GENETIC STUDIES ON ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES IN SUGARCANE

By

AMANY MOHAMED AHMED ABD EL-AZIM

B.Sc. Agric. Sci. (Biotechnology), Fac. Agric., Cairo Univ., 200٤

THESIS

Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

MASTER OF SCIENCE

In

Agricultural Sciences

(Genetics)

Department of Genetics
Faculty of Agriculture
Cairo University
EGYPT

2010

SUPERVISION SHEET

GENETIC STUDIES ON ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES IN SUGARCANE

M.Sc. Thesis
In
Agric. Sci. (Genetics)

By

AMANY MOHAMED AHMED ABD EL-AZIM
B.Sc. Agric. Sci. (Biotechnology), Fac. Agric., Cairo Univ., 200٤

SUPERVISION COMMITTEE

Dr. SAWSAN SAMY YOUSSEF
Professor of Genetics, Fac. Agric., Cairo University

Dr. MOHAMED EL-AWADY
Assistant Professor of Genetics, Fac. Agric., Cairo University

Dr. SANAA ABD EL-KADER MOHMED IBRAHIM
Senior Researcher of Plant Protection Research Institute, ARC

Name of Candidate: Amany Mohamed Ahmed **Degree:** M.Sc.
Title of Thesis: Genetic Studies on Entomopathogenic Nematodes In Sugarcane
Supervisors: Dr. Sawsan Samy Youssef
Dr. Mohamed El-Awady
Dr. Sanaa Abdel Kader
Department: Genetics **Approval:** 14 / 1/ 2010

ABSTRACT

The present investigation was conducted to study the susceptibility of five sugarcane cultivars namely GT54-9, G84-47, G99-103, G98-28 and Ph8013 to white grub (*Pentodon bispinosus*), the cultivars GT54-9 and G84-47 show more tolerance to the larvae feeding. The changes in protein and isozymes banding patterns under artificial infestation were investigated and found that there are an increasing in peroxidase band intensities and induction of some new bands. Also, in esterase some new bands appear and some bands disappear compared with control. In protein, there are changes in protein bands. However, there are no observable changes in protein bands in the two cultivars (GT54-9 and G84-47) which show more tolerance than other cultivars. The genetic polymorphism among the five sugarcane cultivars was determined using the RAPD analysis. Total of 76 scoreable bands were detected, 47 bands (61.8%) of them were polymorphic. RAPD specific markers for each cultivar were determined. Three specific RAPD markers characterize G99-103, G84-47 and G98-28 while GT54-9 and Ph8013 have four specific markers. Based on the dendrogram of the genetic similarities coefficient, the five examined cultivars are divided in two major groups the first includes one cultivar GT54-9. The second contains four sub groups, G98-28, Ph8013, G84-47 and G99-103. Four nematode species; two belong to the genus *Steinernema* (*Steinernema glaseri* and *Steinernema carpocapsae)*, and two belong to *Heterorahabditis sp. (Heterorahabditis bacteriophora* and *Heterorahabditis megidis)* were tested for their ability to kill the third larval instar of white grub (*Pentodon bispinosus*). The mortality percentage increased with increasing the nematode concentration. *S. glaseri* proved to be the most effective against the third larval instar of white grub, 90% mortality, followed by *H. bacteriophora* (83%) and *S. carpocapsae* (70%) while *H. megidis* recoreded 61%. Based on the data obtained, mortality percentage were higher when the soil surface was contaminated with nematode suspension.To test the effect of entomopathogenic nematode on larvae hemolymph, protein and esterase analyses were investigated. The nematode infection induced some new bands and on the other hand cause other bands to disappear. Also an increase in esterase activity at 48h post infection was observed. The genetic polymorphism between the entomopathogenic nematodes species used, was resolved by RAPD analysis.

Key words: Insect parasitic nematode, sugarcane, whitegrub, RAPD.

DEDICATION

I dedicate this work to whom my heart felt thanks: to my father, mother, sister and brothers for all the support and encouragement they continually offered along the period of my post graduation.

