

Name of Candidate: Samah Abdel-Salam Mokbel

Degree: Ph D

Title of Thesis: Studies on Prunus Necrotic Ringspot Virus Affecting Some Species of the Family Rosaceae.

Supervisors: Prof. Dr. Aly Mohamed Mamoun, Abdel-Salam, Prof. Dr. Ibrahim Abdel-Moneim Mohamed, Dr. Abdel-Wahab Amin El-Amrity and Dr. Hayam Samy Abdel-Kader

Department: Plant Pathology

Branch: Plant Pathology

Approval: 20/1/2008

ABSTRACT

Prunus necrotic ring spot virus (PNRSV) was isolated for the first time in Egypt from naturally infected rose plants collected from the experimental farm of the Faculty of Agriculture, Cairo University. Observed symptoms circumvented necrotic ring spots on leaves, bud failure and color breaking of petals. The virus was transmitted mechanically. The purified virus had A_{max} and A_{min} at 260 and 240 nm respectively. The 260/280 ratio was 1.56. Yield of purified virus from infected *Gompherina globosa* was 0.182 mg/g tissue. Electron micrograph of the purified virus showed spherical (23 nm) as well as bacilliform virus particles (42x23 nm). The induced antisera from the purified virus was successfully used to detect *PNRSV* in rose plants in several locations in Egypt.

The full length RNA3 (Coat protein gene) of *PNRSV* (~704 bp) was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) from rose tissues and from purified virus using the designed oligonucleotides CP (-) and CP (+). The full length of the replicase gene (RNA1) of *PNRSV* (~3332 bp) was successfully amplified by RT-PCR using different sets of specific primers. A sensitive and specific IC-RT-PCR was used for the detection of *PNRSV* from rose tissues.

Sequence analysis of *PNRSV*/rep gene of the rose isolate indicated 60 % similarity to that of *PNRSV*-AF278534 and NC-004362.

Virus elimination procedure was performed to determine the efficacy and preferable concentrations of the antiviral chemicals, i.e. ribavirin (virazole) and thiouracil for their antiviral effects on production of *PNRSV*-free rose plants. All the concentrations used of tested substances proved to be beneficial for both explants regeneration and percentages of virus-free plants.

Incorporation of virazole into culture medium resulted in high percentages of *PNRSV*-free plants. These percentages were 61.5%, 76.1% and 85% where the corresponding concentrations were 10, 20 and 30 mg/L respectively for rose plants. On the other hand, supplementing thiouracil at concentrations of 10, 20 and 30 mg/L resulted in 55%, 60% and 80% respectively.

Incorporation of virazole combined with thiouracil into culture medium led to a high percentage of virus-free plants. The percentage of virus-free plantlets reached the maximum, being 93.7% with a total of 30 mg/L equal amount of virazole and thiouracil.

اسم الطالب: سماح عبد السلام مقبل

الدرجة: الدكتوراه

عنوان الرسالة: دراسات على فيروس التبقع الحلقى النيكروزى الذى يصيب بعض انواع

الفصيلة الوردية

المشرفون: الأستاذ الدكتور: على محمد مأمون عبدالسلام

الأستاذ الدكتور: ابراهيم عبد المنعم محمد

الدكتور: عبد الوهاب امين العمريطى

الدكتور: هيام سامى عبد القادر

قسم: أمراض النبات فرع: أمراض النبات تاريخ منح الدرجة: ٢٠٠٨/ ١/ ٢٠

المستخلص العربى

تم للمرة الاولى فى مصر عزل فيروس التبقع الحلقى النيكروزى فى البرقوق بالفيروس والمزروعة فى مشاتل الزينة بالمزرعة التجريبية بكلية الزراعة القاهرة جامعة القاهرة بمصر. وتمثلت مظاهر الاصابة الاساسية على تكون البقع الحلقية على الاوراق وتكسر لون البتلات وتشوها وكذا عدم تكشف البراعم فى النباتات المصابة.

