STUDIES ON CORN STUNT *SPIROPLASMA* IN EGYPT

By

SAWSAN MASSOUD SAIED

B.Sc. Agric. Sci. (Plant Pathology), Fac. Agric., Ain Shams Univ., Egypt, 1996.
M.Sc. Agric. Sci. (Plant Pathology), Fac. Agric., Ain Shams Univ., Egypt, 2002.

THESIS

Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

DOCTOR OF PHILOSOPHY

In

Agricultural Sciences

(Plant Pathology)

Department of Plant Pathology
Faculty of Agriculture
Cairo University
EGYPT

2008

APPROVAL SHEET

STUDIES ON CORN STUNT *SPIROPLASMA* IN EGYPT

Ph.D. Thesis

By

SAWSAN MASSOUD SAIED

B.Sc. Agric. Sci. (Plant Pathology), Fac. Agric., Ain Shams Univ., Egypt, 1996.
M.Sc. Agric. Sci. (Plant Pathology), Fac. Agric., Ain Shams Univ., Egypt, 2002.

Approved by:

Dr. GABER IBRAHIM FEGLA.....
Professor of Plant Pathology, Fac. Agric., Alexandria University.

Dr. IBRAHIM ABD ELMONEIM MOHAMED .....
Professor of Plant Pathology, Fac. Agric., Cairo University.

Dr. MAURICE SABRY MIKHAIL.....
Professor of Plant Pathology, Fac. Agric., Cairo University.

Dr. OM-HASHEM M. EL-BANNA.....
Professor of Plant Pathology, Fac. Agric., Cairo University.

Date: / /

SUPERVISION SHEET

STUDIES ON CORN STUNT *SPIROPLASMA* IN EGYPT

Ph.D. Thesis

By

SAWSAN MASSOUD SAIED

B.Sc. Agric. Sci. (Plant Pathology), Fac. Agric., Ain Shams Univ., Egypt, 1996
M.Sc. Agric. Sci. (Plant Pathology), Fac. Agric., Ain Shams Univ., Egypt, 2002

SUPERVISION COMMITTEE

Dr. MAURICE SABRY MIKHAIL
Professor of Plant Pathology, Fac. Agric., Cairo University.

Dr. OM-HASHEM M. EL-BANNA
Professor of Plant Pathology, Fac. Agric., Cairo University.

Dr. Aboul-Ata E. Aboul-Ata
Head Researcher of Virology, Virus and Phytoplasma Research Department, Plant Pathology Research Institute, ARC.

Name of Candidate: Sawsan Massoud Saied **Degree:** Ph.D.
Title of Thesis: Studies On Corn Stunt *Spiroplasma* In Egypt
Supervisors: Prof. Dr. Maurice Sabry Mikhail, Prof. Dr. Om-Hashem M. El-Banna and Dr. Aboul-Ata E. Aboul-Ata
Department: Plant Pathology **Approval:** / /

ABSTRACT

Spiroplasma kunkelii was isolated from leaves and grains of naturally infected corn (Zea mays L.) plants, cv. Cairo 1, showing typical symptoms of corn stunt disease during growing seasons 2003 and 2004. Examination of the liquid cultures on C-3G medium by phase contrast and dark-field light microscope revealed that *S. kunkelii* is a helical, motile, and unicellular. The isolated *Spiroplasma* formed the fried-egg shape colonies on the solid medium. Growth of *Spiroplasma* in liquid culture was measured by colony-forming units (CFU).

The pathogenicity of the isolated *Spiroplasma* was tested by two different methods on healthy corn seedlings cv. Cairo1. First, seedling injection by *Spiroplasma* culture. Second, infiltration of *Spiroplasma* under vacuum. Then, corn stunt disease symptoms appeared. *Spiroplasma* was detected inside the phloem by Diene's stain and by transmission electron microscope inside thin sections of the phloem tissues of the roots. Also, *Spiroplasma* culture was inspected by negative staining.

