توصيف بعض العزلات السورية من فيروس البطاطا/البطاطس واي (PVY)

وضاح مبيض[1+2]، صفاء قمري[3]، سليم راعي[1] ونوران عطار[3]

(1) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية؛ (2) المشروع الوطني لإنتاج بذار البطاطا، المؤسسة العامة لتأمين المستلزمات الزراعية، حلب، سورية، البريدالالكتروني: mobayed2@gmail.com؛

(3) مختبر الفيروسات، المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (ايكاردا)، حلب، سورية، البريد الالكتروني:s.kumari@cgiar.org

الملخص

مبيض، وضاح، صفاء قمري، سليم راعي ونوران عطار. 2014. توصيف بعض العزلات السورية من فيروس البطاطا/البطاطس واي (PVY). مجلة وقاية النبات العربية، 32(1): 79-87.

استخدمت طرائق الكشف المصلية والحيوية والجزيئية لتوصيف خمس عزلات من فيروس البطاطا/البطاطس واي (*Potato virus Y*، PVY، جنس *Potyvirus*، فصيلة *Potyviridae*) مجموعة من حقول البطاطا/البطاطس في مناطق مختلفة من سورية. أظهرت نتائج اختبار إليزا (DAS-ELISA) للعزلات الخمس تفاعلاً إيجابياً فقط مع المصل المضاد المتعدد الكلون لفيروس البطاطا/البطاطس واي. كما تطابقت نتائج اختبار التفاعل المتسلسل للبوليميراز بعد النسخ العكسي (RT-PCR) مع مثيلاتها في اختبار إليزا للعزلات الخمس المختبرة، وذلك عند استخدام زوج من البادئات المتخصصة بتضخيم جزء من الغطاء البروتيني لفيروس البطاطا/البطاطس واي حيث أعطت جميع العزلات عصابة بالحجم المتوقع (618 زوج قاعدي) مؤكدة وجود فيروس البطاطا/البطاطس واي في العزلات المختبرة. وعند اختبار العزلات الخمس باختبار RT-PCR باستخدام ستة أزواج من البادئات المتخصصة لتحديد سلالات الفيروس، بينت النتائج وجود إصابة مختلطة من السلالة PVY^{NTN-NW} والسلالة PVY^{NTN} في العزلة L1 المجموعة من منطقة اللاذقية، وانتماء العزلتين H2 وK5 المجموعتين من حماه والقنيطرة إلى السلالة PVY^{NW}، في حين انتمت العزلتان D3 وA4 المجموعتين من دمشق وحلب إلى السلالة PVY^{NTN}. وأظهرت النتائج بأن نسبة التشابه بلغت 97-99% بين العزلات الأربع المدروسة مع بعض العزلات السورية والعزلة الأمريكية PVY^{NTN} (HR1 FJ204166.1)، و83-98% ما بين العزلات المدروسة والعزلات الأمريكية (PVY-O5 HQ912901.1) وPVY^{Wi} HQ912868.1)، البريطانية (PVY^{N} العزلة SASA 207 AJ584851.1) والألمانية (PVY^{Wi} العزلة AM113988.1 4-261). كما أوضحت شجرة القرابة الوراثية وجود تقارب بين العزلتين المجموعتين من دمشق (D3) واللاذقية (L1)، وهذا يتوافق مع نتائج اختبارات RT-PCR في هذا البحث والتي أوضحت انتماء العزلتين إلى السلالة PVY^{NTN}، بينما انفصلت العزلة المجموعة من القنيطرة (K5)عن عزلة الشاهد (AL6) المجموعة من حلب.

كلمات مفتاحية: فيروس البطاطا/البطاطس واي، PVY، اختبار إليزا، اختبار RT-PCR، شجرة القرابة الوراثية.

المقدمة

تعتبر العروة الربيعية الموسم الرئيس لإنتاج بذار البطاطا/البطاطس في سورية، ويتنوع مصدر بذار البطاطا المزروع في الحقول، حيث تأتي الكمية الأكبر من البذار عن طريق استيراده من الدول الأوروبية بالإضافة إلى إنتاج المشروع الوطني لإنتاج بذار البطاطا، كما يعمد الكثير من المزارعين عادة إلى إبقاء أو بيع جزء من محصولهم كبذار محلي للعروة القادمة. وهذا يتيح دخول وتضاعف وتطور هجيني لفيروسات أو عزلات أو سلالات فيروسية جديدة أو قديمة محلياً. ويعتبر فيروس البطاطا/البطاطس واي (*Potato virus Y*، PVY، جنس *Potyvirus*، فصيلة *Potyviridae*) أحد أهم الفيروسات الأكثر انتشاراً وتأثيراً على محصول البطاطا/البطاطس دولياً (35)، وهو الفيروس الرئيس الأكثر انتشاراً في حقول البطاطا/البطاطس محلياً (32). كما يعتبر من الفيروسات شديدة التغيُّر، وله العديد من السلالات، عرف منها السلالات التالية: PVY^{O}، PVY^{C}، PVY^{N}، PVY^{Z} وPVY^{E} (35). سجل في العقدين الأخيرين ظهور سلالات جديدة منها: PVY^{NTN} وPVY^{NW} (تسمى في شمال أمريكا $PVY^{N:O}$) في مناطق جغرافية مختلفة (8، 16، 25، 26، 29)، وصنفت هاتان السلالتان ضمن السلالة PVY^{N} (35). تتسم السلالة PVY^{NW} بخصائص مشتركة من السلالة PVY^{O} والسلالة PVY^{N} (34)، وحديثاً أُتبع إلى السلالة PVY^{N} هجين مركب جديد هو PVY^{NTN-NW} الذي يضم خصائص مشتركة من PVY^{NW} وPVY^{NTN} (14). تعتبر القرابة المصلية مابين سلالات فيروس البطاطا واي قويّة جداً، ولهذا فإنه لا يمكن الجزم بدقة وتشخيص الإصابة بالاعتماد على الطرائق المصلية

فقط ولابد من اللجوء إلى أكثر من طريقة من طرائق الكشف عن الفيروس (9) للوصول إلى تشخيص دقيق. هناك بعض الدراسات المحلية على مستوى سلالات فيروس البطاطا واي تمت في السنوات الماضية (1، 9).

