

التوصيف الجزيئي لبعض العزلات السورية من فيروس موزاييك البندورة/الطماطم (ToMV)

فايز إسماعيل¹، أمين عامر حاج قاسم²، صلاح الشعبي¹ وأحمد عبد القادر³

(1) الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، إدارة بحوث وقاية النبات، دوما، ص.ب. 113، دمشق، سورية، البريد الإلكتروني: faizismail@mail.sy

(2) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة بجامعة حلب، حلب، سورية؛

(3) الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، قسم التقانات الحيوية، دوما، ص.ب. 113، دمشق، سورية.

الملخص

إسماعيل، فايز، أمين عامر حاج قاسم، صلاح الشعبي وأحمد عبد القادر. 2013. التوصيف الجزيئي لبعض العزلات السورية من فيروس موزاييك البندورة/الطماطم (ToMV). مجلة وقاية النبات العربية، 31(3): 200-207.

اختبرت 6 عزلات سورية من فيروس موزاييك البندورة/الطماطم (*Tomato mosaic virus* (ToMV، جنس *Tobamovirus*، عائلة *Virgaviridae*) بوساطة اختبار التفاعل المتسلسل للبوليميراز بعد النسخ العكسي (RT-PCR) وباستخدام زوج من البادئات المتخصصة بالفيروس، بهدف توصيف هذه العزلات ودراسة الاختلافات الوراثية فيما بينها، ومقارنتها مع عزلات من بلدان أخرى. أثبتت النتائج إمكانية إكثار قطعة من مورثة أنزيم تضاعف الـ RNA للفيروس بطول 459 زوج قاعدي. كما أوضحت نتائج تحليل التتابع النكليوتيدي لسلاسل الـ cDNA للعزلات المختبرة من الفيروس تشابهاً بنسبة 99.56-100%، بينما تراوحت نسب التماثل فيما بينها على مستوى الأحماض الأمينية ما بين 99.33 و100%. أظهرت شجرة القرابة الوراثية تماثلاً كبيراً للعزلات السورية من فيروس ToMV مع العزلات الآسيوية ومع عذلة واحدة من أستراليا بصورة خاصة، وتراوحت نسب التماثل ما بين 98 و99%. لم تُظهر العزلات السورية من فيروس ToMV تماثلاً مع عزلاته من باقي البلدان. كما تماثلت العزلات السورية من فيروس ToMV مع بعض عزلات فيروس موزاييك التبغ (*Tobacco mosaic virus* (TMV) الآسيوية أيضاً، بنسب تراوحت ما بين 81 و99%. تم إيداع تسلسل النكليوتيدات لمورثة أنزيم تضاعف الـ RNA للعزلات السورية المختبرة من فيروس ToMV في المركز الوطني لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI) وأعطيت أرقام الإدخال من JN561621 إلى JN561626.

كلمات مفتاحية: التفاعل المتسلسل للبوليميراز بعد النسخ العكسي، بندورة/طماطم، فيروس موزاييك البندورة/الطماطم، سورية.

المقدمة

البندورة/الطماطم ونوعها، الأساس الذي اعتمد في توصيف سلالات هذا الفيروس (4، 10). معظم عزلات هذا الفيروس التي مصدرها نباتات البندورة/الطماطم ذات قرابة مصلية، وتختلف فيما بينها بواحد أو اثنين فقط من مواقع مولدات الضد (Epitopes) في غلافها البروتيني (5، 10). السلالات المسجلة لفيروس ToMV عديدة، وأخذت أسماء مختلفة وفقاً للأعراض التي أحدثتها: الموزاييك الأصفر (yellow mosaic) أو أوكوبا (aucuba)، الشائعة (common)، البقعة الحلقية الفلينية (corky ring spot)، الثمرة المقشرة (crusty fruit)، الزوائد (enation)، الترقط الأسود (black fleck)، التورد (rosette)، التماوت الصيفي (summer necrosis)، الاصفرار غير النموذجي (yellow atypical)، البقعة الحلقية الصفراء (yellow ring spot) والتماوت الشتوي (winter necrosis) (4، 10). استخدمت الأجسام المضادة وحيدة الكلون (MAbs) Monoclonal Antibodies في الكشف عن فيروس ToMV وتوصيف عزلاته منذ ثمانينات القرن الماضي (7، 8، 18)، وتستخدم حالياً طرائق جزيئية مختلفة في الكشف عنه وتوصيف عزلاته، مثل: اختبار التهجين الجزيئي

يُعدّ فيروس موزاييك البندورة/الطماطم (*Tomato mosaic virus* (ToMV، جنس *Tobamovirus*، عائلة *Virgaviridae*) أحد الفيروسات المهمة التي تُصيب محصولي البندورة/الطماطم والفليفلة/الفلفل في العالم وتُحدث فيها خسائر اقتصادية كبيرة (3، 6). وقد سجّل هذا الفيروس مؤخراً ولأول مرة في سورية على محصولي البندورة/الطماطم والفليفلة/الفلفل (1، 11). جسيمات الفيروس عسوية الشكل مستقيمة (Rod-shaped)، قطرها حوالي 18 نانومتراً وطولها حوالي 300 نانومتراً (9، 16). يتكون مجين (Genome) هذا الفيروس من حمض نووي ريبوي وحيد السلسلة (ssRNA)، وهو يُمثل حوالي 5% من وزنه (10)، ويُحاط بغلاف بروتيني من نوع واحد (9). عُرفت لهذا الفيروس سلالات عديدة في الظروف الطبيعية تم عزلها من محاصيل البندورة/الطماطم والفليفلة/الفلفل والبطاطا/البطاطس وبعض أنواع الأشجار المثمرة مثل الكرز والأجاص والتفاح والعنب (4). وكانت طبيعة الأعراض التي أحدثها الفيروس على نباتات