Advanced methods for *S. kunkelii* detection were applied: ELISA test was used for detection using the already prepared polyclonal antibodies. DBIA and TBIA were also adopted for detection of *S. kunkelii* in different parts of infected corn plants. TBIA was more sensitive than DBIA in detection. DBIA and TBIA tests emphasized that *S. kunkelii* was transmited by grains which were optaind from infected corn plants. Thes tests were used to declare that *S. kunkelii* was able to infect different corn hybrids and varieties and transmitted by their grains.

Spiralin was extracted and analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophroses in different infected corn plants and *S. kunkelii* liquid cultures. Total nucleic acid was extracted from both healthy and infected plants and from the isolated *S. kunkelii* and used as template for amplification of certain region of spiralin gene using the primer pair : CSSF2 and CSSR6. Dot blot hybridization technique was also used for detection of a unique region of spiralin gene in infected corn plants and in cultured *S. kunkelii* using dig-labeled probe specific to *S. kunkelii* DNA. Antiserum of *S. kunkelii* was producted by injection *S. kunkelii* into young female New Zealand white rabbit and checked by *Spiroplasma* deformation test and the titer was 1: 2560 .

Key words: *S. kunkelii*, Corn stunt, ELISA, DBIA, TBIA, SDS-PAGE, PCR, Dot blot hybridization and Antiserum production.

DEDICATION

I dedicate this work to whom my heart felt thanks; to my husband ***Emeel*** *and my daughter* ***Maria*** *for their patience and help, as well as to my parents, brothers and mother in law for all the support they lovely offered along the period of my post graduation.*

ACKNOWLEDGEMENT

I wish to express my sincere thanks, deepest gratitude and appreciation to ***Prof. Dr. MAURICE S. MIKHAIL*** *Professor of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Cairo University for suggesting the problem, supervision, continued assistance and his guidance through the course of study and revision the manuscript of this thesis.*

Special thanks is due to ***Prof. Dr. OM-HASHEM M. EL-BANNA*** *Professor of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Cairo University for her supervision, continued assistance , guidance and general help during the course of this investigation and for her assistance in writing and preparing this thesis.*

Sincere thanks to ***Prof. Dr. Aboul-Ata E. Aboul-Ata****, Head Researcher of Virology, Virus and Phytoplasma Research Department, Plant Pathology Research Institute, ARC for sharing in supervision.*

Special thanks is extended to ***Dr.Azza Galal Farag****, Researcher of Plant Virology, Virus and Phytoplasma Research Department, Plant Pathology Research Institute, ARC for her valuable assistant in the molecular biology experiments.*

Finaly, Grateful appreciation is also extended to all staff members of Plant Virus and Phytoplasma Research Department, Plant Pathology Research Institute, ARC, for their fruitful assistance and making facilities available during this study.

دراسات على اسبيروبلازما تقزم الذرة فى مصر

رسالة دكتوراه الفلسفة
فيالعلوم الزراعية
(أمراض النبات)

مقدمة من

سوسن مسعود سعيد

بكالوريوس في العلوم الزراعية (أمراض النبات)- كلية الزراعة - جامعة عين شمس، ١٩٩٦
ماجستير في العلوم الزراعية (أمراض النبات)- كلية الزراعـــة - جامعة عين شمس ، ٢٠٠٢

لجنة الإشراف

الدكتور/ موريس صبرى ميخائيل
أستاذ أمراض النبات- كلية الزراعة - جامعة القاهرة

الدكتور/ أم هاشم محمد ابراهيم البنا
أستاذ أمراض النبات – كلية الزراعة - جامعة القاهرة

الدكتور/ أبو العطا النادى أبو العطا
رئيس بحوث أمراض النبات - قسم بحوث الفيروس والفيتوبلازما- معهد بحوث أمراض النبات- مركز البحوث الزراعية

دراسات على اسبيروبلازما تقزم الذرة فى مصر

رسالة دكتوراه الفلسفة
فيالعلوم الزراعية
(أمراض النبات)