هدفَ هذا البحث إلى توصيف عدة عزلات سورية من فيروس البطاطا/البطاطس واي مجموعة من حقول البطاطا/البطاطس في مناطق مختلفة، للوقوف على الواقع الحالي لمكونات مجتمع هذا الفيروس في بعض مناطق إنتاج البطاطا/البطاطس في سورية.

مواد البحث وطرائقه

عزلات فيروس البطاطا/البطاطس واي المستخدمة وأماكن جمعها

تم انتقاء خمس عزلات (تفاعلت إيجابياً مع المصل المضاد لفيروس البطاطا واي) من أصل 60 عينة ورقية مجموعة من مناطق مختلفة لزراعة محصول البطاطا خلال العروة الربيعية 2011 شملت 20 حقلاً وهذه العزلات هي: العزلة L1 مجموعة من وادي قنديل/اللاذقية، العزلة H2 المجموعة من كفرزيتا/حماه، العزلة D3 المجموعة من سعسع/دمشق، العزلة A4 المجموعة من مارع/حلب، العزلة K5 المجموعة من حينة/القنيطرة. بالإضافة لاستخدام عزلة محلية (AL6) من فيروس البطاطا واي معزولة من حقول البطاطا في محافظة حلب، ومعرفة حيوياً ومصلياً في مختبر الفيروسات التابع للمؤسسة العامة لتأمين مستلزمات الإنتاج الزراعي، حلب، سورية وجزيئياً تنتمي إلى السلالة PVY^{NW} (12). استخدم صنف البطاطا الهجين A6 الخالي من أي إصابة فيروسية كشاهد سليم في الاختبارات.

الاختبار المصلي والأمصال المضادة المستخدمة

تم فحص العزلات المختلفة باستخدام اختبار إليزا (DAS-ELISA) وفق الطريقة المتبعة من قبل Clark و Adams (17) في مختبر الفيروسات التابع للمؤسسة. استخدمت ستة أمصال مضادة متعددة الكلون (Polyclonal) للفيروسات التالية: فيروس التفاف أوراق البطاطا (*Potato leafroll virus*، PLRV، جنس *Polerovirus*، فصيلة *Luteoviridae*)، فيروس البطاطا إكس (*Potato virus X*، PVX، جنس*Potexvirus*، فصيلة *Flexiviridae*)، فيروس البطاطا ام (*Potato virus M*، PVM، جنس *Carlavirus*، فصيلة *Flexiviridae*)، فيروس البطاطا أ (*Potato virus A* ، PVA، جنس *Potyvirus*، فصيلة *Potyviridae*)، فيروس البطاطا اس (*Potato virus S*، PVS، جنس *Carlavirus*، فصيلة *Flexiviridae*)، وفيروس البطاطا واي.

الاختبار الحيوي

تم زراعة شتول لنباتات تبغ صنف برلي (*Nicotiana tabacoum*.Var. White Burley) ضمن أصص بلاستيكية بواقع 3 مكررات في البيت الزجاجي التابع لمختبر الفيروسات في ايكاردا، لإجراء عدوى صناعية عليها بعصارة النباتات المصابة بالعزلات المحلية الخمس (L1، H2، D3، A4، K5) وعزلة الشاهد (AL6) كما تم إعداء الشاهد السليم بالماء، وفق الطريقة الموصوفة من قبل Jeffries (21).

التفاعل المتسلسل للبوليميراز بعد النسخ العكسي

تم استخلاص الحمض النووي للعزلات الخمس باستخدام مجموعة استخلاص خاصة RNeasy® Plant Mini Kit 50 المنتجة من قبل شركة Qiagen (رقم 74904) وباتباع الطريقة الموصوفة من قبل Mackenzie وآخرون (24).

تم تضخيم جزء من الحمض النووي (RNA) للعزلات المدروسة بوساطة اختبار RT-PCR باستخدام مجموعة اختبار خاصة بالتفاعل المتسلسل للبوليميراز مع النسخ العكسي لمرحلة واحدة (One-step RT-PCR kit) المنتج من قبل شركة Qiagen (Qiagen company، Hidlen، Germany) (رقم 210212) بحجم تفاعل نهائي 25 ميكروليتر، وفقاً للطريقة الموصوفة من قبل Mackenzie وآخرون (24) وNassuth وآخرون (28)، وبالإعتماد على سبعة أزواج من البادئات المتخصصة المنتجة في شركة SIGMA (جدول 1). استخدم أولاً زوج من البادئات المتخصصة بتضخيم جزء من الغطاء البروتيني لفيروس البطاطا واي للتأكد من إصابة العينات بفيروس البطاطا واي، باستخدام جهاز المدوّر الحراري ABI (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler) وفق برنامج خاص (10)، ومن ثم استخدمت ستة أزواج أخرى من البادئات المتخصصة بتحديد السلالات الخاصة بفيروس البطاطا واي ضمن ستة اختبارات RT-PCR منفصلة باستخدام جهاز المدوّر الحراري ABI وفق برامج خاصة حسب كل بادئ (15).

تمّ فصل نواتج تفاعل اختبار RT-PCR بوساطة جهاز الرحلان الكهربائي بعد تحميلها على هلامة الأجاروز 1% (31)، حيث وضع الهلام في جهاز الرحلان الكهربائي وتم تحميل 5 ميكرولتر من كل عينة من عينات الـDNA المضاعف وذلك بعد مزجها جيداً بـ 2 ميكرولتر من محلول التحميل الملون (Loading dye Buffer). استخدم مؤشر لقياس الوزن الجزيئي (Molecular Weight Marker IX (0.072-1.35 kbp) (إنتاج شركة Roche رقم 1449460). تم تعريض الهلام للأشعة فوق البنفسجية UV لتظهير وسط الفصل باستخدام جهاز التصوير (Gel Documentation).

جدول 1. البادئات المستخدمة في اختبار RT-PCR للكشف عن فيروس البطاطا واي وتحديد سلالاته.

Table 1. Primers used in the RT-PCR tests to identify PVY and its strains.

