توصيف العزلات السورية لفيروسي البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق وجدري الخوخ/البرقوق

فايز إسماعيل[1]، صلاح الشعبي[1]، آربين ميرتا[2] وفيتو سافينو[2]
(1) الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، ص.ب. 113، دوما دمشق، سورية؛ (2) المعهد المتوسطي الزراعي، باري، إيطاليا

الملخص

إسماعيل، فايز، صلاح الشعبي، آربين ميرتا وفيتو سافينو. 2003. توصيف العزلات السورية لفيروسي البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق وجدري الخوخ/البرقوق. مجلة وقاية النبات العربية. 21: 116-122.

اختيرت 15 عزلة من فيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق (PNRSV) مصدرها ثلاثة أنواع من اللوزيات (اللوز والدراق/الخوخ والخوخ/البرقوق) لدراسة مواصفاتها الحيوية والمصلية والجزيئية للوصول إلى دليل أولي يتعلق بتنوعها السلالي. لم تتسبب هذه العزلات من الفيروس المذكور في ظهور أعراض مرضية غير اعتيادية خاصة بكلٍ منها على النباتات الدالة العشبية أو الخشبية. وقد أكد اختبار إليزا غير المباشر انتقال فيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق من الطعم المصاب إلى غراس هجين الدراق/الخوخ "GF305" بعد أسبوعين من التطعيم. أظهرت عينة المشمش الحاملة لفيروس جدري الخوخ/البرقوق والتي أعطت تفاعلاً موجباً بواسطة إليزا أعراضاً مميزة على "GF305" مشابهة لتلك التي يحدثها الفيروس بعد مرور وقت كافٍ من عملية التطعيم. وأظهر اختبار إليزا غير المباشر لعزلات فيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق باستخدام 10 أنواع متخصصة من الأجسام المضادة الأحادية الكلون وجود اختلافات مصلية ما بين العزلات السورية، صنفت في أربع مجموعات. كما أظهر اختبار الطراز المصلي لعزلة فيروس جدري الخوخ من المشمش بطريقة الإليزا غير المباشرة وباستخدام 4 أمصال متخصصة أحادية الكلون إضافة إلى المصل المركب الشاهد وجود السلالة M. تطابقت نتائج تفاعل السلسلة المبلمرة (RT-PCR) لتسع عزلات من فيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق مع نتائج الاختبارات المصلية بعد تحليل منتجات تفاعل السلسلة المبلمرة على هلام الأكريلاميد بواسطة الرحلان الكهربائي، بينما أكدت اختبارات تحليل السلسلة الوحيدة البنية المتعددة الأشكال (SSCP) وبواسطة التقطيع المتعدد الأطوال (RFLP) التجانس الشديد ما بين العزلات المختبرة.

كلمات مفتاحية: التحليل الجزيئي، اللوزيات، إليزا، سلالة الفيروس، فيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق، فيروس جدري الخوخ/البرقوق.

المقدمة

يصيب فيروسي البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV، جنس *Ilarvirus*، عائلة *Bromoviridae*) وجدري الخوخ/البرقوق *Plum pox virus* (PPV، جنس *Potyvirus*، عائلة *Potyviridae*) أشجار اللوزيات (*Prunus* spp.) في سورية (1، 2). وأزالت عمليات استئصال أشجار اللوزيات المصابة بجدري الخوخ بؤر هذا المرض، باستثناء إصابة واحدة سجلت في المجمع الوراثي في دوما (17). ويعدّ فيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق مسؤولاً عن حدوث أمراض مهمة اقتصادياً لمعظم النباتات التابعة للجنس *Prunus*، المزروعة في العالم (13، 36). استخدمت طريقة الحقن الميكانيكي في نقل هذا الفيروس إلى النباتات العشبية الدالة المختلفة بهدف تمييز عزلاته (20). كما استخدمت إليزا ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) في تشخيص هذا الفيروس بما في ذلك تمييز السلالات (22، 24). واستخدمت الأمصال أحادية الكلون (Monoclonal antibodies) والمتعددة الكلونات (Polyclonal antibodies) في دراسة صفات السلالات المختلفة من الفيروسات التي تصيب أشجار اللوزيات (26، 27)، فأمكن تصنيف عزلات فيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق المأخوذة من الكرز الحلو إلى ثلاثة طرز مصلية مختلفة باستخدام الأمصال المتعددة الكلونات (19)، وسبق ذلك تمييز ثلاثة طرز من الفيروس نفسه في تسع عزلات مختبرة باستخدام الأمصال الأحادية الكلون (15). كما تم تمييز 17 طرازاً مصلياً مختلفاً في دراسة لاحقة نتيجة لاختبار 38 عزلة من فيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق بطريقة الإليزا غير المباشرة (DASI-ELISA) (6). وأثبتت الدراسات السابقة وجود عزلات أو سلالات من فيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق تختلف عن بعضها بصورة واسعة في خواصها الإمراضية والمصلية والفيزيائية الحيوية (10). وقد استخدم السنوات الأخيرة تفاعل السلسلة المبلمرة Polymerase chain reaction (PCR) في تشخيص عزلات فيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق (16، 33). كما استخدم تحليل Restriction fragment length polymorphism (RFLP) لمنتجات PCR، وتفاعل Single-strand conformation polymorphism (SSCP) في تصنيف العديد من سلالات الفيروسات النباتية وتمييزها (14، 18). وأثبتت دراسة حركة جزيئات الحمض النووي (RNAs) لهذا الفيروس بواسطة الرحلان الكهربائي وجود اختلافات ما بين عزلاته (9)، كما أظهرت دراسة مقارنة التسلسل والقرابة الوراثية لسلسلة الجزء الرابع من الحمض النووي (RNA-4) الخاص بفيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق والبروتين المغلف للفيروس نفسه (CPs)، توزع العزلات المختبرة في ثلاث مجموعات، هي: PV32 وPE5 وPV96 (4). وكان لاستخدام الأمصال الأحادية الكلون، وهي: AL (7)، 4DG5 (8)، AC (23) و EA 24 (21) الفضل في تمييز عزلات فيروس جدري الخوخ/البرقوق (22)، فأمكن تصنيف أربع

