USE OF BIOCHEMICAL METHODS TO STUDY THE TAXONOMIC RELATIONSHIPS OF *Trichoderma* spp. ISOLATED FROM COTTON ROOTS

By

Marian Monir Habeb Yousef

B.Sc. Botany Department Faculty of Science Ain Shams University, 2001

Thesis

Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Botany

> Department of Botany Faculty of Science Ain Shams University



كلية العلوم

USE OF BIOCHEMICAL METHODS TO STUDY THE TAXONOMIC RELATIONSHIPS OF *Trichoderma* spp. ISOLATED FROM COTTON ROOTS

Thesis Submitted for Master Degree of Science in Botany

By

Marian Monir Habeb Yousef B.Sc. Botany Department, Faculty of Science Ain Shams University, 2001

Supervisors

Dr. Ahmed A. El-Awamri
Assist. Prof. of Botany
Botany Department, Faculty of Science
Ain Shams University

Prof. Dr. Aly A. Aly
Professor of Plant Pathology
Cotton Diseases Res. Department,
Plant Pathology Res. Instit.
Agric. Res. Center

Prof. Dr. Ezzat M. Hussein Professor of Plant Pathology Cotton Diseases Res. Department, Plant Pathology Res. Instit. Agric. Res. Center

2007



كلية العلوم

Master Thesis

Name	: Marian Monir Habeb Y	ousef	
Title	: USE OF BIOCHEMICATAXONOMIC RELATIONS ISOLATED FROM COT	ONSHIPS OF	
Degree	e: Master in Botany		
Super	visors:		
As Bo	. Ahmed A. El-Awan sist. Prof. of Botany tany Department, Facul n Shams University		
Pro Co Pla	of. Dr. Aly A. Aly ofessor of Plant Patholog tton Diseases Res. Depar ant Pathology Res. Instit gric. Res. Center	rtment,	
Pr Co Pla	of. Dr. Ezzat M. Hus ofessor of Plant Patholog tton Diseases Res. Depar ant Pathology Res. Instit gric. Res. Center	gy rtment,	
		Prof. Dr. Azza M. El-Shafey Head of Botany Department Faculty of Science Ain Shams University	



Approval Sheet

Title : USE OF BIOCHEMICAL METHODS TO STUDY THE TAXONOMIC RELATIONSHIPS OF *Trichoderma* spp. ISOLATED FROM COTTON ROOTS

Degree: Master in Botany

Name of Student: Marian Monir Habeb Yousef

This Thesis degree has been approved by:

Prof. Dr. A. M. Amein **Professor of Plant Pathology** Plant Pathol. Dept., Fac. of Agric., **Assiut University** Prof. Dr. Mamdouh A. Tag El-Din **Professor of Biochemistry** Biochemistry Dept., Fac. of Agric., **Ain Shams University** Prof. Dr. Alv A. Alv **Professor of Plant Pathology** Cotton Diseases Res. Department, Plant Pathology Res. Inst., Agric. Res. Center Dr. Ahmed A. El-Awamri Assist. Prof. of Botany, Botany Department, Fac. of Sci., **Ain Shams University**

Prof. Dr. Azza M. El-Shafey

Head of Botany Department Faculty of Science Ain Shams University

إستعمال الطرق البيوكيميائية لدراسة العلاقات التقسيمية لأنواع التريكودرما المعزولة من جذور القطن

رسالة مقدمة من ماريان منير حبيب يوسف بكالوريوس علوم – قسم النبات جامعة عين شمس – 2001

للحصول على درجة الماجستير في العلوم – النبات

قسم النبات كلية العلوم جامعة عين شمس

إستعمال الطرق البيوكيميائية لدراسة العلاقات التقسيمية لأنواع التريكودرما المعزولة من جذور القطن

رسالة مقدمة من ماريان منير حبيب يوسف بكالوريوس علوم – قسم النبات جامعة عين شمس – 2001