المرجع Reference	السلالات التي يكشف عنها Strains identified	حجم ناتج التفاعل (زوج قاعدي) PCR product bp	درجة حرارة الالتحام AT °C	موقع الالتحام Attachment location	تتالي القواعد النتروجينية للبادئات Primers Sequence (5'-3')	القطبية Polarity	البادىء Primer Name
10	CP PVY	618	60	8118–8140	TCACAACATTTCTCAGATCTTGG	Sense	PVY8139
10	CP PVY			8713–8736	GCATTCTCATTTTGGACGTGATAG	Antisense	PVY8735
23	PVY^{N} & PVY^{NTN}	441	62	2260–2281	GTCGATCACGAAACGCAGACAT	Sense	n2258
15	PVY^{O} & PVY^{NW}			2678–2700	CGTAGGGCTAAAGCTGATAGTAG	Antisense	o2700
15	PVY^{N}, $PVY^{N?TN}$ & $NA\text{-}PVY^{N}$	1076	61	7582–7605	ACTGCTGCACCTTTAGATACTCTA	Sense	n7577
33	PVY^{O} & PVY^{NW}			8635–8657	CTTTTCCTTTGTTCGGGTTTGAC	Antisense	YO3-8648
15	PVY^{N}, $PVY^{N?TN}$ & $NA\text{-}PVY^{N}$	1307	63	7582–7605	ACTGCTGCACCTTTAGATACTCTA	Sense	n7577
13	PVY^{N} $PVY^{N?TN}$ & $NA\text{-}PVY^{N}$			8864–8888	GTTTCTCCTATGTCGTATGCAAGTT	Antisense	SeroN
23	PVY^{O} & PVY^{NW}	853	64	5578–5598	GGATCTCAAGTTGAAGGGGAC	Sense	S5585m
15	PVY^{O} & PVY^{NW}			6405–6430	GTAACTCCTAAACAAATGGTGGTTCG	Antisense	o6400
15	PVY^{N} & PVY^{NTN}	633	63	160–179	GGGCAAACTCTCGTAAATTGCAG	Sense	n156
15	PVY^{N} & PVY^{NTN}			770–792	GTCCACTCTCTTTCGTAAACCTC	Antisense	n787
15	PVY^{O}& PVY^{NW}	278	62	515–536	GATCCTCCATCAAAGTCTGAGC	Sense	o514
15	PVY^{N} & PVY^{NTN}			770–792	GTCCACTCTCTTTCGTAAACCTC	Antisense	n787

دراسة تتالي بعض النيوكليوتيدات في مجين الفيروس

تمت دراسة تتالي بعض النيوكليوتيدات في مجين الفيروس في مختبر الأمراض الفيروسية ومختبر التقانات الحيوية في المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (ايكاردا)، حلب، سورية.

استناداً إلى نتائج الاختبار المصلي والجزيئي RT-PCR، تم انتقاء العزلات L1، D3، K5 وعزلة الشاهد AL6، المضخمتين مع البادئتين N2258 S + O2700 A (طول القطعة 441 زوج قاعدي) لدراسة تتالي بعض نيوكليوتيدات الحمض النووي الفيروسي لكل منها.

تم تضخيم الحمض النووي الفيروسي (RNA) بوساطة تفاعل RT-PCR وفقاً للمواد والطرائق المعتمدة سابقاً ولكن بحجم تفاعل نهائي 50 ميكرولتر. كما تمت تنقية منتج الـPCR باستخدام مجموعة استخلاص خاصة (QIAquick PCR Purification Kit) من إنتاج شركة Qiagen (رقم 28104) وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة. أخذت نواتج التضخيم بعد تنقيتها بغية تحديد تتالي بعض نيكليوتيدات الحمض النووي الفيروسي وأدخلت في تفاعل للبوليميراز مرة ثانية لكن باستخدام كل بادئة (Sense وAntisense) على حِدة، ثم أرسلت إلى مختبر التقانات الحيوية في ايكاردا حيث تمت سلسلتها بوساطة جهاز 3100 ABI (Applied Biosystems Genetic analyser) من إنتاج شركة Applied Biosystems, Fostercity (الولايات المتحدة الأمريكية)، باستخدام مجموعة تحليل خاصة ABI PRISM BigDye Terminators version 3.1 Cycle sequencing Kit من إنتاج شركة Applied Biosystems. تمت معالجة البيانات المتحصل عليها باستخدام برنامج Chromas, 2.ab1 للحصول على التسلسل النيكليوتيدي للقطعة المدروسة.

تمت مقارنة التسلسل النيوكليوتيدي المتحصل عليه للعزلات المذكورة مع عدة تسلسلات لعزلات من فيروس البطاطا واي أخرى محلية وعالمية موجودة في قاعدة البيانات التابعة للبنك الوراثي NCBI

باستخدام برنامج البحث عن الاصطفافات في قاعدة البيانات BLAST.

تم إنشاء شجرة القرابة الوراثية (Homology tree) لبعض العزلات باستخدام برنامج DNAMAN LynnonBiosoft , Canada version 4.0.

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج اختبار إليزا للعينات المجموعة تفاعلاً ايجابياً فقط مع المصل المضاد المتعدد الكلون لفيروس البطاطا واي، في حين لم تتفاعل مع الأمصال المضادة للفيروسات الخمسة الأخرى (PVA، PVS، PVM، PVX و PLRV).

كما أظهرت المشاهدات المتتابعة للأعراض الظاهرية على أوراق نباتات تبغ "برلي" ظهور الأعراض بعد 10–15 يوماً من الإعداء بالعصارة النباتية للعزلات الخمس (L1، H2، D3، A4، K5) وعزلة الشاهد AL6 والتي تمثلت بنكرزة العروق ومع تطور الإصابة ظهور الاصفرار والتقزم للنباتات المعدية مقارنة بالشاهد السليم.