سلالات من الفيروس المذكور، هي: PPV-M (Marcus)، PPV-D (Dideron)، PPV-C (Cherry) وPPV-EA (El Amar) (26). وما زالت الدراسات المتعلقة بالفيروسات التي تصيب أشجار اللوزيات في سورية حديثة العهد، ومحدودة، واقتصرت أهدافها على تقدير الحالة الصحية لهذه الأشجار. وهدف هذا البحث إلى توصيف العزلات السورية من فيروسي البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق وجدري الخوخ باستخدام التقانات الحيوية والمصلية والجزيئية.

مواد البحث وطرائقه

دراسة مواصفات العزلات السورية لفيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق

الاختبارات المصلية

1. **مصادر العزلات:** استخدم 15 عزلة من فيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق، جمعت من مناطق جغرافية متباينة (مشتل الناصرية في ريف دمشق، مركز بحوث حمص ومشتل المختارية في حمص، مشتل الشيحا في حماة ومركز بابنس في حلب) من أشجار لوزيات مختلفة الأنواع (7 عزلات جمعت من 4 أصناف من اللوز، 6 عزلات جمعت من 6 أصناف من الدراق/ الخوخ و 2 عزلة جمعت من صنف واحد من الخوخ/البرقوق)، كانت قد أعطت تفاعلات موجبة في اختبار إليزا غير المباشر باستخدام مصل خليط أحادي الكلون (Cocktail-PNRSV-MAbs) وبالتطعيم أيضاً على الهجين "GF305 ".

2. **مصادر الأجسام المضادة:** استخدمت 10 أنواع مختلفة من الأجسام المضادة الأحادية الكلون في اختبار إليزا غير المباشر لتمييز عزلات فيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق وفقاً لطريقة Myrta وآخرون (24). وتم الحصول على هذه الأجسام المضادة من استخدام عزلات فيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق الإيطالية المنشأ والمعزولة من الدراق/الخوخ (6)، وهي تحمل الأرقام التالية: 41، 116، 141، 236، 294، 348، 399، 460، 503 و563. كما استخدم خليط واحد من الأجسام المضادة الأحادية الكلون (Cocktail) في الشاهد الموجب.

3. **اختبار إليزا:** اختبرت عزلات فيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق الخمس عشر بطريقة الإليزا غير المباشرة وباستخدام الأمصال العشر السابقة الذكر وفقاً لطريقة Cambra وآخرون (8).

الاختبارات الحيوية

1. استخدمت ثلاثة أنواع من النباتات الدالة العشبية، هي: *Cucumis sativus* L. و *Chenopodium quinoa* Willd و *C. amaranticolor* Cost et Reyn للتمييز ما بين العزلات السورية الخمسة عشر المختارة من فيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق، بمعدل نباتين من كل نوع لكل عزلة، وذلك لدراسة الأعراض المرضية التي تحدثها تلك العزلات والتفريق ما بينها باستخدام طريقة النقل الميكانيكي للفيروس.

2. استخدمت غراس هجين الدراق/الخوخ "GF305" وهي من النباتات الدالة الخشبية لدراسة تفاعل عزلات فيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق التي كانت قد أعطت تفاعلات موجبة على النباتات الدالة العشبية، بمعدل ثلاث غراس لكل عزلة، وباعتماد طريقة التطعيم بالرقعة (Chip budding). ثم اختبرت غراس "GF305" بعد أسبوعين من تطعيمها بواسطة إليزا غير المباشرة لتقصي انتقال الفيروس المذكور إليها. ثم نقلت الغراس المطعمة إلى الحقل المكشوف لمتابعة تطور الأعراض المرضية عليها، بعد تحضينها في البيت الزجاجي لمدة ثلاثة أشهر عند درجة حرارة 18–22 س.

الاختبارات الجزيئية

1. **عزلات الفيروس:** نفذت الاختبارات الجزيئية على تسع عزلات من فيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق، كانت تفاعلاتها موجبةً في اختبار إليزا والاختبارات الحيوية. وكانت ثلاث عزلات منها قد جمعت من الدراق/الخوخ (PE-11، PE-51 وPE-256)، وأربع من اللوز (AL 116، AL-118، AL-134 و AL-138)، وعزلتان من الخوخ/البرقوق (PL-109 وPL-115)، وهي تنتمي إلى أربع مجموعات مصلية.

