



Department : Agricultural Botany

Field of study : Plant Pathology

Scientific Degree : M.Sc.

Date of Conferment : Jan. 15 , 2020

Title of Thesis : **BIOLOGICAL AND MOLECULAR STUDIES ON PHYTOPLASMA AFFECTING SOME ORNAMENTAL PLANTS IN EGYPT.**

Name of Applicant : Shima Mohamed Ahmed Mohamed Gad

Supervision Committee:

- Dr. M. A. Awad : Prof. of Plant Pathology, Fac. of Agric., Menoufia Univ.

- Dr. A. A. Z. Kheder: Senior Researher of plant Pathology, Plant Pathology Research Institute, Agricultural Researc Centre

ABSTRACT:

Background: *Phytoplasmas known as mycoplasma-like organisms (MLOs) cause diseases in several commercial ornamental plants leads to serious economic losses all over the world. During 2017-2018, phytoplasma disease showing phyllody, yellowing, proliferation, virescence and little leaf symptoms were observed on gazania and other ornamental plants in Giza, Egypt.*

Methods: *Phytoplasma disease was detected and isolated from naturally infected gazania plants during surveys in flower nurseries and open filed in Giza governorate, it was transmitted from naturally infected Gazania to healthy periwinkle and other ornamental plants by dodder (*Cuscuta reflexa*), and insects (*Empoasca decipiens*). Diene's stain was used to detect and differentiate the phloem tissues of leaf sections from infected gazania and periwinkle plants. Transmission Electron Microscopy (TEM) observed the presence of phytoplasma in the sieve tubes and parenchyma cells of leaf midribs in infected plants. DNA extracted from symptomatic samples was used as a template in nested polymerase chain reaction (PCR) using universal primers pairs P1/P7 and R16F2n/R16R2. Sequencing and phylogenetic analysis were performed to identify the detected phytoplasma.*

Results: *Phytoplasma was transmitted successfully from naturally infected Gazania to healthy ornamental plants by dodder, and insect. Light microscopy (LM) and transmission electron microscopy (TEM) revealed that, phytoplasma-like bodies were detected inside phloem, sieve tubes and parenchyma cells of leaf midribs tissues in infected plants and ranging from 200 to 400nm in diameters. The 16srRNA gene from phytoplasma was amplified by nested-PCR assay and direct sequenced using specific primer pairs. Phylogenetic tree was calculated based on obtained sequences data.*

Conclusion: *The phytoplasma associated with Gazania exhibiting phyllody, yellowing, proliferation, virescence and little leaf symptoms was confirmed by the results of LM and TEM observations and Nested-PCR testing. Based on direct sequence date, phylogeny analysis, the associated phytoplasma was classified as related to 16SrII group.*

Key words: *Phytoplasma, Gazania, Light Microscopy, Electron microscopy, Nested-PCR.*

عنوان الرسالة: دراسات بيولوجية وجزيئية علي الفيتوبلازما التي تصيب بعض نباتات الزينة في مصر

اسم الباحث: شيماء محمد احمد محمد جاد

الدرجة العلمية: الماجستير في العلوم الزراعية

القسم العلمي: النبات الزراعي

تاريخ موافقة مجلس الكلية: ٢٠٢٠/١/١٥

لجنة الإشراف: أ.د/ محمد أحمد عوض أستاذ أمراض النبات المتفرغ، كلية الزراعة، جامعة المنوفية

أ.د/ احمد عبد العزيز زكريا خضر باحث اول، معهد بحوث امراض النبات، مركز البحوث الزراعيه، الجيزه

الملخص العربي

الخلفية: تعرف الفيتوبلازما باسم الكائنات الحية الشبيهة بالميكوبلازما (MLOs) تصيب العديد من نباتات الزينة التجارية ، مما يؤدي إلى خسائر اقتصادية خطيرة في جميع أنحاء العالم. خلال الفترة ٢٠١٦-٢٠١٨ ، لوحظ وجود الفيتوبلازما الذي يظهر اعراض وكانت تتمثل في اعراض تشبه الفيللودي والاصفرار واخضرار البتلات واعراض الورقة الصغيره علي نباتات الجزائريا ونباتات الزينة الأخرى في الجيزة ، مصر .

الطريقة: تم الكشف عن الفيتوبلازما وعزلها عن نباتات الجزائريا المصابة طبيعياً من مشاتل الزهور وبعض الاماكن المفتوحة في محافظة الجيزة ، مصر . ، وتم نقلها من جازانيا المصابة طبيعياً إلى نباتات الوينكا والجزائريا السليمه بواسطة الحامول (*Cuscuta reflexa*) والحشرات (*Empoasca decipiens*). تم استخدام صبغه داين (التي تصبغ اللحاء) لصبغ قطاعات يدويه في عنق الورقه للنباتات الجزائريا والوينكا . استخدم الميكروسكوب الالكتروني النافذ (TEM) للكشف عن وجود الفيتوبلازما في الأنابيب الغربالية وخلايا البرانشيما للعرق الوسطي في النباتات المصابة. تم استخدام الحمض النووي المستخلص من عينات التي تظهر عليها الاعراض كقالب في تفاعل البلمرة المتسلسل المتداخل (PCR) باستخدام أزواج البادئات العالمية P1 / P7 و R16F2n / R16R2. تقديم التسلسل النيوكليوتيدي الي بنك الجينات لتحديد الفيتوبلازما المكتشفه.

النتائج: تم نقل الفيتوبلازما بنجاح من نباتات الجزائريا المصابة طبيعياً إلى نباتات الزينة السليمه باستخدام الحامول والحشرات. وقد كشف الفحص بالميكروسكوب الضوئي (LM) والميكروسكوب الإلكتروني النافذ (TEM) أجسام شبيهة بالفيتوبلازما داخل اللحاء والأنابيب الغربالية وخلايا البرانشيما للعرق الوسطي في النباتات المصابة يتراوح من ٢٠٠ إلى ٤٠٠ نانومتر. تم تضخيم الجين ١٦ srRNA من الفيتوبلازما بواسطة تفاعل البلمره المتسلسل المتداخل والمباشرة باستخدام أزواج بادئات متخصصه. تم التعرف علي درجه القرابه الوراثيه علي حسب المعلومات التي تم الحصول عليها.

الخلاصة: إن الفيتوبلازما المرتبطة بظهور الاعراض علي نباتات الغازانيا التي تظهر الالتهابات مثل في اعراض تشبه الفيللودي والاصفرار واخضرار البتلات واعراض الورقه الصغيره، تم تأكيدها من خلال نتائج ملاحظتي LM و TEM و Nested-PCR واستناداً التسلسل النيوكليوتيدي ، صنفت الفيتوبلازما المصابة على أنها مرتبطة بمجموعة SrII. ١٦ الكلمات المفتاحية: الفيتوبلازما ، الجزائريا ،ميكروسكوب الضوئي ،الميكروسكوب الالكتروني ،تفاعل البلمره المتسلسل المتداخل