تطابقت نتائج اختبار RT-PCR (جدول 2، شكل 1) مع مثيلاتها في اختبار إليزا (DAS-ELISA) للعزلات الخمس (L1، H2، D3، A4، K5) المختبرة، وأمكن تضخيم الحمض النووي الفيروسي للعزلات باستخدام زوج البادئات PVY_{8139} وPVY_{8735} المتخصص بتضخيم جزء من الغطاء البروتيني لفيروس البطاطا واي. أعطت جميع العزلات عُصابة (حزمة) بالحجم المتوقع (618 زوج قاعدي) المميز لوجود الفيروس. وعند إعادة اختبار العزلات الخمس باختبار RT-PCR ولكن باستخدام بادئات أكثر تخصصاً أمكن تضخيم الحمض النووي الفيروسي للعزلات باستخدام زوج البادئات O2700 + N2258 حيث أعطت جميع العزلات عُصابة (حزمة) بالحجم المتوقع (441 زوج قاعدي). ونتيجة اختبار العزلات بالبادئات الأخرى (جدول 2، شكل 1) تبين أن العزلة L1 تحوي إصابة مختلطة من السلالة PVY^{NTN-NW} والسلالة PVY^{NTN}. في حين انتمت العزلتان H2 وK5 للسلالة PVY^{NW} وبشكل مماثل لعزلة الشاهد AL6 المنتمية للسلالة PVY^{NW}. أما العزلتين D3 وA4 فقد انتمتا إلى السلالة PVY^{NTN}. لم تعط أي من العزلات المختبرة عُصابة (حزمة) بالحجم 278 زوج قاعدي عند اختبارها مع زوج البادئات المتخصص بالكشف عن السلالة SYR-III.

ولدى مقارنة التتاليات النيوكليوتيدية التي تم الحصول عليها مع التتاليات النيوكليوتيدية للعزلات السورية من الفيروس نفسه موجودة في بنك المورثات (Genbank)، وذلك باستخدام برنامج البحث عن الإصطفافات في قاعدة البيانات BLAST، تبين بأن نسبة التشابه تراوحت بين 97–99% بين العزلات الأربع المدروسة والعزلات السورية (SYR-Wi-11 AB185832.1؛ PVY-12 AB185833.2؛ PVY^{SYR} AB270705.1؛ SYR-II-2-8 AB461451.1؛ SYR-II-Be1 AB461452.1؛ SYR-II-DrH AB461453.1؛ SYR-III-L4 AB461454.1؛ PVY-Bu3 AB461488.1)، والأمريكية (PVY^{NTN}، العزلة HR1 FJ204166.1)، و83–98% مع العزلات الأمريكية (PVY-O5HQ912901.1؛ PVY^{Wi} HQ912868.1)، البريطانية (PVY^{N}، العزلة 207 SASA AJ584851.1)، والألمانية (PVY^{Wi}، العزلة 4-261 AM113988.1).

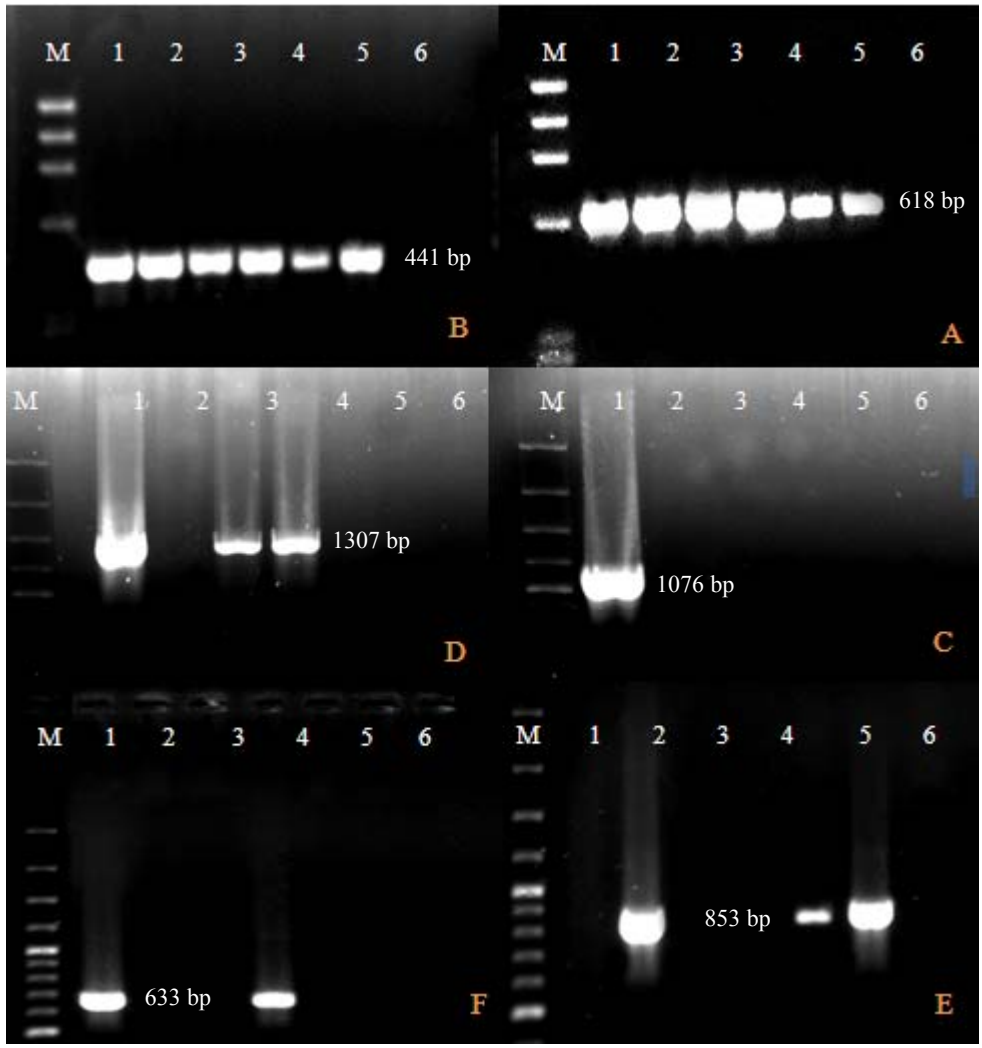
جدول 2. نتائج اختبار التفاعل المتسلسل للبوليميراز بعد النسخ العكسي (RT-PCR) لخمسة عزلات من البطاطا باستخدام عدة أزواج من البادئات التي تميز بين السلالات.

Table 2. Results of RT-PCR for 5 PVY isolates tested by using different primers to identify the PVY strains.