2. **استخلاص الحمض النووي RNA:** تم استخلاص الحمض النووي الكلي لعزلات فيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق باستخدام السيليكا وفقاً لطريقة Foissac وآخرون المعدلة (12)، وحفظ عند درجة حرارة – 20 س.

3. **تفاعل السلسلة المبلمرة المنعكس النسخ (RT-PCR):** أتبعت تقنية تفاعل السلسلة المبلمرة المنعكس النسخ في تمييز عزلات فيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق وتوصيفها، واستخدم لذلك بادئان عشوائيان (random primers)؛ الأول PNRSV I وسلسلته 5'-TCACTCTAGATCTCAAGCAG-3'، والثاني PNRSVIII وسلسلته 5'-GACACTTTTGCGCGTACGCA-3'. تم إنتاج الحمض النووي المكمل (cDNA) المتحصل عليه في جهاز PCR لثلاثين دورة ضمن ظروف الاختبار التالية: 94 س لمدة 1.3 دقيقة، 94 س لمدة 20 ثانية، 52 س لمدة 30 ثانية، 72 س لمدة 45 ثانية و72 س لمدة 5 دقائق. حللت منتجات PCR على هلام بولي أكريلاميد 5% (Polyacrylamid gel 5%) (PAGE)، واستخدم معلّم (Marker) معروف الوزن الجزيئي لتحديد حجم منتجات RT-PCR من الحمض النووي المكمل cDNA لفيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق، ثم صبغ الهلام بنترات الفضة.

4. تحليل السلسلة الوحيدة البنية المتعددة الأشكال Single-strand conformation polymorphism analysis (SSCP): استخدمت طريقة Palacio و Duran-Vila في تحليل منتجات RT-PCR لكل عينة (25).

5. التقطيع المتعدد الأطوال Restriction fragment length polymorphism (RFLP): استخدم الأنزيمان *EcoRI* و*StyI* في اختبار التقطيع المتعدد الأطوال، وأضيفا بمعدل 0.5 ميكروغرام من كل منهما إلى منتجات RT-PCR الخاصة بكل عينة على حدةٍ. واستغرقت عملية الهضم ساعتان عند درجة حرارة 37 س. ثم وضعت العينات في هلام بولي أكريلاميد 7% في محلول منظم من Tris Borate-EDTA (TBE) لمدة ساعة، ثم صبغ الهلام بنترات الفضة.

دراسة مواصفات العزلة السورية لفيروس جدري الخوخ/ البرقوق

الاختبارات المصلية

استخدمت أربعة أمصال أحادية الكلون متخصصة في تشخيص سلالات فيروس جدري الخوخ/البرقوق، وهي: D (4DG5)، M (AL)، C (AC) و EA (EA24)، إضافة إلى المصل الأحادي الكلون الشامل Universal MAb (5B) كشاهد، باعتماد الإليزا غير المباشرة وفقاً لطريقة Myrta وآخرون (22).

الاختبارات الحيوية

استخدمت خمس غراس من هجين الدراق/الخوخ "GF305" لتأكيد نتائج اختبار إليزا غير المباشر باستخدام المصل الأحادي الكلون الشامل Universal MAb (5B) للعينة الوحيدة المأخوذة من المشمش والتي أعطت تفاعلاً موجباً.

النتائج والمناقشة

مواصفات العزلات السورية لفيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبروق

1. الخصائص المصلية

أظهر اختبار إليزا غير المباشر لـــ 15 عزلة من فيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق عدم تفاعل المصل الأحادي الكلون الخاص بالعزلة 294 مع أي من العزلات المختبرة، بينما تفاعلت الأمصال المتخصصة الأخرى (الأحادية الكلون) مع عزلة واحدة على الأقل من عزلات الفيروس المذكور. وكان تفاعل المصل الأحادي الكلون المتخصص بالعزلة 460 موجباً مع كل العزلات المختبرة للفيروس نفسه، في حين تفاعل المصلان أحادي الكلون: 503 و236 مع عزلة واحدة مختبرة من الخوخ/البرقوق (PL-115)، كما تفاعلت ثلاثة أمصال، هي 116 و141 و348 مع 12 عزلة، وثلاثة أمصال أخرى، هي: 399 و563 و41 مع 11 عزلة مختبرة من فيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق (جدول 1). وتشير النتائج السابقة إلى وجود اختلافات مصلية ما بين بعض العزلات السورية لفيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق ، صنفت في أربع مجموعات. وكان التشابه تاماً ما بين العزلات المأخوذة من أشجار اللوز (7 عزلات) وثلاث عزلات أخرى من الفيروس نفسه جمعت من أشجار الدراق/الخوخ (PE-51، PE-112، PE-256)، وهي تختلف مصلياً عن عزلات أخرى من الفيروس نفسه، جمعت من أشجار الدراق/الخوخ (PE-31، PE- 236، PE-11) والخوخ/ البرقوق (PL-109، PL-115) (جدول 1). وتشير الدراسات المرجعية إلى تمييز 34 مجموعة مصلية من فيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق، لدى اختبار 81 عزلة من الفيروس نفسه جمعت من البلدان المحيطة بالبحر الأبيض المتوسط ومن الولايات المتحدة وذلك باستخدام الأمصال الأحادية الكلون نفسها المستخدمة في هذه التجربة (24).

