Name of Candidate: Medhat Ahmed Hassan El-Naggar **Degree:** Ph.D.
Title of Thesis: Toxins produced by Fusarium species isolated from cotton seeds and corn grains
Supervisors: Prof. Dr. Hamdy Y. Aly, Prof. Dr. Khairy A. Abada and Prof. Dr. Samy M. Mahmoud
Department: Plant Pathology **Approval :** 9 /٥/2007

ABSTRACT

Results of different isolation trails from maize grains indicated that there are 317 fugal isolates belong to 10 genera and *Fusarium moniliforme* appeared with more frequency than other *Fusarium* spp. using 3 hybrids namely; hybrid 321, hybrid 155 and hybrid 10. On the other hand there are 324 fungal isolates belong to 13 genera isolated from 3 cultivars of cotton seeds; *Fusarium oxysporum* was more isolated than other types of Fusarium. The percentage of natural infection of maize grain (Hyprid 155) was higher comparing with other tested cultivars, and cotton seeds cv. Giza 80 was highly susceptible to natural infection comparing with the other tested ones.

Pathogenicity test of 29 isolated of *Fusarium moniliforme* and 25 isolates of *Fusarium oxysporum* using high susceptible cultivars from each crop revealed that isolate no. 25 of the first fungus, followed by isolate no. 15 which isolated from maize grains were the most severe isolates capable for infection causing high infection on maize grain hybride 155 accompanied with high reduction of grains germination. Isolate of *Fusarium oxysporum* no. 17 followed by isolate No. 15 recorded the same previous effect on cotton seeds cultivar Giza 80. On contrast, isolate nos. 17, and 13 of *Fusarium moniliforme* and no. 21 and 24 of *Fusarium oxysporum* were less virulent.

Results of bioassay test using two types of yeasts as an indicator for producing the toxin revealed that isolate of *Fusarium moniliforme* no. 8, followed by no. 25 caused a great inactivation of yeast growth and isolate no. 19 of *Fusarium, oxysporum* followed by no. 17 recorded the same effect. On the other hand *Kuliveromyces maxins* was highly susceptible than other used yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)

Production of toxins by five isolates of *Fusarium moniliforme* and *F. oxysporum* nos. 7, 8, 15, 16, 25; 12, 15, 17, 19 and 25 respectively in addition to phytoalexins estimation by immuno affinity column revealed that isolate no. 8 of *F. moniliforme,* followed by isolate no. 25 were the most toxic isolates. Also, isolate no.'19' followed by no.'17' of *F. oxysporum* were more toxic comparing with the other tested isolates. A positive relationship was recorded between the concentration and the reduction in the growth of the yeast in the lab. Also, there was a direct relationship between the production of phytoalexins and pathogenicity. The isolate of the first fungus produced fumonisin, zearalenone and T-2 toxins, while the isolate of the second one produced only zearalenone and T-2 toxins. The fast method by using special primer was more effective in 10 isolates of the two fungi for the determination of (trichothecene toxins).

The effect of 10 previous isolates on the chemical composition of maize grains and cotton seeds was studied and it was found that these isolates caused a reduction in proteins, sugars, fats, total, free and conjugated phenols at different degrees. Also, there was a difference in the fractions of amino acid, fats, phenols due to the difference in the virulence isolate to the seeds and/or grains. Also, hydrolytic, oxidative enzymes,phytohormone as indol acetic acid and gibberellic acid and Vitamines E and C was studied

Two methods, namely calcium propionate and pulsed electric field (PEF) were used to detoxificate Fusarium mycotoxins or decrease their level without any harmful effect on the agriculture products in the presence of infection by one toxic isolate of each of *F. moniliforme* (no.8) and *F. oxysporum* (no.19). The obtained data revealed that the concentration of 8, 10 gm/kg from grains and/or seeds of calcium propionate was most effective in decreasing the toxins concentration. On the other hand, i*n vitro* the frequency of 500 Hz from PEF waves led to a highest decrease in the total toxin level which secrete by isolates of *F. axsporum* and *F. moniliforme*, i.e. No. 19 and No. 8, respectively. this technique was applied on the inoculated seeds and grains