التصنيف وفق حجم ناتج التفاعل Characterization according to PCR product	حجم ناتج التفاعل (زوج قاعدي) PCR product (bp)	Primers and PCR product (bp) البادئات وحجم ناتج التفاعل (زوج قاعدي) O514 & n787 278 bp	N156 & n787 633 bp	S5585m & o6400 853 bp	N7577 & seroN 1307 bp	N7577 & yo3-8648 1076 bp	N2258 & o2700 441 bp	Pvy8139 & pvy8735 618 bp	العزلة* Isolate *
PVY^{NTN-NW}	441+1076+633	-	+	-	+	+	+	+	L1
PVY^{NTN}	441+1307+633								
PVY^{NW}	441+853	-	-	+	-	-	+	+	H2
PVY^{NTN}	441+1307	-	-	-	+	-	+	+	D3
PVY^{NTN}	441+1307+633	-	+	-	+	-	+	+	A4
PVY^{NW}	441+853	-	-	+	-	-	+	+	K5
PVY^{NW}	441+853	-	-	+	-	-	+	+	AL6
-	-	-	-	-	-	-	-	-	A6
-	-	-	-	-	-	-	-	-	B

* أرقام العزلات هي: L1 (وادي قنديل/ اللاذقية)، H2 (كفرزيتا/ حماه)، D3 (سعسع/ دمشق)، A4 (مارع/ حلب)، K5 (حينة/ القنيطرة)، AL6(الشاهد)، A6 (شاهد سليم)، B (محلول منظم).

*Isolates number: L1 (Lattakia), H2 (Hama), D3 (Damascus), A4 (Aleppo), K5 (AL-Kaunetra), AL6 (control), A6 (Healthy), B (Buffer).

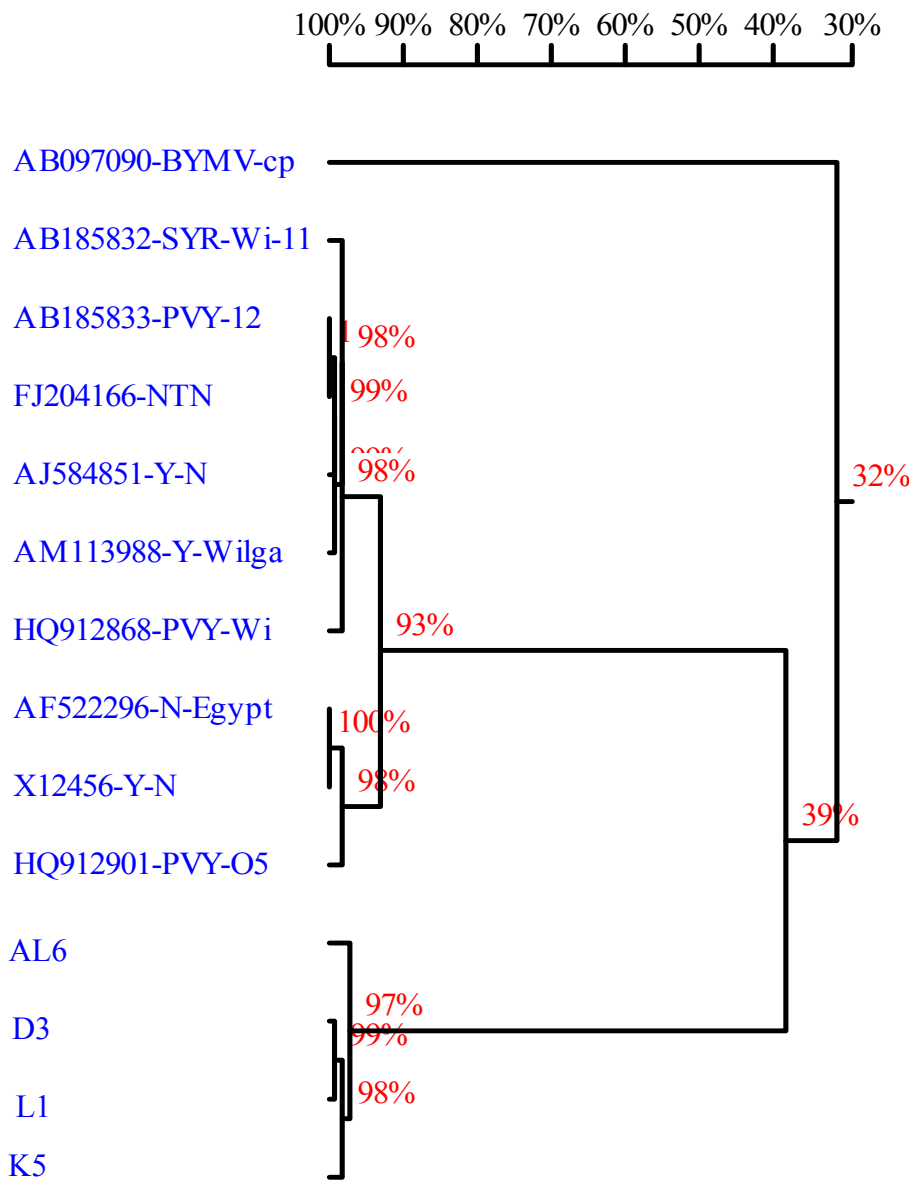


شكل 1. صورة هلامة الأجاروز لاختبار التفاعل المتسلسل للبوليميراز (RT-PCR) لخمسة عزلات سورية من البطاطا L1=1 (وادي قنديل/اللاذقية)، H2 =2 (كفرزيتا/ حماه)، D3 =3 (سعسع/دمشق)، A4 =4 (مارع/ حلب)، K5 =5 (حينة/ القنيطرة)، AL6 =6 (الشاهد)، A6 =7 (شاهد سليم)، B=8 (محلول منظم)، M= مؤشر الوزن الجزيئي DNA molecular weight marker ladder (قياس IX، رقم 460 1449 من شركة Roche). A: باستخدام زوج بادئات Pvy8735 + Pvy8139المتخصص بتضخيم جزء من الغطاء البروتيني لفيروس البطاطا واي، حجم ناتج التفاعل 618 زوج قاعدي، B: باستخدام زوج البادئات O2700 + N2258، حجم ناتج التفاعل 441 زوج قاعدي، C: باستخدام زوج البادئاتyo3-8648 + N7577، حجم ناتج التفاعل 1076 زوج قاعدي، D: باستخدام زوج البادئاتseroN +N7577، حجم ناتج التفاعل 1307 زوج قاعدي، E: باستخدام زوج البادئاتO6400 + S5585m، حجم ناتج التفاعل 853 زوج قاعدي، F: باستخدام زوج البادئات n787 + N156، حجم ناتج التفاعل 633 زوج قاعدي.