وتبين وجود عزلة واحدة تنتمي إلى المجموعة المصلية الثالثة لدى مقارنة العزلات السورية مع المجموعات المصلية المصنفة في تلك الدراسة، وعشرة عزلات أخرى تنتمي إلى المجموعة المصلية الثامنة. كما ظهرت مجموعتان مصليتان جديدتان من العزلات تختلفان عن تلك التي وردت في الدراسة المرجعية لـــ Myrta وآخرون (24)، و تنتمي ثلاث عزلات منها إلى المجموعة المصلية 35، وعزلة واحدة إلى المجموعة المصلية 36 (جدول 2).

2. الخصائص الحيوية

تسببت عزلات فيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق في ظهور أعراض مرضية عامة على أوراق بعض النباتات العشبية الدالة المستخدمة في الاختبار في صورة مساحات مصفرة وتبرقش، ولم تلاحظ أعراض أخرى مميزة لكل منها، تفرقها عن بعضها البعض. وتختلف عزلات هذا الفيروس في عوائلها من النباتات العشبية الدالة بصورة طفيفة، وفي الأعراض التي تحدثها استناداً إلى بعض الدراسات (37). وقد استخدمت النباتات العشبية الدالة في دراسات أخرى بهدف تمييز عزلاته (20).

سجلت أعراض مرضية عامة غير نوعية في صورة خطوط أو بقع حلقية على الأوراق الحديثة لغراس الدراق " GF305 " خلال مدة حفظها في البيت الزجاجي لمدة ثلاثة أشهر بدءاً من موعد إعدائها بعزلات فيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق عن طريق التطعيم بالرقعة، بينما أكد اختبار إليزا للغراس نفسها (GF305) بعد أسبوعين من تطعيمها بعزلات الفيروس المذكور (التي أعطت سابقاً تفاعلاً موجباً على النباتات الدالة العشبية)، انتقال عزلات فيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق إليها من الطعم، فأعطت تفاعلاً موجباً تجاه المصل الأحادي الكلون المركب (Cocktail MAb).

جدول 1. الخصائص المصلية للعزلات السورية لفيروس البقع الحقلية الميتة للخوخ/للبرقوق باستخدام الأمصال المتخصصة الأحادية الكلون.
Table 1. Reaction of Syrian *Prunus necrotic ring spot virus* isolates with ten specific monoclonal antibodies.

مصدر العزلة Origin of isolate	رقم العزلة* Isolate code*	الأمصال الأحادية الكلون المتخصصة بعزلات فيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق PNRSV- specific Monoclonal antibodies										
		116	460	294	141	348	399	563	41	503	236	خليط Cocktail
حلب Aleppo	AL-142	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+
	AL-134	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+
	AL-116	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+
	AL-118	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+
	AL-135	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+
	AL-146	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+
	AL-138	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+
حمص Homs	PE-51	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+
	PE-112	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+
	PE-256	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+
دمشق Damscus	PE-11	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	PE-31	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
حماه Hama	PE-236	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
حمص Homs	PL-109	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
	PL-115	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

* AL= لوز ، PE = دراق/خوخ ، PL= خوخ/برقوق
* AL = Almond, PE= Peach, PL= Plum

جدول 2. المجموعات المصلية التي تنتمي إليها العزلات السورية لفيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق.
Table 2. Serogroups of Syrian *Prunus necrotic ring spot virus* isolates

المجموعات المصلية Serogroups	الأمصال الأحادية الكلون المتخصصة بعزلات فيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق Reaction with PNRSV-specific monoclonal antibodies											التكرار Frequency
	41	116	141	236	294	348	399	460	503	563	خليط Cocktail	
3	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	15/1
8	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	15/10
*35	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	15/3
*36	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	15/1