واظهرت الدراسة التجريبية امكانية نقل الفيروس ميكانيكيا. وبينت خواص الفيروس المنقى ان اعلى وادنى امتصاص للاشعة فوق البنفسجية كان عند ٢٦٠ و ٢٤٠ نانوميتر على التوالي. وذو تركيز يبلغ mg ٠,١٨٢ من انسجة نبات *Gompherina globosa*. وبينت دراسات المجهر الالكترونى تواجد جزيئات كروية (٢٣-nm) واخرى ذات شكل باسيلى. (٢٣x٤٢ nm) فى تحضيرات الفيروس المنقى.

ولقد تمت بلمرة الطول الكلى لجين الغلاف البروتينى (٧٠٤) نيوكليوتيدة و جين ال replicase الخاص بالفيروس بواسطة انزيم النسخ العكسى وتفاعل البلمرة المتسلسل *reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)* باستخدام عدة بادئات متخصصة لكل جين على حدة للكشف عن الفيروس فى نباتات الورد المصابة و فى تحضيرات الفيروس المنقى و كذلك امكن تطويع اختبار الارتباط المناعى الحساس المدمج مع تفاعل البلمرة المتسلسل *IC-RT-PCR* بنجاح فى الكشف عن الفيروس فى نباتات الورد المصابة. وقد اوضحت دراسات التتابع النيوكليوتيدى الجزئى لجين الريبليكيلىز للفيروس الخاص بعزلة الورد المصرية لـ *PNRSV-R* وجود درجة تشابه تبلغ ٦٠% مع العزلتين *PNRSV-AF٢٧٨٥٣٤* و *NC-٠٠٤٣٦٢* والمسجلتين فى بنك الجينات الامريكى.

أثبتت التجارب انه يمكن التخلص كيمياويا من الفيروسات التى تحملها النباتات الناتجة عن الزراعة المعقمة وقد جربت اثنتين من مضادات الفيروس *Antiviral compounds* وهى الفيرازول والثيوبوراسيل وقد اثبتت كل التركيزات المستعملة فعاليتها لذلك وكانت افضل نتيجة للنباتات الخالية من الفيروس لاستعمال الفيرازول هى ٦١,٥% و ٧٦,١% و ٨٥% نباتات خالية من الفيروس عندما كانت التركيزات ١٠ و ٢٠ و ٣٠ ملليجرام/لتر اما بالنسبة للثيوبوراسيل فكانت النسب ٥٥,٥% و ٦٠% و ٨٠% نباتات خالية من الفيروس عند استخدام نفس التركيز.

وعند اضافة كل من الفيرازول والثيوبوراسيل معا الى بيئة الزراعة بتركيز ١٠ و ٢٠ و ٣٠ ملليجرام/ لتر كانت نسبة النباتات الخالية من الفيروس هى ٧٣,٣% و ٨٣,٣% و ٩٣,٧% على التوالي.

CONTENTS

	Page
INTRODUCTION	1
REVIEW OF LITERATURE	4
1. Virus Isolate Economic Importance and Geographic Distribution	4
2. Symptomatology	6
3. Virus transmission	14
4. Host range studies	15
5. Purification and electron microscopy	18
6. Serological studies	19
a. Antiserum production.....	19
b. Detection of PNRSV using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	21
7. Molecular studies	25
a. RNA extraction.....	26
b. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	26
c. Immunocapture Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (IC-RT-PCR)	28
d. Cloning and Sequencing.....	29
8. In vitro propagation of PNRSV-free rose plantlets	30
a. Chemotherapy.....	31
b. Effect of activated compounds to culture medium on the production of virus-free rose plants.....	32
c. Virazole (Ribavirin)	32
d. Thiouracil.....	35
MATERIAL AND METHODS	37
1. Biological studies	37
a. Source of the virus isolate.....	37
b. Isolation and propagation of PNRSV-R.....	37
c. Host range studies.....	38
d. Virus incidence in rose fields.....	38
2. Physical and chemical studies on purified virus	39
a. Virus Purification.....	39
b. Electron Microscopic Examination (EM)	39

