دراسات مرضية وبيوكيميائية على عفن جذور الريحان فى مصر

رسالة مقدمة من

عبير رمضان محمد عبد العزيز

بكالوريوس في العلوم الزراعية (الكيمياء الحيوية)- كلية الزراعة- جامعة القاهرة، ١٩٩٩
ماجستير في العلوم الزراعية (أمراض النبات) - كلية الزراعة - جامعة القاهرة،٢٠٠٥

للحصول على درجة

دكتور الفلسفة

فى

العلوم الزراعية
(أمراض نبات)

قسم أمراض النبات
كلية الزراعة
جامعة القاهرة
مصـــــــــر

٢٠١٠

PATHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL STUDIES ON ROOT ROT OF BASIL IN EGYPT

BY

ABEER RAMADAN MOHAMED ABD EL-AZIZ

B.Sc. Agri. Sci. (Biochemistry), Fac. Agri., Cairo Univ., 1999
M.Sc. Agri. Sci. (Plant Pathology), Fac. Agri., Cairo Univ., 2005

THESIS

Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

DOCTOR OF PHILOSOPHY

IN

Agriculture Sciences

(Plant Pathology)

Department of Plant Pathology
Faculty of Agriculture
Cairo University
EGYPT

2010

دراسات مرضية وبيوكيميائية على عفن جذور الريحان فى مصر

رسالة دكتوراه الفلسفة
فى العلوم الزراعية
(أمراض النبات)

مقدمة من

عبير رمضان محمد عبد العزيز

بكالوريوس في العلوم الزراعية (الكيمياء الحيوية)- كلية الزراعة - جامعة القاهرة، ١٩٩٩
ماجستير فى العلوم الزراعية (أمراض النبات)- كلية الزراعة - جامعة القاهرة، ٢٠٠٥

لجنة الإشراف

دكتور / منى محمود ماهر رجب
أستاذ أمراض النبات – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

دكتور / مجدي محمد صابر
أستاذ أمراض النبات – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

دكتور / سامي عبد الفتاح المرسى
باحث أول – معهد بحوث أمراض النباتات – مركز البحوث الزراعية

INTRODUCTION

Sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) is one of the most important aromatic plants subjected to be infected with soil borne diseases including wilt and root rot diseases which causes several important considerable losses in yield in the present investigation (Reis *et al*., 2007).

Medicinal and aromatic plants have a major role in agriculture and industry. They are the main source for safe drugs and raw substances used in manufacturing of pharmaceuticals. Some of their components are nucleus to the chemical biosynthesis (Reis *et al*., 2007).

Sweet basil (*Ocimum basilicum*) is one of the leading herb crops, used fresh or dry Sweet basil is used as flavoring agent as a source of oil perfume and acts principally on digestive and nervous system, stomach cramps, colic and indigestion. It can be used to prevent nausea and vomiting and help to kill intestinal worms; it has a mild sedative action (Dudai *et al*., 2002).

Induced systemic resistance is the phenomenon by which the plant can utilize its specific mechanism to increase the level of resistance without any changes in plant genome (Kuc, 1982). Induced resistance has been adapted as a general term and defined as the process of active resistance dependent on the hosts, physical or chemical barriers activated by biotic and abiotic agents (inducing agents).

SUPERVISION SHEET

PATHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL STUDIES ON ROOT ROT OF BASIL IN EGYPT

Ph.D. Thesis
In
Agri. Sci. (Plant Pathology)

By

ABEER RAMADAN MOHAMED ABD EL-AZIZ

B.Sc. Agri. Sci. (Biochemistry), Fac. Agri., Cairo Univ., 1999
M.Sc. Agri. Sci. (Plant Pathology), Fac. Agri., Cairo Univ., 2005

SUPERVISION COMMITTEE

Dr. MONA MAHMOUD MAHER RAGAB
Professor of Plant Pathology, Fac. Agri., Cairo University

Dr. MAGDY MOHAMED SABER
Professor of Plant Pathology, Fac. Agri., Cairo University

Dr. SAMY ABDEL-FATAH El- MORSY
Senior Researcher of Plant Pathology, A. R. C., Giza, Egypt