للحصول على درجة الماجستير في العلوم – النبات

المشرفون

د. أحمد عبد الرحمن العوامرى أستاذ مساعد الطحالب قسم النبات ـ كلية العلوم جامعة عين شمس

أ.د. على عبد الهادى على أبد. على أستاذ أمراض النبات قسم بحوث أمراض القطن – معهد بحوث أمراض النباتات مركز البحوث الزراعية

أ.د. عـزت محمـد حسيـن أستاذ أمراض النبات قسم بحوث أمراض القطن – معهد بحوث أمراض النباتات مركز البحوث الزراعية



ثىكــــــر ***

أتوجه بالشكر والتقدير إلى الأستاذة الذين أشرفوا على هذه الرسالة وهم:

استاذ مساعد النبات كلية العلوم قسم النبات – كلية العلوم جامعة عين شمس أستاذ أمراض النبات قسم بحوث أمراض القطن معهد بحوث أمراض النباتات مركز البحوث الزراعية أستاذ أمراض النبات قسم بحوث أمراض النباتات أستاذ أمراض النبات قسم بحوث أمراض النبات معهد بحوث أمراض النبات معهد بحوث أمراض النبات معهد بحوث أمراض النباتات معهد بحوث أمراض النباتات

كما أتقدم بخالص الشكر لأسرة قسم بحوث أمراض القطن بمعهد بحوث أمراض النباتات – مركز البحوث الزراعية وخاصة الدكتور معوض رجب للمساعدة القيمة في إنجاز هذا العمل.

مركز البحوث الزراعية

ماریان منیر حبیب یوسف



أسم الطالبة : ماريان منير حبيب يوسف

عنوان الرسالة : إستعمال الطرق البيوكيميانية لدراسة العلاقات التقسيمية

لأنواع التريكودرما المعزولة من جذور القطن

أسلم الدرجة : ماجستير في العلوم

القسم التابعة له : النبات

أسم الكلية : العلوم

أسم الجامعة : جامعة عين شمس

سنة المنح : 2007



كلية العلوم

رسالة ماجستير

أسم الطالبة : ماريان منير حبيب يوسف

عنوان الرسالة : إستعمال الطرق البيوكيميائية لدراسة العلاقات التقسيمية

لأنواع التريكودرما المعزولة من جذور القطن

أسلم الدرجة : ماجستير في العلوم

لجنة الإشراف

د.أحمد عبد الرحمن العوامرى أستاذ مساعد النبات ـ قسم النبات ـ كلية العلوم حامعة عين شمس

أ.د. على عبد الهادى على أستاذ أمراض النبات - قسم بحوث أمراض القطن معهد بحوث أمراض النباتات مركز البحوث الزراعية

أ.د. عـزت محمـد حسيـن أستاذ أمراض النبات ـ قسم بحوث أمراض القطن معهد بحوث أمراض النباتات مركز البحوث الزراعية

لجنة التحكيم

أ.د. عبد المنعم محمود أمين أستاذ أمراض النبات _ قسم أمراض النبات كلية الزراعة _ جامعة أسبوط

أ.د. ممدوح أبومسلم تاج الدين أستاذ الكيمياء الحيوية _ قسم الكيمياء الحيوية كلية الزراعة _ جامعة عين شمس

أ.د. على عبد الهادى على أستاذ أمراض النبات - قسم بحوث أمراض القطن معهد بحوث أمراض النباتات

مركز البحوث الزراعية (مشرف)

/ /

جامعة عين شمس (مشرف)

د. أحمد عبد الرحمن العوامري أستاذ مساعد النبات - قسم النبات - كلية العلوم

تاريخ البحث: / / . ختم الإجازة: الدراسات الدراسات . / / . الدراسات موافقة مجلس الكلية مجلس الجامعة

ACKNOWLEDGEMENT

The present work has been accomplished under the supervision of **Dr. A.A. El-Awamri**, Assist. Prof. of Botany, Botany Department, Faculty of Science, Ain Shams University, **Dr. Aly A. Aly**, Professor of Plant Pathology, Cotton Diseases Res. Department, Plant Pathology Res. Instit., Agric. Res. Center, and **Dr. E.M. Hussein**, Professor of Plant Pathology, Cotton Diseases Res. Department, Plant Pathology Res. Instit., Agric. Res. Center. To all of them, I wish to express my thankfulness and appreciation for their help, advice, and criticism.

