جامعة الموصل
كلية العلوم

عزل وتشخيص بعض فطريات أشجار الحمضيات وتشخيص فطر *Phytophthora infestans* جزيئياً

مها محمد طه حسن النعيمي

أطروحة دكتوراه
علوم الحياة / علم نبات

بإشراف

الأستاذ المساعد الدكتورة
فاتن نوري عبد ملا عبد

1442هـ
2021م

الخلاصة

تم عزل وتشخيص 10 أجناس فطرية من ترب أشجار الحمضيات (البرتقال والليمون والنارنج)، في الموسمين الشتوي والصيفي في مدينة الموصل، كان تردد الفطريات في الموسم الشتوي هو الأعلى وتحديدا في ترب أشجار الليمون بتردد 26% ثم ترب أشجار النارنج بتردد 21% أما ترب أشجار البرتقال فكانت نسبة التردد فيها 15.7 %، أما الموسم الصيفي فكانت أعلى نسبة تردد 15% في ترب أشجار النارنج يليها 10.5 % في ترب أشجار الليمون والبرتقال، وكان أكثر الأجناس الفطرية تواجدا في ترب أشجار الحمضيات هو الفطر *Aspergillus* بتردد 57% في الموسم الشتوي و56 % في الموسم الصيفي، ثم يأتي الفطر *Penicillium* بنسبة تردد 36 % في الموسم الصيفي والفطر *Fusarium* في الموسم الشتوي بنسبة تردد 25 %، أما بقية الأجناس الفطرية فقد تم عزلها بنسبة تردد أقل من الفطريات المذكورة أعلاه، وأوضحت النتائج أن هناك تبايناً وتغايراً للعدد الكلي لوحدة تكوين المستعمرة CFU للفطر *Aspergillus* في معظم عينات ترب أشجار الحمضيات وتكرار نسبة تردده في الموسمين الشتوي والصيفي لهذه العينات، وأيضاً بالنسبة للفطريات *Fusarium* و*Penicillium* و*Cladosporium* و*Trichoderma* وكان العدد الكلي لوحدة تكوين المستعمرة CFU لها أقل من الفطر *Aspergillus*، ولكن بنسبة أكبر من الفطريات الأُخرى التي سجلت ترددا في نوع واحد من الترب لهذه الأشجار مثل *Mucor* و*Diplodia* و*Ulocladium*، وكانت أعلى نسبة مئوية للعدد الكلي لوحدة تكوين المستعمرة (CFU) هي للفطر *Aspergillus* spp. وسجل نسبة 23% من أشجار البرتقال في الموسم الشتوي و28 % من أشجار النارنج في الموسم الصيفي، في حين كانت أقل نسبة مئوية للعدد الكلي CFU للفطر *Geotrichum candidum* والفطر *Ulocladium* spp. وبلغت 2.6% و2.1% لكل منهما على التوالي في الموسم الشتوي، أما الموسم الصيفي كانت أقل نسبة مئوية للعدد الكلي CFU للفطرين *Alternaria alternata* و*Ulocladium*. وبلغت 3.8 % و2.6% على التوالي.

أوضحت نتائج دراسة خصائص التربة أن أعلى نسبة للرطوبة كانت في تربة أشجار النارنج بلغت 94 %، تبعها في تربة أشجار الليمون 88%، بينما في تربة أشجار البرتقال بلغت 86%،وإن قيمة الأس الهيدروجيني(pH) للعينات كانت7.33 و7.40 و7.68 لكلٍ من ترب أشجار البرتقال والنارنج والليمون على التوالي، وكانت أعلى قيمة للتوصيلية الكهربائية للتربة (EC) في تربة أشجار النارنج بلغت 0.38 ملي مول / سم وكانت قيمتها 0.26 و0.25 ملي مول / سم لكل من تربة أشجار الليمون والبرتقال على التوالي.

