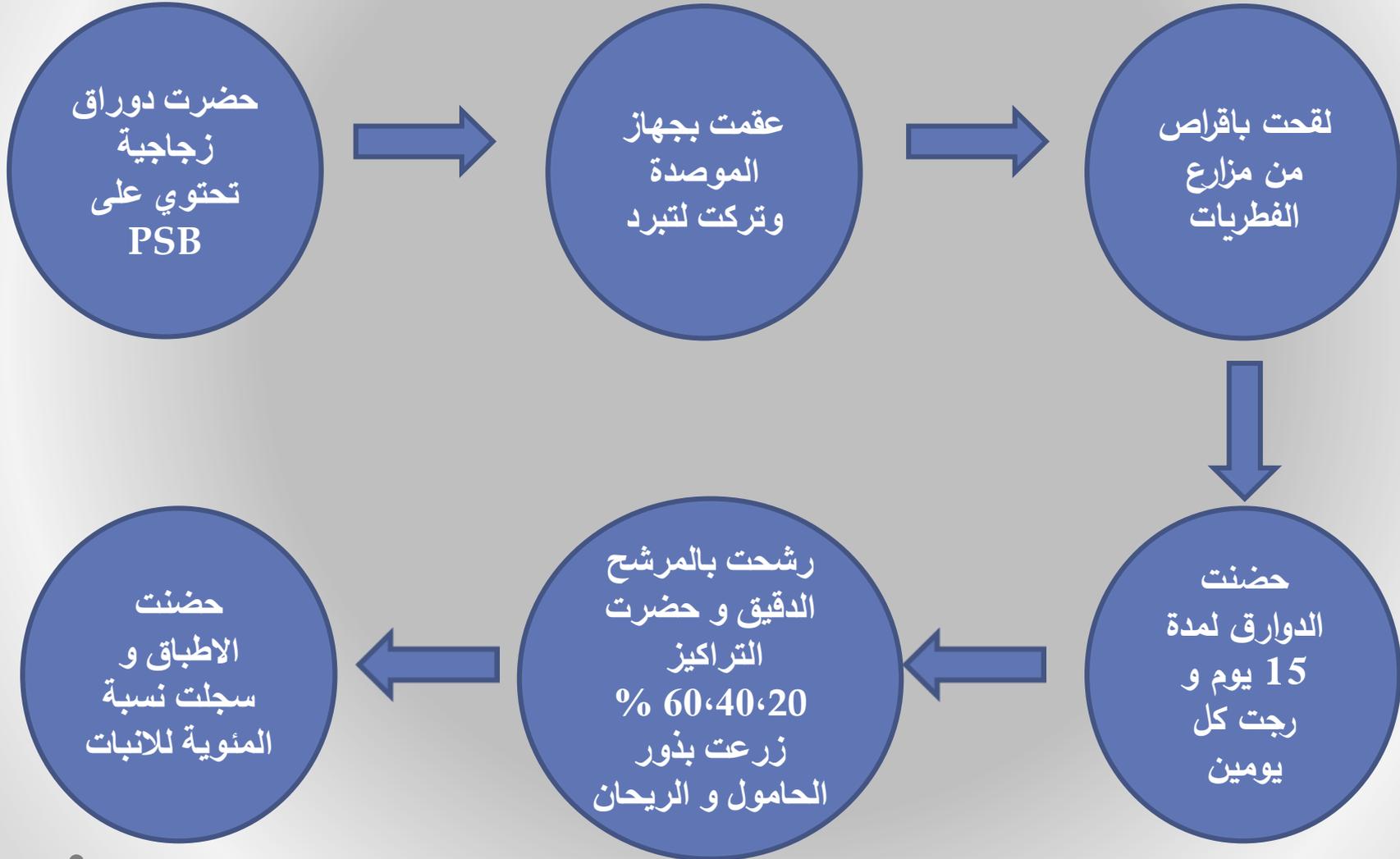
حامول



ريحان

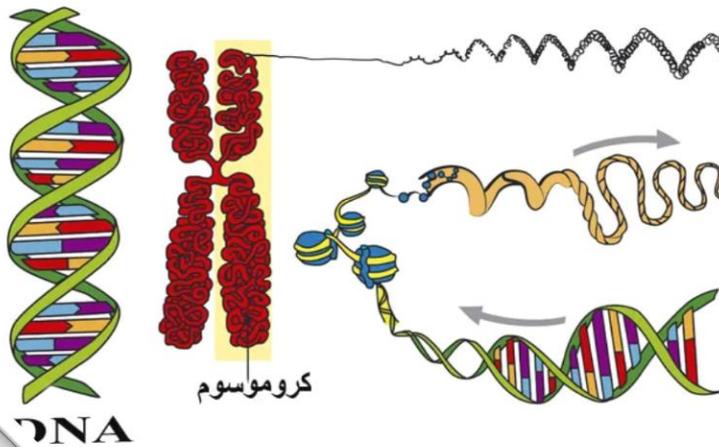
✓ اختبار كفاءة رواشح الفطريات الممرضة في

انبات بذور الريحان والحامول



✓ تشخيص الجزيئي للفطريات

استخلص الحامض النووي DNA لخمسـة من الفطريات *Alternaria* ، *Chaetomium sp.* ، *Aspergillus sp.* (F6) ، *sp.*(F4) ، *Stemphylium sp.* (F3) و *Curvularia sp.* (F5)،(F7) الممرضة للحامول التي اثبت في اختبارات المقدرة الامراضية كفاءتها العالية في خفض النسبة المئوية للانبات وتمت عملية استخلاص الدنا في شركة جسر المسيب

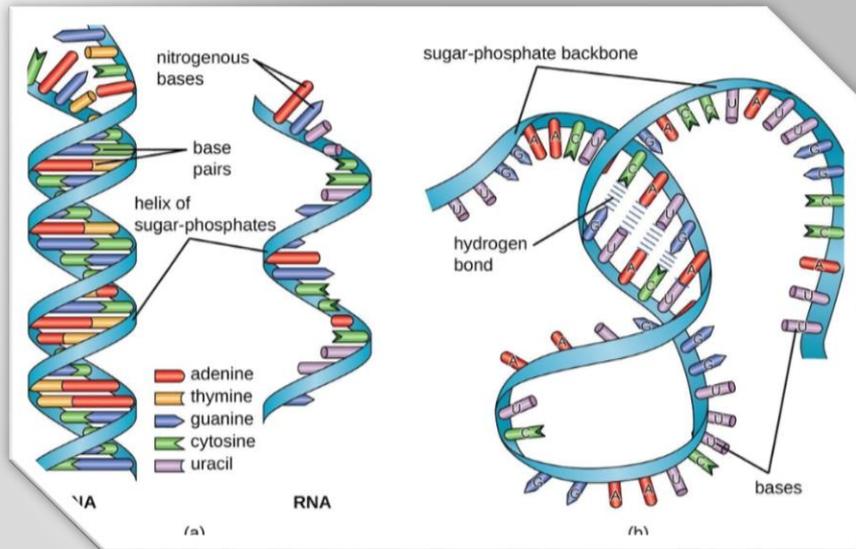


اجريت عملية التضاعف للفطريات باستخدام البادئ الذي يستهدف التسلسل النوعي الخاص بالمنطقة البينية الفاصلة (ITS) للجين الرايبوسومي rRNA لأجراء تفاعل تضخيم السلسلة (PCR) الرنا الرايبوسومي

اسم البادئ	تتابع البادئ	Tm (C)	GC (%)	حجم المنتج
Primer Forwar ITS1	5 -TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3	57.7	49	500 – 700 bp
Primer Reverse ITS2	5 -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3	43.7	40	

✓ تشخيص الجزيئي للحامول

استخلص الحامض النووي DNA لعينتين من الحامول، وضعت العينات في انابيب بلاستيكية معقمة كلا على انفراد وحفظت في المجمدة لحين استخلاص الحامض النووي وتمت عملية استخلاص الدنا في شركة جسر المسيب