باستخدام مجموعة اختبار جاهرة Access RT-PCR System (Cat. No. A1250) وفقاً لتعليمات الشركة الصانعة (Promega Corporation, Madison, WI, USA). أُتبعَت لائحة التدوير الحراري التالية: 45° س لمدة 45 دقيقة بهدف إجراء عملية النسخ العكسي وتركيب السلسلة الكاملة (cDNA) بدءاً من الحمض النووي الريبي الكلي المستخلص بوساطة أنزيم النسخ العكسي، بعدها 2 دقيقة عند حرارة 94° س بهدف تعطيل النسخ العكسي بتخريب الأنزيم المتبقي وفصل السلسلتين المتشكلتين RNA/cDNA وتنشيط أنزيم البوليميراز، أُتبعَت بـ 35 دورة مكونة من 1 دقيقة عند حرارة 94° س، و 45 ثانية عند حرارة 56° س، و 1 دقيقة عند حرارة 72° س. وانتهت العملية بدورة واحدة نهائية عند حرارة 72° س لمدة 5 دقائق.

الرحلان الكهربائي Electrophoresis

حُضِرَت هلامة أجاروز بتركيز 1% المذاب في محلول منظم 1X TBE Buffer (Tris-borate-EDTA)، وأضيفت مادة بروميد الإيثيديوم مباشرة إلى الهلامة بتركيز 0.5 ميكروغرام/مل من أجل صبغها. استخدم سلم قياسي ذو وزن جزيئي 100 زوج قاعدي (MW 100 bp Ladder) من إنتاج شركة Promega. تمت عملية تظهير عصابات الـ cDNA في الهلامة باستخدام جهاز توثيق الهلام (صنع شركة VILBER LOURMAT الفرنسية) وبوجود الأشعة فوق البنفسجية (UV). صُوِرَت الهلامة بعد نهاية الرحلان الكهربائي بكاميرا وحُفِظَت نسخة عن الصورة في الحاسوب.

تحديد تتابع النكليوتيدات في السلسلة الكاملة Sequencing

أُرسلت السلاسل الكاملة cDNA للعزلات السورية الست المدروسة من فيروس ToMV بمعدل 10 ميكروليتر لكل عزلة، إلى فرع شركة LGC البريطانية في برلين، ألمانيا (LGC Genomics GmbH) لتحديد تتابع نكليوتيداتها. أُجِري اختبار التفاعل المتسلسل للبوليميراز (PCR) للسلسلة الكاملة cDNA الناتجة عن اختبار RT-PCR لكل عزلة على حدة باستخدام البادئة الموافقة (Forward primer) المتخصصة بالفيروس، ثم تمت عملية تنقية لنواتج تفاعل PCR قبل تحميلها في جهاز محدد التتابع النكليوتيدي (Sequencer). تم تجميع قراءات الجهاز الخاصة بتحديد التتابع النكليوتيدي للعزلات السورية من الفيروس ومعالجتها ببرامج حاسوبية خاصة تسمح بالحصول على التتالي المطلوب على شكل نصي يمكن تحليله بوساطة برامج المعلوماتية الحيوية (Bioinformatics analysis) (اللاحقة).

(Molecular Hybridization) (15)، واختبار التفاعل المتسلسل للبوليميراز بعد النسخ العكسي Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) (16، 17).

هدف هذا البحث إلى توصيف بعض العزلات السورية من فيروس ToMV باستخدام الطرائق الجزيئية ومقارنتها مع العزلات العالمية.

مواد البحث وطرائقه

العزلات الفيروسية واستخلاص الحمض النووي الريبي RNA

تم اختيار 6 عزلات محلية من فيروس ToMV جُمِعت أثناء المسح الحقلية الذي تم إجرائه خلال الفترة 2007-2010 (1) من ثلاث محافظات سورية، هي: درعا (3 عزلات، اثنتان من الفليفلة/الفلفل وعزلة واحدة من البندورة/الطماطم)، القنيطرة (عزلات من البندورة/الطماطم) وعزلة واحدة من محافظة ريف دمشق من البندورة/الطماطم، لإجراء التوصيف الجزيئي لها بوساطة اختبار RT-PCR.

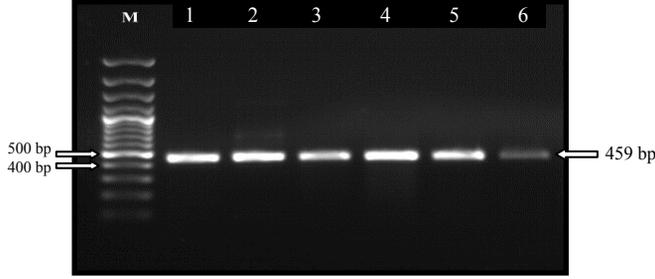
تم استخلاص الحمض النووي الريبي الكلي (RNA) من أوراق وثمار مجفدة ومحفوظة عند درجة حرارة -20° س باستخدام مادة الترايزول (Trizol reagent) من إنتاج شركة Invitrogen وفقاً لتعليمات الشركة الصانعة.