ACKNOWLEDGEMENTS

At first, I would like to thank ***ALLAH*** *that allowing me to achieve this work, without his bless any great effort is invaluable.*

I wish to express my deep gratitude to ***Dr. Sawsan S. Youssef****, Professor of Genetics, Faculty of Agriculture, Cairo University, for suggesting the problem, supervision, continued assistance, guidance, great interest, encouragement, following the progress of the work with great interest and continuous criticism through the course of study. I would like also to express my deep appreciations and utmost gratitude to* ***Dr. Sanna Abdel kader****, Senior Researcher of Plant Protection Research Institute, Agricultural Research Center, Ministry of Agriculture, for her supervision of this investigation, unlimited help and valuable guidance throughout the achievement of this study.*

My special and deep thanks to ***Dr. Reda Moghaeib****, Assistant Professor of Genetics, Faculty of Agriculture, Cairo University, for his valuable help, and encouragement during this work. Sincere thanks are due to* ***Dr. Ahmed EL-Sharkawy*** *Professor of Genetics, Faculty of Agriculture, Cairo University, and* ***Dr. Mohamed El-Awady*** *lecturer of genetics, Faculty of Agriculture, Cairo University for their generous help. Many thanks are due to all the members of the Genetic Engineering Research Center, Faculty of Agriculture, Cairo University and all the members of the Plant Protection Research Institute, Department of Field Crop Pests for their continuous help, facilities and moral support.*

استمارة معلومات الرسائل التى تمت مناقشتها

الكلية / المعهد : **الزراعة** **القسم :** الوراثة

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

٢ - بيانات الرسالة :

عنوان الرسالة باللغة العربية :

درسات وراثية علي النيماتودا الممرضةلافات قصب السكر

عنوان الرسالة باللغة الأجنبية :

Genetic studies on entomopathogenic nematodes in sugarcane

تاريخ المناقشة : ١٤-١-٢٠١٠

٣ - بيانات الطالب :

الاسم :اماني محمد احمد عبد العظيم الجنسية : مصريه النـوع : أنثي

العنـوان : ٩ شـارع مـدحت محمـد عـزت فيصـل الـدور السـادس شـقة١٧ رقـم التليفـون :٠١٠٧٨٢٨٣٣٦

جهة العمل :معهد بحوث وقاية النباتات - مركز البحوث الزراعية

البريد الإلكترونى :monaliza83_monaliza@yahoo.com

٤ - المشرفون على الرسالة :

الاسم	القسم	الكلية	الجامعة
١- أ.د/ سوسن سامي يوسف	الوراثه	الزراعه	القاهره
٢- د/ محمد عبد الحميد العوضي	الوراثه	الزراعه	القاهره
٣- د/ سناء عبد القادر محمد	معهد بحوث وقاية النباتات – مركز البحوث الزراعية- الجيزة		

٥ - مستخلص الرسالة (Abstract)

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

تهدف هذه الدراسة إلي تقييم خمسة أصناف من قصب السكر لتحمل الإصابة بيرقات حشرة . تم دراسة التغير في أنماط شرائط البروتين والمشابهات الإنزيمية للنباتات المقارنة والنباتات السليمة. تم اختبار النيماتودا الممرضة للحشرات من جنسي .*Steinernema* and *Heterorhabditis* sp) من حيث قدرتها علي قتل يرقات. و تم أيضاً دراسة الاختلاف في أنماط شرائط البروتين والمشابهات الإنزيمية للهيموملف لحشرة الجعال بعد إجراء عدوي لها. تم دراسة التباينات الوراثية بين أنواع النيماتودا الأربعة المستخدمة كما تم تحديد الواسمات الجزيئية المحددة لكل نوع . تم اختبار أربعة طرق مختلفة لتحديد تأثير أربعة أنواع من النيماتودا علي العمر اليرقي الثالث لحشرة. وبالإضافة لذلك تم أيضاً تحديد التركيز الفعال من النيماتودا ضد يرقات العمر الثالث للحشرة

الكلمات المفتاحية: النيماتودا الممرضة للحشرات- الجعال- RAPD marker- قصب السكر.