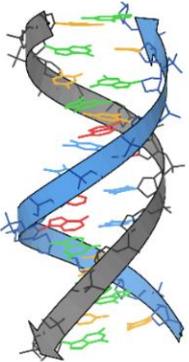
اجريت عملية التضاعف للحامول باستخدام البادئ الذي يستهدف التسلسل النوعي الخاص بالمنطقة البينية الفاصلة (ITS) للجين الرايبوسومي rRNA لأجراء تفاعل تضخيم السلسلة (PCR) الرنا الرايبوسومي

اسم البادئ	تتابع البادئ	Tm (C)	GC (%)	حجم المنتج
ITS1 Primer Forward	5-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3	56.7	48	1250 - 1500
ITS2 Primer Reverse	5-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3	42.7	39	Bp

✓ تشخيص الجزيئي للبكتريا

اجري التشخيص الجزيئي لثلاث عزلات من البكتريا هي (B1 ، B2 و B3) التي تم عزلها من الحامول المتطفل على كينوكاربس ، رغيلة والمديد ، تم تنقية البكتريا للحصول على مستعمرات نقية كلا على انفراد

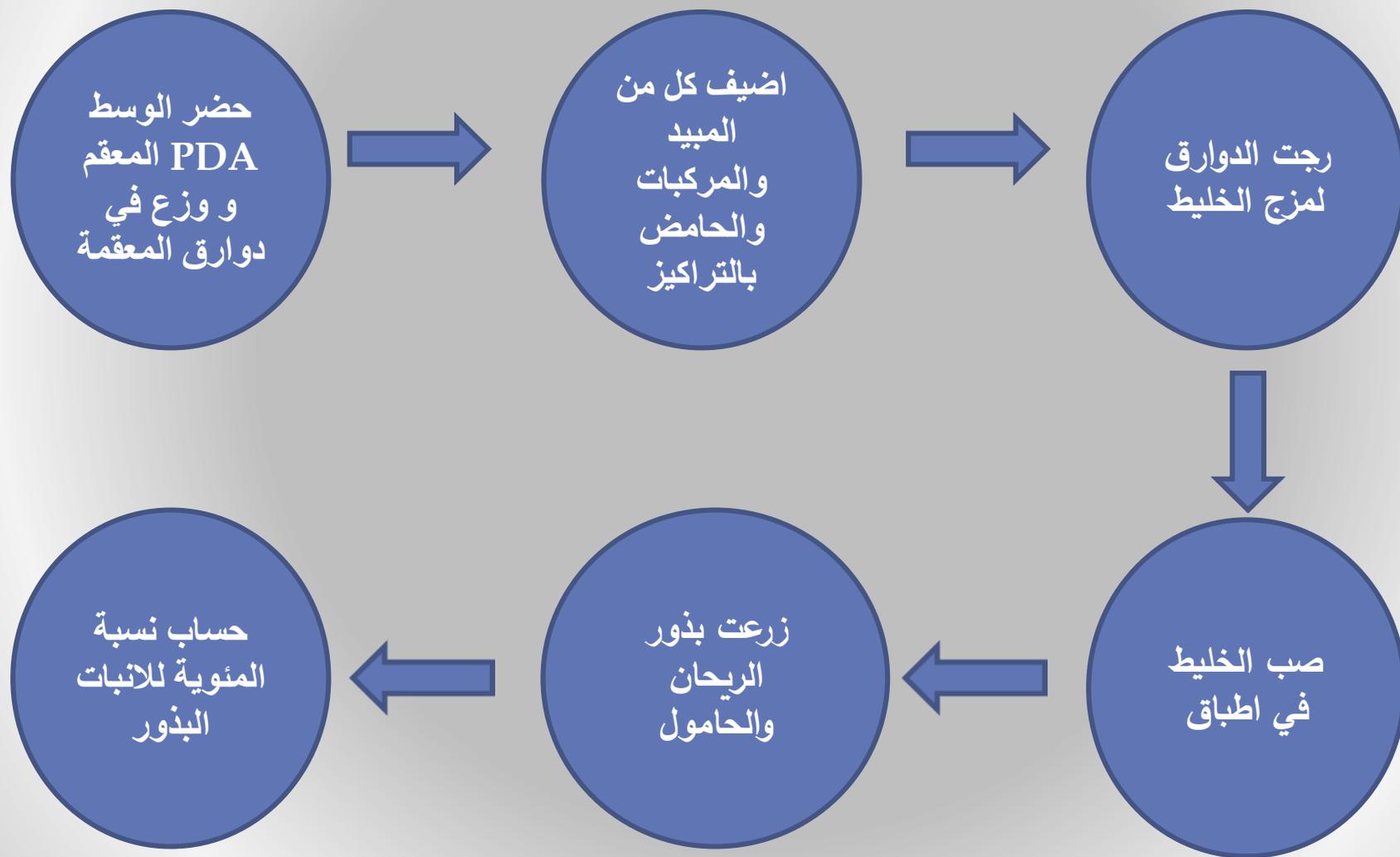
تم اجراء التشخيص الجزيئي اعتمادا على الجين SrRNA16 في تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل PCR، باستعمال العدة القياسية G- Spin DNA Extraction Kit والمجهزة من شركة Intron Biotechnology/Korea

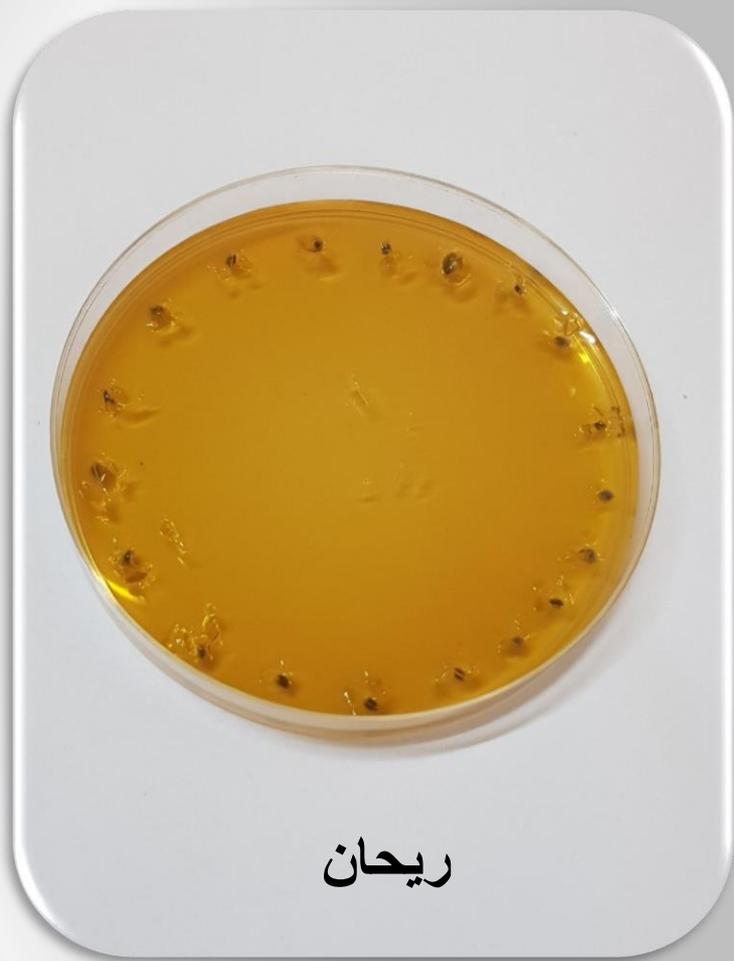


لأجراء تفاعل تضخيم السلسلة (PCR) استعمل البادئ
المتخصص من gene 16srRNA (جدول 11) المصنع من شركة
Integrated DNA (Technologies company, USA).

