MENOUFIA JOURNAL OF AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY

https://mjab.journals.ekb.eg

Title of Thesis	**:**	Detection of some Trichoderma genes for biodegradation of cellulosic wastes
Name of Applicant	**:**	Mohamed Hamed Mohamed Ismaiel
Scientific Degree	**:**	M.Sc.
Department	**:**	Genetic
Field of study	**:**	Genetic
Date of Conferment	**:**	Sep. 13, 2023

Supervision Committee:

- Dr. A. M. El-Zanaty: Prof. of Genetics, Fac. of Agric., Menoufia Univ.
- Dr. Kh. S. Mohamed: Assistant Prof. of Genetics, Fac. of Agric., Menoufia Univ.

ABSTRACT: Many Trichoderma aggregate species are of economic interest because of their ability to produce hydrolytic enzymes. In this study**,** twenty isolates of *Trichoderma* were obtained from lignocellulosic agriculture wastes-rich soil collected from different Egyptian locations (Sadat, Tala, Abo Hamad, Belbeis, Zagazig, Mansoura, Belqas, Kafer-Elshikh, Bella, Tanta, Borg El Arab, Banha, Kafr Shoker, Qalyoub, Shebien Elqanater, Damanhur, Abu al-Matamir, Damietta, Kafr al-Battikh, and Kafr Saad). These isolates were first identified morphologically based on conidiophore branching type and conidium morphology. Seven isolates were found to belong to *Trichoderma Viride*: TM4, TM5, TM9, TM13, TM16, TM29, and TM42; four isolates classified as *Trichoderma Koningii*: TM6, TM8, TM18 and, TM19 and nine isolates were identified as *Trichoderma Harizianum*: TM23, TM30, TM31, TM33, TM35, TM36, TM41, TM44, and TM45.

Molecular identification based on the ITS barcode was achieved using specific primers. The sequencing data were compared with published ITS sequences on the NCBI database. The tested isolates exhibited from 98.63% to 100% identity with two species of *Trichoderma*. Seven isolates were identified as *Trichoderma longibrachiatum*: TM13, TM31, TM33, TM36, TM41, TM44 and TM45, and 11 isolates classifiedas *Trichoderma asperellum*: TM4, TM5, TM6, TM8, TM9, TM16, TM18, TM19, TM29, TM35, and TM42. Furthermore, PCR based on specific primers was employed for detection of important cellulase genes (CBH1, EGI and EGII) in the genomes of the tested *Trichoderma* isolates.

Qualitative and quantitative tests were employed for screening the cellulolytic activity of these isolates. First, the isolates were screened for cellulase production based on the clearing zone diameters. The results showed that seven isolates: TM41, TM4, TM35, TM18, TM36, TM42, and TM19, exhibited the highest hydrolysis zones. Moreover, the isolates TM8 and TM13 gave the lowest hydrolysis zones. The extracellular hydrolytic cellulases activities (FPase, β-1,4-endoglucanase (CMCase) and Xylanase) were determined in the culture supernatant of isolates grown on minimal media supplemented with sugar cane bagasse and rice straw as sole carbon sources. For Fpase activity, the isolates TM9, TM41, TM35, TM13, and TM33 exhibited the highest enzyme activities on media supplemented with rice straw. Meanwhile, the isolates TM6, TM31, TM8, and TM44 showed the lowest enzyme activities.

The isolates TM18, TM41, TM35, and TM19 showed the highest enzyme levels on media supplemented with sugarcane bagasse, whereas the isolates TM8 and TM6 gave low levels of cellulase enzymes. Regarding CMCase activity, the isolates TM44, TM31, and TM41 exhibited the highest enzyme activities on media supplemented with rice straw, whereas the isolates TM29, TM33, and TM45 showed the lowest enzyme activities. The isolates TM6, TM9, TM45, TM5, TM8, and TM35 showed the highest enzyme activities on media containing sugarcane bagasse, but the isolates TM19, TM18, and TM41 gave low levels of cellulose enzymes.

Key words: Trichoderma, cellulases activities, Fpase, Cmcase, Xylanase, CBH1, EGI and EGII.