Thanks are also due to my mother and my husband as well as all the staff members of Cotton Diseases Res. Department in particular **Dr. M.R. Omar** for their help and cooperation throughout this work.

Finally, I would like to thank **Dr. I.H. El-Abbasi**, Senior Researcher at Seed Pathology Res. Department, Plant Pathology Res. Instit., Agric. Res. Center, who expertly prepared the manuscript.

ABSTRACT

Trichoderma spp. were isolated from roots of cotton plants showing the typical symptoms of seedling damping-off or root rot of adult plants. Identification of 15 randomly selected isolates of Trichoderma to species level revealed that 8 isolates (53.3%) were belonging to T. longibrachiatum, while 7 isolates (46.7%) were belonging to T. harzianum. The beneficial and deleterious effects of Trichoderma isolates on growth of cotton seedlings were evaluated by planting cotton seeds in autoclaved soil infested with Trichoderma isolates. The deleterious isolates were pathogenic during the postemergence stage, while the beneficial isolates significantly promoted seedling height. Biocontrol capacity of Trichoderma spp. against soilborne fungi involved in cotton seedling damping-off was evaluated by planting cotton seeds in autoclaved soil infested with a mixture of the soilborne fungi commonly involved in the disease. Before planting, seeds were treated with a fine powder consisted of a mixture of sorghum and Trichoderma spp. The tested isolates of *Trichoderma* spp. could be classified into 3 distinct groups based on their biocontrol capacity. The first group included the isolates, which were effective biocontrol agents. Isolates of this group significantly increased the percentage of the surviving seedlings. Some isolates of this group also significantly increased dry weight of the surviving seedlings. The second group included the isolates, which significantly reduced seedling height. Some isolates of this group also reduced the percentage of the surviving seedlings. The third group included the isolates, which were neither biocontrol agents nor pathogens. immunoelectrophoresis, Double diffusion. polyacrylamid proteins, electrophoresis (PAGE) of sodium dodecyl polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of proteins, and PAGE of isozymes (esterase and peroxidase) were employed as biochemical methods to study the taxonomic relationships of Trichoderma spp. Of these methods, PAGE, and SDS-PAGE of proteins and esterase isozymes were reliable for grouping isolates of T. longibrachiatum and T. harzianum.

Keywords: *Trichoderma*, cotton, pathogenicity, biocontrol capacity, serology, electrophoresis of proteins and isozymes.

CONTENTS

	Page
CHAPTER 1: INTRODUCTION	1
CHAPTER 2: REVIEW OF LITREATURE	4
Beneficial effects of <i>Trichoderma</i> spp. on plant growth	4
Biocontrol capacity of <i>Trichoderma</i> spp. against soilborne fungi pathogenic on cotton	6
Use of biochemical methods to study the taxonomic relationships of <i>Trichoderma</i> spp.	9
a. Serological interactions	9
b. Protein electrophoresis	11
c. Isozyme electrophoresis	13
CHAPTER 3: MATERIALS AND METHODS	17
Isolation, purification, and identification of <i>Trichoderma</i> spp. from cotton (<i>Gossypium barbadense</i> L.) roots	17
Beneficial and deleterious effects of <i>Trichoderma</i> spp. on growth of cotton seedlings	17
Biocontrol capacity of <i>Trichoderma</i> spp. against soilborne fungi involved in cotton seedling damping-off	18
Statistical analysis of greenhouse studies	19
Use of biochemical methods to study the taxonomic relationships of <i>Trichoderma</i> spp.	19
a. Serological interactions	19
1. Extraction of antigens (proteins) from <i>Trichoderma</i> isolates	19
2. Immunization and preparation of antisera	20
3. double diffusion (DD) techniques	20
4. Immunoelectrophoresis (IE) techniques	21
5. Cluster analysis	22
b. Electrophoresis	22

