

التشخيص الجزيئي لفايروس الورقة المروحية للعنب بطريقة النسخ العكسي لتفاعل البلمرة المتسلسل (RT-PCR)

مثنى عكيدي عبد المعاضيدي
الهيئة العامة للبحوث الزراعية
وزارة الزراعة

فراس كاظم داؤد الجبوري
قسم وقاية النبات / كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل - العراق
نبيل عزيز قاسم

E-mail: firaskad@yahoo.com

الخلاصة

اجريت هذه الدراسة بهدف التشخيص الجزيئي لفايروس الورقة المروحية على العنب *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) المسبب لمرض الورقة المروحية للعنب في عينات العنب الورقية التي جمعت من بساتين العنب في محافظة صلاح الدين - العراق، واعتمدت الطريقة المباشرة السريعة في انبوبة واحدة للنسخ العكسي لتفاعل البلمرة المتسلسل Rapid direct one tube RT-PCR باستعمال زوج البوادئ GFLV2231F و GFLV2533R وانزيم النسخ العكسي SuperScript™ III RT لتضخيم جزء من جين الغلاف البروتيني 2Ccp في رنا الفايروس الثاني RNA2 وبحجم 322 زوج من القواعد النيروجينية Base pair. وثبتت اصابة العينات المختبرة بالفايروس من خلال الكشف عن نواتج النسخ العكسي RT-PCT باستعمال الترحيل الكهربائي في هلام الاجروز 1%، اذ تبين من خلال القياس بسلم الدنا الدليل ان احجام القطع الناتجة كانت بحدود 322 زوجا من القواعد النيروجينية وهذا مطابق لأحجام قطع الدنا الناتجة عن معاملة المقارنة الموجبة للفايروس مما اكد اصابتها بالفايروس.

الكلمات الدالة: فايروس الورقة المروحية، RT-PCR، GFLV

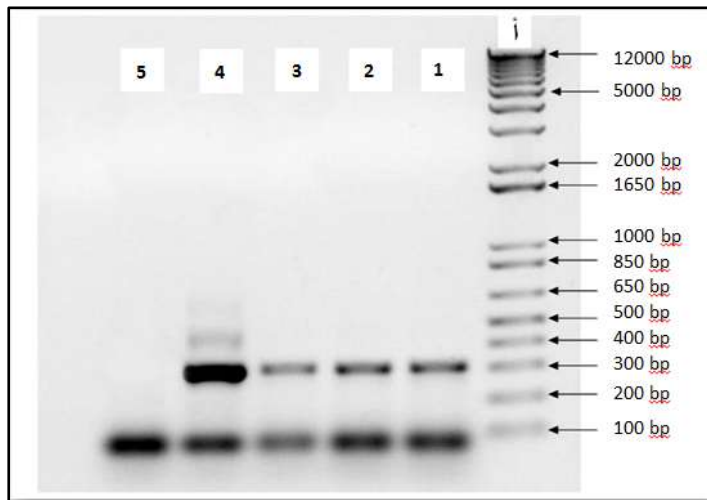
تاريخ تسلم البحث: 2013/2/17 ، وقبوله: 2013/5/27.

المقدمة

يسبب مرض الورقة المروحية المتسبب عن الفايروس *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) خسائر في الحاصل تتراوح بين المتوسطة 10-15% والعالية 90%، ذلك اعتمادا على ضراوة سلالة الفايروس وحساسية الصنف المصاب، ويؤثر المرض على جودة الثمار المنتجة حيث ينخفض محتواها من السكر وترتفع حموضتها، وتعاني الأشجار المصابة وخصوصا الأصناف الحساسة من نقص كبير في النمو قد يتجاوز 50%. كما ينخفض متوسط أعمار الأشجار المصابة (Martelli و Boudon-Podieu، 2006). يعود الفايروس GFLV الى العائلة *Secoviridae* والى الجنس *Nepovirus*. وينقل الفايروس بشكل تخصصي من اشجار العنب المصابة الى السليمة بواسطة النيماتودا الخنجرية *Xiphinema index*، وهي نيماتودا خارجية التطفل التي تتبع العائلة *Longidoridae* وتعد الناقل الرئيسي الطبيعي له اذ تكتسب الفايروس اثناء تغذيتها على جذور اشجار العنب المصابة (Cohn و اخرون، 1970 و Gerard، 2005).