Figure 1. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR amplifications for 5 PVY Syrian isolates 1= L1 (Lattakia); 2= H2 (Hama); 3= D3 (Damascus); 4= A4 (Aleppo); 5= K5 (AL-Kaunetra); 6= AL6 (Positive control); 7= A6 (Healthy Potato); 8= B (Buffer);M= Marker. 100 bp ladder DNA Marker (Molecular Weight Marker IX (0.072-1.35 kbp), Roche, Cat. No.1449460). A: using Pvy8139 + pvy8735 primer (PVY coat protein), PCR Product 618 bp, B: using N2258 + O2700 primer, PCR Product 441 bp, C: using N7577 + yo3-8648 primer, PCR Product 1076 bp, D: using N7577+ seroN primer, PCR Product 1307 bp, E: using S5585m + O6400 primer, PCR Product 853 bp, F: using N156 + n787 primer, PCR Product 633 bp.

كما أوضحت شجرة القرابة الوراثية المرسومة باستخدام برنامج DNAMAN LynnonBiosoft، Canada version 4.0 وجود تقارب بين العزلتين المجموعتين من دمشق (D3) واللاذقية (L1)، وهذا يتوافق مع نتائج اختبارات RT-PCR في هذا البحث والتي أوضحت انتماء العزلتين إلى PVY^{NTN}، بينما انفصلت العزلة المجموعة من القنيطرة (K5) عن عزلة الشاهد AL6 (شكل 2).

تتفق نتائج هذه الدراسة مع نتائج دراسات سابقة، حيث أكدت دراسات متعددة مصلية وجزيئية الإصابة بفيروس البطاطا واي في المناطق المختلفة لزراعة البطاطا في سورية، بنسب إصابة مختلفة وفق المنطقة والصنف والعام الذي أُجري فيه البحث (1، 2، 3، 4، 5، 7، 11). وهذا يؤكد خطورة الانتشار الواسع للفيروس على المحصول وارتفاع نسبة الإصابة به في محصول البطاطا والعديد من المحاصيل العائلة الأخرى وخاصة نباتات العائلة الباذنجانية.



شكل 2. شجرة القرابة الوراثية المرسومة بالاعتماد على التتالي النيوكليوتيدي للعزلات السورية المدروسة (L1، D3، K5 وAL6) من فيروس البطاطا واي والعزلات الموجودة في البنك الوراثي: SYR-Wi-11 (AB185832.1)، PVY-12 (AB185833.2)، الأمريكية PVY^{NTN} العزلة HR1 (FJ204166.1)، PVY-O5 (HQ912901.1)، PVY^{Wi} (HQ912868.1)، البريطانية: PVY^{N} العزلة SASA 207 (AJ584851.1)، الألمانية: PVY^{Wi}العزلة 261-4 (AM113988.1)، المصرية: PVY^{N}-Eygpt (AF522296.1)، الفرنسية: $N\text{-}FrPVY^{O}$ (X12456). بالإضافة لعزلة من فيروس اصفرار وموزاييك الفاصولياء (BYMV، *Bean yellow mosaic virus*، فصيلة *Potyvirus*، عائلة *Potyviridae*).

Figure 2. Homology tree showing the relationship among PVY Syrian isolates (L1, D3, K5 and AL6) and different isolates from the Genbank based on partial sequences for 441 bp. SYR-Wi-11 (AB185832.1), PVY-12 (AB185833.2)., USA: PVY^{NTN} isolate HR1 (FJ204166.1), PVY-O5 (HQ912901.1), PVY^{Wi} (HQ912868.1)., UK: PVY^{N} isolate SASA 207 (AJ584851.1), Germany: PVY^{Wi} isolate 261-4 (AM113988.1), France: $N\text{-}FrPVY^{O}$ (X12456), Egypt: PVY^{N}-Eygpt (AF522296.1), *Bean yellow mosaic virus* (BYMV, genus *Potyvirus*, family *Potyviridae*) isolate AB097090-BYMV-cp was add to compare with PVY Isolates.

تم وللمرة الأولى، وباستخدام اختبار جزيئي واحد بخطوة واحدة، التمييز بين السلالات الأبوية القديمة (PVY^{N}، PVY^{O}، $NAPVY^{N}$) وبين السلالات الهجينة التي حدث فيها عبور (تصالب) جيني للمجين الفيروسي (PVY^{NTN} و PVY^{NW}، $PVY^{NTN\text{-}NW}$)، باختبار RT-PCR، باستخدام زوج البادئات N2258+o2700، التي تعطي عُصابة (حزمة) بالحجم 441 زوج قاعدي، غير الموجودة في السلالات الأبوية القديمة.

أكدت نتائج هذه الدراسة وجود السلالة الهجينة PVY^{NTN-NW} الجديدة من فيروس البطاطا واي والتي لها قرابة وثيقة مع السلالتين PVY^{NTN} و PVY^{NW} والناتجة عن العبور الجيني بين هاتين السلالتين في الإصابات المركبة، وهذا يتفق مع دراسة سابقة (6). كما بينت النتائج وجود السلالات الهجينة PVY^{NTN} و PVY^{NW} وهذا يتوافق مع دراسات عدة حديثة تؤكد سيادة هذه السلالات وانتشارها مقارنة بالسلالات الأبوية القديمة. خاصة أن السلالات أو العزلات الجديدة الناتجة عن التصالب الجيني تكون ذات قدرة إعدائية عالية وبالتالي أكثر شراسة من العزلات الأبوية (27). لقد وجد سابقاً أن عزلات فيروس البطاطا واي الأكثر تكراراً في حقول البطاطا في مصر تتبع للسلالة PVY^{NTN} (19)، كما تسيطر السلالتان PVY^{NTN} و PVY^{NW} على معظم مناطق زراعة محصول البطاطا الطعام في بولندا (36). إن نشوء هذه السلالات الهجينة PVY^{NTN} و PVY^{NW} ناتجة عن التصالب الجيني للسلالات القديمة الكلاسيكية PVY^{O} و PVY^{N}، وتبع ذلك تزايد مفاجئ في وجودها وانتشارها في الحقول ضمن وقت قصير نسبياً بحيث سيطرت على معظم مناطق إنتاج البطاطا/البطاطس (12، 18، 20، 22، 23، 30، 33).