اختبار التفاعل المتسلسل للبوليميراز مع النسخ العكسي RT-PCR

نُقِدَ هذا الاختبار بمرحلة واحدة (One step RT-PCR) في مختبر البيولوجيا الجزيئية التابع لإدارة بحوث وقاية النبات في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية خلال عام 2010 بهدف تحديد التسلسل النكليوتيدي للعزلات الست المختبرة من فيروس ToMV. استخدم لهذا الغرض زوج من البادئات المتخصصة بمورثة أنزيم تضاعف الـ RNA الخاص بالفيروس (RNA Polymerase Gene)، وهما: 1F: 5'-TGC AGC AAA GGT AAT AGT AG-3' (الموقع: 1841-1860) و 1R: 5'-CCG AAC TTT TAG CGA GTT TC-3' (الموقع: 2280-2299). صُممت هاتين البادئتين من قبل Galipienso و Aramburu (2) اعتماداً على تسلسل نكليوتيدات كامل مجين سلالة الكاميليا (Camellia strain) من فيروس ToMV المدرجة في موقع NCBI برقم إدخال AJ417701 لإكثار قطعة DNA بطول 459 زوج قاعدي. تم تصنيع السلسلة الكاملة cDNA من سلسلة RNA المفردة المستخلصة من العزلات الست بإجراء تفاعل النسخ العكسي بوساطة أنزيم النسخ العكسي Reverse Transcriptase

تحليل تتابع النكليوتيدات بواسطة الحاسوب

استخدمت برامج حاسوبية متخصصة في معالجة البيانات الحيوية التي تم الحصول عليها من سلسلة الـ cDNA، حيث تم قراءة وتحليل نتائج تحديد التتابع النكليوتيدي لمورثة أنزيم تضاعف الـ RNA لعزلات فيروس ToMV باستخدام برنامج Chromas (Version 2.33). كما تمت المقارنة فيما بينها وتحديد نسب التشابه والاختلافات في تتابع نكليوتيداتها بعد رصف التتابعات (Sequence alignment) باستخدام برنامج حاسوبي آخر (Clustal X2). كما تم إنشاء شجرة القرابة الوراثية (Phylogenetic tree) باستخدام موقع NCBI على الشبكة العنكبوتية، وتمت مقارنة هذه العزلات مع عزلات عالمية أخرى للفيروس تم الحصول عليها من مدخلات موقع NCBI باستخدام البرنامج BLASTN 2.2.25+ (20). تم إيداع تسلسل نكليوتيدات عزلات الفيروس في موقع المركز الوطني لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI) في الولايات المتحدة الأمريكية وأعطيت أرقام إدخال خاصة (Accession numbers).



شكل 1. نواتج اختبار RT-PCR لمورثة أنزيم تضاعف الـ RNA من ست عزلات سورية من فيروس ToMV بعد عزلها على هلامه أجاروز بنسبة 1%، M: سلم وزن جزيئي 100 زوج قاعدي، 1-6: عُصابات (Bands) بحجم 459 زوج قاعدي للعزلات المختبرة

Figure 1. Amplified segment of the RNA polymerase gene for six Syrian isolates of ToMV by RT-PCR and separation on 1% Agarose. M: 100 bp molecular ladder bands. Lanes 1-6: 459 bp bands of the six ToMV isolates

النتائج والمناقشة

ورُسمت شجرة القرابة الوراثية (Phylogenetic tree) للعزلات السورية من فيروس ToMV وتمت مقارنتها مع مثيلاتها من باقي دول العالم من خلال موقع المركز الوطني لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI) على الشبكة العنكبوتية باستخدام البرنامج BLASTN 2.2.25+. أظهرت الشجرة تماثلاً كبيراً للعزلات السورية من فيروس ToMV مع العزلات الآسيوية بصورة خاصة ومع عزلة واحدة من أستراليا، ولم تُظهر تماثلاً مع عزلات الفيروس نفسه من باقي البلدان، وتراوحت نسب التماثل ما بين 98 و99%. كما تماثلت العزلات السورية من فيروس ToMV مع بعض عزلات فيروس موزايك التبغ *Tobacco mosaic virus* (TMV)، جنس *Tobamovirus*، عائلة *Virgaviridae* الآسيوية أيضاً، بنسب تراوحت ما بين 81 و99%. كما أظهرت شجرة القرابة الوراثية وجود عنقودين رئيسيين، توزعت في العنقود الأول العزلات السورية الست المختبرة من فيروس ToMV مع بعض العزلات الآسيوية وعزلة واحدة من أستراليا من الفيروس نفسه، ومع بعض العزلات الآسيوية أيضاً من فيروس TMV، بينما ضم العنقود الثاني عزلة واحدة من فيروس TMV (EF 392659) مصدرها تاوان، وبعض عزلات فيروس التبرقش المعتدل على الفليفلة/الفلفل *Pepper mild mottle virus* (PMMoV)، جنس *Tobamovirus*، عائلة *Virgaviridae*، وتراوحت نسبة التماثل معها ما بين 79 و81% (جدول 2 وشكل 3).

أمكن الكشف جزيئياً عن العزلات السورية الست المدروسة من فيروس ToMV بواسطة اختبار RT-PCR وباستخدام زوج من البادئات المتخصصة به، وهما البادئتان IF وIR اللتان تحددان قطعة بطول 459 زوج قاعدي من مورثة أنزيم تضاعف الـ RNA. أظهرت نتائج اختبار التفاعل المتسلسل للبوليميراز تطابق أطوال قطع الـ DNA التي تم ترحيلها على هلامه الأجاروز مع طول القطعة المتوقعة التي تحدها كل من البادئتين المستخدمتين (شكل 1).