Hamdy Y. Aly

اسم الطالب: مدحت أحمد حسن النجار الدرجة: الدكتوراه
عنوان الرسالة :السموم التى تفرزها أنواع من الفيوزاريوم المعزولة من بذور القطن وحبوب الذرة.
المشرفون : أ.د / حمدى يوسف ، أ.د/ خيرى عبد المقصود عبادة ، أ.د/ سامى محمد مصطفى محمود
قسم: امراض نبات تاريخ المناقشة: ٩ / ٥ /٢٠٠٧

المستخلص العربي

أوضحت تجارب العزل المختلفة من حبوب الذرة الشامية أن هناك ٣١٧ عزله فطريه تتبع ١٠ أجناس و كان الفطر فيوزاريوم مونوليفورم هو أكثر فطريات الفيوزاريوم ظهورا أثناء عمليات العزل من ٣ هجن هى هجين ٣١٢ ، هجين ١٥٥ ، هجين ١٠ و من الجانب الأخر فقد حصل على ٣٢٤ عزله فطريه تتبع ١٣جنس من ٣ أصناف من بذور القطن هي جيزة ٨٠، ٨٥ ،٨٩ و كان الفطر فيوزاريوم أوكسيسبورم هو أكثر الفطريات ظهورا بين أنواع الفيوزاريوم الأخرى. كانت نسبه الأصابه الطبيعية لحبوب الذرة الشامية هجين١٥٥عاليه بالمقارنة بنسبه أصابه الأصناف الأخرى كما كان صنف القطن جيزة ٨٠ هو أكثر الأصناف قابليه للأصابه الطبيعية بعكس الأصناف الأخرى المختبرة من القطن.

دلت تجارب القدرة المرضية باستعمال ٢٩ عزله من الفطر فيوزاريوم مونوليفورم ، ٢٥ عزله من الفطر فيوزاريوم أوكسيسبورم باستعمال أكثر الأصناف قابليه للأصابه من كل محصول أن العزلة رقم ٢٥ من الفطر الأول يليها العزلة ١٥ و المعزولة من حبوب الذرة الشامية كانت أكثر قدره على أحداث المرضية مسببه نسبه أصابه صناعية عاليه على هجين حبوب الذرة الشامية ١٥٥ مع التأثير الكبير على إنبات الحبوب و قد كانت لعزله الفطر فيوزاريوم أوكسيسبورم رقم ١٧ يليها العزلة رقم ١٥ نفس التأثير السابق على صنف بذور القطن جيزة ٨٠ و على النقيض من ذلك فقد أثبتت العزلات ١٧ ، ١٣ للفطر فيوزاريوم مونوليفورم ، رقم ٢٤ ، ٢١ للفطر فيوزاريوم أوكسيسبورم اقل قدره على أحداث المرض.

أوضحت تجارب الاختبار الحيوي باستعمال نوعين من الخمائر كمؤشر لإنتاج السموم أن عزله الفطر فيوزاريوم مونوليفورم رقم ٨ يليها رقم ٢٥ سببت تثبيط كبير لنمو الخميرة و كانت العزلة رقم ١٩ للفطر فيوزاريوم أوكسيسبورم يليها رقم ١٧ نفس السلوك – هذا و قد كانت الخميرة كليفيروميسس ماكسينز أكثر حساسية من الخميرة الأخرى المستعملة ساكاروميسيس سيرفيزى تجاه العزلات المستخدمة.

عند تقدير السموم بواسطة خمس عزلات من كلا من الفطريين فيوزاريوم مونوليفورم و أوكسيسبورم و هي ٧، ٨ ، ١٥ ، ١٦ ، ٢٥ ،١٢ ، ١٥ ،١٧ ،١٩ ،٢٥ على التوالي و كذلك لتقدير السموم النباتية بواسطة طريقة الأعمدة المناعية وأيضا تقدير السموم النباتية أوضحت النتائج أن العزلة رقم ٨ للفطر الأول يليها العزلة رقم ٢٥ و كذلك العزلة رقم ١٩ يليها العزلة رقم ١٧ للفطر الثاني كانت أكثر العزلات سميه بالمقارنة ببقية العزلات المختبرة – و كان هناك علاقة ايجابيه بين تركيز السموم و القدرة على تثبيط نمو الخميرة بالمعمل كما أن هناك أيضا علاقة مباشره بين إنتاج السموم النباتية و القدرة المرضية و قد أنتجت عزلات الفطر الأول السموم فيومونيزين ، زيراليون ، تى- تو بينما أنتجت عزلات الفطر الثاني السموم زيراليون ، تى- تو فقط. كانت الطريقة السريعة باستعمال التقنيات الوراثية باستخدام برايمر خاص أكثر من فعاله في العزلات العشر للفطريين للكشف عن سموم الترايكوسيسين.