* مجموعات جديدة
* New Serogroups

3. الخصائص الجزيئية

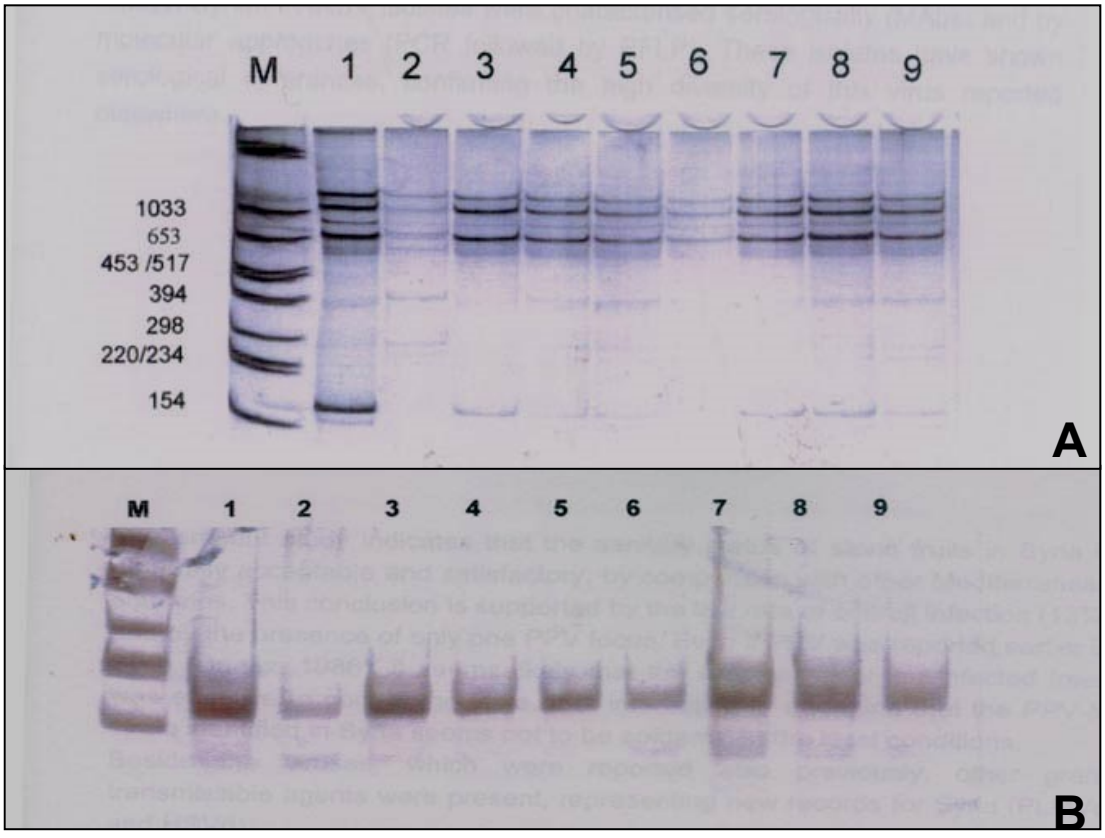
أكد تفاعل السلسلة المبلمرة (RT-PCR) لتسع عزلات من فيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق تنتمي إلى أربع مجموعات مصلية [ست عزلات تنتمي إلى المجموعة 8 (Serogoup 8)، وعزلة واحدة تنتمي إلى المجموعة 3 (Serogroup 3)، وعزلة واحدة تنتمي إلى المجموعة 35 (Serogroup 35)، وعزلة واحدة أخيرة تنتمي إلى المجموعة 36 (Serogoup 36)] تطابق نتائجه الموجبة مع نتائج الاختبارات المصلية. وتظهر هذه النتائج وجود حزمة مضخمة من الحمض النووي المكملcDNA لعزلات الفيروس المذكور بعد تحليل منتجات تفاعل RT-PCR بواسطة الرحلان الكهربائي على هلام أكريلاميد 5% (شكل 1–A). وتشير الدراسات المرجعية إلى وجود اختلاف في حركة الطبعات الأحادية السلسلة (Single-stranded transcripts) من الحمض النووي RNA والتي مصدرها العزلات المختلفة من فيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق عند تمريرها على هلام بولي أكريلاميد بالرحلان الكهربائي (32)، بينما أثبتت اختبارات SSCP وRFLP في هذا البحث التجانس الشديد ما بين عزلات الفيروس المذكور، لكون البادئ مصمماً للأغراض التشخيصية ويقع بصورة تامة في المنطقة المحافظة (Conserved region) من الحمض النووي لفيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق. ويبين الشكل B-1 التجانس الواضح في الحزم المتشكلة بالنسبة للعزلات الثمانية المنتمية للمجموعات المصلية رقم 8، 3 و 36 وتشير إليها الأرقام 1، 3، 4، 5، 6، 7، 8 و9، بينما يلاحظ اختلاف بسيط لكنه

واضح في أحد الحزم المتشكلة في العزلة المنتمية للمجموعة المصلية رقم 35 والتي يشار إليها بالرقم 2. وقد بين ترتيب السلسلة المتعددة للنيكلوتيدات وجود اختلاف طفيف متوقع في الجزء المضخم عند النهاية 3 لجين الغلاف البروتيني للفيروس (CP)، لذلك يمكن أن تتركز المحددات التي تقوم بتوليد الأجسام المضادة والمسؤولة عن السلوك المصلي المتباين لسلالات الفيروس في الجزء الطرفي الأميني للبروتين المغلف للفيروس. وقد ثبت وجود ارتباط ما بين جينات البروتين المغلف من جهة، وجين بروتين الحركة (MP) من جهة أخرى والتي تشفر بالجزء الثالث للحمض النووي (RNA-3) لفيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق والمسؤول عن تخصصية العائل. ويشير البحث في سلاسل جينات كل من البروتين المغلف (CP) وبروتين الحركة (MP) إلى حدوث تبدلات في تتابع النيكلوتيدات، ويمكن أن يكون عدد الأحماض الأمينية السبب في التباين السلالي (35). علماً أن الاختلاف في نيكلوتيد واحد وحمض أميني واحد في كل من بروتين الحركة والبروتين المغلف للفيروس يتحكم بشكل وثيق بالعلاقات المصلية ما بين عزلات الفيروس وفي نمط الأعراض التي تحدث على النبات العائل (16). وتم توزيع عزلات فيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق إلى ثلاث مجموعات مختلفة اعتماداً على مقارنة سلسلة الحمض النووي RNA-4 وتحاليل القرابة وبروتينات غلاف الفيروس (CPs) (4).