وهذا يعكس قدرة الفيروس التطورية مما يؤثر في فعالية الطرائق المتبعة في مكافحته ويزيد من أهمية إجراء عمليات مسح دورية للكشف عن مكونات مجتمع هذا الفيروس في مناطق إنتاج البطاطا لمعرفة مدى فاعلية برامج المكافحة المتبعة. ونظراً لتفوق هذه العزلات الجديدة وشراستها فإنها تستطيع منافسة العزلات الأخرى مما يسهم بزيادة الإصابة بها (27). كما يرتبط حدوث العبور الجيني بارتفاع نسبة الإصابة المركبة بالسلالات المختلفة من فيروس البطاطا واي والتي وجد أنها كثيرة الحدوث في الحقول السورية (9)، ويعزى هذا لتنوع مصادر البذار المزروع في الحقول السورية، وبخاصة عند استخدام جزء من المحصول الناتج كبذار للعروة القادمة. كذلك فإن تخفي الأعراض الظاهرية للإصابة الفيروسية (أو ضعفها) عند استخدام كميات كبيرة من السماد الآزوتي في حقول البطاطا وبخاصة في حال الإصابة الوافدة يسهم بشكل كبير في تضليل المفتشين الحقليين وبالتالي بقاء الإصابة وتضاعفها في المواسم القادمة.

Abstract

Mobayed, W., S.G. Kumari, S. Ra'ai and N. Attar. 2014. Characterization of Some Syrian isolates of *Potato Virus Y*. Arab Journal of Plant Protection, 32(1): 79-87.

Characterization of five Syrian isolates of *Potato virus Y* (PVY, genus *Potyvirus*, family *Potyviridae*) was studied using serological, biological and molecular methods. ELISA test showed that all tested isolates reacted strongly with PVY polyclonal antibodies. Veinal necrosis symptoms were produced by all tested isolates on *N. tabacum* (cv. White Burley). RT-PCR test showed that isolate L1 (collected from Lattakia) was infected with PVY^{NTN-NW} and PVY^{NTN}, whereas H2 (from Hama) and K5 (from Al-Qaunetra) isolates belonged to PVY^{NW}, and D3 (from Damascus) and A4 (from Aleppo) isolates belonged to PVY^{NTN}. The alignments of nucleotide sequences of the tested Syrian isolates with other isolates from GenBank showed a 97-99% nucleotide sequence homology between the tested Syrian isolates: SYR-Wi-11 (AB185832.1), PVY-12 (AB185833.2), PVY^{SYR} (AB270705.1), SYR-II-2-8 (AB461451.1), SYR-II-Be1 (AB461452.1), SYR-II-DrH (AB461453.1), SYR-III-L4 (AB461454.1), PVY-Bu3 (AB461488.1) and USA (PVY^{NTN} isolate HR1 FJ204166.1), and 83-98% homology between tested isolates and USA isolates (PVY-O5 HQ912901.1; PVY^{Wi} HQ912868.1), UK isolate (PVY^{N}, isolate SASA 207 AJ584851.1) and German isolate (PVY^{Wi}, isolate 261-4 AM113988.1).

Keywords: *Potato Virus Y*, ELISA test, RT-PCR, homology tree.

Corresponding author: Wadah Mobayed, Aleppo, Syria, Email: mobayed2@gmail.com

المراجع

References

1. **اسماعيل، عماد دأود وسليم يونس راعي.** 2004. مسح فيروس Y البطاطا وسلالاته في حقول إنتاج البطاطا في محافظة اللاذقية- سورية. مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية، سلسلة العلوم الزراعية، 26: 151-160.
2. **حاج قاسم، أمين عامر وأم التقى غفران الرفاعي.** 2009- أ. أهم الفيروسات التي تصيب الباذنجانيات المزروعة في سورية. كتاب ملخصات بحوث المؤتمر العربي العاشر لعلوم وقاية النبات، بيروت- لبنان، مجلة وقاية النبات العربية، 27 (عدد خاص): 87.
3. **حاج قاسم، أمين عامر، خليل عبد الحليم، أم التقى غفران الرفاعي ومحمد قاسم.** 2006. فيروسات جديدة تصيب البطاطا لأول مرة في سورية. صفحة 251. كتاب ملخصات بحوث المؤتمر العربي التاسع لعلوم وقاية النبات، دمشق، سورية.
4. **حاج قاسم، أمين ومحمد عبد اللطيف.** 1997. مسح حقلي لأهم الإصابات الفيروسية على البطاطا في شمال سورية خلال مراحل إكثارها المختلفة. مجلة بحوث جامعة حلب سلسلة العلوم الزراعية، 28: 95-110.
5. **حاج قاسم، أمين، عبد المحسن السيد عمر ومعن ناصر.** 2009- ب. مسح حقلي لأهم الأمراض الفيروسية المنتشرة على محصول البطاطا في شمال سورية. مجلة الباسل لعلوم الهندسة الزراعية، 72: 90-112.
6. **شيخ علي، محمد، ماوكا تيتسو، ناتسواكي توموهيده.** 2009. انتشار سلالة جديدة من فيروس البطاطا واي في سورية.

ملخصات بحوث المؤتمر العربي العاشر لعلوم وقاية النبات، بيروت، لبنان، مجلة وقاية النبات العربية، 27 (عدد خاص): 96.

7. **قواص، هدى**. 2009. الأمراض الفيروسية على البطاطا في جنوب سورية. ملخصات بحوث المؤتمر العربي العاشر لعلوم وقاية النبات، بيروت، لبنان، مجلة وقاية النبات العربية، 27 (عدد خاص): 93.

8. **Beczner, L., H. Horvath, L. Romhanyi and H. Foster**. 1984. Etiology of tuber ringspot disease in potato. Potato Research, 27: 339-52.

9. **Chikh Ali, M.** 2009. Studies on characteristics and diversity of Potato Virus in Syria. PhD thesis. Department of International Agricultural, Development Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture. 208 pp.