اسم الطالب: عبير رمضان محمد عبد العزيز **الدرجة:** دكتور الفلسفة
عنوان الرسالة: دراسات مرضية وبيوكيميائية على عفن جذور الريحان فى مصر
المشرفون: دكتور: منى محمود ماهر رجب
دكتور : مجدي محمد صابر
دكتور : سامي عبد الفتاح المرسى
قسم : أمراض النبات **فرع:** **تاريخ منح الدرجة:** / / ٢٠١٠

المستخلص العربي

يُعتبر نبات الريحان من النباتات العطرية الهامة التى لها فوائد طبية متعددة وهو من النباتات التى تصدر الى عديد من الدول مثل ألمانيا وايطاليا وهولندا والولايات المتحدة ويصاب الريحان بعديد من الأمراض أهمها عفن الجذور الذى يؤدى الى انخفاض فى كمية ونوعية المحصول.

أوضحت نتائج حصر المرض فى ثلاث محافظات هى بنى سويف والمنيا وأسيوط ، خلال موسمى ٢٠٠٦/٢٠٠٧ و٢٠٠٧/٢٠٠٨ أن شدة الاصابة تتراوح بين ١٤.٩٦ الى ١٥.٢٠% على النباتات التى ظهرت عليها اعراض الاصابة بأعفان الجذور .تم عزل عدد من الفطريات التى تتبع ستة أجناس فطرية ، حيث كانت الفطريات ريزوكتونيا سولانى والماكروفومينا فاسيولينا وفيوزاريوم أوكسيسبورم هم الأكثر تكراراً.

تم دراسة نقع بذور الريحان قبل الزراعة لمدة ساعتين ونصف فى تركيزات مختلفة لبعض المواد المحفزة لأليات الدفاع الطبيعية ومنها مضادات الأكسدة مثل حامض السالسيليك و حامض الأوكساليك و حامض الأسكوربيك وحامض التانيك وذلك بثلاث تركيزات مختلفة وهى ٨,٤,٢ مللي مولر. في حالة العدوى بفطر ماكروفومينا فاسيولينا أو الفطر فيوزاريوم أوكسيسبورم كان حامض السالسيليك عند تركيز ٨ مللي مولر هو الأعلى فعالية في خفض نسبة الإصابة بعفن الجذور أن حامض الأوكساليك هو الأكثر فعالية في حالة العدوى بفطر ريزوكتونيا سولانى.

تم أيضا استخدام بعض الأملاح مثل كلوريد البوتاسيوم وفوسفات البوتاسيوم وكلوريد الصوديوم وفوسفات الصوديوم بتركيزات ١% ،٢% ،٤% حيث وجد أن كلوريد البوتاسيوم عند تركيز ٤% هو الأكثر فعالية في خفض نسبة الإصابة بعفن يليه فوسفات البوتاسيوم وذلك بدون فروق معنوية بينهما وكان فوسفات الصوديوم هو الأقل فعالية في حالة العدوى بفطر ماكروفومينا فاسيولينا أو الفطر فيوزاريوم أوكسيسبورم بينما أظهر كلوريد الصوديوم أقل فعالية في حالة العدوى بفطر ريزوكتونيا سولانى وذلك مقارنة بالنباتات غير المعاملة بهذه الأملاح.

تم أيضا استخدام بعض منظمات النمو مثل الأندول بيوتريك أسيد و أندول أستيك أسيد بتركيزات ٤٠٠,٢٠٠,١٠٠ جزء في المليون حيث أدى استخدام جميع المستحثات إلى خفض معنوي فى نسبة الإصابة بعفن الجذور حيث أعطى الأندول بيوتريك أسيد التأثير الأعلى وذلك في حالة العدوى بكلا من ماكروفومينا فاسيولينا أو فيوزاريوم أوكسيسبورم بينما في حالة العدوى بفطر ريزوكتونيا سولانى أعطى الأندول أستيك أسيد أعلى فعالية ولكن دون فروق معنوية بينه وبين حامض الأندول بيوتريك .

أجريت دراسة تأثير المعاملة بأثنين من المبيدات الحيوية وهما بيوزيد و بيوأرك وذلك على نسبة الاصابة وصفات النمو.

تم تقدير الفينولات (الحرة والمرتبطة والكلية) وقياس نشاط انزيمات البيروكسيديز والبولى فينول أكسيديز والشيتينيز في نبات الريحان. عمل فصل كهربي لبروتينات نبات الريحان لدراسة تأثير المقاومة المستحثة عليها حيث وجد ظهور عدد من البروتينات الجديدة المرتبطة بالمقاومة المستحثة.