تم تحديد تتابع النكليوتيدات في السلسلة المكتملة للعزلات الست المختبرة وتم إيداعها في بنك المورثات الدولي التابع للمركز الوطني لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI) في الولايات المتحدة الأمريكية تحت الأرقام المتسلسلة من JN561621 إلى JN561626. وأظهر تحليل التتابع النيوكليوتيدي للعزلات المدروسة تشابهاً بنسبة 99.56 إلى 100% (شكل 2). وتراوحت نسبة التماثل على مستوى الأحماض لأمينية ما بين 99.33 و100% (جدول 1)، الأمر الذي يُشير إلى تماثل عالٍ ما بين عزلات الفيروس المختبرة من الناحية الوراثية رغم تنوع مصادرها الجغرافية (محافظة درعا والقنيطرة وريف دمشق).

SY-ToMV877: (JN561621) TGCAGCAAAGGTAATAGTAGCAGTTATGAGCAACGACAGTGGTCTTACTCTCACGTTTGA 60
SY-ToMV875: (JN561622) TGCAGCAAAGGTAATAGTAGCAGTTATGAGCAACGAGAGTGGTCTTACTCTCACGTTTGA 60
SY-ToMV780: (JN561623) TGCAGCAAAGGTAATAGTAGCAGTTATGAGCAACGAGAGTGTCTTACTCTCACGTTTGA 60
SY-ToMV775: (JN561624) TGCAGCAAAGGTAATAGTAGCAGTTATGAGCAACGAGAGTGGTCTTACTCTCACGTTTGA 60
SY-ToMV279: (JN561625) TGCAGCAAAGGTAATAGTAGCAGTTATGAGCAACGAGAGTGGTCTTACTCTCACGTTTGA 60
SY-ToMV13: (JN561626) TGCAGCAAAGGTAATAGTAGCAGTTATGAGCAACGAGAGTGGTCTTACTCTCACGTTTGA 60

SY-ToMV877: (JN561621) ACAGCCACCGAAGCTAATGTTGCGTAGCATTGCAAGATTCTGAAAAGGCTTCTGATGG 120
SY-ToMV875: (JN561622) ACAGCCACCGAAGCTAATGTTGCGTAGCATTGCAAGATTCTGAAAAGGCTTCTGATGG 120
SY-ToMV780: (JN561623) ACAGCCACCGAAGCTAATGTTGCGTAGCATTGCAAGATTCTGAAAAGGCTTCTGATGG 120
SY-ToMV775: (JN561624) ACAGCCACCGAAGCTAATGTTGCGTAGCATTGCAAGATTCTGAAAAGGCTTCTGATGG 120
SY-ToMV279: (JN561625) ACAGCCACCGAAGCTAATGTTGCGTAGCATTGCAAGATTCTGAAAAGGCTTCTGATGG 120
SY-ToMV13: (JN561626) ACAGCCACCGAAGCTAATGTTGCGTAGCATTGCAAGATTCTGAAAAGGCTTCTGATGG 120

SY-ToMV877: (JN561621) GGCGTTGGTAGTTACCTCAAGAGATGTTGAGGAACCGTCCATAAAAGGTTTCGATGGCCCG 180
SY-ToMV875: (JN561622) GGCGTTGGTAGTTACCTCAAGAGATGTTGAGGAACCGTCCATAAAAGGTTTCGATGGCCCG 180
SY-ToMV780: (JN561623) GGCGTTGGTAGTTACCTCAAGAGATGTTGAGGAACCGTCCATAAAAGGTTTCGATGGCCCG 180
SY-ToMV775: (JN561624) GGCGTTGGTAGTTACCTCAAGAGATGTTGAGGAACCGTCCATAAAAGGTTTCGATGGCCCG 180
SY-ToMV279: (JN561625) GGCGTTGGTAGTTACCTCAAGAGATGTTGAGGAACCGTCCATAAAAGGTTTCGATGGCCCG 180
SY-ToMV13: (JN561626) GGCGTTGGTAGTTACCTCAAGAGATGTTGAGGAACCGTCCATAAAAGGTTTCGATGGCCCG 180

SY-ToMV877: (JN561621) TGGTGAGTTACAATTGGCCGGATTATCTGGCGACGTTCTGAATCTTCATACACTAGGAG 240
SY-ToMV875: (JN561622) TGGTGAGTTACAATTGGCCGGATTATCTGGCGACGTTCTGAATCTTCATACACTAGGAG 240
SY-ToMV780: (JN561623) TGGTGAGTTACAATTGGCCGGATTATCTGGCGACGTTCTGAATCTTCATACACTAGGAG 240
SY-ToMV775: (JN561624) TGGTGAGTTACAATTGGCCGGATTATCTGGCGACGTTCTGAATCTTCATACACTAGGAG 240
SY-ToMV279: (JN561625) TGGTGAGTTACAATTGGCCGGATTATCTGGCGACGTTCTGAATCTTCATACACTAGGAG 240
SY-ToMV13: (JN561626) TGGTGAGTTACAATTGGCCGGATTATCTGGCGACGTTCTGAATCTTCATACACTAGGAG 240

SY-ToMV877: (JN561621) CGAGGAGATTGAGTCTCTCGAGCAGTTTCATATGGCAACAGCTAGTTCGTTAATTCATAA 300
SY-ToMV875: (JN561622) CGAGGAGATTGAGTCTCTCGAGCAGTTTCATATGGCAACAGCTAGTTCGTTAATTCATAA 300
SY-ToMV780: (JN561623) CGAGGAGATTGAGTCTCTCGAGCAGTTTCATATGGCAACAGCTAGTTCGTTAATTCATAA 300
SY-ToMV775: (JN561624) CGAGGAGATTGAGTCTCTCGAGCAGTTTCATATGGCAACAGCTAGTTCGTTAATTCATAA 300
SY-ToMV279: (JN561625) CGAGGAGATTGAGTCTCTCGAGCAGTTTCATATGGCAACAGCTAGTTCGTTAATTCATAA 300
SY-ToMV13: (JN561626) CGAGGAGATTGAGTCTCTCGAGCAGTTTCATATGGCAACAGCTAGTTCGTTAATTCATAA 300

