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

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

Thi	is thesis for Ph.D. degree has been approved by:			
Dr.	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 cyanobeteria, 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 Sp₁, Sp₂ and Sp₃.

Two *Anabaena* cyanophages (virulent and temperate) were successfully isolated from soil and *Anabaena* (Sp₁). 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

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 الفيرولوجي ، كلية الزراعة ، جامعة المنيا
••••••	د. سلهير ابراهيم العقيقى
ة عين شمس	أستاذ الفيرولوجي المتفرغ ، كلية الزراعة ، جامع
•••••	د. بدوی عبد السلام عثمان
مس	أستاذ الفيرولوجي ، كلية الزراعة ، جامعة عين ش
•••••	د. عصمت خالد عــــلام
ة عين شمس	أستاذ الفيرولوجي المتفرغ ، كلية الزراعة ، جامع
	تاريخ المذاقشة بالمرات

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)

اللجنة:

وقد تمت مناقشة الرسالة والموافقة عليها

تاريخ المناقشة: / 2011/

د. عادل محمود حماد

أستاذ الفيرولوجى ، كلية الزراعة ، جامعة المنيا
د. سهير ابراهيم العقيفى
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
أستاذ الفيرولوجى المتفرغ ، كلية الزراعة ، جامعة عين شمس

جامعة عين شمس كلية الزراعة

رسالة دكتوراه

اسم الطالب: إيمان محمد مختار عبد المؤمن مرعى عنوان الرسالة: دراسات على فيروس يصيب بعض الطحالب المعزولة من التربة والمياه المدرجة: دكتور فلسفة في العلوم الزراعية (فيروسات زراعية)

لجنة الإشراف:

د. عصمت خالد علام

أستاذ الفيروسات الزراعية المتفرغ، قسم الميكروبيولوجيا الزراعية، كلية الزراعة، جامعة عين شمس (المشرف الرئيسي)

د. بدوی 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

أجيزت الرسالة بتاريخ

ختم الإجازة

2011/ /

موافقة مجلس الجامعة

موافقة مجلس الكلية

2011 / /

2011 / /

بسم الله الرحمن الرحيم

وقل ربی زدنی علماً

صدق الله العظيم

LIST OF ABBREVIATIONS

bp : base pair

CaCl₂ : Calcium chloride

cfu : colony forming unit

cm : centimeter

ds-DNA: Double stranded Deoxy ribonucleic acid

dNtd : Dideoxy nucleotide triphosphate

EG : Egyptian

g : Gramh : Hour(s)

H₂O₂ : Hydrogen peroxide

KDa : Kilo DaltonsmA : Milliampermg : 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

List of tables	
List of figures	Page
I. INTRODUCTION	1
II. REVIEW OF LITERATURE	4
III. MATERIAL AND METHODS	
IV. RESULTS	
4.1. Isolation and identification of some cyano-63	
bacteria (Blue green algae)	56
4.1.1. Isolation and identification of bacterial	
sheath associated to cyanobacteria	56
4.1.2. Isolation and identification of fungi	
associated with cyanobacterial isolates	58
4.1.3. Lysis of cyanobacterial cultures	60
4.2. Biological, chemical and molecular characters	
of cyanophages	62
- Biological and chemical characters:	62
4.2.1. Virulent phage	62
4.2.2. Induced phage	62
4.3. Cyanophage infectivity	62
4.4. Purified <i>Anabaena</i> phages	63
4.5. Extinction spectra characters	68
4.6. Morphological characters	68
4.7. Thermal inactivation point	71
4.8. Longevity of cynophages	71
4.9. Dilution end point	71
4.10. One step growth experiment	71
4.11. Protein patterns of phages specific for	
Anabaena Sp ₁	73
4.12 Genetic distance of gel documentation	75

	Page
4.12.1. Molecular.characters of cyanophages	
genome	79
a. DNA purity and concentration of cyano-	
phages genome	79
b. Designed CP-gene primer sets	79
c. CP code gene amplification	80
d. PCR product conformation	80
4.13. The nucleotide sequence of cyanophage	
strains	80
4.14. Molecular diversity of cyanophages	84
4.14. 1. Nucleotide sequence	84
4.14.2. Base composition	84
4.14.3. Amino acid sequences	85
4.14.4. Amino acid composition	90
4.14.5. Restriction enzymes	93
4.15 Effect of lytic cyanophages of Anabaena Sp ₁	
isolate	93
4.15.1. Cytopathic effects on Anabaena Sp ₁	93
4.152. Enzyme activities	103
415.2.1. Peroxidase activity	103
4.15.2.2. Polyphenol oxidase activity	103
4.16Cell protein content of Anabaena Sp ₁	
infected with cyanophage isolates	107
4.17 Genetic distance	109
4.18 Qualitative assay of protein in Anabaena Sp1	
infected cell with cyanophage isolates	113
4.19. Effect of virulent cyanophage on	
Anabaena Sp ₁ as a biofertilizer in vivo	113
4.19.1. Effect of cyanophage on N2-fixation	117

	Page
V. DISCUSSION	122
VI. SUMMARY	132
VII. REFERENCES	136
ARABIC SUMMARY	