ABSTRACT

Chickpea (*Cicer arietinum*) is susceptible to a large number of biotic and abiotic diseases. These diseases are a major constrain to successful cultivation of chickpea. The two most important biotic diseases include Ascochyta blight caused by *Ascochyta rabiei* and Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporun* f. sp. *ciceris* (*F.o.c*). Fusarium wilt is a serious and wide spread disease of chickpea in all chickpea growing countries. It is reported to cause annual yield losses of 10-15 percent. The disease is seed and soil borne and it can survive in soil even in the absence of a host for three years.

Ten (*F.o.c*) isolates were isolated from different governorates and identified by traditional methods as well as by BIOLOG™ system. The pathogenicity and host range of *Fusarium oxysporum* isolates were evaluated on the highly susceptible cultivars of legumes crops i.e. chickpea (cv. Giza 2), faba bean (cv. Giza 40), lentil (cv. Giza 370) and lupine (Giza1) under favorable greenhouse conditions. Given results showed that only chickpea plants were vulnerable to infection by tested *Fusarium oxysporum* isolates at different levels. This result indicated that all tested isolates were *Fusarium oxysporum f. sp. cicreis.* The pathogenicity of (*F.o.c*) isolates were evaluated on the highly susceptible chickpea cultivar (Giza 2) under favorable greenhouse conditions. Tested isolates were divided into two main groups according to their virulence. The first group included all isolates that caused high percentage of early wilted plants (25 days after inoculation) and caused only foliar yellowing and drooping of leaves. The second group included isolates that caused high percentage of late wilted plants (60 days after inoculation) and consisted of from two sub-groups, the first sub-group included one isolate which caused foliar yellowing and drooping of the leaves in the upper part of plants and lower leaves became chlorotic. The second sub-group included three isolates, these isolates caused foliar yellowing and wilt. Obtained results indicated that there was no correlation between early or late wilt symptoms and geographical

origin. The host rang experiments indicated that all tested isolates were (*F.o.c.)*

On the Basis of the morphological features, all isolates were divided into four groups and there was no relationship between morphological characterization and geographic area for cultures isolated from the same geographic region in Egypt.

All isolates identified by using BIOLOG™ system to study the ability of microorganisms to assimilate or oxidize a preselected panel of different carbon sources. Moreover, a cluster analysis was performed to determine the relationship between tested isolates based on their metabolism profile patterns. All isolates clustered into two main groups and there was no correlation between geographic area and metabolism fingerprint. On the other hand, there was correlation between metabolism profiles and isolates virulence.

The RAPD technique for 10 isolates using five primers indicated that there was no correlation between pathological characterizations and RAPD profiles of tested isolates but there was correlation between morphological characterizations and RAPD profiles patterns for all isolates.

Sixty-two chickpea entries were evaluated under greenhouse conditions for their reaction against the most pathogenic isolate (isolate F4). Twenty- two chickpea entries were evaluated during (2004-2005& 2005-2006) and Forty-one chickpea entries were evaluated during (2006-2007& 2007-2008) at Giza Research Station. presented results indicated that 32 entries gave a resistant reaction, 25 entries gave a moderate susceptible reaction and 5 entries gave a susceptible reaction. Twenty Trichoderma isolates were tested against the most pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (*F.o.c*) isolates (F1 and F4) and obtained results indicated that all tested *Trichoderma* isolates significantly inhabited the growth of (*F.o.c*) isolates *in vitro*. The most effective isolate against (*F.o.c*) isolate (F1) was *Trichoderma harzianum* (T15) thereby causing maximum inhibition (60.8%), and The most effective isolate against (*F.o.c*)

isolate (F4) was *Trichoderma hamatum* (T5) thereby causing maximum inhibition (68.4%) for growth of *(F.o.c).*

The most effective Trichoderma isolates (T5 and T15) in controlling the growth of different isolates of (*F.o.c*) (F1 and F4) *in vitro* were examined against (*F.o.c*) isolates (F1 and F4) on two chickpea cultivars under greenhouse conditions. *Trichoderma harzianum* (T15) was the most effective in controlling both early and late wilt disease with different treatments as compared *Trichoderma hamatum* (T5). *Trichoderma harzianum* (T15) was also more effective in increasing number, fresh and dry weight of nodules per plant and in increase plant growth parameters.