SY-ToMV877: (JN561621) GCAGATGTGTTTCGATCGTGTACACGGGCCCTCTTAAAGTTCAACAAATGAAAACTTTAT 360
SY-ToMV875: (JN561622) GCAGATGTGTTTCGATCGTGTACACGGGCCCTCTTAAAGTTCAACAAATGAAAACTTTAT 360
SY-ToMV780: (JN561623) GCAGATGTGTTTCGATCGTGTACACGGGCCCTCTTAAAGTTCAACAAATGAAAACTTTAT 360
SY-ToMV775: (JN561624) GCAGATGTGTTTCGATCGTGTACACGGGCCCTCTTAAAGTTCAACAAATGAAAACTTTAT 360
SY-ToMV279: (JN561625) GCAGATGTGTTTCGATCGTGTACACGGGCCCTCTTAAAGTTCAACAAATGAAAACTTTAT 360
SY-ToMV13: (JN561626) GCAGATGTGTTTCGATCGTGTACACGGGCCCTCTTAAAGTTCAACAAATGAAAACTTTAT 360

SY-ToMV877: (JN561621) AGACAGCCTGGTAGCCTCGCTCTCTGCTGCGGTGTGCAATCTAGTGAAGATCCTAAAAGA 420
SY-ToMV875: (JN561622) AGACAGCCTGGTAGCCTCGCTCTCTGCTGCGGTGTGCAATCTAGTGAAGATCCTAAAAGA 420
SY-ToMV780: (JN561623) AGACAGCCTGGTAGCCTCGCTCTCTGCTGCGGTGTGCAATCTAGTGAAGATCCTAAAAGA 420
SY-ToMV775: (JN561624) AGACAGCCTGGTAGCCTCGCTCTCTGCTGCGGTGTGCAATCTAGTGAAGATCCTAAAAGA 420
SY-ToMV279: (JN561625) AGACAGCCTGGTAGCCTCGCTCTCTGCTGCGGTGTGCAATCTAGTGAAGATCCTAAAAGA 420
SY-ToMV13: (JN561626) AGACAGCCTGGTAGCCTCGCTCTCTGCTGCGGTGTGCAATCTAGTGAAGATCCTAAAAGA 420

SY-ToMV877: (JN561621) TACAGCTGCGATTGACCTTGAAACTCGTCAAAAGTTTCGG 459
SY-ToMV875: (JN561622) TACAGCTGCGATTGACCTTGAAACTCGTCAAAAGTTTCGG 459
SY-ToMV780: (JN561623) TACAGCTGCGATTGACCTTGAAACTCGTCAAAAGTTTCGG 459
SY-ToMV775: (JN561624) TACAGCTGCGATTGACCTTGAAACTCGTCAAAAGTTTCGG 459
SY-ToMV279: (JN561625) TACAGCTGCGATTGACCTTGAAACTCGTCAAAAGTTTCGG 459
SY-ToMV13: (JN561626) TACAGCTGCGATTGACCTTGAAACTCGTCAAAAGTTTCGG 459

شكل 2. التسلسل النيوكليوتيدي لمورثة أنزيم تضاعف الـ RNA لست عزلات سورية من فيروس ToMV والاختلافات في التركيب الوراثي فيما بينها.
Figure 2. Variability in nucleotide sequence of the amplified 459 bp bands of the RNA polymerase gene among six Syrian ToMV isolates.

جدول 1. تسلسل الأحماض الأمينية لمورثة أنزيم تضاعف الـ RNA لست عزلات سورية من فيروس ToMV والاختلافات فيما بينها.

Table 1. Variability in amino acids sequences of the RNA polymerase gene among six ToMV isolates from Syria.

| تسلسل الأحماض الأمينية Amino acids sequences | رمز العزلة ورقم الإدخال في NCBI Isolate code and NCBI number |
|--|---|
| AAKVIVAVMSN D SGLTLTFEQPTEANVALALQDSEKASDGALVVTSRDVE EPSIKGSMARGELQLAGLSGDVPESSYTRSEEIESLEQFHMATASSLIHKQ MCSIVYTGPLKVVQQMKNFIDSLVASLSAAVSNLVKILKDTAAIDLETRQKF | SY-ToMV-877 (JN561621) |
| AAKVIVAVMSNESGLTLTFEQPTEANVALALQDSEKASDGALVVTSRDVE EPSIKGSMARGELQLAGLSGDVPESSYTRSEEIESLEQFHMATASSLIHKQ MCSIVYTGPLKVVQQMKNFIDSLVASLSAAVSNLVKILKDTAAIDLETRQKF | SY-ToMV-875 (JN561622) |
| AAKVIVAVMSNES A LTLTFEQPTEANVALALQDSEKASDGALVVTSRDVE EPSIKGSMARGELQLAGLSGDVPESSYTRSEEIESLEQFHMATASSLIHKQ MCSIVYTGPLKVVQQMKNFIDSLVASLSAAVSNLVKILKDTAAIDLETRQKF | SY-ToMV-780 (JN561623) |
| AAKVIVAVMSNESGLTLTFEQPTEANVALALQDSEKASDGALVVTSRDVE EPSIKGSMARGELQLAGLSGDVPESSYTRSEEIESLEQFHMATASSLIHKQ MCSIVYTGPLKVVQQMKNFIDSLVASLSAAVSNLVKILKDTAAIDLETRQKF | SY-ToMV-775 (JN561624) |
| AAKVIVAVMSNESGLTLTFEQPTEANVALALQDSEKASDGALVVTSRDVE EPSIKGSMARGELQLAGLSGDVPESSYTRSEEIESLEQFHMATASSLIHKQ MCSIVYTGPLKVVQQMKNFIDSLVASLSAAVSNLVKILKDTAAIDLETRQKF | SY-ToMV-279 (JN561625) |
| AAKVIVAVMSNESGLTLTFEQPTEANVALALQDSEKASDGALVVTSRDVE EPSIKGSMARGELQLAGLSGDVPESSYTRSEEIESLEQFHMATASSLIHKQ MCSIVYTGPLKVVQQMKNFIDSLVASLSAAVSNLVKILKDTAAIDLETRQKF | SY-ToMV-13 (JN561626) |

