STUDIES ON VIRUS INFECTING SOME ALGAE ISOLATED FROM SOIL AND WATER

By

Eman Mohammed Mokhtar Abd Elmomen Mareii

B.Sc. Agric. Sc. (Agricultural Microbiology), Ain Shams University, 2003
M.Sc. Agric. Sc. (Agricultural Viruses), Ain Shams University, 2007

A thesis submitted in partial fulfillment

of

the requirements for the degree of

DOCTOR OF PHYLOSOPHY

in

Agricultural Science
(Agricultural Viruses)

Department of Agricultural Microbiology
Faculty of Agriculture
Ain Shams University

2011

Approval Sheet

STUDIES ON VIRUS INFECTING SOME ALGAE ISOLATED FROM SOIL AND WATER

By

Eman Mohammed Mokhtar Abd Elmomen Mareii

B.Sc. Agric. Sc. (Agricultural Microbiology), Ain Shams University, 2003
M.Sc. Agric. Sc. (Agricultural Viruses), Ain Shams University, 2007

This thesis for Ph.D. degree has been approved by:

Dr. Adel Mahmoud Hammad .....

Prof. of Virology, Faculty of Agriculture, El-Menia University

Dr. Sohair Ibrahim El-Afifi .....

Prof. Emeritus of Virology, Faculty of Agriculture, Ain Shams University

Dr. Badawy Abd El-Salam Othman .....

Prof. of Virology, Faculty of Agriculture, Ain Shams University

Dr. Esmat Khalid Allam .....

Prof. Emeritus of Virology, Faculty of Agriculture, Ain Shams University

Date of Examination: / / 2011

STUDIES ON VIRUS INFECTING SOME ALGAE ISOLATED FROM SOIL AND WATER

By

Eman Mohammed Mokhtar Abd Elmomen Mareii

B.Sc. Agric. Sc. (Agricultural Microbiology), Ain Shams University, 2003
M.Sc. Agric. Sc. (Agricultural Viruses), Ain Shams University, 2007

Under the supervision of:

Dr. Esmat Khalid Allam

Prof. Emirtus of Agricultural Viruses, Department of Agricultural Microbiology, Faculty Agriculture, Ain Shams University (Principal Supervisor)

Dr. Badawy Abd El-Salam Othman

Prof. of Agricultural Viruses, Department of Agricultural Microbiology, Faculty Agriculture, Ain Shams University.

Dr. Khalid Abd El-Fattah El-Dougdoug

Prof. of Agricultural Viruses, Department of Agricultural Microbiology, Faculty Agriculture, Ain Shams University.

ACKNOWLEDGEMENT

Praise and thanks be to ALLAH, the most merciful for assisting and directing me to the right way

I would like to express my sincere gratitude to my supervisor **Prof. Dr. E.K. Allam,** Professor (Emeritus) of Agricultural Virology, Department of Agricultural Microbiology, Faculty of Agriculture, Ain Shams University, for his Supervision, encouragement, continuous guidance and fruitful discussions.

Also, I would like to express my sincere thanks, special gratitude and appreciation to my advisor **Prof. Dr. B.A. Othman,** Professor of Agric. Viruses, Faculty of Agriculture, Ain Shams University for his valuable help, guidance, supporting, supervising the present investigation, fruitful discussions constructive criticism, supporting with all facilities available and played a major role in this investigation.

Also, to my advisor **Prof. Dr. Khlid A. El-Dougdoug,** Professor of Agric. Viruses, Faculty of Agriculture, Ain Shams University, for his help, providing facilities and giving advices during this investigation.

And also my advisor **Dr. Pelal Abd El-Samea Kandel,** Senior Researcher, Biofertilizer Unit., Soil, Water and Environment Research Institute, Agricultural Research Center, El-Giza, Egypt, for providing me with isolates of cyanobcteria, and *N. mascarum*, and for his help and support during this investigation.

I am sincerely thankful to all staff members of Agric. Microbiology Dept., Faculty of Agric., Ain Shams University.

ABSTRACT

Eman Mohammed Mokhtar Mareii Studies on Virus Infecting Some Algae Isolated From Soil and Water. Unpublished Ph.D. Thesis, Department of Agricultural Microbiology, Faculty of Agriculture, Ain Shams University, 2011.

In this study, isolation and different characteristic of *Anabaena* cyanophages are described. Three isolates of cyanobactria were isolated by the streaking method from rice field. The isolates were defined as *Anabaena* spp. depending upon their morphological characters and signed as Sp_1, Sp_2 and Sp_3.

Two *Anabaena* cyanophages (virulent and temperate) were successfully isolated from soil and *Anabaena* (Sp_1). The virulent cyanophage produced clear, circular plaques, and the temperate cyanophage produced turbid, circular plaques. Electron microscopy examination showed that the particles of both have isometric heads and short tails. The one step growth experiment revealed that, the virulent cyanophage has latent period of about four hours and a half, and the phage particles release from the infected cells after eleven hours from infection.

Electron microscopy examination of infected *Anabaena* spp. ultrathin sections showed marked changes in protoplasm and cell membrane, i.e. coagulation of the cytoplasm, formation of vesicles and vacules and compact of photosynthetic lamella. The putative major capsid protein of virulent and temperate phages were successfully amplified using specific primer set by PCR technique and expected nucleotide size 181.94 bp for the both isolates. The DNA sequences of two cyanophages (virulent and temperate) were performed using PCR produced and appeared to be containing 195 and 203 bp for virulent and temperate cyanophage, respectively. Translation of partial nuclotide sequences of CP-gene for the lytic and

temperate cyanophages produced 65 and 67 amino acids starting with leucine and proline respectively.