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

(Key Words :– Insect parasitic nematode, sugarcane, whitegrub, RAPD.

The present investigation was conducted to study the susceptibility of five sugarcane cultivars to white grub, two cultivars show more tolerance to the larvae feeding. The changes in protein and isozymes banding patterns under artificial infestation were investigated. Nematode species; genus *Steinernema* and *Heterorahabditis* were tested for their ability to kill the white grub. The effect of nematode on larvae hemolymph, protein and esterase analyses were investigated. The genetic polymorphism between the nematodes species was determined using the RAPD analysis.

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

(لا تزيد عن سطرين لكل منها)

٦-١ عمل تجربه لتقييم تحمل خمسة أصناف من قصب السكر للإصابة بيرقات الجعال.

وقد أوضحت النتائج المتحصل عليها بعد اجراء عدوي صناعية بيرقات الجعال ان هناك صنفين اكثر تحملا للإصابة بحشرة الجعال .

٦-٢ دراسة التغير في انماط شرائط البروتين والمشابهات الانزيمية للنباتات المقارنة والنباتات التي ظهرت عليها اعراض الاصابة.

اظهرت النتائج ان هناك اختفاء لبعض شرائط البروتين من النباتات المصابة كما ان هناك ايضا ظهور واختفاء وزيادة كثافة لبعض شرائط الاستيريز والبيروكسيديز في النباتات المصابة.

٦-٣ كشف التباينات الوراثية بين اصناف القصب الخمسة المستخدمة في الدراسة .

٦-٤ تم اختبار اربعة طرق مختلفة لتحديد تأثير النيماتودا علي يرقات حشرة الجعال.

كانت اعلي نسبة موت عند معاملة سطح التربة بعلق النيماتودا

٦-٥ تم تحديد التركيز الفعال من النيماتودا الممرضة للحشرات ضد يرقات الجعال.

٦-٦ تم دراسة الاختلاف في انماط شرائط البروتين والمشابهات الانزيمية للهيولينف المفصول من يرقات الجعال بعد اجراء عدوي صناعية بالنيماتودا

اظهرت النتائج ان هناك تأثير علي شرائط البروتين وايضا زيادة في نشاط الاستيريز.

٦-٧ تم كشف التباينات الوراثية بين انواع النيماتودا الاربعة.

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 معهد بحوث المحاصيل السكرية

من الممكن إستخدام هذا البحث كدعامه لبرامج التربية لقصب السكر

٧ – ٢ معهد بحوث وقاية النباتات

استخام النيماتودا الممرضة للحشرات كوسيلة من وسائل المكافحة الحيوية ضد يرقات حشرة الجعال في حقول قصب السكر

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

فى حالة نعم اذكر هذه الجهات :

٨ – ١ معهد بحوث وقاية النباتات –مركز البحوث الزراعية- الجيزة

ما هى طبيعة العلاقة :

مشروع بحثى ☑

تعاون أكاديمى ☐

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

أخرى ☐ (تذكر)

٩ - <u>هل توافق على التعاون مع جهات مستفيدة من خلال الجامعة :</u>

لا ☐ **(لماذا**)

نعم ☑

(I) لتطبيق البحث : ☑

(II) لاستكمال البحث : ☑

(ج) أخرى ☐ **(تذكر**)

١٠ - <u>هل تم نشر بحوث مستخرجة من الرسالة فى مجلات أو مؤتمرات علمية</u>

(تذكر مع جهة النشر و المكان و التاريخ)

١٠ - ١ نعم فى المجلة العربية للتكنولوجيا العربية (٤-٢٠٠٩)

١١ - <u>هل سبق التقدم لتسجيل براءات اختراع</u> (تذكر مع الجهة و المكان و التاريخ)