اسم البادئ	تتابع البادئ	Tm (C)	GC (%)	حجم المنتج
Forward	5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3	54.3	50.0	1250 – 1500 bp
Reverse	5 -GGTTACCTTGTTACGACTT-3	49.4	42.1	

✓ اختبار تأثير المبيد Mortal والمركبات سليكات وكلوريد البوتاسيوم والحامض الاميني في انبات بذور الحامول والريحان





ريحان



حامول

✓ كفاءة الفطر *Amesia atrobrunnrum* وسليكات البوتاسيوم والمبيد الكيماوي Mortal في خفض نسبة الاثبات وشدة الاصابة

المعاملات :

1. معاملة الريحان + حامول + اضافة الراشح *Chaetomium atrobrunneum* 60%
2. معاملة الريحان + حامول + رش الراشح *Chaetomium atrobrunneum* 60%
3. معاملة الريحان + حامول + اضافة سليكات البوتاسيوم بتركيز 1%
4. معاملة الريحان + حامول + رش سليكات البوتاسيوم بتركيز 1%
5. معاملة الريحان + حامول + اضافة المبيد Mortal بتركيز 3%
6. معاملة الريحان + حامول + رش المبيد Mortal بتركيز 3%
7. معاملة الريحان + حامول + رش الراشح *Chaetomium atrobrunneum* + رش سليكات البوتاسيوم بتركيز 1% + رش المبيد Mortal بتركيز 3%
8. معاملة الريحان + حامول + اضافة الراشح *Chaetomium atrobrunneum* + اضافة سليكات البوتاسيوم بتركيز 1% + اضافة المبيد Mortal بتركيز 3%
9. معاملة الريحان + حامول + اضافة جميع المواد + رش جميع المواد
10. معاملة الريحان فقط
11. معاملة الريحان + الحامول فقط

وتمت دراسة تشريح اجزاء من نبات الريحان المصابة وسليمة والحامول باستخدام مجهر مركب (نوع ألتاي) تحت تكبير 4-40 مرة

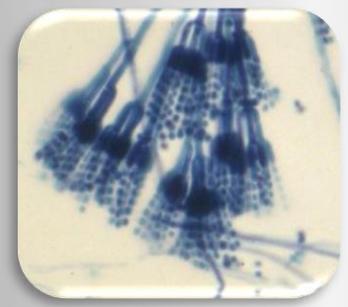
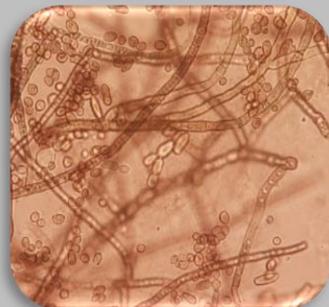
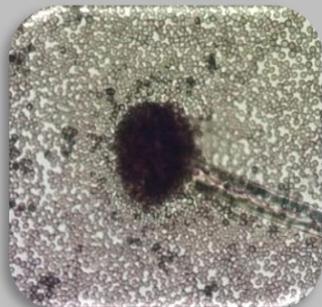
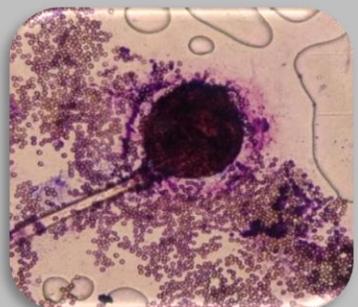
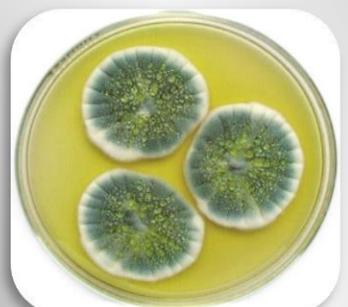
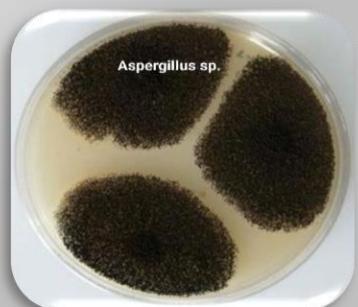
النتائج والمناقشة

✓ عزل وتشخيص المسببات المرضية المتطفلة على الحامول

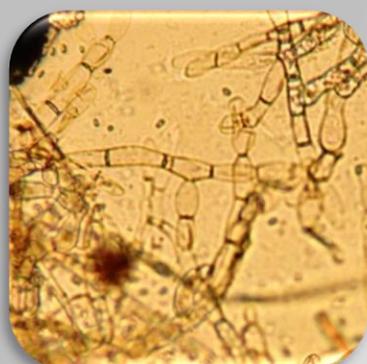
اسم العزلة	اسم المنطقة	اسم العائل	الجزء الذي تم العزل منه
<i>Helminthosporium sp. (F10)</i>	جامعة بغداد	طماطة	سيقان
<i>Aspergillus sp. (F6)</i>	جامعة بغداد	طماطة	بذور
<i>Cladosporium sp. (F8)</i>	محافظة ديالى	طماطة	سيقان
<i>Penicillium sp. (F9)</i>	محافظة ديالى	الريحان	سيقان
<i>Rhizoctonia sp. (F1)</i>	جامعة بغداد	ام الحليب	بذور
<i>Chaetomium sp. (F7)</i>	جامعة بغداد	الريحان	بذور
<i>Stemphylium sp. (F3)</i>	قضاء بعقوبة	ام الحليب	سيقان
<i>Curvularia sp. (F5)</i>	جامعة بغداد	كينوكاريس	بذور
<i>Stemphylium sp. (F11)</i>	جامعة بغداد	كينوكاريس	سيقان
<i>Alternaria sp. (F2)</i>	قضاء بعقوبة	رغيلة	بذور
<i>Alternaria sp. (F4)</i>	محافظة ديالى	عاقول	سيقان
<i>Aspergillus sp. (F12)</i>	محافظة ديالى	عاقول	سيقان
B1	جامعة بغداد	كينوكاريس	سيقان
B2	قضاء بعقوبة	رغيلة	سيقان
B3	محافظة ديالى	المديد	بذور

Helminthosporium sp. Aspergillus sp.

Aspergillus sp. Cladosporium sp. Penicillium sp.



Rhizoctonia sp.



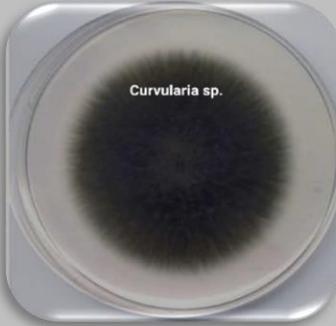
Stemphylium sp.



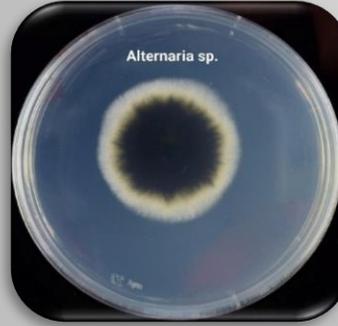
Stemphylium sp.



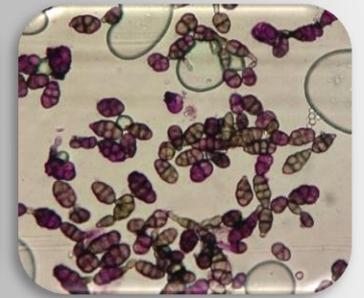
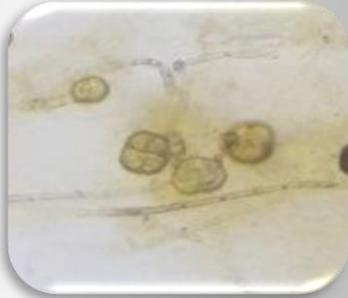
Curvularia sp.



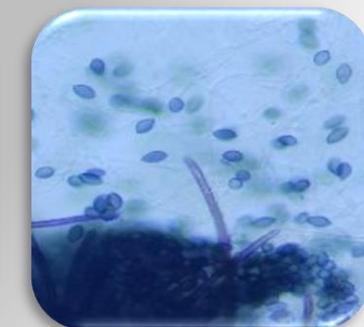
Alternaria sp.



Alternaria sp.



Chaetomium sp.

