DETECTION TECHNIQUES OF BANANA VIRUSES AND PRODUCTION OF VIRUS FREE PLANTLETS

By

HANAN AHMED KAMAL RAMADAN

B.Sc. Agric. Sci. (Plant Pathology), Fac. Agric., Cairo Univ., 2000

THESIS

Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

MASTER

In

Agricultural Sciences

(Plant Pathology)

Department of Plant Pathology
Faculty of Agriculture
Cairo University
EGYPT

2009

APPROVAL SHEET

DETECTION TECHNIQUES OF BANANA VIRUSES AND PRODUCTION OF VIRUS FREE PLANTLETS

M.Sc. Thesis
In
Agric. Sci. (Plant Pathology)

By

HANAN AHMED KAMAL RAMADAN
B.Sc. Agric. Sci. (Plant Pathology), Fac. Agric., Cairo Univ., 2000

Approval Committee

Dr. MOUSTAFA AHMED SALAMA EL-KADY .....
Chief Researcher of Plant Pathology, Agriculture Research Center

Dr. IBRAHIUM ABDEL-MONEAM MOHAMED .....
Professor of Plant Pathology, Fac. Agric., Cairo University

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

Dr. ABDELRAHMAN MORSY GHALLAB .....
Professor of Plant Physiology, Fac. Agric., Cairo University

Date: 28 / 10 /2009

SUPERVISION SHEET

DETECTION TECHNIQUES OF BANANA VIRUSES AND PRODUCTION OF VIRUS FREE PLANTLETS

M.Sc. Thesis
In
Agric. Sci. (Plant Pathology)

By

HANAN AHMED KAMAL RAMADAN
B.Sc. Agric. Sci. (Plant Pathology), Fac. Agric., Cairo Univ., 2000

SUPERVISION COMMITTEE

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

Dr. ABDELRAHMAN MORSY GHALLAB
Professor of Plant Physiology, Fac. Agric., Cairo University

Dr. ABDEL-MOHSEN AFEFY ABOU-ZEID
Head of Research of Plant Pathology, NRC, Giza

تقنيات الكشف عن فيروسات الموز وإنتاج نباتات خالية من الفيروس

رسالة مقدمة من

حنان أحمد كمال رمضان

بكالوريوس في العلوم الزراعية (أمراض النبات)- كلية الزراعة – جامعة القاهرة ،٢٠٠٠

للحصول على درجة

الماجستير

في

العلوم الزراعية
(أمراض النبات)

قســـــم أمراض النبات
كليـــــة الزراعـــة
جـامعــة القــاهرة
مصـــــــر

٢٠٠٩

تقنيات الكشف عن فيروسات الموز و انتاج نباتات خالية من الفيروس

رسالة ماجستير
فيالعلوم الزراعية
(أمراض النبات)

مقدمة من

حنان أحمد كمال رمضان

بكالوريوس في العلوم الزراعية (أمراض النبات) - كلية الزراعة - جامعة القاهرة، ٢٠٠٠

لجنة الحكم

دكتور / مصطفى أحمد سلامة القاضى .....
رئيس بحوث – معهد بحوث أمراض النباتات – مركز البحوث الزراعية

دكتور / إبراهيم عبد المنعم محمد.....
أستاذ أمراض النبات – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

دكتور / أم هاشم محمد البنا.....
أستاذ أمراض النبات – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

دكتور/ عبد الرحمن مرسي غلاب.....
أستاذ فسيولوجى النبات – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

التاريخ٢٨ / ١٠ / ٢٠٠٩

تقنيات الكشف عن فيروسات الموز وانتاج نباتات خالية من الفيروس

رسالة ماجستير
في العلوم الزراعية
(أمراض النبات)

مقدمة من

حنان أحمد كمال رمضان

بكالوريوس في العلوم الزراعية (أمراض النبات) - كلية الزراعة - جامعة القاهرة ،٢٠٠٠

لجنة الإشراف

دكتور/ أم هاشم محمد البنا
أستاذ أمراض النبات - كلية الزراعة - جامعة القاهرة

دكتور/ عبد الرحمن مرسى غلاب
أستاذ فسيولوجى النبات – كلية الزراعة - جامعة القاهرة

دكتور/ عبد المحسن عفيفى أبو زيد
رئيس بحوث- معهد بحوث أمراض النباتات – مركز البحوث الزراعية

Cairo
Univ.

Fac.
Agric.

HANAN A. K. RAMADAN

M.Sc.