الخلاصة

يصاب الحمص بالعديد من المسببات المرضية سواء الناتجة من الكائنات الحية الدقيقة أو الناتجة من عوامل أخرى فسيولوجية. و يعتبر من أهم الأمراض التي تصيب الحمص مرض لفحة الأسكوكيتا و الذي بسببة الفطر *Ascochyta rabiei* و مرض الذبول الفيوزارمى و الذي يسببه الفطر *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* . ويعتبر مرض الذبول الأكثر انتشاراً وذلك لانتشاره في جميع حقول زراعة الحمص في العالم و كذلك وجد أنة يسبب خسارة في المحصول تقدر بنسبة 10-15 % مع قدرته على البقاء في التربة لمدة 3 سنوات في غياب العائل. تسلط هذه الدراسة الضوء على بعض الجوانب المرضية و البيولوجية و الجزيئية للمسبب المرضى حيث تم تجميع 10 عزل من المسبب المرضى من العديد من المحافظات في جمهورية مصر العربية و تم تعريف المسبب المرضى عن طريق الطرق التقليدية و الطرق غير التقليدية باستخدام جهاز BIOLOG و ذلك لتحديد البصمة التنفسية لعزلات المسبب المرضى و تم اختبار القدرة المرضية للعزلات على صنف جيزة 2 و هو صنف حساس للمسبب المرضى و ذلك تحت ظروف الصوبة ومن خلال النتائج تم تقسيم العزلات حسب قدرتها المرضية إلى مجموعتين. المجموعة الأولى تشمل جميع العزلات التي تسببت في إصابة أكبر عدد من النباتات بعد 25 يوم من العدوى وكانت تسبب اصفرار للمجموع الخضري مع تساقط للأوراق و المجموعة الثانية تشتمل على كل العزلات التي تسببت في إصابة عدد كبير من النباتات بعد 60 يوم من العدوى و تفرعت هذه المجموعة إلى مجموعتين فرعيتين. المجموعة الفرعية الأولى تحتوى على العزلات التي تسببت في حدوث اصفرار للأوراق و المجموعة الفرعية الثانية تحتوى على العزلات التي تسببت في حدوث اصفرار للأوراق و ذبول للنباتات. أظهرت نتائج اختبار المدى العوائلى للعزلات المختبرة أنها تصيب الحمص فقط من بين بعض المحاصيل البقولية الشتوية مما يدل أن العزلات المختبرة هى

Fusarium oxysporum f. sp. ciceris

تمت دراسة الصفات المورفولوجية لجميع العزلات فتم تقسيم العزلات إلى أربع مجاميع منفصلة عن بعضها البعض ووجد أنة لا توجد علاقة بين منطقة العزل الجغرافية و الصفات المورفولوجية للعزلات المعزولة من نفس المنطقة الجغرافية وكذلك أيضا بين باقي العزلات التي تم عزلها من مناطق مختلفة وكذلك تم دراسة البصمة التنفسية للعزلات المختبرة عن طريق جهاز BIOLOG ووجد أنة لا توجد علاقة ارتباط و واضحة بين اختبار القدرة المرضية للعزلات و البصمة التنفسية لها.

تم دراسة الاختلافات الوراثية للعزلات المختبرة باستخدام طريقة RAPD و أظهرت النتائج أنة توجد مستويات مختلفة من الاختلافات الوراثية بين العزلات و أظهرت النتائج أيضا أنة لا توجد علاقة بين اختبار القدرة المرضية و الاختبارات الجزيئية لجميع العزلات بينما توجد علاقة و واضحة بين الصفات المورفولوجية و الجزيئية لجميع العزلات المختبرة. فيما يتعلق بمقاومة مرض الذبول في الحمص فإنه تم إحتبار القدرة التثبيطية لعشرين عزلة من فطر *Trichoderma sp* في المعمل ضد عزلتين من المسبب المرضى و أظهرت النتائج أن العزلتين T5 و T15 وهما أقوى العزلات التي تم اختبارها وكذلك تم استخدامهما تحت ظروف الصوبة ضد عزلتين من المسبب المرضى وعلى صنفين مختلفين هما جيزة 4 و جيزة 531 وأثبتت النتائج أن العزلة T15 هي أقوى العزلات المختبرة حيث أدت إلى انخفاض نسبة الإصابة وزيادة كل من الوزن الجاف و طول النبات و زيادة وزن و عدد العقد الجذرية.