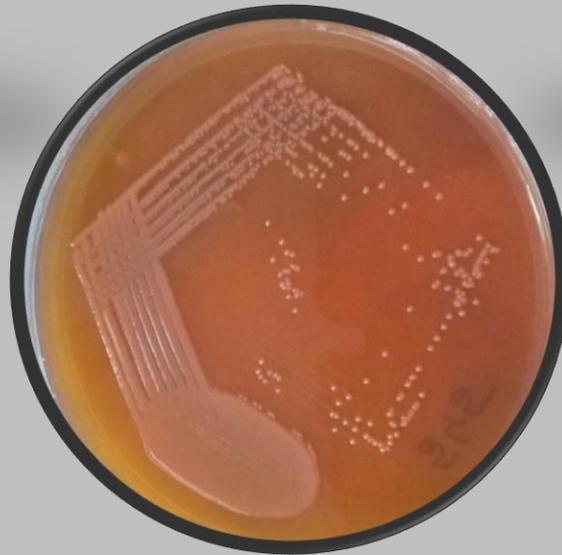




B1



B2



B3

تأثير المسببات المرضية المرافقة للحامول على انبات بذور الحامول و بذور الريحان ✓

النسبة المئوية للانبات		
%الريحان	%الحامول	اسماء عزلات الفطريات
57.33	*30.67	<i>Alternaria sp.</i> (F2)
70.66	28.00	<i>Alternaria sp.</i> (F4)
66.66	29.33	<i>Aspergillus sp.</i> (F6)
46.00	36.66	<i>Aspergillus sp.</i> (F12)
81.33	24.00	<i>Chaetomium sp.</i> (F7)
64.00	41.33	<i>Cladosporium sp.</i> (F8)
52.00	33.33	<i>Curvularia sp.</i> (F5)
58.66	37.33	<i>Helminthosporium sp.</i> (F10)
77.33	34.66	<i>Penicillium sp.</i> (F9)
52.00	28.33	<i>Rhizoctonia solani</i> (F1)
64.00	28.00	<i>Stemphylium sp.</i> (F3)
61.33	48.00	<i>Stemphylium sp.</i> (F11)
95.00	88.90	Control
11.28**	10.37**	LSD 5%

تأثير كفاءة البكتريا المرافقة للحامول في انبات بذور الحامول و الريحان

النسبة المئوية للانبات		
بذور الريحان	بذور الحامول	عزلات البكتريا
50.00	*48.66	B1
92.33	90.66	B2
79.33	76.00	B3
92.66	88.00	Control
6.73**	7.68**	LSD 5%

✓ اختبار كفاءة الرواشح الفطرية في انبات بذور الحامول

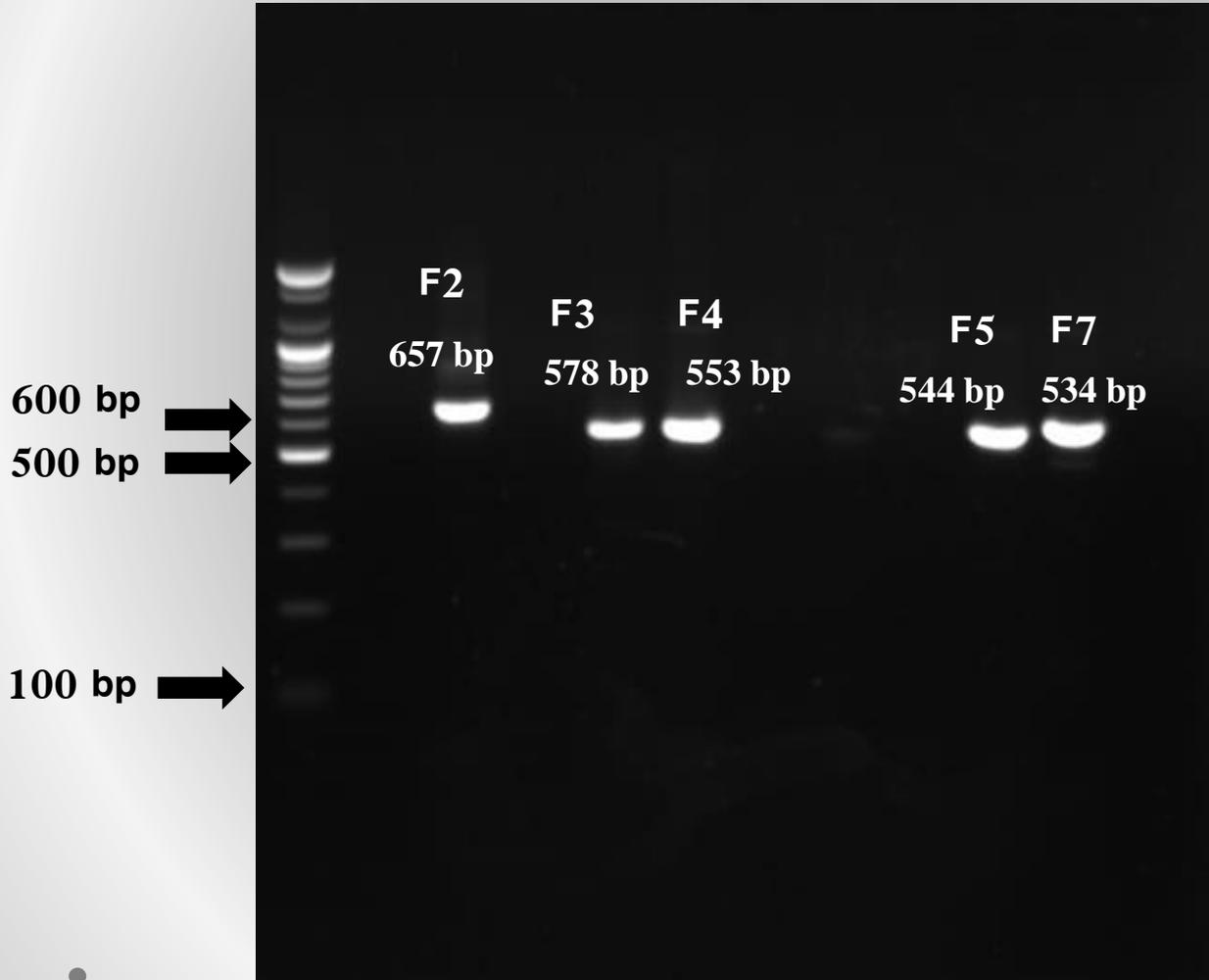
المعدل	النسبة المئوية للانبات			اسم الفطر
	تركيز 60 %	تركيز 40 %	تركيز 20 %	
41.95	38.70	41.64	*45.51	<i>Aspergillus sp.</i> (F6)
46.50	41.56	46.62	51.33	<i>Alternaria sp.</i> (F4)
49.85	44.94	49.80	54.82	<i>Curvularia sp.</i> (F5)
33.89	29.67	32.66	39.33	<i>Chaetomium sp.</i> (F7)
44.24	40.51	44.65	47.57	<i>Stemphylium sp.</i> (F3)
87.47	85.92	87.71	88.77	Control
1.83**	Ns			LSD5%
	46.88	50.51	54.56	متوسط التركيز
	1.29**			LSD5%

✓ اختبار كفاءة الرواشح الفطرية في انبات بذور الريحان

المعدل	% للانبات			اسم الفطر
	تركيز 60 %	تركيز 40 %	تركيز 20 %	
83.64	78.88	83.60	*88.44	<i>Aspergillus sp.</i> (F6)
77.35	72.12	77.24	82.68	<i>Alternaria sp.</i> (F4)
76.76	75.00	76.28	79.00	<i>Curvularia sp.</i> (F5)
84.77	82.00	84.32	87.99	<i>Chaetomium sp.</i> (F7)
79.34	77.65	79.22	81.14	<i>Stemphylium sp.</i> (F3)
87.47	85.92	87.71	88.77	Control
1.61**	2.78**			LSD5%
	78.60	81.40	84.67	معدل التركيز
	1.14**			LSD5%