جينوم الفايروس من النوع الرايبي مفرد الخيط موجب التوجه ثنائي القطعة Bipartite + sense ssRNA genome ويتكون فريون الفايروس من ثلاث جسيمات بلورية بقطر 30 نانومتر لكل منها (Martelli و Hewitt، 1963)، تتوزع فيها قطعتي الجينوم RNA1 و RNA2، وتملك بعض عزلات الفايروس ومنها العزلة F13 قطعة رايبية تابعة Satellite RNA (Pinck و اخرون، 1988). وتعد طرائق الكشف عن الفايروسات التي تعتمد تقانات تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase Chain Reaction فانقة الحساسية ولا تتأثر كثيرا بتغير تركيز الفايروس في النبات خلال السنة مقارنة بتقانة الاليزا (Liebenberg، 2008). وتم اجراء هذا البحث بهدف التعرف على امكانية تشخيص العزلة العراقية لفايروس الورقة المروحية للعنب باستعمال تقانة Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) والبوادئ المصممة للكشف عن عزلات الفايروس العالمية اذ لا تتوافر اي دراسات او معلومات جينية حول الفايروسات المنتشرة في العراق والتي قد تحوي على بعض الاختلافات في التعاقب النكليوتيدي في جينومها ناتج عن التغيرات بسبب اختلاف المنطقة الجغرافية والظروف المناخية خصوصا عندما يكون هذا التغير الجيني في منطقة الجينوم التي تستهدفها هذه البوادئ.

الحاوي على صبغة الاحماض النووية GelRed وهذه الحزم مطابقة في حجمها للحزمة في العمود الرابع التي تمثل عينة المقارنة الموجبة للفايروس في حين لا توجد اي حزمة في العمود الخامس الذي يمثل معاملة المقارنة السالبة المتمثلة بعينة اوراق العنب السليمة.



الشكل (1): الكشف عن قطع نسخ الحامض النووي الدنا المضخمة للغلاف البروتيني لفايروس GFLV باستعمال الهجرة الكهربائية في هلام الاجرورز 1% الحاوي على صبغة الاحماض النووية GelRed حيث يمثل العمود (أ) سلم الدنا الدليل 1Kb والاعمدة 1 و 2 و 3 تمثل ثلاث مكررات للعينة المصابة ويمثل العمود الرابع العينة الموجبة للفايروس و العمود الخامس هو العينة السالبة. (bp = Base pair = زوج من القواعد النتروجينية).

MOLECULAR IDENTIFICATION OF *GRAPEVINE FANLEAF VIRUS*

Al Juboori, F. K.

Qassem, N. A.

Al-Maadhedi, M.

Plant protection Dept., College of Agriculture and Forestry,
Mosul University. Iraq.

Ministry of Agriculture
Iraq

E-mail: firaskad@yahoo.com

ABSTRACT

This study was conducted to molecular diagnostics of *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) in leaf samples of grapevine were collected from the grapevine yards in Salahuddin governorate, where grapevines are commonly grown in Iraq. The virus was detected in the samples by using SuperScriptTM III RT kit and pair of specific primers GFLV2231F and GFLV2533R was used to amplify fragments of the coat protein gene (CP) in rapid direct one tube RT-PCR.

Keywords: *Grapevine fanleaf virus*, GFLV, RT-PCR, Iraq.

Received: 17/2/2013, Accepted: 27/5/2013.

المصادر

Cohn, E., E. Tanne, and F. E. Nitzany (1970). *Xiphinema italiae*, a new vector of the *Grapevine fanleaf virus*. *Phytopathology*. 60:181-182.

Gerard, A., C. Ritzenthaler, M. Pinck, M. Serghini and L. Pinck (1995). The 119 kDa and 124 kDa polyproteins of *Arabis mosaic Nepovirus* (isolate S) are encoded by two distinct RNA2 species. *Journal of General Virology*. 76: 899-906.

- Martelli, G. P. and E. Boudon-Padieu (2006). Directory Of Infectious Diseases Of Grapevines Viruses And Virus Like Diseases Of Grapevine: Bibliographic Report 1998-2004. Opinions Mediterraneennes Series B: Studies and Research.
- Martelli, G. P. and W. B. Hewitt (1963). Purification and serology of some Italian and Californian virus diseases of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*. 2: 232-242.
- Mekuria, T., R. R. Martin and R. A. Naidu (2008). The Occurrence of *Grapevine Fanleaf Virus* in Washington State Vineyards. Proceedings of the 2nd Annual National Viticulture Research Conference. July 9–11, 2008. University of California, Davis. P. 52-53.
- Pinck, L., M. Fuchs, M. Pinck, M. Ravelonandro and B. Walter (1988). A satellite RNA in Grapevine fanleaf virus strain F13. *Journal of General Virology*. 69: 233-239.
- Rowhani, A., L. Biardi, R. Johnson, P. Saldarelli, Y. P. Zhang, J. Chin, and M. Green (2000). Simplified sample preparation method and one-tube RT-PCR for grapevine viruses. In: Proceedings of XIII International Council For The Study Of Viruses And Virus-Like Diseases Of The Grapevine, Adelaide 2000, p. 82(Abstract).