مواصفات العزلة السورية لفيروس جدري الخوخ/البرقوق

1. الخصائص المصلية

أظهر اختبار الطرز المصلية لفيروس جدري الخوخ بطريقة الإليزا غير المباشرة، تفاعل كل من المصل الأحادي الكلون الشامل (5B) والمصل الأحادي الكلون المتخصص (AL) بالسلالة M مع العزلة السورية لفيروس جدري الخوخ/البرقوق، بينما لم تتفاعل الأمصال الأحادية الكلون الخاصة بالسلالات الأخرى (4DG5 الخاص بالسلالة D، AC الخاص بالسلالة C، EA24 الخاص بالسلالة EA) مع العزلة نفسها للفيروس المذكور. وبذلك تكون العزلة السورية من فيروس جدري الخوخ/البرقوق عائدة إلى السلالة PPV-M، التي تمتاز بارتفاع شراستها وبخاصة في الدول الأوروبية (26)، بينما لم يسجل لها نشاط وبائي ملحوظ في الظروف السورية. ويعدّ هذا البحث الأول الذي يعرّف سلالة فيروس جدري الخوخ/البرقوق المعزولة من أشجار المشمش في سورية، وتتوافق هذه النتيجة مع النتائج التي سجلت في شمال الأردن حول وجود السلالة نفسها على أشجار المشمش (3)، وفي اليونان (34)، وألبانيا وقبرص وإيطاليا وتركيا (22).



شكل 1. قراءة RT-PCR (A) و SSCP (B) لعزلات فيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/للبرقوق.
العزلات وأرقامها: 1= PE-51، 2= PE-11، 3= AL-116؛ 4= PL-115، 5= AL-118، 6= PL-109، 7= PE-256، 8= AL-138؛ 9= AL-134

Figure 1. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) (A) and Single-strand conformation polymorphism analysis (SSCP) (B) of *Prunus necrotic ring spot virus* isolates. M= Marker
Isolates and their numbers: 1= PE-51, 2= PE-11, 3= AL-116, 4= PL-115, 5= AL-118, 6= PL-109, 7= PE-256, 8= AL-138, 9= AL-134.

ويعدّ جدري الخوخ من أكثر الأمراض الفيروسية ضرراً على أشجار اللوزيات في أوروبا، وبخاصة في الدول الواقعة في وسط وشرق القارة (34)، وعلى أشجار المشمش في أسبانيا (11) حيث سجلت السلالة PPV-D (5)، وهي السلالة نفسها التي سجلت في جنوب شرق فرنسا (34)، وإيطاليا وألبانيا (22، 26)، وتشيلي (31). كما سجلت السلالتان PPV-D وPPV-M على أشجار الخوخ/البرقوق في رومانيا (30)، وسلالة PPV-EA على أشجار المشمش في مصر (38)، علماً أن سلالة الفيروس PPV-D أكثر شيوعاً على أشجار المشمش والخوخ/البرقوق، بينما تكون السلالة PPV-M أكثر تردداً على أشجار الدراق/الخوخ، ولا تلعب البذور أي دور في نقل كلتا السلالتين من الفيروس نفسه (28). ويعدّ التشخيص الصحيح لسلالة فيروس جدري الخوخ غاية في الأهمية نظراً لاختلاف هذه السلالات في سلوكياتها الحيوية والوبائية (29).

2. الخصائص الحيوية

أظهرت عزلة فيروس جدري الخوخ/البرقوق المأخوذة من المشمش والتي أعطت من قبل تفاعلاً موجباً في اختبار إليزا غير المباشر، الأعراض المميزة للفيروس نفسه على هجين الدراق/الخوخ "GF305"، وشوهد تغير في لون عروق الأوراق فصارت فاتحة، كما تشوه نمو الأوراق الصغيرة، وظهرت بعض البقع على طول العروق بعد مرور وقت كاف من عملية التطعيم بالرقعة.

Abstract

Ismaeil, F., S. Al-Chaabi, A. Myrta and V. Savino. 2003. Characterization of Syrian Isolates of *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV) and *Plum pox virus* (PPV). Arab J. Pl. Prot. 21: 116-122.

To obtain preliminary evidence concerning strain diversity, 15 PNRSV isolates from three different *Prunus* hosts (Almond, Peach and Plum) were chosen for studying their biological, serological and molecular characteristics. Usualy, non-specific symptoms for each PNRSV isolate were observed on herbaceous and woody indicator plants. PNRSV transmission from infected scions to GF305 rootstocks occurred two weeks after grafting and were confirmed by indirect ELISA. The PPV ELISA-positive apricot sample was grafted on GF305 and symptoms similar to those induced by PPV were obtained. PNRSV isolates tested by DASI-ELISA using 10 PNRSV-specific MAbs showed that there were some serological differences between Syrian PNRSV isolates, which were identified as four PNRSV serogroups. DASI-ELISA using 4 serotype-specific MAbs and universal MAb (Control) showed that the PPV isolate tested belonged to the PPV-M strain. The results of RT-PCR of 9 PNRSV isolates were in a agreement with the serological data. However, single-strand conformation polymorphism (SSCP) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis confirmed substantially a high homology among all the tested PNRSV isolates.