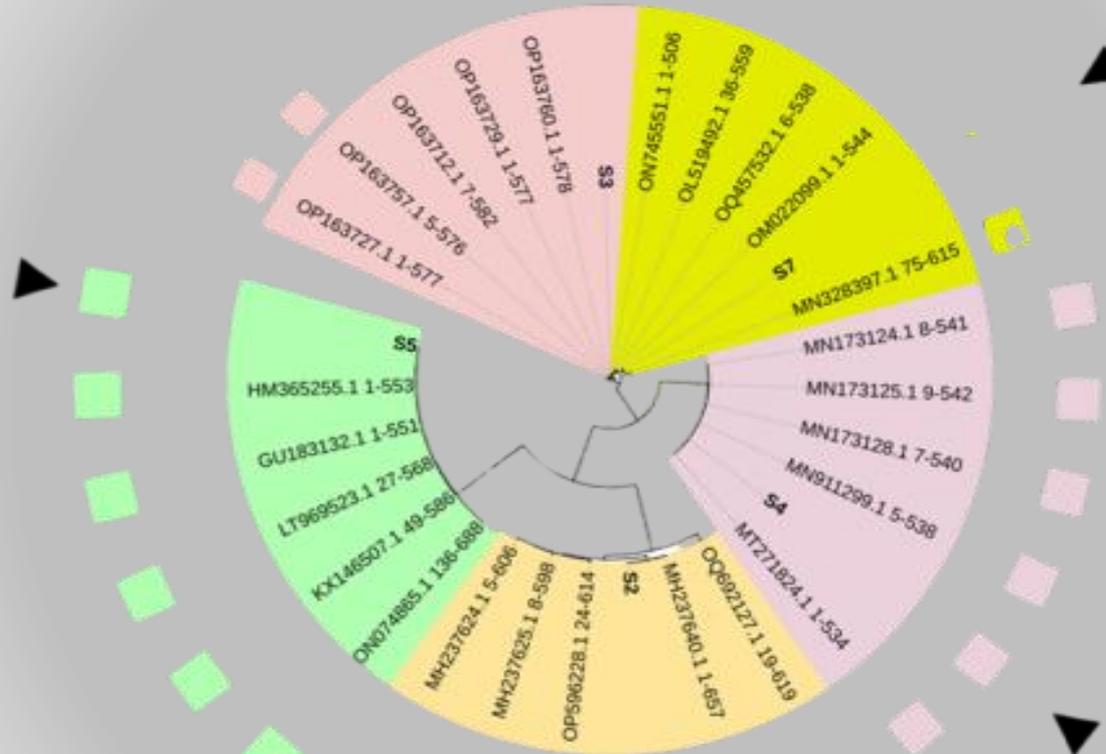
التشخيص الجزيئي ✓

نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز وجود خمس حزم ذات حجم ما بين (500 - 700 bp) زوجاً قاعدياً ✓



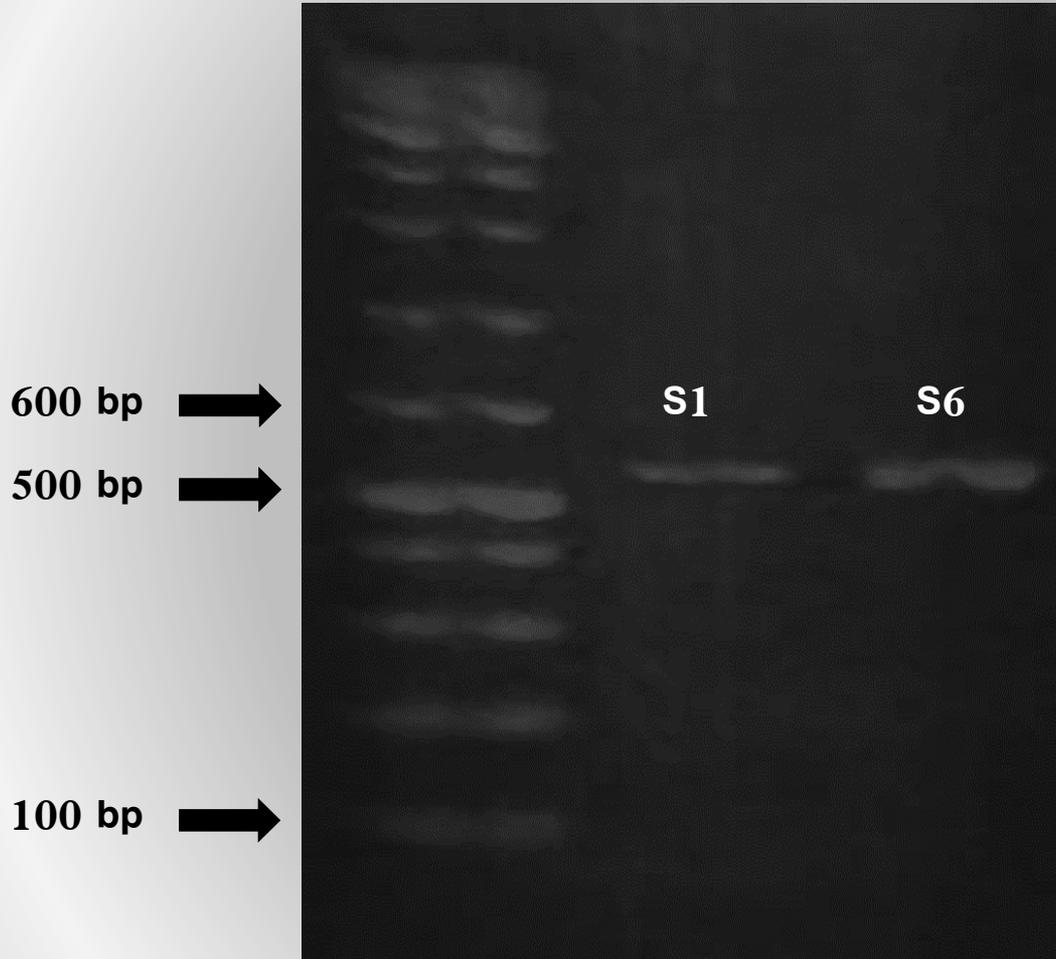
F2 = *Aspergillus flavus*
F3 = *Stemphylium vesicarium*
F4 = *Alternaria alstroemeria*
F5 = *Curvularia spicifera*
F7 = *Amesia atrobrunneum*

