جامعة الموصل

كلية الزراعة والغابات

التشخيص الجزيئي لفايتوبلازما Candidatus لمحصول الطماطة وبعض الادغال في محافظة نينوى

ليث قيس يونس الصواف

رسالة ماجستير

وقاية النبات

إشراف

الدكتور حميد حمود علي الكنو

استاذ مساعد

1444 هـ

2022 م

الخلاصة

تبين من خلال نتائج المسح الحقلي وجود اعراض الاصابة بالفايتوبلازما بصورة متكررة في بعض حقول محافظة نينوى وتباينت تلك الاعراض ودرجة وضوحها، وعموما تميزت بتلون الفروع الحديثة وقمم النبات باللون الأحمر والبنفسجي وتشوه انصال الأوراق واختزال حجمها كذلك تلون الأوراق السفلى باللون الأصفر وكانت ذو ملمس الجلدي سهلة الكسر، اما الازهار فتأخذ شكل الجرس الذي يلاحظ فيه التحام الأوراق الكاسية للزهرة طوليا وفي الغالب يفشل العقد فيها ولا تنتج ثماراً.

كما لوحظ انتشار للأدغال البرية في حقول الطماطة التي شملها المسح وهي عرف الديك *Amaranthus retroflexus*، الكسوب *Carthamus oxycanthus*، الرغيلة *Chenopodium murale*، المديد *Convolvolus arvensis*، الخباز *Malva sp.*، الرجلة (الحمكة) *Portulaca oleracea*، والقسم الأكبر من تلك الادغال لم تظهر عليها أية اعراض. ولقد اكدت نتائج التشخيص الجزيئي PCR بان الاعراض المذكورة آنفا على الطماطة مرتبطة مع وجود الإصابة بالفايتوبلازما، اذ تبينت من نتائج الاختبار للعينات الفردية المستهدفة من نبات الطماطة صنف جي سي إصابة 28عينة من اجمالي 60 وبلغت نسبة الإصابة الحقلية 16.8%بينما اظهرت نتائج الاختبار الجزيئي إصابة 16 عينة من نباتات الطماطة صنف نورا بالفايتوبلازما من مجموع 30 عينة مختبرة باختبار PCR ووصلت نسبة الإصابة الحقلية 4.8% اما نسبة الإصابة في كلا الصنفين فقد وصلت الى 21.6% في حقول الطماطة عموماً، اما النسبة المئوية للإصابة بالفايتوبلازما على الادغال المرافقة لمحصول الطماطة فوصلت مجتمعة 5.5% ولقد سجلت اعلى نسبة إصابة على دغل عرف الديك اذ بلغت نسبة الإصابة بالفايتوبلازما 33.3% (2 عينة مصابة من مجموع 6 عينات مختبرة باختبار PCR) . اظهر مقياس الكروماتوكرام (Chromatogram) في اختبار HPLC احتباساً للاوكسين IAA بزمن احتباس مقداره 2.708 دقيقة في العينات المصابة بينما وصل الى 2.642 دقيقة في العينات السليمة، واستمر بالزيادة في العينات المصابة الى أن وصل الى 4.670 دقيقة وهذا مؤشر لوجود مثل ذلك المركب وبكثرة في العينات المصابة مقارنة بالعينات السليمة التي توقف زمن الاحتباس فيها بالظهور عند الدقيقة 2.642.

تبين النتائج التي أجريت على أنواع الحامول التي تم جمعها من حقول الطماطة بان الحامول الموجود في حقول الطماطة يعود لنوع الحامول الحقلي *Cuscuta campostris* اذ يعد هذا النوع من الحامول من اهم الأنواع الاقتصادية التي تصيب العديد من المحاصيل.

واظهرت الدراسة بان الحامول كان له القدرة على نقل الفايتوبلازما من نباتات الطماطة المصابة (كنبات مانح) الى نباتات زهرة الونكا periwinkle (كنبات مستقبل)، اذ تكشفت الاعراض بعد 10 أيام وكانت في البداية بشكل اصفرار ثم تبعها تشوه والتفاف الأوراق وكذلك بتلات الازهار، اذ تم الكشف عن الفايتوبلازما في أجزاء مختلفة من نبات زهرة الونكا والتي تمثلت بالأوراق والاوعية الناقلة عن طريق اختبار الـPCR . تم استخلاص الحامض النووي الفايتوبلازمي بنجاح من اوراق نباتات الطماطة وكذلك نبات زهرة الونكا المصابة حيويا بها بطريقة الـ Spin columnاذ تم الحصول على كمية مناسبة من الحامض النووي تراوحت بين 438.6 – 2190.3 نانو غرام/ مايكرو ليتر، وبنقاوة وصلت 1.76–1.8 أظهرت نتائج اختبار تفاعل البوليمير المتسلسل المباشر PCR على الحامض النووي المعزول من عينات الطماطة المصابة على ناتج جزيئي بحدود1800 زوج قاعدة نتروجينية وذلك عند استخدام البوادئ العامة P1/P7، ونواتج الـ PCR هذه تم تحليلها في بنك الجينات العالمي NCBI وتم تسجيلها تحت رقم الانضمام Accession number (ON204171) واخذت العزلة الاسم PT1–LH22 (Phytoplasma Tomato 1 – Laith Hameed) وعند استخدام البادئات المتخصصة R16F2h/R16R2 في اختبار البوليميراز المتسلسل المتداخل Nested-PCR على العينات التي اجري عليها اختبار PCR العادي اذ تم الحصول حجم جزيئي بمقدار1200 زوج قاعدة نتروجينية وحللت نواتج الاختبار في بنك الجينات وادرجت تحت رقم انضمام Accession number (ON204172) واخذت اسم العزلة PT2–LH22 كشفت نتائج التسلسل والتحليل الوراثي أن العزلة المحلية من مدينة الموصل لها هوية تسلسلية بلغت < 99.2٪ مع *Candidatus* Phytoplasma trifolii 16Sr VI–A وهي تابعة الى مجموعة فرط النمو للبرسيم Clover proliferation (16Sr VI). الأهم من ذلك ، التسلسل الجيني لعزلة الموصل كان لها تطابق وراثي مشترك <98.9٪ تشابه مع اكثر من 20 نوعاً تابعاً للجنس *Candidatus*. لذلك قد تكون الفيتوبلازما المكتشفة يمكن أن تمثل نوعًا جديدًا من الـ Candidatus و هذا هو التقرير الأول عن مثل هذا النوع من الفيتوبلازما التي تصيب الطماطة في العراق، وقد يعزى عدم ظهور فيتوبلازما تتبع مجموعات أخرى مثل مجموعة الستولبور 16 SrXII ومجموعة اصفرار الأستر 16Srl وغيرها في العينات المدروسة إلى ضيق ومحدودية المنطقة الجغرافية التي أخذت منها العينات فقد كان الهدف فقط إثبات وجود الممرض في الموصل . و هذا هو التسجيل الأول للمرض في العراق.