10. **Chikh Ali, M., A. Said Omar and T. Natsuaki.** 2011**.** An infectious full-length cDNA clone of potato virus Y^{NTN-NW}, a recently reported strain of PVY that causes potato tuber necrotic ring spot disease. Archives of Virology, 155: 1-5.

11. **Chikh Ali, M., K. Katayama, T. Maoka and K.T. Natsuaki.** 2006. The occurrence of potato virus Y on potato in Syria. Japanese Journal of Tropical Agriculture, 50: 23-28.

12. **Chikh Ali, M., T. Maoka and K.T. Natsuaki.** 2007. The occurrence and characterization of new recombinant isolates of PVY displaying shared properties of PVY^{NW} and PVY^{NTN}. Journal of Phytopathology, 155: 409-415.

13. **Chikh Ali, M., T. Maoka and K.T. Natsuaki.** 2008. The discrimination between Potato virus Y serotypes O and N using a multiplex PCR assay. Tropical Agriculture and Development, 52: 37-42.

14. **Chikh Ali, M., T. Maokac, K.T. Natsuaki and T. Natsuaki,** 2010a. PVY^{NTN-NW}, a novel recombinant strain of Potato virus Y predominating in potato fields in Syria Plant Pathology, 59: 31-41.

15. **Chikh Ali, M., T. Maokac, K.T. Natsuaki and T. Natsuaki.** 2010b. The simultaneous differentiation of Potato virus Y strains including the newly described strain PVY^{NTN-NW} by multiplex PCR assay. Journal of Virological Methods, 165: 15–20.

16. **Chrzanowska, M.** 1991. New isolates of the necrotic strain of Potato virus Y (PVY^{N}) found recently in Poland. Potato Research, 34: 179-82.

17. **Clark, M. and A.N. Adams.** 1977. Characteristics of the micro plate method Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the detection of plant viruses. Journal General Virology, 34: 475-483.

18. **Crosslin, J.M., P.B. Hamm and D.C. Hane.** 2006. The occurrence of PVY^{O}, PVY^{N} and $PVY^{N:O}$ strains of Potato virus Y in certified potato seed lot trials in Washington and Oregon. Plant Disease, 90: 1102-1105.

19. **El-Absawy, E.A., A. Mahmoud, A.A. Hemeida and M. Helmy.** 2012. Molecular variation of Potato Virus Y isolated from Egypt. International Journal of Virology, 8: 81-89.

20. **Glais, L., M. Tribodet and C. Kerlan.** 2005. Specific detection of the PVY^{N-W} variant of Potato virus Y. Journal of Virological Methods, 125: 131–136.

21. **Jeffries, C.J.** 1998. FAO/IPGRI technical guidelines for the safe movement of germplasm Potato. FAO/IPGRI, Rome, Italy, 19: 177.

22. **Kerlan, C., M. Tribodet, L. Glais and M. Guillet.** 1999. Variability of potato virus Y in potato crops in France. Journal of Phytopathology, 147: 643-651.

23. **Lorenzen, J.H., T. Meacham and P.H. Berger.** 2006a. Whole genome characterization of Potato virus Y isolates collected in the western USA and their comparison to isolates from Europe and Canada. Archives of Virology, 151: 1055-1074.

24. **Mackenzie, D.J., M.A. McLean, S. Murkerji and M. Green.** 1997. Improved DNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogen by polymerase chain reaction. Plant Disease, 81: 222-226.

25. **McDonald, J.G. and R.P. Singh,** 1996a. Host range, symptom atology and serology of isolates of Potato virus Y (PVY) that shared properties with both the PVY^{N} and PVY^{O} strain groups. American Potato Journal, 73: 309–315.

26. **McDonald, J.G. and R.P. Singh,** 1996b. Response of potato cultivars to North American isolates of PVY^{NTN}. American Potato Journal, 73: 317-323.

27. **Nagy, P.D.** 2008. Recombination in plant RNA viruses. Pages 133-156. In: Plant Virus Evolution. M.J. Roossinck (ed.). Heidelberg, Germany. Springer-Verlag.

28. **Nassuth, A., E. Pollari, K. Helmeczy, S. Stewart and S.A. Kofalvi.** 2000. Improved RNA extraction and one-tube RT-PCR assay for simultaneous detection for control plant RNA plus several viruses in plant extracts. Journal of Virology Methods, 90: 37-49.

29. **Ohshima, K., K. Sako, C. Hiraishi. A. Nakagawa, K. Matsuo, T. Ogawa, E. Shikata and N. Sako,** 2000. Potato tuber necrotic ringspot disease occurring in Japan: its association with Potato virus Y necrotic strain. Plant Disease, 84: 1109-1115.

30. **Piche, L.M., R.P. Singh, X. Nie and N.C. Gudmestad.** 2004. Diversity among Potato virus Y isolates obtained from potatoes grown in the United States. Phytopathology, 94: 1368-1375.

31. **Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis.** 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor , NY.

32. **Sankari, S., M. Chikh-Ali, K. Katayama, N. Miki, A.M.S. Omar, A.B. Sawas and K.T. Natsuaki.** 2007. The first repot of polyclonal antibody production of a Syrian isolate of Potato virus. Journal of Agricultural Science, Tokyo University of Agriculture, 2: 109-114.

33. **Schubert, J., V. Fomitcheva and J. Sztangret-Wisniewski.** 2007. Differentiation of Potato virus Y using improved sets of diagnostic PCR-primers. Japan Virology Methods, 140: 66-74.

34. **Singh, R.P., D.L. McLaren, X. Nie and M. Singh.** 2003. Possible escape of a recombinant isolate of

Potato virus Y by serological indexing and methods of its detection. Plant Disease, 87: 679-685.

35. **Singh, R.P., J.P.T Valkonen, S.M. Gray, N. Boonham, R.A.C. Jones, C. Kerlan and J. Schubert.** 2008. Discussion paper: The naming of Potato virus Y strains infecting potato. Archives of Virology, 153:1-13.

36. **Yin, Z., M. Chrzanowska, K. Michalak, H. Zagórska and E. Zimnoch-Guzowska.** 2012. Recombinants of PVY strains redominate among isolates from potato crop in Poland. Journal of Plant Protection Research, 52: 214-219.

تاريخ الاستلام: 2012/6/7؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2012/10/22

Received: June 7, 2012; Accepted: October 22, 2012