عزلت وشخصت فطريات *Phytophthora infestans* و*Fusarium solani* و*Rhizoctonia solani* و*Aspergillus niger* من قطع اللحاء والجذور الليفية لأشجار البرتقال والليمون التي ظهرت عليها أعراض الإصابة بمرض التصمغ (عفن القدم) ومرض عفن الجذور، عزل الفطر *Phytophthora infestans* من لحاء أشجار البرتقال بنسبة تردد 65 % ومن جذور أشجار

الليمون بنسبة تردد 86% يليه الفطر *Fusarium solani* بتردد مقداره 80% من لحاء أشجار الليمون و22% من لحاء أشجار البرتقال و13 % و50 % من جذور أشجار البرتقال والليمون على التوالي.

وأظهرت نتائج اختبار القدرة الإمراضية للفطر الممرض *Phytophthora infestans* في المختبر باستخدام الأغصان والأوراق المأخوذة من الشتلات السليمة للحمضيات أن الفطر قد تسبب في إصابة الأغصان بمرض التصمغ وكانت نسبة الإصابة 75% و58.3 % للأغصان المعزولة من الليمون والبرتقال على التوالي، وان النسبة المئوية لإصابة الأوراق بمرض التبقع البني 100% و90 % لأوراق أشجار الليمون والبرتقال على التوالي.

عند دراسة كفاءة الفطر *Trichoderma harzianum* مختبريا كمقاوم حيوي أظهر تضادية عالية ضد الفطريات الممرضة المعزولة من أشجار الحمضيات وبلغت درجة التضاد 1، وأظهرت عزلات البكتريا *Bacillus subtilis* قدرة وكفاءة تضادية عالية ضد الفطريات الممرضة والمعزولة من أشجار الحمضيات وحققت أعلى نسبة تثبيط للنمو ضد الفطر الممرض *Phytophthora infestans* وبلغت 83 %، وأظهرت النتائج أن استخدام عامل المكافحة الحيوية *T. harzianum* مختبريا له تأثير واضح وأدى إلى تقليل الإصابة بمرض التصمغ للأغصان ومرض التبقع البني للأوراق، إذ بلغت أعلى نسبة لإصابة الأغصان المعاملة بلقاح الفطر المقاوم *T.harzianum* 25 % و16.6 % لكل من الأغصان المعزولة من أشجار الليمون والبرتقال على التوالي، في حين بلغت نسبة الإصابة بمرض التبقع البني على الأوراق 10 % لكل من أوراق الليمون والبرتقال.

تم تأكيد تشخيص عزلتي الفطر *Phytophthora infestans* (المعزولتان من لحاء أشجار البرتقال ومن جذور أشجار الليمون) باستخدام تقنية الـ PCR وبالاعتماد على زوج البوادئ (Primers) [البادئ ITS1 والبادئ ,ITS4] إذ أظهرت النتائج بعد إجراء الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز بتركيز 2 %إن الحزم الناتجة لكلا العزلتين كانت بحجم 650 زوج من القواعد.

نتائج دراسة تتابع تسلسل القواعد النتروجينية في شريط الحامض النووي DNA كشفت عن وجود 6 مواقع للتباين أو التغاير الوراثي في تسلسل النيوكليوتيدات لكلا العزلتين مقارنة مع الجين الأصلي في موقع NCBI، العزلتان كانتا غير متطابقتين مع بعض ونسبة تطابقهما مع العزلات الأُخرى في موقع NCBI بلغت 99% وهذا يعني أن نسبة التغاير أو التباين الوراثي لكل عينة هي 1% مقارنة مع الجين الأصلي للفطر *P.infestans*.