3. Serological studies	39
a. Antiserum production.....	39
b. Separation of IgG.....	40
c. Conjugation of IgG with alkaline phosphates.....	40
d. Titration of antiserum.....	41
e. Purification of Immunoglobulins (IgG)	41
f. Preparation of cross-absorbed antiserum and γ .globulin.....	42
g. Serological tests.....	42
1. Indirect ELISA method.....	43
2. Double antibody sandwich ELISA method (DAS- ELISA)	43
4. Molecular biological studies	44
a. RNA extraction.....	44
1. Total RNA isolation.....	44
2. Viral RNA extraction from purified <i>PNRSV</i>	45
b. Design of oligonucleotide primers and Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	46
c. Immunocapture Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (IC-RT-PCR)	48
d. Molecular cloning	49
1. Preparation of <i>E. coli</i> competent cells	50
2. Bacterial Transformation	51
3. Preparation of recombinant plasmids.....	53
e. Automated DNA sequencing	54
5. In Vitro propagation of <i>PNRSV</i>-free rose plantlets	54
a. Virus detection by ELISA test.....	54
b. Micropropagation of shoots.....	54
c. Surface sterilization.....	55
d. Elimination of browning.....	55
e. Used media for establishment stage.....	56
f. Rooting stage.....	56
g. Effect of antiviral compounds on production of virus-free rose plants.....	57
RESULTS	58
1. Biological studies	58
a. Source of the virus isolate.....	58
b. Isolation and propagation of <i>PNRSV</i> -R.....	58
c. Host range studies.....	58

d. Virus incidence in rose fields.....	59
2. Physical and chemical studies on purified virus.....	63
a. Virus purification.....	63
b. Electron Microscopic Examination (EM)	63
3. Serological studies.....	64
a. Antiserum production.....	64
b. Separation of IgG.....	65
c. Conjugation of IgG with alkaline phosphates.....	66
4. Molecular biological studies.....	67
a. RNA extraction	67
b. Design of oligonucleotide primers.....	67
c. RT-PCR detection of <i>PNRSV</i> -R in rose tissues.....	70
1. Coat protein gene amplification.....	70
2. Replicase gene amplification.....	71
d. IC-RT-PCR for <i>PNRSV</i> detection in rose.....	72
e. Molecular cloning.....	73
f. Sequence analysis of <i>PNRSV</i> /rep gene.....	74
5. In vitro propagation of <i>PNRSV</i>-free rose plantlets....	76
a. Virus detection by ELISA test.....	76
b. Micropropagation of shoots.....	76
c. Eliminating browning.....	76
d. Rooting stage.....	77
e. Effect of antiviral compounds on production of virus-free rose plants.....	77
DISCUSSION.....	81
SUMMARY.....	90
1. Biological studies.....	
a. Virus isolation and propagation.....	90
b. Host range studies.....	90
c. Virus incidence in rose fields.....	91
2. Physical and chemical studies on purified virus.....	91
a. Virus purification.....	91
b. Electron Microscopic Examination (EM)	91
3. Serological studies.....	91
a. Antiserum production.....	91
b. Extraction and purification of immunoglobulins and preparation of IgG-conjugate.....	91
c. Serological tests.....	92
1. Indirect ELISA method.....	92

2. Direct ELISA method (DAS-ELISA)	92
4. Molecular biological studies	92
a. Design of oligonucleotide primers	92
b. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	93
c. Immunocapture Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (IC-RT-PCR)	93
d. Molecular Cloning.....	94
e. Automated DNA sequencing.....	94
5. In Vitro propagation of <i>PNRSV</i>-free rose plantlets...	94
REFERENCES	96
APPENDIX	113
ARABIC SUMMARY	