Summary

Through the results of the field survey, it was found that there are frequent manifestations of phytoplasma infection in some fields in Nineveh Province. Fracture as for the flowers, they take the shape of a bell, in which it is noticed that the casing leaves of the flower are fused longitudinally, and the contract often fails in them and does not form fruits.

The spread weeds were also observed in tomato fields in the sampling areas, which included *Amaranthus retroflexus*, *Carthamus oxycanthus*, *Chenopodium murale*, *Convolvolus arvensis*, *Malva sp.*, *Portulaca oleracea*, and the bulk of those weeds did not appear or has symptoms, only the weeds *Amaranthus retroflexus* and *Chenopodium murale* the presence of symptoms stunting and yellowing.

The results of PCR test confirmed that the symptomatic on tomato plant are related to the presence of phytoplasma infection, the test results of the targeted individual samples of the tomato cultivar GC found 28 samples out of a total of 60 were infected, and the field infection rate was 16.8%, while the molecular test results showed that 16 were infected A sample of tomato plants cultivar Nora with phytoplasma out of a total of 30 samples tested by PCR test, and the field infection rate reached 4.8%. The infection rate in both varieties generally reached 21.6% in tomato fields in general. The percentage of phytoplasma infection on the weeds accompanying the tomato crop reached 5.5%. The highest infection rate was on cockerel's mane weed, while the percentage of infection with phytoplasma was 33.3% (2 infected samples out of the total of 6 samples tested by PCR).

The chromatogram in the HPLC test showed a retention of auxin IAA with a retention time of 2.708 minutes in the infected samples, while it reached 2.642 minutes in the healthy samples, and it continued to increase in the infected samples until it reached 4.670 minutes. This is an indication of the

presence of such a compound and its abundance in the infected samples compared to healthy samples, the retention time stopped appearing at 2.642 minutes.

The study showed that the dodder *Cuscuta campostris* had the ability to transfer phytoplasma from infected tomato plants (as a donor plant) to the periwinkle plants *Catharanthus roseus* (as a recipient plant). For phytoplasma in different parts of the periwinkle plants, which were represented by the leaves and vas deferens, by PCR testing using general primers to detect phytoplasma. Phytoplasmic DNA was successfully isolated from leaves of tomato plants as well as the bio-infected periwinkle plants by Spin column method. An appropriate amount of DNA was obtained, ranging from 438.6 - 2190.3 ng/µL, and with a purity of 1.76 - 1.8.

The results of the direct polymerase chain reaction (PCR) test on the DNA isolated from the infected tomato samples showed that a complete product with a molecular weight of 1.8 kb. was obtained when using the universal primers P1/P7, and these PCR was sequenced in the genebank (accession number ON204171) The isolate took the name PT1-LH21 (Phytoplasma Tomato 1 - Laith Hameed) and when using the specialized primers R16F2h/R16R2 in the Nested-PCR test on the template DNA that the normal PCR test was done, a product with a molecular weight of 1.2 kilobase was obtained. The test products were analyzed in the genebank and listed under the accession number (ON204172) and the isolate was named PT2-LH22.

Phylogenetic tree analysis classified PT2-LH22 as a strain of *Candidatus* Phytoplasma trifolii, locally isolated from Iraq/Mosul city, showed a sequence identity with a high percentage of genetic similarity of 99% with *Ca.* Phytoplasma trifolii 16Sr member VI-A Clover proliferation group (16Sr VI), with 27 isolates from around the world. This research is the first record this

type of phytoplasma in Mosul city and Iraq that infects the tomato crop and weeds.

University of Mosul

College of Agriculture and Forestry

MOLECULAR INDENTIFICATI OF PHYTOPLASMA CANDIDATUS IN TOMATO PLANT AND SOME WEEDS IN NINEVEH PROVINCE

Laith Qais Yuneis AL-Sawaf

M.Sc. Thesis in
Plant Prodection

Supervised by
Dr. Hameed Hamoud Ali AL-Kanow

Assist. Prof

2022 A.D. **1444 A.H.**