Abstract

Ten fungal genera were isolated and diagnosed from soils of citrus trees (orange, lemon, and bitter orange). During the winter and summer seasons in Mosul city, the frequency of fungi in general during the winter season was highest, specifically in soils of lemon trees with a frequency of 26%, followed by soils of bitter orange at a frequency of 21%. In the soils of orange trees, the frequency rate was 15.7%, but during the summer season, the highest frequency was 15% in the soils of bitter orange trees, followed by 10.5% in each of the soils of lemon and orange trees. The most common fungal species present in soils of citrus trees was the *Aspergillus* with a frequency of 57% during the winter season and 56% during the summer season, followed by *Penicillium*, at a frequency of 36% during the summer season, and *Fusarium* during the winter season and at a frequency of 25%, while the rest of the fungal genera were isolated with a lower frequency than the above-mentioned fungi, and the results are clear. There is variation in the total number of CFU colony forming unit for *Aspergillus* in most samples of citrus tree soil and the frequency of its frequency during the winter and summer seasons for these samples, as well as for *Fusarium, Penicilium* and *Trichoderma*. The other fungi that recorded frequency in one type of soil for these trees, such as *Mucor, Diplodia*, and *Ulocladium*, with the highest percentage of total number of formation unit The CFU colony is for *Aspergillus* sp., and it recorded 23% of orange trees during the winter season and 28% of bitter orange during the summer season, while the lowest percentage of the CFU total number of colony forming unit was for *Geotrichum candidum* and *Ulocladium* spp., 2.6% and 2.1% each. During the winter season, the lowest percentage of the total number of colony forming units was for the fungi *Alternria alternata* and *Ulocldium* spp. during the summer season. It was 3.8% and 2.6%, respectively.

A study of soil characteristics the highest percentage of moisture was found in the soil of sour orange trees, wich reached 94%, followed by the soil of lemon

trees 88%, while the soil of orange trees 86%. The pH value of the samples was 7.33,

121, 7.40 and 7.68 for orange, bitter orange and lemon tree soils respectively, and the highest electrical conductivity value (EC) of bitter orange soil was 0.38 mmol / cm and its value was 0.26 and 0.25 mmol / cm each of the soil of lemon and orange trees, respectively.

Phytophthora infestans, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, and *Aspergillus niger* were isolated and diagnosed from cutting the bark and fibrous roots of orange and lemon trees showing symptoms of gum disease (foot rot) and root rot disease. *Phytophthora infestans* was isolated from the bark of orange trees at 65%. The roots of lemon trees with a frequency of 86%, followed by the *Fusarium solani* with a frequency of 80% of the bark of lemon trees, 22% of the bark of orange trees, and 13% and 50% of the roots of orange and lemon trees, respectively.

The results of the test results of the pathogenic *Phytophthora infestans* in the laboratory using twigs and leaves taken from healthy citrus seedlings showed that the fungus may cause gum disease in twigs, and the infection rate was 75% and 58.3% for the isolated branches of lemon and orange, respectively, and that the percentage of leaves infected with disease Brown spot 100% and 90% for lemon and orange leaves, respectively.

When studying the efficacy of *Trichoderma harzianum* in vitro as a biological resistance, it showed high antagonism against pathogenic fungi isolated from citrus trees, reaching the degree of antagonism 1, and *Bacillus subtilis* isolates showed high antibacterial ability and efficiency against pathogenic fungi isolated from citrus trees and achieved the highest growth inhibition against the pathogenic *Phytophthora infestans* The amount of 83%, and the results showed that the use of biological control agent *T. harzianum*, in the laboratory, had a clear effect and led to a reduction in the disease gum disease of branches and brown leaf spot disease, as the highest percentage of

branches infection treated with *T.harzianum* was 25% and 16.6% for each of the isolated branches 122 of lemon and orange trees, respectively, while it reached The incidence of brown spot disease on leaves is 10% for each of lemon and orange leaves.

The diagnosis of the two isolates of *Phytophthora infestans* (isolated from the bark of orange trees and the roots of lemon trees) was confirmed using the PCR technique and based on the primers pair) [the initiator ITS1 and the initiator ITS4], as the results were shown after the electrophoresis procedure on the agarose gel at a concentration of 2%. The resulting beams for both isolations were about 650 base pairs.

The results of a study that sequences the sequence of nitrogenous bases in a DNA strand revealed the presence of 6 sites of genetic variation or heterogeneity in the nucleotide sequence of both isolates compared to the original gene at the NCBI site, the two isolates were not identical with some and their match rate with other isolates in the NCBI site was 99%. This means that the percentage of genetic variation for each sample is 1% compared to the original gene of *P.infestans*.

University of Mosul

College of Science

Isolation and Identification of Some Citrus Fungi with Molecular Identification of *Phytophthora infestans*

Maha Mohammed Taha Hassan Al-Noaimy

Ph.D. Thesis

Biology /Botany

Supervised By

Prof. Assist.

Dr. Faten Noori Abed Mula Abed

1442 A.H. **2021 A.D.**