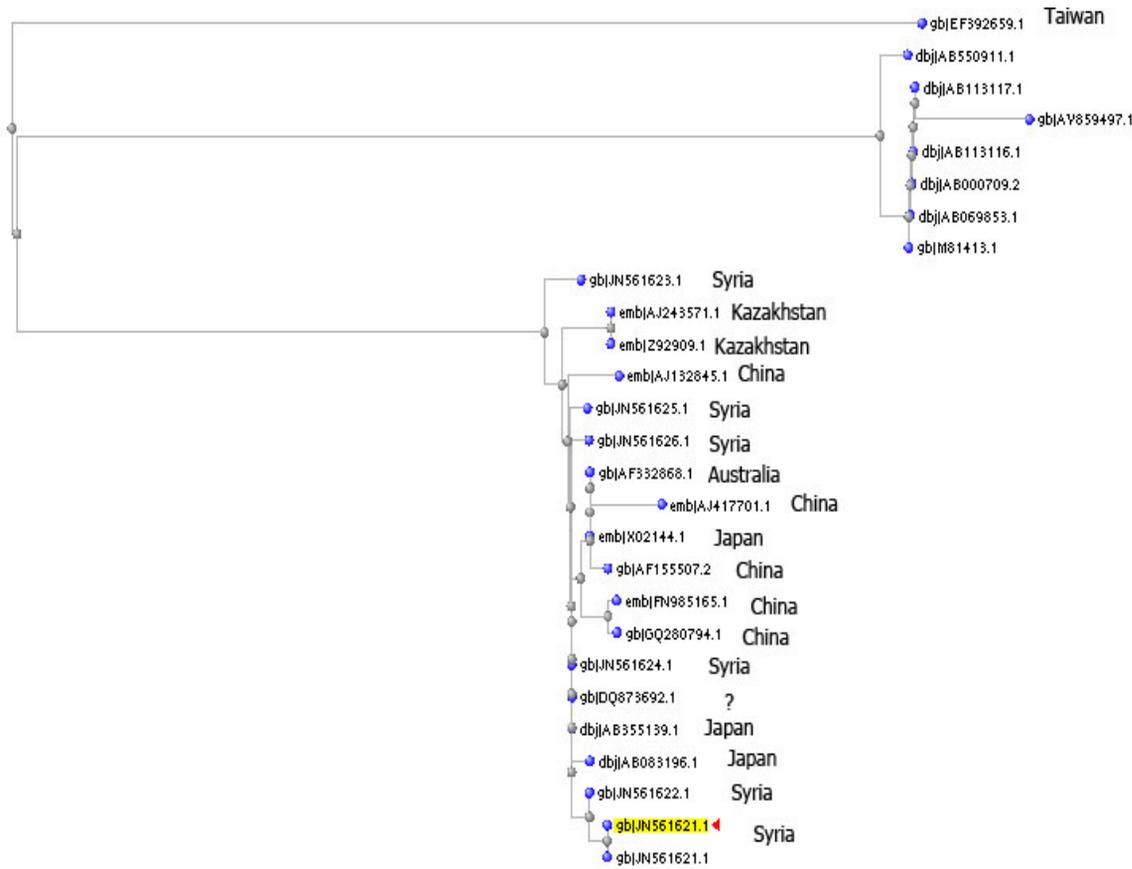
جدول 2. النسب المئوية لتمامات تسلسل نيكليوتيدات مورثة أنزيم تضاعف الـ RNA للعزلات السورية من فيروس ToMV مع بعض العزلات الأخرى من بلدان مختلفة.

Table 2. Homology in nucleotide sequences of the RNA polymerase gene among the Syrian ToMV isolates compared with isolates from different regions of the world.

| نسبة التماثل % Homology % | رقم الإدخال في NCBI NCBI Number | Origin | المصدر | Isolate name | اسم العزلة | التسلسل Serial |
|------------------------------|------------------------------------|------------|----------|----------------------------|------------|-------------------|
| 99 | AB355139 | Japan | اليابان | Strian: L11Y | | 1 |
| 99 | AB083196 | Japan | اليابان | L11A-Fukushima | | 2 |
| 99 | X02144 | Japan | اليابان | OM Strain (Tomato Strain)* | | 3 |
| 99 | FN985165 | China | الصين | XJT-1 | | 4 |
| 99 | AF155507 | China | الصين | Tomato Strian* | | 5 |
| 99 | AF332868 | Australia | أستراليا | Queensland | | 6 |
| 99 | DQ873692 | - | - | Strain: ToMV1-2 | | 7 |
| 98 | AJ132845 | China | الصين | S-1 | | 8 |
| 98 | GQ280794 | China | الصين | Strain: N5 | | 9 |
| 98 | AJ417701 | China | الصين | Camellia Strain | | 10 |
| 98 | AJ243571 | Kazakhstan | كازخستان | K1* | | 11 |
| 98 | Z92909 | Kazakhstan | كازخستان | K2* | | 12 |
| 81 | EF392659 | Taiwan | تايوان | Pet-TW Strain* | | 13 |