2009

استمارة معلومات الرسائل التى تمت مناقشتها

الكلية:كلية الزراعة – جامعة القاهرة **القسم: أمراض النبات**

١ - **الدرجة العلمية** : ماجستير [√] دكتوراه [ ]

٢ - بيانات الرسالة :

عنوان الرسالة باللغة العربية : تقنيات الكشف عن فيروسات الموز وإنتاج نباتات خالية من الفيروس.

عنوان الرسالة باللغة الأجنبية : Detection techniques of banana viruses and production virus free plantlets.

التخصص الدقيق :

تاريخ المناقشة : ٢٠٠٩/١٠/٢٨

٣ - بيانات الطالب :

الاسم : حنان أحمد كمال رمضان أبو العلا الجنسية : مصرية النوع : أنثى

العنوان :١٦ش الرياض من عثمان محرم الطالبية – الهرم تليفون:٠١٢٦٥٧٣٢٣٣

جهة العمل :مركز البحوث الزراعية رقم الفاكس : البريد الإلكترونى :

٤ - المشرفون على الرسالة :

الاسم	القسم	الكلية	الجامعة
١- دكتور/ أم هاشم محمد البنا	أمراض النبات	كلية الزراعة	جامعة القاهرة
٢- دكتور/ عبد الرحمن مرسى غلاب	فسيولوجى النبات	كلية الزراعة	جامعة القاهرة
٣- دكتور/ عبد المحسن عفيفى أبو زيد	معهد بحوث أمراض النباتات		مركز البحوث الزراعية

٥ – مستخلص الرسالة (Abstract)

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

تم الكشف عن فيروس تورد القمة في الموز في نباتات الموز و نباتات الكانا المصابة طبيعيا في محافظة القليوبية (مصر) باستخدام تكنيك الـDAS-ELISA و تكنيك PCR للكشف عن الفيروس في هذه النباتات . في هذه الدراسة استخدمت بعض المواد الكيميائية مثل مادة حمض الجاسمونيك ، مادة حمض البنزويك و مادة 8-Azaguanine لإنتاج نباتات موز خالية من الفيروس محل الدراسة. أظهرت التحليلات الكيميائية لنباتات الموز المصابة بالفيروس و تلك السليمة أن محتوى النباتات المصابة من كل من الكلوروفيل و الكاروتينات و البروتين و الأحماض الأمينية و الفينولات قد انخفض عن السليمة. أما بالنسبة للعناصر المعدنية فقد لوحظ زيادة مستوى النيتروجين في النباتات المصابة بينما باقي العناصر فقد كان مستواها في النباتات السليمة اعلي من النباتات المصابة .

الكلمات داله : موز- فيروس تورد القمة في الموز - اختبار الأليزا - تفاعل البلمرة المتسلسل - حمض الجاسمونيك - حمض البنزويك - 8-Azaguanine - الكلوروفيل -الكاروتينات- البروتين - الأحماض الأمينية - الفينولات - العناصر المعدنية.

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

Banana bunchy top virus (BBTV) was detected in naturally infected banana and canna plants grown in Qalubia Governorate (Egypt) by DAS-ELLSA and PCR. Efficiency of jasmonic acid, Benzoic acid and 8-azaguanine for production of BBTV-free banana plantlets were checked. Chemical analysis revealed that chlorophyll and carotenoids, proteins, amino acids and soluble phenols were higher in healthy plants than in infected ones. The nitrogen content was higher in infected plants while the rest of nutrients were higher in healthy plants than infected ones**.**

Key Words : Banana ,*Banana bunchy top virus*, ELISA, PCR, Dot blot, Southern blot, Jasmonic acid, Benzoic acid, 8-Azaguanine, chlorophyll , proteins , amino acids, soluble phenols, nutrients elements.

٦ - **أهم النتائج التطبيقية التى تم التوصل إليها** :

(لا تزيد عن سطرين لكل منها)

٦ – ١

عزل الفيروس من نباتات موز مصابة طبيعياً و أن الطريقة الوحيدة لإنتقاله بواسطة حشرة من الموز الأسود كما ان المدى العوائلى لفيروس تورد القمة ضيق جداً وهو نبات الموز.

٦ – ٢

استخدم تكنيك DAS-ELISA وتكنيك PCRللكشف عن وجود الفيروس في نباتات الموز ونباتات الكانا المصابة طبيعياً و أوضحت دراسات المجهر الإلكتروني النافذ تواجد جزيئات كروية قطرها حوالي ١٨-٢٠ نانوميتر في تحضيرات الفيروس المجهزة من نباتات الموز و الكانا المصابة طبيعياً.