الشجرة الوراثية للفطريات التي تم تشخيصها جزيئياً



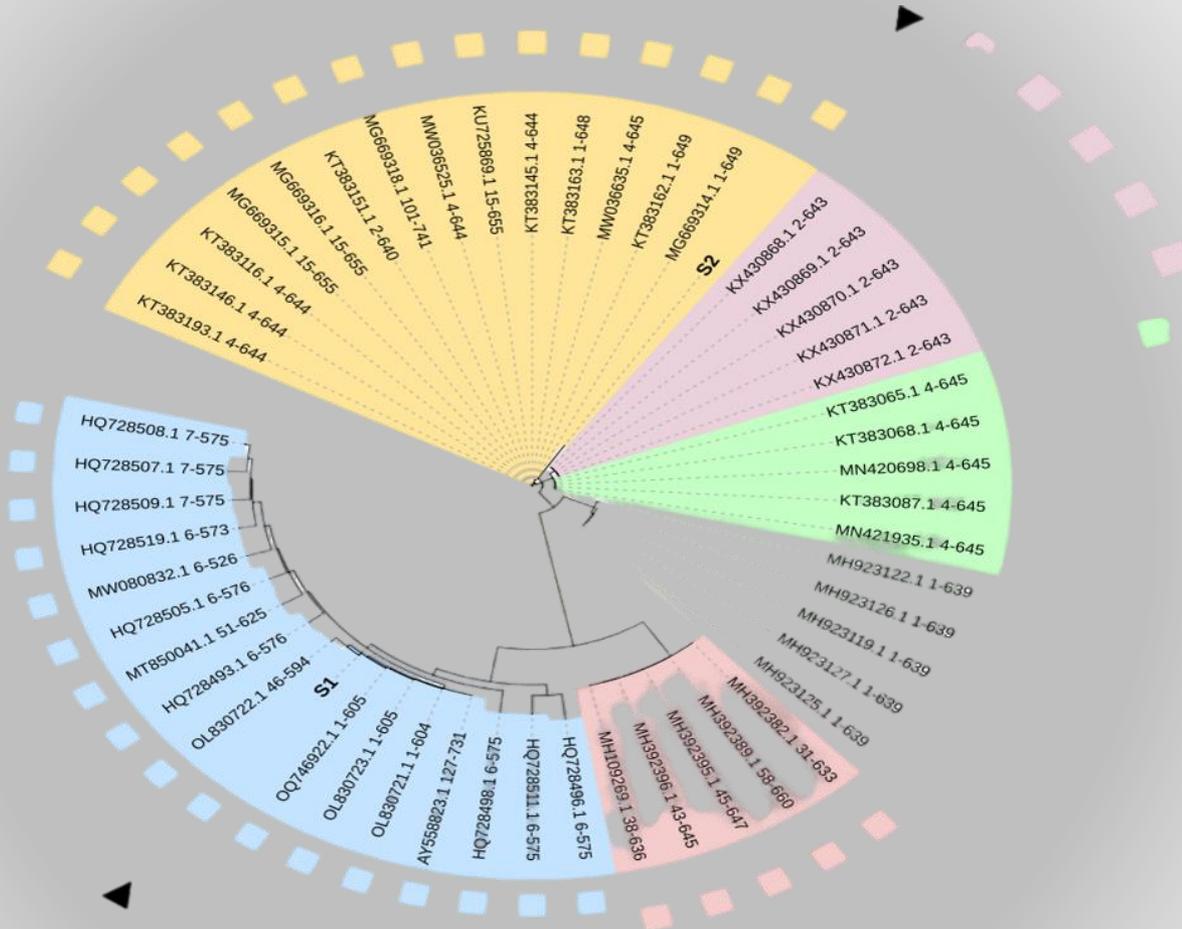
- ◀ Investigated fungal samples
- ◻ Aspergillus flavus
- ◻ Alternaria alstroemeriae
- ◻ Curvuluria specifera
- ◻ Chaetomium atrobrunneum
- ◻ Stemphylium vesicarium

✓ نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز وجود زوج من الحزم ذات حجم جزيئي (bp 650-600)



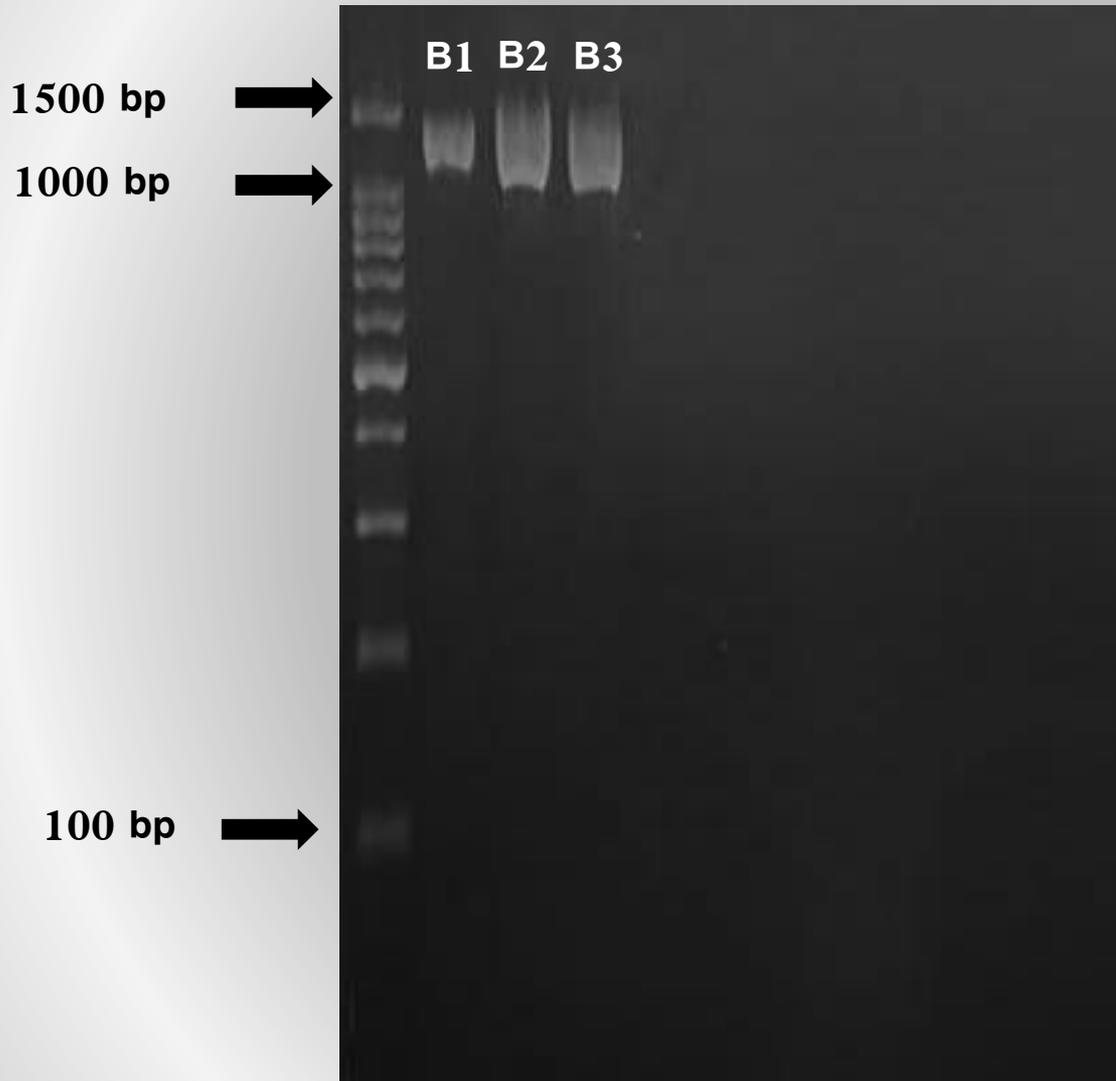
S1 = *Cuscuta reflexa*
S6 = *Cuscuta campestris*

الشجرة الوراثية لعينات الحامول التي تم تشخيصها جزيئياً



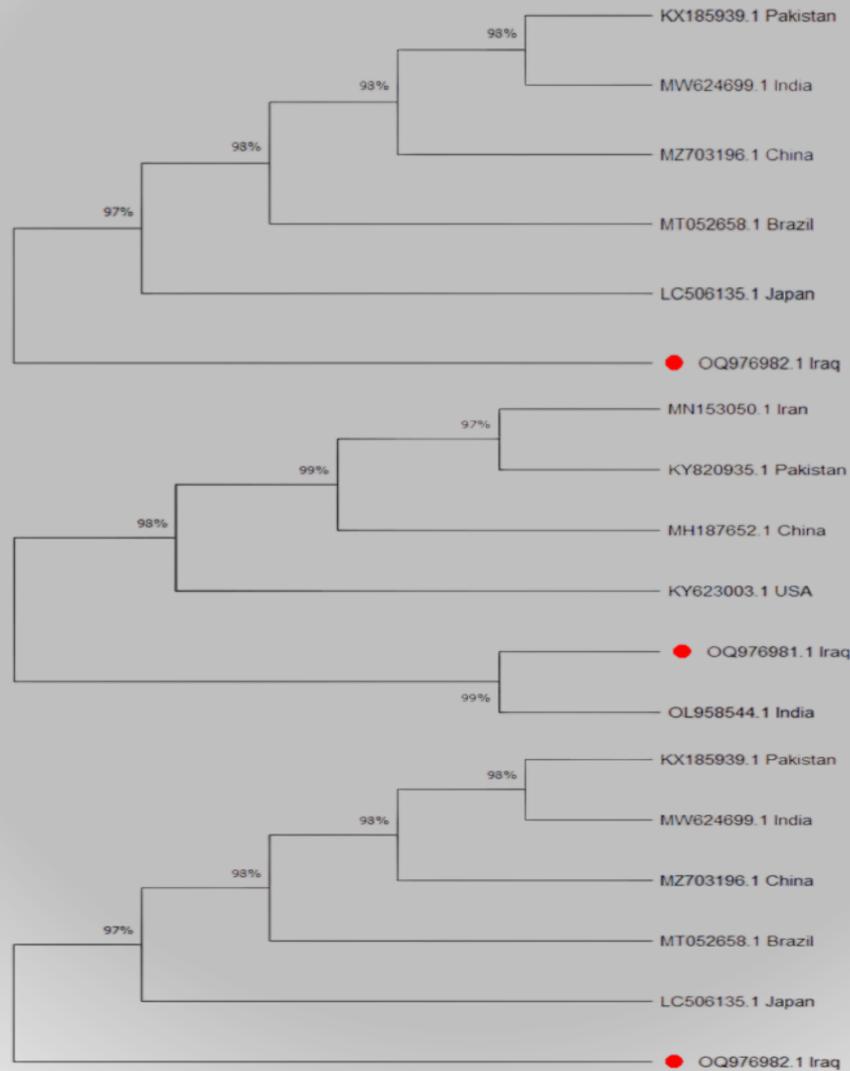
 *Cuscuta campestris*
 *Cuscuta reflexa*

نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز وجود ثلاث حزم ✓ بحجم (bp1500-1250)



B1 = *Staphylococcus aureus*
B2 = *Bacillus subtilis*
B3 = *Achromobacter xylosoxidans*

العلاقة الوراثية للبكتريا *Bacillus subtilis* و *Staphylococcus aureus* و *Achromobacter xylosoxidans*

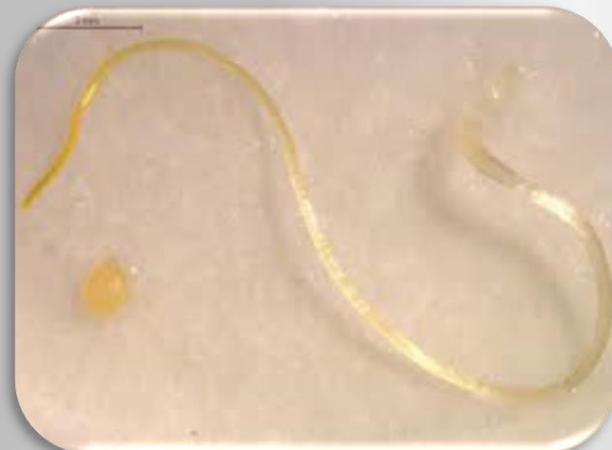
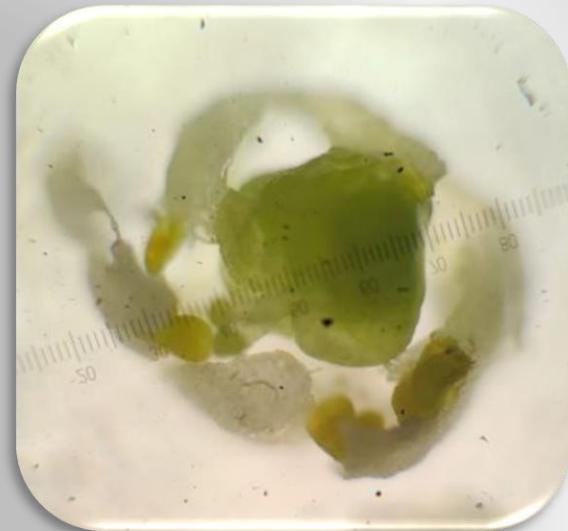


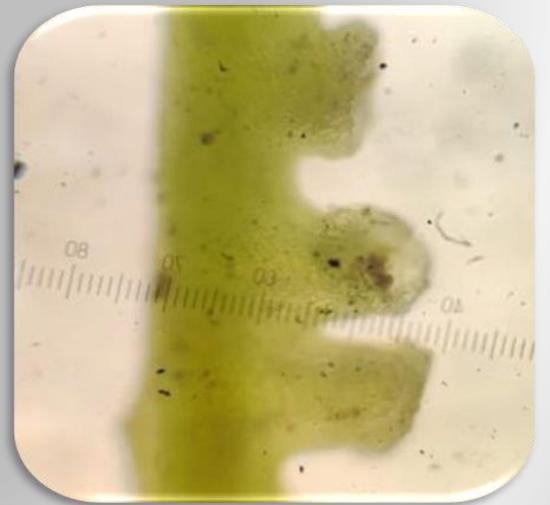
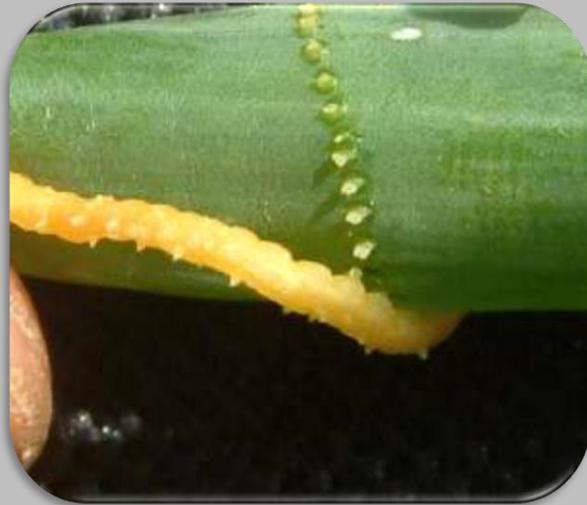
✓ اختبار تأثير المبيد Mortal و المركبات سيليكات البوتاسيوم و كلوريد البوتاسيوم و الحامض الاميني في انبات بذور الحامول والريحان في المختبر