* = Isolates from *Tobacco mosaic virus* (TMV)

* = عزلات من فيروس موزاييك التبغ TMV



شكل 3. شجرة القرابة الوراثية ما بين العزلات السورية الست المختبرة من فيروس ToMV مقارنة مع عزلات من دول مختلفة. **Figure 3.** Phylogenetic tree showing relatedness among the Syrian ToMV isolates as compared with ToMV isolates from other parts in the world.

البنودرة/الطماطم (19). وتم حديثاً في الصين تحديد التابع النكليوتيدي الكامل لعزلتين من فيروس ToMV مصدرهما نبات البنودرة/الطماطم ونبات الكاميليا، وأعطيتا رقمي إدخال في البنك الوراثي (AJ417701 وAJ132845)، وقد أظهر تحليل التابع النكليوتيدي تشابه هاتين العزلتين مع باقي عزلات فيروس ToMV بنسبة تجاوزت 92% وكانت أقل من 80% مع باقي الفيروسات التابعة للجنس *Tobamovirus* (12). واستخدم اختبار RT-PCR بنجاح في جمهورية مصر العربية للكشف عن عزلات محلية من فيروس ToMV (16، 17). وتم تطوير اختبار التفاعل المتسلسل للبوليميراز مع النسخ العكسي وبوساطة الالتقاط المناعي [Immunocapture (IC) RT-PCR] للكشف عن عزلات فيروس ToMV في عوائل نباتية مختلفة وفي عينات من الماء ومن التربة، كما تم الكشف عن الفيروس ذاته في تراكيز منخفضة جداً (1-10 pg/ml) مقارنة ببعض الاختبارات المصلية كاختبار إليزا (1 ng/ml) (13). واستخدم اختبار RT-PCR بوساطة أزواج من البادئات المتخصصة أيضاً للكشف والتفريق ما بين خمسة فيروسات منها فيروس ToMV وهي ترتبط فيما بينها بعلاقة مصلية وتابعة

أظهرت نتائج الكشف الجزيئي للعزلات السورية الست من فيروس ToMV المتحصل عليها في هذا البحث بوساطة اختبار RT-PCR وباستخدام زوج من البادئات المتخصصة بالفيروس (1R و1F) إمكانية إكثار قطعة بطول 459 زوج قاعدي من مورثة تضاعف الـ RNA، وهذا يتطابق مع النتيجة التي حصل عليها Galipienso وAramburu (2) في إسبانيا باختبار عزلة إسبانية من الفيروس نفسه أصابت صنف البنودرة/الطماطم Marmande، وتم الحصول على منتجات PCR (cDNA) بنفس الحجم. يشير عدم وجود اختلافات وراثية ما بين العزلات السورية من فيروس ToMV إلى أنها لم تتطور على المستوى الجزيئي، وعُزي ذلك لعدم وجود ضغط انتخابي من قبل الأصناف المقاومة لهذا الفيروس وذلك لندرة هذه الأصناف في سورية، وبالتالي لم تؤدي إلى حدوث طفرات في مجينه. وأظهر تحليل تتابع النكليوتيدات باستخدام برنامج Blast على موقع (NCBI) تماثلاً كبيراً بنسبة 99.63% للسلاسل السورية من فيروس ToMV مع السلالة L11A (AB083196) التي تغلبت على المورثة *Tm-2* المسؤولة عن صفة المقاومة إزاء هذا الفيروس في نباتات

أخرى من باقي المحافظات التي ينتشر فيها هذا الفيروس، والعمل على تحديد وتوصيف سلالاته المنتشرة في سورية باستخدام التقانات الجزيئية الحديثة.

للجنس *Tobamovirus* (14). إن النتائج الأولية المتحصل عليها من خلال هذا البحث حول الطبيعة الوراثية لعدد قليل من العزلات المحلية من فيروس ToMV والاختلافات فيما بينها وبين العزلات العالمية الأخرى من دول متعددة، يستدعي توسيع نطاق البحث ليشمل عزلات

Abstract

Ismaeil, F., A. A. Haj Kasem, S. Al-Chaabi and A. Abdulkader. 2013. Molecular characterization of some Syrian isolates of *Tomato mosaic virus*. Arab Journal of Plant Protection, 31(3): 200-207.

Six Syrian isolates of *Tomato mosaic virus* (ToMV, Genus *Tobamovirus*, Family *Virgaviridae*) were tested by RT-PCR using specific primer pairs of the virus, in order to characterize these isolates and study the genetic variation among them and to compare them with other isolates from different countries. Results showed that a 459 bp fragment of the RNA polymerase gene was amplified. Results of cDNA sequence analysis of the tested isolates of the virus had 99.56 to 100% sequence homology, whereas, homology at the amino acids level ranged between 99.33 and 100%. The phylogenetic tree showed high similarity between Syrian ToMV isolates and Asian isolates and one isolate from Australia, and the homology level ranged between 98 and 99%. The homology between Syrian ToMV isolates and some Asian ToMV isolates ranged between 81 and 99%. The sequences of RNA polymerase gene of the tested Syrian ToMV isolates were deposited at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) under accession numbers from JN561621 to JN561626.