Restriction enzymes revealed sequencing variation among virulent and temperate cyanophages. the polymorphism among 2 cyanophage isolates were differed whereas 20 unique fragments as a genetic marker.

Key words: *Anabaena,* Cyanophages, CP-gene, PCR, sequencing, Restriction enzymes.

دراسات على فيروس يصيب بعض الطحالب المعزولة من التربة والمياه

رسالة مقدمة من

إيمان محمد مختار عبد المؤمن مرعى

بكالوريوس علوم زراعية (ميكروبيولوجيا زراعية) ، جامعة عين شمس ، 2003

ماجستير علوم زراعية (فيروسات زراعية) ، جامعة عين شمس ، 2007

للحصول على

درجة دكتور فلسفة في العلوم الزراعية

(فيروسات زراعية)

قسم الميكروبيولوجيا الزراعية

كلية الزراعة

جامعة عين شمس

2011

صفحة الموافقة على الرسالة

دراسات على فيروس يصيب بعض الطحالب المعزولة من التربة والمياه

رسالة مقدمة من

إيمان محمد مختار عبد المؤمن مرعى

بكالوريوس علوم زراعية (ميكروبيولوجيا زراعية) ، جامعة عين شمس ، 2003

ماجستير علوم زراعية (فيروسات زراعية) ، جامعة عين شمس ، 2007

للحصول على

درجة دكتور فلسفة في العلوم الزراعية

(فيروسات زراعية)

وقد تمت مناقشة الرسالة والموافقة عليها

اللجنة:

د. عادل محمود حماد .....

أستاذ الفيرولوجى ، كلية الزراعة ، جامعة المنيا

د. سهير ابراهيم العفيفـى .....

أستاذ الفيرولوجى المتفرغ ، كلية الزراعة ، جامعة عين شمس

د. بدوى عبد السلام عثمان .....

أستاذ الفيرولوجى ، كلية الزراعة ، جامعة عين شمس

د. عصمت خالد عـــلام .....

أستاذ الفيرولوجى المتفرغ ، كلية الزراعة ، جامعة عين شمس

تاريخ المناقشة: / /2011

صفحة الموافقة على الرسالة

دراسات على فيروس يصيب بعض الطحالب المعزولة من التربة والمياه

رسالة مقدمة من

إيمان محمد مختار عبد المؤمن مرعى

بكالوريوس علوم زراعية (ميكروبيولوجيا زراعية) ، جامعة عين شمس ، 2003

ماجستير علوم زراعية (فيروسات زراعية) ، جامعة عين شمس ، 2007

للحصول على

درجة دكتور فلسفة في العلوم الزراعية

(فيروسات زراعية)

وقد تمت مناقشة الرسالة والموافقة عليها

اللجنة:

د. عادل محمود حماد .....

أستاذ الفيرولوجى ، كلية الزراعة ، جامعة المنيا

د. سهير ابراهيم العفيفـى .....

أستاذ الفيرولوجى المتفرغ ، كلية الزراعة ، جامعة عين شمس

د. بدوى عبد السلام عثمان .....

أستاذ الفيرولوجى ، كلية الزراعة ، جامعة عين شمس

د. عصمت خالد عـــلام .....

أستاذ الفيرولوجى المتفرغ ، كلية الزراعة ، جامعة عين شمس

تاريخ المناقشة: / /2011

جامعة عين شمس
كلية الزراعة

رسالة دكتوراه

اســـم الطـالــب: إيمان محمد مختار عبد المؤمن مرعى
عنوان الرسـالة: دراسات على فيروس يصيب بعض الطحالب المعزولة من التربة والمياه
اســـم الدرجـــة: دكتور فلسفة فى العلوم الزراعية (فيروسات زراعية)

لجنة الإشراف:

د. عصمت خالد عـلام
أستاذ الفيروسات الزراعية المتفرغ ، قسم الميكروبيولوجيا الزراعية ، كلية الزراعة ، جامعة عين شمس (المشرف الرئيسي)

د. بدوى عبد السلام عثمان
أستاذ الفيروسات الزراعية، قسم الميكروبيولوجيا الزراعية ، كلية الزراعة، جامعة عين شمس

د. خالد عبد الفتاح الدجدج
أستاذ الفيروسات الزراعية ، قسم الميكروبيولوجيا الزراعية ، كلية الزراعة ، جامعة عين شمس

تاريخ التسجيل: 11 /2 /2008
الدراسات العليا

ختم الإجازة **أجيزت الرسالة بتاريخ**

/ /2011

موافقة مجلس الكلية **موافقة مجلس الجامعة**

/ / 2011 / / 2011

بسم الله الرحمن الرحيم

وقل ربى زدنى علماً

صدق الله العظيم

LIST OF ABBREVIATIONS

bp : base pair
$CaCl_2$: Calcium chloride
cfu : colony forming unit
cm : centimeter
ds-DNA: Double stranded Deoxy ribonucleic acid
dNtd : Dideoxy nucleotide triphosphate
EG : Egyptian
g : Gram
h : Hour(s)
H_2O_2 : Hydrogen peroxide
KDa : Kilo Daltons
mA : Milliamper
mg : Milligram
Min : Minute
ml : Milliliter
Mol.wt.: Molecular weight
nt : Nucleotide
NaCl : Sodium chloride
PAGE : Polycrylamide gel electrophoresis
PCR : Polymerase chain reaction
PDA : Potato dextrose agar
pfu : Plaque forming unit
rpm : Revolution per minute
SDS : Sodium dodecyl sulfate
µl : Micro liter
Taq : Thermus aquaticus
Xg : Gravity centrifugal

CONTENTS

Page

Page