مقدمة من

سوسن مسعود سعيد

بكالوريوس في العلوم الزراعية (أمراض النبات)- كلية الزراعة - جامعة عين شمس، ١٩٩٦
ماجستير في العلوم الزراعية (أمراض النبات)- كلية الزراعـــة - جامعة عين شمس ، ٢٠٠٢

لجنة إجازة الرسالة:

د. جابر أبراهيم فجلة..... ....
أستاذ أمراض النبات- كلية الزراعة – جامعة الأسكندرية

د.أبراهيم عبد المنعم محمد أبراهيم.....
أستاذ أمراض النبات- كلية الزراعة - جامعة القاهرة

د. موريس صبرى ميخائيل.....
أستاذ أمراض النبات- كلية الزراعة - جامعة القاهرة

د. أم هاشم محمد أبراهيم البنا.....
أستاذ أمراض النبات – كلية الزراعة - جامعة القاهرة

التاريخ: / /

دراسات على اسبيروبلازما تقزم الذرة فى مصر

رسالة مقدمة من

سوسن مسعود سعيد

بكالوريوس في العلوم الزراعية (أمراض النبات)- كلية الزراعة - جامعة عين شمس، ١٩٩٦
ماجستير في العلوم الزراعية (أمراض النبات)- كلية الزراعـــة - جامعة عين شمس ، ٢٠٠٢

للحصول على

درجة دكتوراه الفلسفة

في

العلوم الزراعية
(أمراض النبات)

قســـــم أمراض النبات
كليـــــة الزراعـــة
جـامعــة القــاهرة
مصـــــــر

٢٠٠٨

استمارة معلومات الرسائل التى تمت مناقشتها

الكلية / المعهد : **الزراعة** **القسم :** أمراض النبات

١ - **الدرجة العلمية :** ماجستير ☐ دكتوراه ■

٢ - بيانات الرسالة :

عنوان الرسالة باللغة العربية : دراسات على اسبيروبلازما تقزم الذرة فى مصر

عنوان الرسالة باللغة الأجنبية :
STUDIES ON CORN STUNT *SPIROPLASMA* IN EGYPT

التخصص الدقيق : فيروس وأسبيروبلازما
تاريخ المناقشة : ٢٠٠٨/١٢/٢٥

٣ - بيانات الطالب :

الاسم : سوسن مسعود سعيد الجنسية : مصرية النـوع : أنثى
العنوان : ٦ ح بهيج من ش الكنيسة الفرنساوى-عزبة النخل رقم التليفون :٢٤٩٣٩٨٢٢
جهة العمل : مركز البحوث الزراعية رقم الفاكس :
البريد الإلكترونى : Sawsan_sms@yahoo.com

٤ - المشرفون على الرسالة :

الاسم	القسم	الكلية	الجامعة
١ أ.د موريس صبرى ميخائيل	أمراض النبات	الزراعة	القاهرة
٢ أ.د أم هاشم محمد ابراهيم البنا	أمراض النبات	الزراعة	القاهرة
٣ أ.د أبو العطا النادى أبو العطا	معهد أمراض النبات- قسم بحوث الفيروس والفيتوبلازما- مركز البحوث الزراعية		

٥ - مستخلص الرسالة (Abstract)

٥ - ١ باللغة العربية : بشرط ألا يزيد عن ٧ أسطر

تم عزل *Spiroplasma kunkelii* من نباتات الذرة صنف القاهرة١التى عليها أعراض مرض تقزم الذرة وتنميتها على بيئة C-3G وتم اختبار المرضية للأسبيروبلازما المعزولة بطريقتين: أ- حقن بادرات بواسطة مزرعة من الأسبيروبلازما ب- بتسريب الاسبيروبلازما تحت تفريغ الهواء. تم الكشف عن الاسبيروبلازم بعدة طرق: ١- الميكروسكوب الضوئى ٢-ميكرسكوب الحقل المظلم ٣- صبغة دينيس ٤- الميكروسكوب الإلكتروني ٥- الطرق السيرولوجية ٦- عزل بروتين الاسبيرالين ٧ - طرق البيولوجيا الجزيئية. وقد تم انتاج اجسام مضادة للأسبيروبلازما.