عنعنوان الرسالة: تحديد بعض جينات فطر التريكوديرما المسؤولة عن التحلل الحيوي للمخلفات السيليولوزية

اسم الباحث : محمد حامد محمد اسماعيل

الدرجة العلمية: ماجستير فى العلوم الزراعية

القسم العلمى : الوراثة

تاريخ موافقة مجلس الكلية : ٢٠٢٣/٩/١٣

لجنة الإشراف: أ.د. عبد الفتاح مندى الزناتى أستاذ الوراثة، كلية الزراعة، جامعة المنوفية

د . خالد صلاح الدين محمـــد أستاذ الوراثة المساعد، كلية الزراعة، جامعة المنوفية

الملخص العربي

العديد من أنواع فطرالترايكوديرما ذات أهمية اقتصادية بسبب قدرتها على إنتاج الإنزيمات المحللة. في هذه الدراسة، تم الحصول على عشرين عزلة من الترايكوديرما من تربة غنية بالمخلفات الزراعية حيث تم جمعها من مواقع مصرية مختلفة وهي (السادات، تلا، بيلا، أبو حماد، بلبيس، الزقازيق، المنصورة، بلقاس، كفر الشيخ، طنطا، برج العرب، بنها، كفر شكر، قليوب، شبين القناطر، دمنهور، أبو المطامير، دمياط ، كفر البطيخ، كفر سعد). فى البداية تم تعريف هذه العزلات من الناحية المورفولوجية بناءً على نوع التفرع للهايفات وشكل الكونيديوم وقد وجد ان سبع عزلات تنتمي إلى النوع ترايكودرما فيردى وهي (TM4, TM5, TM9, TM13, TM16, TM29, TM42) وأربع عزلات صنفت على أنها ترايكودرما كونينجياى وهى (TM19, TM18, TM8, TM6)، بينما تم تحديد تسع عزلات على أنها ترايكودرما هاريزيانم وهى (TM45, TM44, TM41, TM36, TM35, TM33, TM31, TM30, TM23).

كما تم التعريف الجزيئي عن طريق تحليل تتابع تواليات منطقة (ITS) الخاصة باستخدام بادئات محددة. تمت مقارنة نتائج تحديد التواليات مع تواليات قواعد ITS المنشورة على قاعدة بياناتNCBI وأظهرت العزلات المختبرة من ٩٨,٦٣٪ إلى ١٠٠٪ مطابقة لنوعين من الترايكوديرما. وتم تعريف سبع عزلات على أنها ترايكودرما لونجبراكتيام وهى: (TM36, TM33, TM13, TM31)، واحدي عشر عزلة تم تعريفها على أنها ترايكودرما اسبيريلم وهى (TM9, TM8, TM6, TM5, TM4)، علاوة على ذلك، تم استخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) بناءً على بادئات محددة للكشف عن جينات السليولاز المهمة (CBH1, EGI, EGII) في جينومات عزلات الترايكودرما محل الدراسة. وتم استخدام الاختبارات الوصفية والكمية لفحص النشاط السيليولوزي لهذه العزلات.

أولاً تم فحص قدره العزلات لإنتاج انزيمات السليولاز بناءً على قطر الهاله. وقد أظهرت النتائج أن سبع عزلات هي (TM41, TM4, TM19, TM42, TM36, TM18, TM35,) أظهرت أعلى مناطق للتحلل السليلوزى. علاوة على ذلك، أعطت العزلات (TM8 و TM13) أقل مناطق تحلل.

ثانيا؛ تم قياس أنشطة انزيماتFPase و CMCase و Xylanase للعزلات المنماه على بيئة تحتوى على تفل قصب السكر وقش الأرز كمصدر وحيد للكربون.

بالنسبة لنشاط **Fpase**، أظهرت العزلات (TM9 و TM41 و TM35 و TM13 و TM33) أعلى أنشطة للانزيم على البيئة المحتوية على قش الأرز. بينما أظهرت العزلات (TM6 و TM31 و TM8 و TM44) أقل نشاط للإنزيم. وأظهرت العزلات (TM18 و TM41 و TM35 و (TM19 أعلى نشاط للإنزيم على البيئة المحتوية على تفل قصب السكر، بينما أعطت العزلات (TM8 و TM6) أقل نشاط للإنزيم على نفس البيئة.

اما بالنسبة لنشاط **CMCase**، أظهرت العزلات (TM44 و TM31 و TM41) أعلى نشاط إنزيم على البيئة المحتوية على قش الأرز، بينما أظهرت العزلات (TM29 و TM33 و TM45) أقل نشاط للإنزيم. كما أظهرت العزلات (TM6 و TM9 و TM45 و TM5 و TM8 و TM35) أعلى نشاط إنزيمي على البيئة المحتوية على تفل قصب السكر، بينما أعطت العزلات (TM19 و TM18 و TM41) أقل نشاط للإنزيم على نفس البيئة.

فيما يتعلق بنشاط **Xylanase**، أظهرت العزلات (TM4 و TM5 و TM18 و TM6) أعلى أنشطة الإنزيم على البيئة المكملة بقش الأرز. بينما أظهرت العزلات (TM36 و TM45) أقل فعالية للإنزيم.