تم عمل تفريد لمكونات الزيت باستخدام جهاز GC-Mass لمعرفة مدى تأثر مكوناته الأساسية نتيجة لاستخدام المستحثات حيث وجد أن جميع المعاملات أدت إلى زيادة في المكونات الفعالة للزيت.

الكلمات الدالة: الريحان ، عفن الجذور، مقاومة مستحثة، تغيرات بيوكيميائية، المكافحة الحيوية

Name of Candidate: Abeer Ramadan Mohamed Abd El-aziz **Degree:** Ph.D
Title Of Thesis: Pathological and Biochemical Studies on Root Rot of Basil in Egypt
Supervisors: Dr. Mona Mahmoud Maher Ragab
Dr. Magdy Mohamed Saber
Dr. Samy Abdel-Fatah El-Morsy
Department: Plant Pathology
Branch:

ABSRTRACT

A survey of fungi associated to diseased basil plants was conducted in Beni-Suef, Menia and Assiut. During 2005/2006 growing season. Six species were identified fungal species. *Rhizoctonia solani* was the most frequently isolated fungus followed by *Macrophomina phaseaolina* and *Fusarium oxysporum.*

All tested *Macrophomina phaseolina* isolates were pathogenic, isolate No.M3E (from El-Menia) which caused the highest percentage of pre- and post-emergency damping off. All tested *Rhizoctonia solani* isolates were pathogenic, isolate No.R1A (from Assiut) which caused the highest percentage of pre and post-emergency damping off.

Variation among the acids at three different concentrations on the percentages of pre and post emergency damping off caused by *M. Phaseolina*, *R. solani* and *F. oxysporum.* Salicylic acid was the most effective treatments at 8mM for decreasing pre-emergence damping off in case of *M. phaseolina* and *F. oxysporum* while, Oxalic acid was the most effective acids as inducer in case of *R. solani.* Potassium chloride (KCl) at 4% was the most effective salts as inducer for decreasing percentages of pre & post emergence damping off, indole butyric acid (IBA) at 400ppm gave the highest effect in case of *M. phaseolina* and *F. oxysporum.* Whereas, indole acetic acid (IAA) at 400 ppm gave the highest effect.

Two biocides (Bioarc and Biozeid) were significantly effective in controlling disease incidence caused by *M. phaseolina*, *F. oxysporum* and *R. solani* at survival plants.

Seeds treatment of basil plants with different biotic and abiotic inducers resulted in an increase in, free, conjugated and total phenols content compared with untreated check.The maximum increase in polyphenoloxidase and polyphenooxidase activity were recorded after 15 days in all treatments then the enzyme activity was decreased. Treatment basil plants with biotic and abiotic inducers induced new proteins. All treatments led to increase percentages of main components of the essential oil of basil.

Key words: Basil, Root Rot , Induce resistance, Biochemical Changes, Biological control

ACKNOWLEDGEMENTS

Firstly, Ultimate Praise and Thanks to "Allah"

After having spent a significant portion of my life in pursuit of a doctorate in Plant Pathology, I would like to acknowledge the large number of people whose support, encouragement and inspiration backed me up constantly.

First and foremost I express my heartfelt gratitude to my advisors: ***Dr. Mona Maher Ragab*** *Professor of Plant Pathology, and* ***Dr. Magdy Mohamed Saber*** *Professor of Plant Pathology and* ***Dr. Sami Abdel Fatah*** *Senior Researcher of Plant Pathology for giving me the opportunity and the means to achieve this work. Their friendliness, openness, constructive criticism and positive approach to solve difficulties indeed boosted me during the trying times in research.*

I express my deepest gratitude to all colleagues and staff members in Finger-printing and Molecular Marker Laboratory, Central Lab. for Biotechnology, Plant Pathology Research Institute, A.R.C., for their cooperation and kind help during the experimental stages.

Deepest and most sincere appreciations are due to the endless love, support and sacrifice of my husband and my daughter Jana and my son Ahmed.

Finally, I thank all my well-wishers I may not have mentioned here for helping me carry out this unassuming research work.