Key words: ELISA, Molecular analysis, PNRSV, PPV, *Prunus*, virus strain.

Corresponding author: Salah Al-Chaabi, Directorate of Scientific Agricultural Research, Douma, P. O. Box 113, Damascus, Syria

References

المراجع

1. **Al-Chaabi, S., R.A. Darwesh, A. Al Saleh, J. Mando, L. Matrod and S. Numan.** 1997. Evaluation of sanitary status of stone fruit trees in Syria. Page 68. In: Abstracts of XVII International Symposium on Virus Diseases of Fruit Trees, Bethesda, USA, 1997, 68 pp.
2. **Al-Chaabi, S., R.A. Darwesh, F. Esmaeil, J. Mando, S. Numan, L. Matrod, A. Al Saleh and F. Aswad.** 2000. Assessment of the phytosanitary status of stone fruit trees and grapevine in Syria. Arab Journal of Plant Protection, 18(1): 17-23.
3. **Al Rwahnih, M., A. Myrta, B. Di Terlizzi and D. Boscia.** 2000. First record of *plum pox virus* in Jordan. Journal of Plant Pathology, 3: 243.
4. **Aparicio, F., A. Myrta, B. Di Terlizzi and V. Pallas.** 1999. Molecular variability among fifteen isolates of *Prunus necrotic ringspot* from six different *Prunus* spp. Phytopathology, 89 (11): 991-999.
5. **Asensio, M.** 1996. El virus de la sharka (*Plum pox virus*) caracterization, diagnostico y deteccin mediante anticuerpos especificos. Tesis Dotoral. Universidad Politecnica de Valencia, 112 pp.
6. **Boari, A., O. Potere, D. Boscia, C. Turturo and V. Savino.** 1998. Uso di anticorpi monoclonali per la diagnosi di ilarvirus del ciliegio. Pages 577-581. In: Atti del Convegno del Ciliegio. Valenzano (Ba), 19-21 giugno 1997.
7. **Boscia, D., H. Zeramdini, M. Cambra, O. Potere, M. T. Gorris, A. Myrta, B. Di Terlizzi and V. Savino.** 1997. Production and characterisation of a monoclonal antibody specific to the M serotype of *Plum pox potyvirus*. European Journal of Plant Pathology, 103: 477-480.
8. **Cambra, M., M. Asensio, M.T. Gorris, E. Perez, E. Camarasa, J.A. Garcia, J.J. Moya, D. Lopez-Abella, C. Vela and A. Sanz.** 1994. Detection of *Plum pox potyvirus* using monoclonal antibodies to structural and non-structural proteins. EPPO Bulletin, 24: 569-579.
9. **Crosslin, J.M. and G.I. Mink,** 1992. Biological differences among *prunus necrotic ringspot ilarviruses*. Phytopathology, 82: 200-206.
10. **Crosslin, J.M., R.W. Hammond and F.A. Hammerschlag.** 1992. Detection of *prunus necrotic ring spot virus* serotypes in herbaceous and *Prunus* hosts with a complementary RNA probe. Plant Disease, 76: 1132-1136.
11. **Dicenta, F., E. Garcia, R. Gella and P. Martinez-Gomez.** 1996. Resistencia al virus de la sharka: un character a mejorar en los albaricoqueros espanoles. Informacin. Tecnia Economica Agraria, 92 (2): 131-143.
12. **Foissac, X., L. Svanella-Dumas, M.J. Dulucq and P. Gentit.** 2001. Polyvalent detection of fruit tree Tricho, Capilo and Foveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (PDO RT-PCR). Acta Horticulturae, 550: 37-43.
13. **Fulton, R. W.** 1981. Ilarviruses. In: Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis. E. Kurstak (Editor), Elsevier, Amsterdam. Pages 277-414.
14. **Glais, L., C. Kerlan, M. Tribodet, V. Marie-Jean Tordo, C. Robaglia and S. Astier-Manifacier.** 1996. Molecular characterization of *potato virus YN* isolates

by PCR-RFLP. European Journal of Plant Pathology, 102: 655-662.