CONTENTS

INTODUCTION…….. 1

REVIEW OF LITERATURE……. 4

1-Causal pathogen ……... 4

2- Molecular characterization……. 10

3- Disease control……. 18

MATERIALS AND METHODS…… 25

1- Isolation of causal pathogen…… 25

2- Identification of fungal isolates using traditional methods……..... 26

3- Isolates preservation…… 26

4- Pathogenicity tests and host range for *Fusarium oxysporum* isolates……..... 26

4.1. Inoculum preparation……... 27

4.2. Pathogenicity tests and host range for *Fusarium oxysporum* isolates on highly susceptible cultivars of legumes crops……... 27

5- Variability of *Fusarium oxysporum* isolates…….. 28

5.1. Morphological characterization for *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*…….. 28

5.2. Using BIOLOG™ system…… 28

5.2.1. Inoculum preparation…… 29

5.2.2. Inoculation of the FF microplate wells…….. 29

5.3. Molecular characterization……. 29

5.3.1. Fungal isolates……. 29

5.3.2. Mycelium production…….…….. 29

5.3.3. DNA extraction……..... 30

5.3.4. Determining DNA Concentration by Spectrophotometer……..... 32

5.3.5. Adjusting the DNA Concentration……. 32

5.3.6. Polymerase chain reaction (PCR)……..... 32

6- Reaction of chickpea entries to infection by *Fusarium oxysporum*……..... 33

7-Antagonistic activity of Trichoderma isolates against *Fusarium oxysporum*…….. 34

7.1. Source of tested microorganisms…….. 34

7.2. Isolation of tested microorganisms from rhizosphere of chickpea roots..... 34

7.3. *In vitro* assay of *Trichoderma* speices…….. 35
8- Biological control experiments…….. 38
8.1. Inoculum preparation of causal pathogen…….. 38
8.2. Soil infestation by *F. oxy*. f. sp. *cicries*……. 38
8.3. Treatment and sowing of seeds…… 38
EXPERMENTAL RESULTS……. 40
1- Isolation and identification of causal pathogen and associated fungi…… 40
4- Pathogenicity tests and host range for *Fusarium oxysporum* isolates……. 41
3- Variability of *Fusarium oxysporum* isolates…….. 42
3.1. Morphological characterization for *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*……. 42
3.2. Using BIOLOG system…… 49
3.3. Molecular characterization……. 61
3.3.1 RAPD profiles of 10 *(F.o.c)* isolates obtained by primer 1……..... 61
3.3.2 RAPD profiles of 10 *(F.o.c)* isolates obtained by primer 2…….. 63
3.3.3. RAPD profiles of 10 *(F.o.c)* isolates obtained by primer 3……..... 65
3.3.4. RAPD profiles of 10 *(F.o.c)* isolates obtained by primer 4……..... 67
3.3.5. RAPD profiles of 10 *(F.o.c)* isolates obtained by primer. 5……..... 69
4- Reaction of chickpea entries to infection by *Fusarium oxysporum*…… 79
5- Antagonistic activity of *Trichoderma* isolates against *Fusarium oxysporum* isolates ……... 74
6- Biological control experiment……. 91
6.1. Effect of *Trichoderma* isolates on wilt incident under greenhouse conditions……. 91
6.2. Effect of *Trichoderma* isolates on nodulation and growth parameters of chickpea plants…… 92
DISCUSSION……... 95
SUMMARY…….. 106
REFRENCES……... 114