تمت دراسة تأثير العزلات العشر السابقه على التركيب الكيماوي لحبوب الذرة الشامية و بذور القطن وجد أن هذه العزلات أدت إلى انخفاض محتوى البروتين و السكريات و الدهون و الفينولات الحرة و المرتبطة و الكلية بدرجات تختلف باختلاف العزلات المختبرة. كما لوحظ أن هناك تباينات في الأحماض الأمينيه ، الدهنيه ، الفينولات عند تفرديها تبعا للعزلة المستخدمة في عدوى الحبوب أو البذوروتم دراسة تاثيرها على الانزيمات المحللة والمؤكسدة علاوة على دراسة تأثيرها على الهرمونات النباتية مثل أندول أسيتك أسيد والجبريلك وايضا محتوى الحبوب والبذورمن الفيتامين E وايضا من الفيتامين C .

استخدمت طريقتين للتخلص من السموم أو تقليل مستواها بدون أدنى تأثير ضار على المنتجات الزراعية هما بروبيونات كالسيوم والموجات الكهرومغناطيسية في وجود عدوى بواسطة عزلة واحدة سامة من الفطر فيوزاريوم مونوليفورم رقم (٨) ، وعزلة سامة من الفطر فيوزاريوم أوكسيسبورم رقم (١٩). وأوضحت النتائج أن تركيز ٨ ، ١٠ جرام / كيلوجرام من الحبوب أو البذور من بروبيونات الكالسيوم كانت أكثر فعالية لتقليل السموم. من الجانب الأخر كانت الجرعة ٥٠٠ (Hz) هيرتز منPEF في المعمل هي المؤدية إلى أعلى نقص للسموم الكلية و كان ذلك للسموم المفرزه بواسطة عزله رقم ١٩ للفطر فيوزاريوم أوكسيسبورم ثم عزله رقم ٨ للفطر فيوزاريوم مونوليفورم وتم تطبيق هذه الطريقة على الحبوب والبذورالملقحة.

CONTENTS

		Page
INTRODUCTION		1
REVIEW OF LITERATURE		3
MATERIALS AND METHODS		22
EXPERIMENTAL RESULTS		35
1-	Isolation, purification and identification of fungi associated with:	35
	1- Maize grains:	35
	2- Cotton seeds:	36
2-	Pathogenicity test:	37
	1- Isolates obtained from maize grains	37
	2- Isolates obtained from cotton seeds	38
3-	Bioassay technique to detect toxic Fusarium isolates:	38
	1- *Fusarium moniliforme* isolates	38
	2- *Fusarium oxysporum* isolates	39
4-	Determination of produced mycotoxins and phytotoxins by some Fusarium isolates	40
5-	A quick method using specific primer to detect some Fusarium toxins	42
6-	Effect of different toxic Fusarium isolates on the chemical components of maize grains and cotton seeds	43
	1- Protein content	43
	2- Fractionation of amino acids	44
	3- Reducing, non-reducing and total soluble sugars content	46
	4- Fat content	47
	5- Fractionation of fatty acids	48
	6- Phenolic compounds content	48
	7- Fractionation of phenolic compounds	50
	8- Hydrolytic enzymes *in vitro*	52
	Oxidative enzymes *in vivo*	53
	10- Phytohormones content	54
	11- Vitamins content	55
7-	Detoxification of mycotoxins produced by *Fusarium* spp.	59
	1- Effect of different concentrations of calcium propionate *in vivo*	59
	2-1 Effect of pulsed electric fields (PEF) on toxins formation *in vitro*	63
	2-2 Effect of pulsed electric fields (PEF) on toxins production *in vivo*	65
DISCUSSION		66
SUMMARY		75
REFERENCES		78
ARABIC SUMMARY		