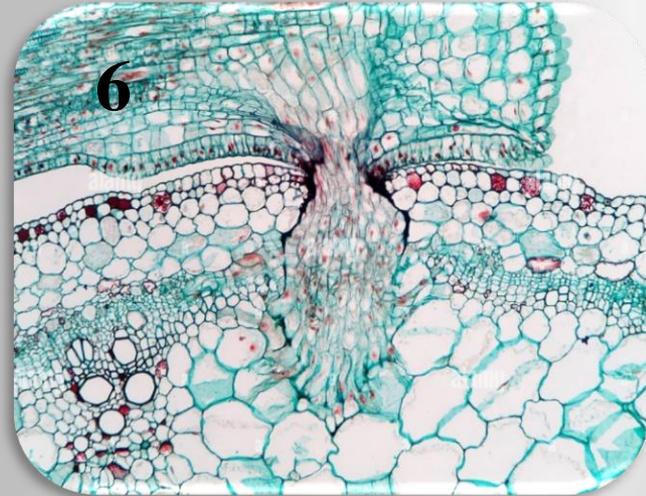
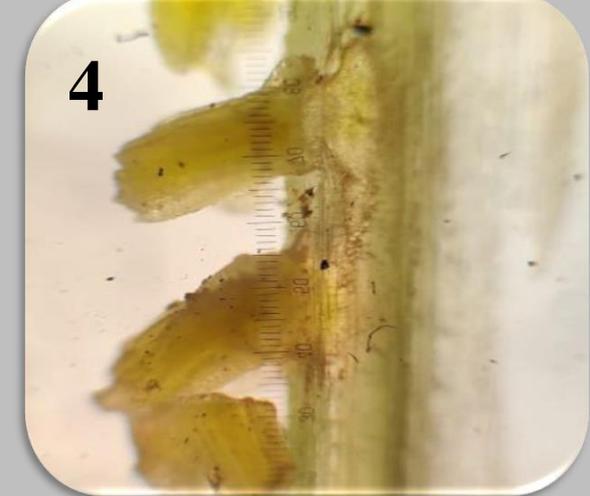
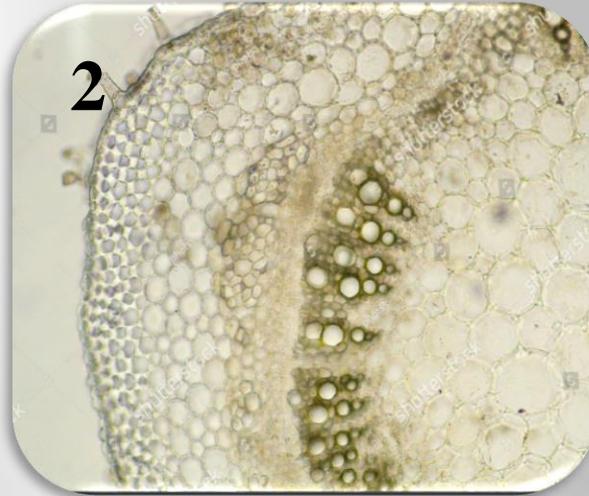
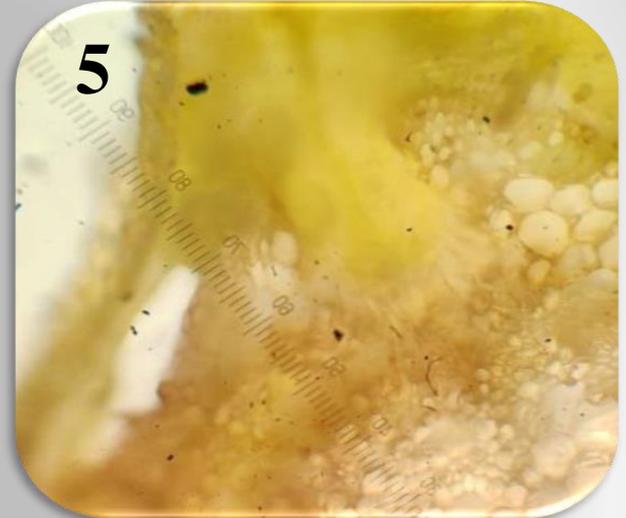
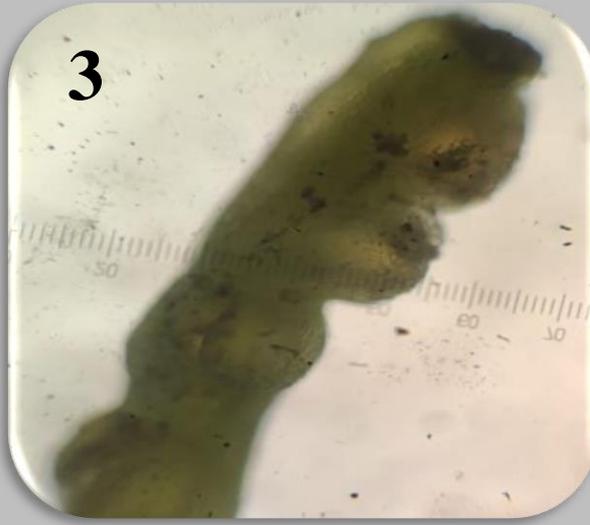
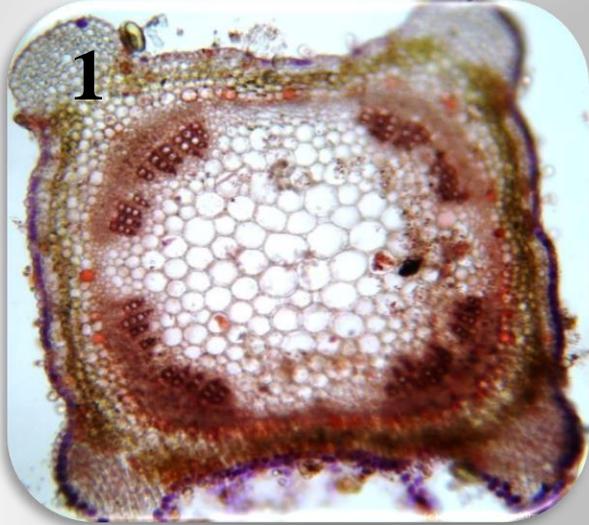
اسم المواد	التركيز % للحامول	نسبة انبات الحامول	نسبة انبات الريحان
مبيد الحامول	1	56.00*	89.00
	2	38.67	82.67
	3	29.33	78.00
كلوريد البوتاسيوم	1	78.00	92.33
	2	80.67	94.00
	3	84.00	96.67
احماض امينية	1	82.67	94.00
	2	86.33	96.33
	3	90.00	98.67
سيليكات البوتاسيوم	1	70.67	91.00
	2	72.33	94.33
	3	76.00	97.67
Control		89.67	92.67
LSD5%		4.94**	3.89**

✓ كفاءة الفطر *Amesia atrobrunneum* وسليكات البوتاسيوم والمبيد الكيميائي Mortal في خفض نسبة الانبات وشدة الاصابة بالحامول

معاملات	ارتفاع النبات	عدد الاوراق	تفرعات النبات	شدة الاصابة %	نسبة الانبات %
الريحان + الحامول + اضافة الراشح	24.33*	26.12	4.00	.1931	32.31
الريحان + الحامول + رش الراشح	25.73	27.27	4.00	34.67	35.00
الريحان + الحامول + اضافة سليكات البوتاسيوم	27.77	29.33	4.00	60.00	61.12
الريحان + الحامول + رش سليكات البوتاسيوم	28.89	30.67	5.00	63.67	64.44
الريحان + الحامل + اضافة المبيد Mortal	24.12	26.56	3.00	27.00	28.33
الريحان + الحامول + رش المبيد Mortal	22.45	25.78	3.00	.6730	31.33
الريحان + الحامول + اضافة جميع المواد	25.67	27.56	4.00	23.67	24.33
الريحان + الحامول + رش جميع المواد	26.33	28.00	4.00	21.12	22.67
الريحان + الحامول + اضافة جميع المواد + رش جميع المواد	27.12	28.89	5.00	19.33	20.00
الريحان فقط	29.33	31.52	5.00	0.00	0.00
معاملة الريحان + الحامول فقط	20.26	22.00	2.00	100.00	98.67
LSD5%	2.18**	1.96**	1.61**	1.51**	1.69**







الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات

1. جميع الفطريات معزولة اثرت في نسبة انبات بذور الحامول وكان الفطر *Chaetomium atrobrunneum* اكثرها تأثيرا .
2. اثرت رواشح الفطريات *Chaetomium sp.*(F7) ، *Aspergillus sp.*(F6) ، *Stemphylium sp.*(F3) ، *Alternaria sp.*(F4) ، *Curvularia sp.*(F5) في خفض نسبة أنبات بذور الحامول وكان اكثرها تأثير الفطر *Chaetomium sp.*(F7)
3. تشخيص عدد من انواع الفطريات جزيئاً من الحامول لاول مرة في العراق وهي *Curvularia spicifera* ، *Chaetomium atrobrunneum* ، *Stemphylium vesicarium* و *Alternaria alstroemeria* تم ايداعها في بنك الجينات تحت ارقام انضمام هي (OQ746925، OQ746924، OQ746925، OQ746928) على التتابع .
4. عزل ثلاث انواع من البكتريا هي *Staphylococcus aureus* ، *Bacillus subtilis* ، *Achromobacter xylosoxidans* وتشخيصها جزيئاً واودعت في بنك الجينات تحت ارقام انضمام 976979OQ، 976981OQ، 976982OQ على التتابع .
5. تشخيص نوعين من الحامول جزيئاً هما *Cuscuta campestris* و *Cuscuta reflex* تحت رقم انضمام 746922OQ، 746927OQ لاول مرة في العراق
6. اضافة المعاملات الفطر *Chaetomium atrobrunneum* وسليكات البوتاسيوم (3 %) والمبيد Mortal (3 %) عند الزراعة ورشها على سيقان الحامول اعطت اقل شدة اصابة .

التوصيات

1. البحث عن المزيد من عوامل مكافحة احيائية من اجل استعمالها في برنامج المكافحة ضد الحامول .
2. امكانية تصنيع مبيد حيوي من العوامل التي تم عزلها واستعمالها ضد الحامول .
3. التحري عن عزلات جديدة من البكتريا يمكن استعمالها ضد الحامول التي تصيب محاصيل الزراعية .

شُكْرًا لِأَصْفَائِكُمْ