(**الكلمات الدالة :** *Spiroplasma kunkelii*، تقذم الذرة، ELISA ،DBIA، TBIA ، SDS-PAGE، PCR،Dot blot hybridization و إنتاج أجسام مضادة.)

٥ ـ ٢ باللغة الأجنبية : بشرط ألا يزيد عن ٧ أسطر

Spiroplasma kunkelii was isolated from corn plants, cv. Cairo 1 showing typical symptoms of corn stunt disease and was cultured on C-3G medium. The pathogenicity of the isolated *Spiroplasma* was tested by two different methods: a. Seedling injection by *Spiroplasma* culture. b. Infiltration of *Spiroplasma* under vacuum. *S. kunkelii* was detected by several methods: 1- Phase contrast light microscope 2- Dark-field light microscope 3- Diene's stain 4- Electron microscope 5- Serological methods 6- Spiralin was isolated 7- Molecular biology methods. Antiserum of *S. kunkelii* was producted .

(Key Words : *S. kunkelii*, Corn stunt, ELISA, DBIA, TBIA, SDS-PAGE, PCR, Dot blot hybridization and Antiserum production**)**

٦ – **<u>أهم النتائج التطبيقية التى تم التوصل إليها</u>** :

(لا تزيد عن سطرين لكل منها)

٦ –١ يعتبر استخدام الميكروسكوب الضوئى وميكروسكوب الحقل المظلم من الطرق السريعة للكشف عن الإصابة بالاسبيروبلازما في العصارة و المزرعة و اللحاء بعد صبغة بالدينيس.

٦ – ٢ استخدام الطرق السيرولوجية في الكشف عن اسبيروبلازما تقزم الذرة مثل اختبار ELISA واختبار DBIA و TBIA ويعتبر الاختبار الأخير أكثرهم حساسية.

٦ – ٣ تم فحص ثماني أصناف وهجن ذرة مختلفة ووجد بهم إصابة بالمرض وهم ٦٤٩ ،٦١٣، ٦٠٢ ، هـ ث ٣١٠ ، هـ ف ١٠ ، ٦٢٨ ، جيزة ٦٣٨ و٦١٤

٦ – ٤ تم إنتاج أجسام مضادة لاسبيروبلازما تقزم الذرة يمكن استخدامها للكشف المبكر عن المرض.

٧ – ما هى الجهات التى يمكن أن تستفيد من هذا البحث :

(اذكر هذه الجهات مع شرح أهمية البحث لهذه الجهة بما لا يزيد عن أربعة سطور لكل جهة)

٧ – ١ الحجر الزراعي : لاختبار حبوب الذرة المستوردة للتأكد من خلوها من مرض تقزم الذرة.

٧ – ٢ مركز البحوث الزراعية: لاختبار حبوب الذرة للأصناف والهجن المختلفة المنتجة ومعرفة مدى مقاومتها للمرض.

٧ – ٣

٧ – ٤

٨ – هل توجد علاقة قائمة بإحدى هذا الجهات : **نعم** ■ **لا** ☐

فى حالة نعم اذكر هذه الجهات :

٨ – ١ الحجر الزراعي

٨ – ٢ مركز البحوث الزراعية

٨ – ٣

ما هى طبيعة العلاقة :

مشروع بحثى ☐

تعاون أكاديمى ☐

مشروع ممول من جهة ثالثة ☐ (اذكر ما هى :)

أخرى ■ (حيث إنني اعمل في مركز البحوث الزراعية بالجيزة– معهد أمراض النبات– قسم الفيروس والفيتوبلازما– معمل السيرولوجى– والمعمل لـه دور فـي الكشف عن الأمراض الفيروسية والفيتوبلازمية في عينات الحجر الزراعي).