Keywords: RT-PCR, Syria, Tomato, ToMV.

Corresponding author: F. Ismaeil, General Commission for Scientific Agricultural Research, Douma, P.O. Box 113, Damascus, Syria, Email: faizismail@mail.sy

References

المراجع

1. إسماعيل، فايز، أمين عامر حاج قاسم وصلاح الشعيبي. 2011. انتشار وتوزيع فيروس موزاييك البندورة/الطماطم على محصولي البندورة/الطماطم والفليفلة/الفلفل في سورية ودراسة انتقاله بواسطة البذور. مجلة وقاية النبات العربية، 29: 21-28.
2. Aramburu, J. and L. Galipienso. 2005. First report in Spain of a variant of *Tomato mosaic virus* (ToMV) overcoming the Tm-22 resistance gene in tomato (*Lycopersicon esculentum*). Plant Pathology, 54: 566.
3. Broadbent, L. 1976. Epidemiology and control of *Tomato mosaic virus*. Annual Review of Phytopathology, 14: 75-96.
4. Brunt, A.A. 1988. *Tomato mosaic virus*. Pages: 181-204. In: The Plant Viruses. Volume 2, The Rod-Shaped Viruses. M.H.V. van Regenmortel, H. Fraenkel-Conrat (eds). New York, USA: Plenum Press.
5. Burgyan, J., L. Beczner and R. Gaborjanyi. 1978. Relationship among some tobamo-viruses I. A symptomatological and serological comparison. Acta Phytopath Hung, 13: 75-85.
6. Candilo, M., G. Faccioli, G. Grassi and V. Faeti. 1992. Effect of *Tomato mosaic virus* (ToMV) on yield of machine-harvested processing tomatoes. Phytopathologia Mediterranea, 31: 32-36.
7. Dekker, E.L., I. Dore, C. Porta and M.H.V. van Regenmortel. 1987. Conformational specificity of monoclonal antibodies used in the diagnosis of *Tomato mosaic virus*. Archives of Virology, 94: 191-203.
8. Duarte, K.M.R., L.H. Gomes, J. Gesztesi, J.D. Lopes and F.C.A. Tavares. 2001. Monoclonal antibodies to identify *Tomato mosaic tobamovirus* (TOMV). Brazilian Journal of Microbiology, 32: 240-242.
9. El-Afifi, S.I., A.S. Sadik, M.H. Abdel-Ghaffar and A.M. El-Borollosy. 2004. Molecular characterization of an Egyptian isolate of *Tomato mosaic Tobamovirus*. Annals of Agricultural Science, 49: 467-483.
10. Hollings, M., and H. Huttinga. 1976. *Tomato mosaic virus*. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, 156. Wellesbourne, UK: Association of Applied Biologists, 6 pp.
11. Ismaeil, F., A. Haj Kassem and S. Al-Chaabi. 2012. First report of *Tomato mosaic virus* on tomato and pepper in Syria. Journal of Plant Pathology, Supplement 4, 94: pS4.90.
12. Hu, Q., T. Jiang, C. Xue and X. Zhou. 2012. Characterization and complete nucleotide sequence of two isolates of *Tomato mosaic virus*. Journal of Phytopathology, 160: 115-119.
13. Jacobi, V., G.D. Bachand, R.C. Hamelin and J.D. Castello. 1998. Development of a multiplex immunocapture RT-PCR assay for detection and differentiation of *Tomato and Tobacco mosaic tobamoviruses*. Journal of Virological Methods, 74: 167-178.
14. Letschert, B., G. Adama, D.E. Lesemann, P. Willingmann and C. Heinze. 2002. Detection and differentiation of serologically cross-reacting tobamoviruses of economical importance by RT-PCR and RT-PCR-RFLP. Journal of Virological Methods, 106: 1-10.
15. Palukaitis, P. and R.H. Symons. 1980. Nucleotide sequence homology of thirteen *tobamovirus* RNAs as determined by hybridization analysis with complementary DNA. Virology, 107: 354-361.

tomato strain of Tobacco mosaic virus detected by monoclonal antibodies. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 55: 179-186.

19. **Yamamoto, H., T. Abe, K. Ueda, M. Inoue and T. Matsumoto.** 2002. A missense mutation in *Tomato mosaic virus* L11A-Fukushima genome determines its symptomless systemic infection of tomato. Journal of General Plant Pathology, 68: 385–389.
20. **Zhang, Z., S. Schwartz, L. Wagner and W. Miller.** 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. Journal of Computational Biology, 7: 203-214.
16. **Sadik, A.S., H.E. Soweha, A.A. El-Morsie and M.R. Enan.** 2000. Biological, Serological and molecular studies on an Egyptian isolate of *Tomato mosaic Tobamovirus*. Pages: 53-75. In: Proceeding of the 9th Congress of Phytopathology, Giza, Egypt.
17. **Shoman, S.A. and B.A. Othman.** 2004. Reverse transcription-polymerase chain reaction mediated detection and identification of *Tobacco mosaic virus*, Egyptian strain. Egyptian Journal of Virology, 1: 139-147.
18. **Takahashi, Y., M. Kameya-Iwaki and K.I. Shohara.** 1989. Characteristics of epitopes on the

Received: June 7, 2012; Accepted: August 7, 2012

تاريخ الاستلام: 2012/6/7؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2012/8/7