المملكة العربية السعودية
وزارة التعليم
جامعة الملك عبد العزيز

King Abdulaziz University
Faculty of Sciences
Biology Department

تأثير إستخدام الفطريات الداخلية المعزولة من النبات على تقليل سمية أوراق *Calotropis procera* (العشار)

إعداد:
دلال بنت سعد الحربي

بحث مقدم كجزء من متطلبات الحصول على درجة الماجستير في علوم الأحياء
(أحياء/أحياء دقيقة)

اشراف:
د.أزهار نجار

كلية العلوم
جامعة الملك عبد العزيز
جدة-المملكة العربية السعودية
202م-1441هـ

تأثير استخدام الفطريات الداخلية المعزولة من النبات على تقليل سمية أوراق *Calotropis procera*(العشار)

إعداد
دلال بنت سعد الحربي

المستخلص

العشار (*Calotropis procera*) هو نبات سام، وينتشر على نطاق واسع في مناطق المملكة العربية السعودية. وبالتحديد، أوراق العشار تظهر خصائص طبية تستخدم في الطب التقليدي لعلاج العديد من الأمراض والالتهابات. إضافة إلى ذلك، فإن أوراق العشار *C. procera* تحتوي على مركبات سامة تجعلها مادة غير آمنة. وبالتالي، الهدف من هذه الدراسة هو علاج مسحوق أوراق العشار*C. procera* المجففة من خلال العزل البيولوجي عن الفطريات الداخلية المعزولة من نبات العشار *C. procera* للحد من سمية الأوراق وتستخدم كعلاج آمن وبعض الاستخدامات الأخرى. تم أخذ ٢٠٠ ورقة نباتية من نبات العشار *C. procera*. تم تطهير السطح الخارجي للأوراق وتقطيعها إلى قطع صغيرة (٥ × ٥ مم). ثم تمت زراعتها على بيئة آجار البطاطس والدكستروز وحضنت عند درجة حرارة قدرها ٢٨ درجة مئوية لمدة ٧-١٤ يوما. تم التعرف على الفطريات بواسطة المظهر الخارجي والتعريف الجيني باستخدام (ITS rDNA)، وتم عزل ١٥٠ سلالة مصنفة إلى ١٢ نوعاً ينتمون إلى ٩ أجناس من الفطريات الداخلية المعزولة من العشار *C. procera* والتي تتضمن *Cladosporium* sp. و *Cochliobolus* sp. و *Curvularia* spp. و *Penicillium* spp. وكذالك نوع واحد من *Periconia*، *Pseudozyma*، *Quambalaria*، *Trichoderma* و *Wickerhamomyces*. وكانت أكثر الأنواع انتشارا هي *Cladosporium sphaerospermum*(CFU23)، *Penicillium chrysogenum* (CFU18) و *Curvularia hawaiiensis*(CFU16). تم اختيار ثلاث عزلات فطرية تشمل *Cochliobolus* sp. *C. sphaerospermum* و *C. lunata* لإختبار قدرتها على الحد من سمية مسحوق أوراق العشار *C. procera* المجففة . أشارت النتائج بأن استخدام ٢ جرام من مسحوق الأوراق المجففة يؤدي إلى زيادة النمو الفطري لهذه الفطريات المختارة أكثر من استخدام ١و٣جرام في بيئة البطاطس والدكستروز السائلة عند درجة حرارة ٢٨ درجة مئوية لمدة ٤ أسابيع من التحضين. وكانت هذه العزلات الفطرية قادرة على استخدام مسحوق أوراق العشار *C. procera*المجففة كمصدر للكربون. تم اختبار قدرتهم على تقليل سمية مسحوق أوراق العشار*C. procera* المجففة باستخدام ألواح الفصل الكروماتوغرافي (TLC). كان *C. sphaerospermum* له قدرة على تقليل سم الكلاكتين (Calactin) الموجود في أوراق العشار *C. procera*المجففة من بين الفطريات الثلاثة المختارة. كما تم إضافة المعلق الجرثومي لفطر *C. sphaerospermum* إلى نبات العشار*C. procera* في بيئته الطبيعية. هذه الدراسة أثبتت التأثير الإيجابي لـفطر *C. sphaerospermum* على تحسين نمو النبات وتقليل نمو الميكروبات الأخرى في التربة. علاوة على ذلك، أثر نشاط سمية مسحوق أوراق العشار *C. procera* المجففة المعالجه بواسطة *C. sphaerospermum* على دودة الأرض (*Lumbricus Rubellus*)، والتي اشارت إلى حيوية ديدان الأرض بنسبة كبيرة (١٠٠٪) ($p < ٠,٠٠٥$) مقارنةً مع معدل وفاة الديدان (١٠٠٪) المعرضة لمسحوق أوراق العشار*C. procera* المجففة الغير معالجة، لم تظهر أي تأثير سمي على الديدان المعرضة لمسحوق فطر*C. Sphaerospermum* المجفف. في الختام، يعد استخدام *C. sphaerospermum* المعزول من النبات من التطبيقات الواعدة للتخلص من سمية أوراق النبات واستخدامها بأمان.