دراسات مرضية وبيوكيميائية على عفن جذور الريحان فى مصر

رسالة دكتوراه الفلسفة
فى العلوم الزراعية
(أمراض النبات)

مقدمة من

عبير رمضان محمد عبد العزيز

بكالوريوس في العلوم الزراعية (كيمياء حيوى)- كلية الزراعة - جامعة القاهرة، ١٩٩٩
ماجستير فى العلوم الزراعية (أمراض النبات)- كلية الزراعة - جامعة القاهرة، ٢٠٠٥

لجنة الحكم

دكتور / محمد محمد عمار.....
أستاذ أمراض النبات – كلية الزراعة – جامعة المنوفية

دكتور / كامل كمال ثابت.....
أستاذ أمراض النبات – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

دكتور / مجدي محمد صابر.....
أستاذ أمراض النبات – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

دكتور / منى محمود ماهر رجب .....
أستاذ أمراض النبات – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

التاريخ / / ٢٠١٠

APPROVAL SHEET

PATHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL STUDIES ON ROOT ROT OF BASIL IN EGYPT

Ph.D. Thesis
In
Agri. Sci. (Plant Pathology)

By

ABEER RAMADAN MOHAMED ABD EL-AZIZ

B.Sc. Agri. Sci. (Biochemistry), Fac. Agri., Cairo Univ., 1999
M.Sc. Agri. Sci. (Plant Pathology), Fac. Agri., Cairo Univ., 2005

Approval Committee

Dr. MOHAMED MOHAMED AMAR……
Professor of Plant Pathology, Fac. Agri., Menofya University

Dr. KAMEL KAMAL SABET…….
Professor of Plant Pathology, Fac. Agri., Cairo University

Dr. MAGDY MOHAMED SABER ……
Professor of Plant Pathology, Fac. Agri., Cairo University

Dr. MONA MAHMOUD MAHER RAGAB……
Professor of Plant Pathology, Fac. Agri., Cairo University

Date: / /2010

CONTENTS

	Page
INTRODUCTION.....	**1**
REVIEW OF LITERATURE.....	**2**
1. The disease occurrence and causal organism.....	**2**
2. Chemical resistant inducers.....	**3**
3. Biological control.....	**7**
4. Biochemical studies.....	**8**
a. Changes on phenolic compounds associated with induced resistance.....	**8**
b. Changes on Enzymes associated with induced resistance...	**10**
5. Oil contents.....	**12**
6. Pathogenesis related proteins.....	**12**
MATERIALS AND METHODS.....	**14**
RESULTS.....	**28**
1. Survey of basil root rot in different governorates.....	**28**
2. Isolation, purification and identification of the fungi associated with basil diseased plants.....	**28**
3. Pathogenicity tests.....	**30**
a. Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* on basil plants.....	**30**
b. Pathogenicity of *Macrophomina phaseolina* on basil plants.....	**31**
c. Pathogenicity of *Rhizoctonia solani* on basil plants.....	**33**
4. Chemical resistant inducer.....	**34**
a. Effect of some organic acids as seeds soaking on percentages pre, post emergence and survival plants in soil infested with *M. phaseolina, R. solani* and *F. oxysporum* under greenhouse conditions	**34**
b. Effect of some salts as seed soaking on percentages pre, post emergence and survival plants in soil infested by *M. phaseolina, R. solani* and *F. oxysporum* under greenhouse conditions.....	**36**
c. Effect of some growth regulators as seeds soaking on percentages pre, post emergence and survival plants in soil infested with *M. phaseolina, R. solani* and *F. oxysporum* under greenhouse conditions.....	**36**
d. Effect of some organic acids as seed soaking on plant height, fresh and dry weight of basil infested with *M.*	**39**

phaseolina, F. oxysporum and *R. solani* under greenhouse conditions.…..…

e. Effect of some salts as seed soaking on plant height, fresh and dry weight of basil infested with *M. phaseolina, F. oxysporum and R. solani* under greenhouse conditions..... **40**

f. Effect of some growth regulators as seed soaking on plant height, fresh and dry weight of basil infested with *M. phaseolina, F. oxysporum* and *R. solani* under greenhouse conditions..... **40**

5. Biological control..... **45**

a. Effect of two biocide as seed soaking on the incidence of root rot disease, plant height, fresh and dry weight of basil infected with *M. phaseolina F. oxysporum* and *R. solani* under greenhouse conditions..... **45**