	Page
1. Extraction of proteins from <i>Trichoderma</i> isolates	22
2. Electrophoresis of native protein (PAGE)	22
3. Electrophoresis of dissociated protein (SDS-PAGE)	23
4. Electrophoresis of isozymes	23
5. Gel analysis	23
CHAPTER 4: EXPERIMENTAL RESULTS	24
Isolation and identification of Trichoderma spp. from	24
cotton roots	
Beneficial and deleterious effects of <i>Trichoderma</i> spp. on growth of cotton seedlings	24
Biocontrol capacity of <i>Trichoderma</i> spp. against	27
soilborne fungi involved in cotton seedling damping-off	
a. Serological interactions	30
1. DD technique	30
2. IE technique	47
b. Electrophoresis	56
1. Electrophoresis of native protein (PAGE)	56
 Electrophoresis of dissociated protein (SDS- PAGE) 	56
3. Electrophoresis of isozymes	61
3.1. Esterase isozymes	61
3.2. Peroxidase isozymes	61
CHAPTRE 5: DISCUSSION	66
CHAPTER 6: SUMMARY	71
CHAPTER 7: REFERENCES	75
APPENDIX	86
ARARIC SUMMARY	

LIST OF TABLES

		Page
Table (1).	Sources and geographic origins of <i>Trichoderma</i> spp. used in the present study.	25
Table (2).	Beneficial and deleterious effects of <i>Trichoderma</i> isolates on cotton seedlings (cultivar Giza 89) under greenhouse conditions.	26
Table (3).	Correlation coefficients among variables used for evaluating beneficial and deleterious effects of <i>Trichoderma</i> spp. on growth of cotton seedlings (cultivar Giza 89).	28
Table (4).	Effect of <i>Trichoderma</i> isolates on incidence of cotton seedling damping-off (cultivar Giza 89) under greenhouse conditions.	29
Table (5).	Correlation coefficients among variables used for evaluating biocontrol capacity of <i>Trichoderma</i> spp. against soilborne fungi involved in cotton seedling damping-off.	31
Table (6).	Number and distribution of protein fractions obtained by double-diffusion reaction of antiserum of <i>Trichoderma</i> isolate no. T9 against antigens of <i>Trichoderma</i> isolates from cotton.	36
Table (7).	Correlation among serological protein patterns when antiserum of <i>Trichoderma</i> isolate no. T9 interacted against antigens of 15 isolates of <i>Trichoderma</i> spp.	37
Table (8).	Number and distribution of protein fractions obtained by double-diffusion reaction of antiserum of <i>Trichoderma</i> isolate no. T31 against antigens of <i>Trichoderma</i> isolates from cotton.	44
Table (9).	Correlation among serological protein patterns when antiserum of <i>Trichoderma</i> isolate no. T31 interacted against antigens of 15 isolates of <i>Trichoderma</i> spp.	45

	Page
Table (10). Number and distribution of immunoglobulins obtained by immuno-electrophoresis of antiserum of <i>Trichoderma</i> isolate no. T9 against antigens of <i>Trichoderma</i> isolates from cotton.	48
Table (11). Correlation among immunoglobulin patterns when antiserum of <i>Trichoderma</i> isolate no. T9 interacted against antigens of 15 isolates of <i>Trichoderma</i> spp.	50
Table (12). Number and distribution of immunoglobulins obtained by immuno-electrophoresis of antiserum of <i>Trichoderma</i> isolate no. T31 against antigens of <i>Trichoderma</i> isolates from cotton.	52
Table (13). Correlation among immunoglobulin patterns when antiserum of <i>Trichoderma</i> isolate no. T31 interacted against antigens of 15 isolates of <i>Trichoderma</i> spp.	54
Table (1A). Abbreviations used in this work.	86
Table (2A). Staining solutions used for the detection of isozymes.	87