٦ – ٣

استخدام حمض الجاسمونيك حدثت زيادة في نسبة النباتات الخالية من الفيروس بزيادة التركيز و كانت النسبة كالآتي: ٣.٩٢،٦.٩١،٦.٨٤ % للتركيزات الثلاثة (٢،١،٠.٥ جزء في المليون) على التوالي بينما في حالة استخدام حمض البنزويك زادت نسبة النباتات الخالية من الفيروس مع زيادة تركيز المادة وكانت النسب كالآتي : ٧٠ ، ٨.١٨ ، ٨٨.٨ % للتركيزات الثلاثة (١٠،٢٠،٣٠ جزء في المليون) و إضافة مادة 8-azaguanine إلى بيئة الزراعة أدى إلى موت جميع النباتات في حالة التركيزات العالية أو المنخفضة.

٦ – ٤

أظهرت التحليلات الكيميائية لنباتات الموز المصابة بفيروس تورد القمة في الموز و تلك السليمة أن محتوى النباتات المصابة من كل من الكلوروفيل و الكاروتينات و البروتين و الأحماض الأمينية و الفينولات قد انخفض في النباتات المصابة عن السليمة و لوحظ زيادة مستوى النيتروجين في النباتات المصابة عن السليمة بينما باقي العناصر فقد كان مستواها في النباتات السليمة اعلي من النباتات المصابة .

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 –٢

٧ – ٣

٧–٤

٨ – هل توجد علاقة قائمة بإحدى هذا الجهات : **نعم** [X] **لا** [√]

فى حالة نعم اذكر هذه الجهات :

٨ – ١

٨ – ٢

٨ – ٣

ما هى طبيعة العلاقة :

مشروع بحثى [X]

تعاون أكاديمى [X]

مشروع ممول من جهة ثالثة [X] (اذكر ما هى :)

أخرى [X] (تذكر)

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

لا [√] **(لماذا)**

نعم [X]

(أ) لتطبيق البحث : [ ]

(ب) 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

المؤتمر الحادى عشر لأمراض النبات – جمعية أمراض النبات المصرية

٢٧-٢٨ نوفمبر ٢٠٠٧.

١٠ - ٢

١٠ - ٣

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 [X] لا [√]

توقيع الطالب : توقيع المشرفين :

-

-

-

-

وكيل الكلية (المعهد) للدراسات العليا و البحوث : التاريخ

CONTENTS

	Page
INTRODUCTION	**1**
REVIEW OF LITERATURE	**4**
1. Isolation and identification of *Banana bunchy top* virus (BBTV)	**4**
a. Economoic Importance and geographic distribution of *Banana bunchy top virus*.....	**4**
b. Isolation of *Banana bunchy top virus*	**5**
c. Identification of *Banana bunchy top virus*.....	**8**
2. Production of virus-free banana plantlets using chemical substances.....	**22**
a. Jasmonic acid	**22**
b. Benzoic acid	**29**
c. 8-Azaguanine	**32**
d. Acclimations	**33**
3. Effect of BBTV-infection on some chemical constituents of banana plants.	**34**
a. Photosynthetic pigments.....	**34**
b.Organic components.....	**36**
c. Nutrient elements	**40**
MATERIALS AND METHODS.....	**42**
1. Isolation and identification of *Banana bunchy top* virus (BBTV)	**42**
a. Source of virus isolate	**42**
b. Isolation	**42**
c. Identification	**43**
1. Host rang and symptoms	**43**
2. Modes of transmission	**44**
3. Serological assay.....	**45**
4. Electron microscopy	**46**
5. Molecular biology studies.....	**47**

2. Production of virus-free banana plantlets using chemical substances **52**
a. Meristem culture..... **52**
b. Production of BBTV-free banana plantlets using chemical compounds..... **53**
c. Acclimatization…..... **55**
3. Effect of BBTV-infection on some chemical constituents of banana plants..... **56**
a.Source of the banana plants..... **56**
b.Chemical analylsis..... **56**
1. Estimation of photosynthetic pigments..... **56**
2.Organic components..... **57**
3. Nutrient elements determination..... **58**
RESULTS..... **60**
1. Isolation and identification of *Banana bunchy top* virus... **60**
2. Production of BBTV-free banana plantlet using chemical compounds **71**
a. 8-azaguanin..... **71**
b. Jasmonic acid..... **71**
c. Benzoic acid..... **75**
d. Acclimatization..... **78**
3. Effect of BBTV-infection on some chemical constituents of banana plants..... **79**
a. Photosynthetic pigments..... **79**
b. Organic components..... **79**
c. Nutrient elements **79**
DISCUSSION..... **83**
SUMMARY..... **96**
REFERENCES..... **102**
ARABIC SUMMARY.....