6. Biochemical studies..... **45**

a. Phenolic compounds **44**

1. Effect of some chemical resistant inducers and two biocide products on phenol compounds of basil plants infested with *M. phaseolina* **44**
2. Effect of some chemical resistant inducers and two biocide products on phenol compounds of basil plants infested with *F. oxysporum*..... **45**
3. Effect of some chemical resistant inducers and two biocide products on phenol compounds of basil plants infested with *R. solani*..... **45**

b. Fractionation of phenolic compounds..... **49**

c. Enzymes activity..... **50**

1. Effect of some chemical resistant inducers and two biocide products on peroxidase activity of basil plants infested with *M. phaseolina, F. oxysporum* and *R. solani*..... **50**
2. Effect of some chemical resistant inducers and two biocide products on Polyphenoloxidase activity of basil plants infested with *M. phaseolina, F. oxysporum* and *R. solani*..... **50**
3. Effect of some chemical resistant inducers and two biocide products on chitinase/min activity of basil plants infested with *M. phaseolina, F. oxysporum* and *R. solani*..... **51**

7. Effect of basil seeds treatment with some inducers on proteins..... **54**
8. Field Experiments..... **55**
a. Effect of treatment of basil seeds with the best biotic and abiotic inducers on pre and post emergence damping off, some growth parameters and percentages of oil under field conditions..... **55**
b. Effect of some biocide and abiocide on percentages of main components of the essential oil..... **56**
DISCUSSION..... **64**
SUMMARY..... **75**
REFERENCES..... **83**
ARABIC SUMMARY.....

REVIEW OF LITERATURE

1. The disease occurrence and causal organism

Wick and Haviland (1992) mention that *F. oxysporum* f. sp. *basilici*, the causal organism of Fusarium wilt of basil causes sever losses in several crops of hydroponically grown basil (*Ocimum basilicum*).

Davis *et al.* (1993) reported that Fusarium wilt of basil causes sever losses in several fields of basil in California. *Fusarium oxysporum* Schlechtend sp. *basilici* was consistently recovered from stems of affected plants.

Angelo *et al*. (1997) found that *Rhizoctonia solani* Kühn, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, *S. minor* Jagger, and *Microdochium tabacinum* (Van Beyma) Arx were the causal agents of basal rots of basil. *R. solani* attacks most frequently, affecting plants at all growth stages. The organism is particularly serious on young plants, causing damping-off. *R. solani* rapidly colonizes the basal parts of the stem, *S. sclerotiorum* and *S. minor* are less frequently which cause of basil stem rot.

Hilal *et al.* (1998) recorded that Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* Schlechtend f. sp. *basilici on basil* for the first time in Egypt. Disease incidence was ranged between 21-40% in survey trials performed during four seasons in Giza, Fayoum, Beni-Sueif and Minia governorates.

Chiocchetti *et al*. (1999) recorded in Russia that wilt and crown rot of sweet basil caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici*, represents a major problem on this crop.

Chiocchetti *et al*. (2001) isolated *F. oxysporum*, *F. redolens*, *F. tabacinum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. minor*, and *Pythium ultimum* from diseased basil seedlings in Albenga.

Swart *et al.* (2003) recorded *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici* causing wilt and crown rot of sweet basil plants in the Western Cape province of South Africa, for the first time.

Reis *et al.* (2007) indicated that the causal organism of wilt, stem blight and collar root rot disease of sweet basil was the fungus *F. oxysporum* f. sp. *basilici* .

2. Chemical resistant inducers

Dubravera *et al*. (1982) reported that the induced resistance is accomplished by the inoculation of plant with a virulent or non-pathogenic isolates prior to or concomitant with a challenge inoculation with a pathogen. That is called biotic inducers, while chemical inducers include natural or systemic chemicals *i.e*. salicylic acid, phosphate and benzoic acid.

Kuc (1982) recorded that induced systemic resistance is the phenomenon by which the plant can utilize its specific mechanism to increase the level of resistance without any changes in plant genome.

Shahda (2002) reported that six antioxidants were tested for their effect on *Fusarium oxysporum* Schlect. emend.Snyd & Hans, *F. solani* (Mart.) Sacc. and *Rhizoctonia solani* Khun. Benzoic acid, salicylic acid, and ascorbic acid significantly reduced the linear growth of the three fungi and spore germination of *Fusarium* spp. at