لا

١٢ - <u>هل توافق على إعطاء البيانات المذكورة فى هذه الاستمارة لجهات أخرى</u>

نعم ☑ لا ☐

توقيع الطالب : توقيع المشرفين :

- اماني محمد احمد عبد العظيم **-د. سوسن سامي يوسف**

-د. محمد عبد الحميد العوضي

-د. **سناء عبد القادر محمد**

وكيل الكلية (المعهد) للدراسات العليا و البحوث : التاريخ

اسم الطالب: أماني محمد أحمد عبد العظيم **الدرجة**: الماجستير
عنوان الرسالة: دراسات وراثية على النيماتودا الممرضة لآفات قصب السكر
المشرفون: دكتور: سوسن سامي يوسف
دكتور: محمد عبدالحميد العوضي
دكتور: سناء عبد القادر محمد
قسم: الوراثة **تاريخ منح الدرجة:14** / 1 / 2010

المستخلص العربي

تهدف هذه الدراسة إلي تقييم خمسة أصناف من قصب السكر لتحمل الإصابة بيرقات حشرة الجعال والتي تسبب أضراراً بالغة لهذا المحصول.وجد أن أكثر الأصناف تحملاً للإصابة هو GT54-9 وذلك بعد عمل عدوي صناعية بيرقات العمر الثالث لحشرة الجعال والتي تُعتبر الطور الضار لمحصول القصب . تم دراسة التغير في أنماط شرائط البروتين والمشابهات الإنزيمية للنباتات المقارنة والنباتات السليمة والنباتات التي ظهرت عليها أعراض الإصابة بعد إحداث العدوي و اتضح أن هناك اختفاء لبعض أشرطة البروتين من النباتات التي ظهرت عليها أعراض الإصابة .كما أن هناك أيضاً ظهور واختفاء وزيادة كثافة لبعض شرائط الإستيريز والبيروكسيديز في النباتات المصابة . هذا وقد تم كشف التباينات الوراثية بين الأصناف الخمسة علي المستوي الجزيئي بإجراء اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل علي عينات منDNA المفصول من الأصناف الخمسة. تم اختبار النيماتودا الممرضة للحشرات من جنسي (*S. glaseri* and *S. carpocapsae*) *Heterorhabditis* sp. (*Steinernema H. bacteriophora* and *H. megidis*) من حيث قدرتها علي قتل يرقات الجعال و وجد أن نسبة الموت تزداد بزيادة تركيز النيماتودا وكان النوع *S. glaseri* أكثر الأنواع فاعلية ضد يرقات الجعال حيث أعطي نسبة موت ٩٠% يليها النوع *H. bacteriophora* الذي أعطي نسبة موت ٨٣% ثم *S. carpocapsae* التي أعطت 70% بينما كانت *H.* megidis أقل تأثيراً وأعطت نسبة موت 61 %. و تم أيضاً دراسة الاختلاف في أنماط شرائط البروتين والمشابهات الإنزيمية للهيمولمف المفصول من يرقات العمر الثالث لحشرة الجعال بعد إجراء عدوي لها بالنيماتودا باستخدام *Steinernema glaseri* ونوع *Heterorhabditis bacteriophora* بتركيز ٥٠٠ فرد معدي من النيماتودا لليرقة الواحدة. و تم فصل الهيموليمف علي فترات مختلفة من وقت إحداث العدوي (بعد ٢٤ ساعة- ٣٦ ساعة و ٤٨ ساعة) و أوضحت النتائج أن هناك تأثيراً يظهر نتيجة إحداث العدوي في شرائط البروتين خاصة بالنسبة لعينات الهيمولمف المفصولة بعد ٤٨ ساعة من إحداث العدوي حيث ظهرت شرائط بروتين في نوعي النيماتودا بينما لم تظهر في باقي العينات ولا حتي في المقارنة. و لوحظ أن هناك زيادة في نشاط الإستيريز في عينات الهيموليمف المفصول بعد ٤٨ ساعة . تم دراسة التباينات الوراثية بين أنواع النيماتودا الأربعة المستخدمة كما تم تحديد الواسمات الجزيئية المحددة لكل نوع . تم اختبار أربعة طرق مختلفة لتحديد تأثير أربعة أنواع من النيماتودا علي العمر اليرقي الثالث لحشرة الجعال وكانت أعلي نسبة موت عند معاملة سطح التربة بمعلق النيماتودا بينما كانت نسبة الموت أقل من الطريقة السابقة عند معاملة اليرقات بالرش المباشر بمعلق النيماتودا. وبالإضافة لذلك تم أيضاً تحديد التركيز الفعال من النيماتودا ضد يرقات العمر الثالث للحشرة وذلك بعد اختبار خمس تركيزات و هي ١٠٠- ٢٠٠-٣٠٠ - ٤٠٠ -٥٠٠ فرد معدي من النيماتودا لليرقة الواحدة. و كان التركيز الأكثر تأثيراًهو ٥٠٠ فرد معدي من النيماتودا لليرقة الواحدة.