ii

Effect of Using Endophytic Fungi in Reduction of *Calotropis procera* (Ushar) Leaves Toxicity

By:
Dalal Saad Alharbi

A thesis submitted for the partial requirements of the degree of Master of Science (Biology/Microbiology)

Supervised by:
Dr. Azhar Najjar

Faculty of Science
King Abdulaziz University
Jeddah- Saudi Arabia
1441-2020

Effect of Using Endophytic Fungi in Reduction of *Calotropis procera* (Ushar) Leaves Toxicity

By
Dalal Saad Alharbi

Abstract

Calotropis procera (Ushar) is a toxic plant, widely spreading in Saudi Arabia regions. In particular, the leaves of *C. procera* show potential as a traditional medicine effects to treat several diseases and infections. However, the leaves have toxic compounds make it unsafe material. Hence, the objective of this study was to treat *C. procera* dried leaves powder by bioprospecting for fungal endophytes to reduce the leaves toxicity to be a safe medicine and for other applications. Two hundred plant leaves were taken from different parts of *C. procera* branches. Leaves surfaces were disinfected and cut into small segments (5x5 mm). Then cultured on potato dextrose agar and incubated at 28°C for 7-14 days. The mycological analysis was confirmed by sequencing the ITS region of the rDNA gene which resulted in the isolation of 150 strains classified into 12 species belonging to 9 genera of endophytic fungi including *Cladosporium* sp., *Cochliobolus* sp., *Curvularia* spp., *Penicillium* spp., and one species for *Periconia, Pseudozyma, Quambalaria, Trichoderma* and *Wickerhamomyces*. The most prevalence species were *Cladosporium sphaerospermum* (23 CFU), *Penicillium chrysogenum* (18 CFU) and *Curvularia hawaiiensis* (16CFU). Three selected fungal isolates including *C. sphaerospermum, Cochliobolus* sp. and *C. lunata* were used for reduction of *C. procera* dried leaves powder toxicity. Fungal sporulation for these selected fungi were increased in the presence of 2 g more than 1 and 3 g of dried leaves powder in PDB media at 28°C within 4 weeks incubation. These fungal isolates were able to utilize *C. procera* dried leaves powder as a carbon source. Also, *C. sphaerospermum, Cochliobolus* sp. and *C. lunata* were tested for their ability to reduce *C. procera* dried leaves powder toxicity by using Thin Layer Chromatography (TLC) analysis. Among the three selected fungi, *C. sphaerospermum* only had the ability to reduce Calactin toxin presented in *C. procera* dried leaves powder. *In vivo,* Ushar plant inoculation by *C. sphaerospermum* suspension study represented an evidence for the positive impact of *C. sphaerospermum,* as endophytic fungal isolate on *C. procera* host plant by improving plant growth and suppressing microbial growth in the surrounding habitat. Furthermore, the toxic activity of dried leaves powder treated by *C. sphaerospermum* on adults *Lumbricus rubellus*, showed significantly ($p<0.05$) survival worms (100%) compared to negative control which had significantly ($p<0.05$) mortality worms (100%), these results were comparable with *C. sphaerospermum* powder mycelium showing no signs of toxicity. In conclusion, it is promising to use *C. sphaerospermum* fungal endophytes as treatment to eliminate plant leaves toxicity and used the product safely.