15. **Halk, E.L., H.T. Hsu, J. Aebig and J. Franke.** 1984. Production of monoclonal antibodies against three ilarviruses and *alfalfa mosaic virus* and their use in serotyping. Phytopathology, 74: 367-372.
15. **Hammond, R.W. and J.M. Crosslin.** 1998. Virulence and molecular polymorphism of *Prunus necrotic ring spot virus* isolates. Journal of General Virology, 79: 1815-1823.
17. **Ismaeil, F.** 2001. Sanitary status of stone fruits in Syria and characterisation of Syrian *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV) isolates. Thesis (Master of Science). Istituto Agronomico Mediterraneo di Bari, Italia. 37 PP.
18. **Koenig, R., P. Luddecke and A.M. Haeberle.** 1995. Detection of *beet necrotic yellow vein virus* strains, variants and mixed infection by examining single-strand conformation polymorphisms of immmmunocapture RT-PCR products. Journal of General Virology. 76: 2051-2055.
19. **Mink, G.I., W.E. Howell, A. Cole and S. Regev.** 1987. Three serotypes of *prunus necrotic ringspot virus* isolated from rugose mosaic-diseased sweet cherry trees in Washington. Plant Disease, 71: 91-93.
20. **Mink, G. I.** 1992. *Prunus necrotic ringspot virus*. *In:* Plant Diseases of international importance, Pages 335-356, Vol. 3. A. N. Mukhopadhyay (Editor), Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
21. **Myrta, A., O. Potere, D. Boscia, T. Candresse, M. Cambra and V. Savino.** 1998. Production of a monoclonal antibody specific to El Amar strain of *plum pox potyvirus*. Acta Virologica, 42: 248-250.
22. **Myrta, A., B. Di Terlizzi, D. Boscia, K. Caglayan, I. Gavriel, G. Ghanem, C. Varveri and V. Savino.** 1998. Detection and serotyping of mediterranean *plum pox virus* isolates by means of strain-specific monoclonal antibodies. Acta Virologica 42: 251-253.
23. **Myrta, A., D. Boscia, O. Potere, M. Kolber, B. Di Terlizzi, M. Cambra and V. Savino.** 2001. Existence of two serological subclusters of *plum pox virus*, strain M. European Journal of Plant Pathology, 83 (1): 45-49.
24. **Myrta, A., B. Di Terlizzi, D. Boscia, E. Choueiri, M. Gatt, I. Gavriel, K. Caglayan, C. Varveri, H. Zeramdini, F. Aparicio, V. Pallas and V. Savino.** 2001. Serological characterisation of Mediterranean *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) isolates. Journal of Plant Pathology, 83 (1): 45-49.
25. **Palacio, A. and N. Duran-Vila.** 1999. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis as a tool for viroid characterisation. Journal of Virological Methods, 77: 27-36.
26. **Pasquini, G. and M. Barba.** 1994. Serological characterization of Italian isolates of *plum pox potyvirus*. EPPO Bulletin, 24: 615-625.
27. **Pasquini, G., F. Faggioli, M. Pilotti, V. Lumia and M. Barba.** 1998. Characterisation of *apple chlorotic leaf spot virus* isolates from Italy. Acta Horticulturae, 472 (2): 195-199.
28. **Pasquini, G., A.M. Simeone, L. Conte and M. Barba.** 2000. RT-PCR evidence of the non-transmission though seed of *Plum pox virus* strains D and M. Journal of Plant Pathology, 82 (3): 221-226.
29. **Quiot, J.B., G. Labonne, M. Boeglin, C. Adamolle, L. Y. Renaud and T. Candress.** 1995. Behaviour of two isolates of *plum pox virus* inoculated on peach and apricot trees, First results. Acta Horticulture, 386: 290-297.
30. **Ravelonandro, M. and N. Minoiu.** 1998. Characterization of *Plum pox virus* infecting plum trees in North Transylvania and North Moldiva of Romania. Acta Horticulture, 472: 367-370.
31. **Rosales, M., P. Hinrichsen and G. Herrera.** 1998. Molecular characterization of *Plum pox virus* isolates from apricot, plums and peaches in Chile. Acta Horticulture, 472: 401-405.
32. **Rosner, A.L. Maslenin and S. Spiegel.** 1998. Differentiation among isolates of *prunus necrotic ringspot virus* by trancript conformatiom polymorphism. Journal of Virological Methods, 74: 109-115.
33. **Rowhani, A., M.A. Maningas, L.S. Lile, S.D. Daubert and D.A. Golino.** 1995. Development of a detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions. Phytopathology, 85: 347-352.
34. **Roy, A.S. and I.M. Smith.** 1994. *Plum pox* situation in Europe. EPPO Bulletin, 24: 515-523.
35. **Sanchez-Navarro, J.A., C.B.E.M. Reusken, J.F. Bol and V. Pallas.** 1997. Replication of *alfalfa mosaic virus* RNA3 with movement and coat protein genes replaces by corresponding genes of prunus necrotic ringspot ilarvirus. Journal of General Virology, 78: 3171-3176.
36. **Uyemoto, J. and S.W. Scott.** 1992. Important disaese of *Prunus* caused by viruses and other graft-transmissible pathogens in California and South Carolina. Plant Disease, 76 (1): 5-11.
37. **Waterworth, H.E. and R.W. Fulton.** 1964. Variations among isolates of *necrotic ringspot* and *prune dwarf viruses* isolated from sour cherry. Phytopathology, 54: 1115-1116.
38. **Wetzel, T., T. Candresse, M. Ravelonandro and J. Dunez.** 1991. A polymerase chain reaction assay adapted to *plum pox potyvirus* detection. Journal of Virological Methods, 33: 355-365.

Received: June 30, 2002; Accepted: September 15, 2002

تاريخ الاستلام: 2002/6/30، تاريخ الموافقة على النشر: 2002/9/15