الكلمات المفتاحية: النيماتودا الممرضة للحشرات- الجعال- RAPD marker- قصب السكر.

دراسات وراثية على النيماتودا الممرضة لآفات قصب السكر

رسالة ماجستير
فى العلوم الزراعية
(وراثة)

مقدمة من

أماني محمد أحمد عبد العظيم
بكالوريوس في العلوم الزراعية (تكنولوجيا حيوية)- كلية الزراعة- جامعة القاهرة، ٢٠٠٤

لجنة الإشراف

دكتور / سوسن سامي يوسف
أستاذ الوراثة- كلية الزراعة- جامعة القاهرة

دكتور/ محمد عبدالحميد العوضي
المدرس بقسم الوراثة- كلية الزراعة- جامعة القاهرة

دكتور / سناء عبد القادر محمد
باحث أول - معهد بحوث وقاية النباتات- مركز البحوث الزراعية

دراسات وراثية على النيماتودا الممرضة لآفات قصب السكر

رسالة مقدمة من

أماني محمد أحمد عبد العظيم
بكالوريوس في العلوم الزراعية (تكنولوجيا حيوية)- كلية الزراعة- جامعة القاهرة ،٢٠٠٤

للحصول على درجة

الماجستير

في

العلوم الزراعية
(وراثة)

قســـــم الوراثة
كليـــــة الزراعـــة
جـامعــة القــاهرة
مصـــــــر

٢٠١٠

CONTENTS

	Page
INTRODUCTION.....	**1**
REVIEW OF LITERATURE.....….....	**4**
1. Characterization of sugarcane cultivars by biochemical and molecular analysis	**4**
2. The use of entomopathogenic nematodes against white grub …….....	**13**
3. The changes in protein and isozymes banding patterns of hemolymph under infection with entomopathogenic nematodes …….....	**17**
4. Molecular characterization of the entomopathogenic nematodes.....	**20**
MATERIALS AND METHODS……....	**22**
RESULTS AND DISCUSSION……....	**33**
1. Susceptibility of sugarcane cultivars to white grub (*Pentodon bispinosus*)……....	**33**
a. The effect of feeding of white grub (*pentodon bispinosus*) larvae on cultivars plants of sugarcane ….	**33**
b. Changes in protein and isozymes banding patterns in leaves under artificial infection.....	**٣5**
c. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD).....	**40**
2. Selection of application method and most effective Species of EPN …….....	**44**
3. The selection of the most effective concentration of EPN against white grub larvae …….....	**45**
4. Changes in protein and isozymes banding patterns in the hemolymph of white grub larvae under infection entomopathogenic nematodes	**47**
a. Protein profiles.…….……....	**47**
b. Isozyme variations.……....	**49**
5. Identification of entomopathogenic nematode with protein and RAPD markers.……....	**51**
a. Protein banding patterns …..……....	**51**

b. Random amplified polymorphic DNA (RAPD)……...… **53**
SUMMARY…….…... **57**
REFERENCES …….…….……...… **60**
ARABIC SUMMARY