Name of Candidate: Ali Hussein Hamed **Degree:** Ph.D.

Title of Thesis: Studies on Some Viruses Infecting Onion (*Allium cepa* L.) Plants in Egypt

Supervisors: Dr. Om-Hasheim Mohammed El-Banna
Dr. Gamal Amien Mohammed Ghanem
Dr. Hassan Ibrahim Ali Ahmed El-Naggar
Dr. Mahmoud Sabry Ahmad Shafie

Department: Plant Pathology **Approval:** 26 / 7/ 2011

ABSTRACT

Two viruses used in this study, *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) and *Tobacco rattle virus* (TRV), were isolated from naturally infected onion (*Allium cepa* L.) plants growing in the fields of onion plants during the survey carried out in 2007-2008 and 2008-2009 in seven Egyptian Governorates. The results indicated that the mean percentages of OYDV-infection were 24.48 and 19.98 % and TRV-infection were 1.04 and 0.42%, respectively in first and second seasons all over the seven Governorates.

Naturally infected onion plants showing symptoms of OYDV *i.e.* leaf curling, stunting, malformation and yellow striping and TRV *i.e.* yellowing, malformation, chlorotic and white necrotic stripes. The obtained results indicated the possibility of mechanical transmission of the two viruses, which were also transmitted by seeds with percentages ranged between12-18% for OYDV and 8-13 % for TRV. *Meloidogyne incognita* nematodes were able to transmit TRV to healthy onion plants by 12%. The host range of the two viruses included 7 different plant families.

Cytological study using light microscopy resulted the formation of amorphous inclusion bodies in the cytoplasm of infected onion plant "Beheri" leaves with OYDV and tobacco leaves infected with TRV. By light microscopy of semi thin sections of both healthy and artificially infected onion leaves with the two viruses several anatomical changes were observed reflecting the external symptoms on infected plants. By electron microscopy, the two virus particles were observed with two main dimensions (length 770 nm and 12nm width for OYDV and tubular particles with straight *i.e.* long about 190 nm, short about 114 nm with diameter about 22 for TRV). Investigation of ultrathin sections by Transmission electron microscopy revealed changes in the chloroplast and in the cytoplasm where showed pinwheels and scrolls with OYDV only, in both the nucleus and the chloroplast with TRV. The different serological methods were used successfully for detection of the two viruses *i.e.* DAS-ELISA, indirect ELISA, TBIA and DIBA. According to the available data, TRV was isolated and identified for the first time in Egypt from onion plants during the present study.

Changes in some biochemical components associated with OYDV infection were studied, using two onion cultivars "Giza 6" and "Beheri". The virus OYDV reduced the photosynthetic pigments (chlorophyll A, B and total chlorophyll) and carotene contents of infected onion leaves "Beheri". In addition, percentages of reducing, non-reducing and total sugars were increased in bulbs of both cultivars, but reduced in leaves of "Beheri". The results indicated that the percentages of free, conjugate and total phenols were reduced in bulbs of both cultivars, while increased in leaves of "Beheri" in infected onion plants. Concerning peroxidase activity was increased in infected bulbs of "Giza 6" followed by leaves and bulbs of "Beheri", but polyphenoloxidase activity was increased in the bulbs of "Beheri", "Giza 6" and leaves of "Beheri".

Key words: *Tobacco rattle virus* (TRV), *Onion yellow dwarf virus* (OYDV), serological detection, inclusion bodies, histological changes, electron microscope,

إسم الطالب: على حسين حامد محمد **الدرجة:** الدكتوراه

عنوان الرسالة: دراسات على بعض الفيروسات التى تصيب نباتات البصل فى مصر

المشرفون : دكتور: أم هاشم محمد إبراهيم البنا
دكتور: جمال أمين محمد غانم
دكتور: حسن إبراهيم على أحمد النجار
دكتور: محمود صبرى أحمد شفيع

قسم: أمراض النبات **تاريخ منح الدرجة:** 26/ 2011/7

المستخلص العربي

فى هذه الدراسة تم عزل و تعريف فيروسين مختلفين من نباتات البصل (*Allium cepa* L.) المصابة طبيعياً فى الحقل وهما فيروس تقزم واصفرارالبصل *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) وفيروس خشخشة الدخان *Tobacco rattle virus* (TRV), كما تم تقدير نسبة انتشار الفيروسين فى سبعة محافظات مختلفة فى الوجة البحرى (الغربية, المنوفية والقليوبية) ومصر الوسطى (الجيزة ,الفيوم وبنى سويف) ومصر العليا (محافظة قنا). أجري الحصر خلال موسمين متتاليين هما (2007-2008 و 2008-2009). لوحظت أعراض مختلفة متفاوتة مثل اصفرار الاوراق ، التقزم ، تشوه ، التخطيط الأصفر والأبيض. على النباتات وكانت نسبة الإصابة 24.48 و19.98% خلال الموسم الاول و الثانى للفيروس OYDV على التوالى, اما فيروس TRV كانت نسبة الإصابة خلال الموسم الأول والثانى 1.04و0.42% على التوالى. كما أظهرت النتائج وجود أنواع نيماتودا التقزم ,تعقد الجذور, التقرح, الرمحية و نيماتودا السوق والأبصال بأعداد مختلفة في عينات التربة التي تم جمعها. ينحصر المدى العوائلى للفيروسOYDV فى العائلة الزنبقية, أما فيروس TRV يعطى أعراضاً مع بعض النباتات التابعة لبعض العائلات النباتية مثل العائلة الزنبقية ,القرعية ,الزربيحية, البقولية والباذنجانية .وجد أيضاً أن كلا الفيروسين ينتقل عن طريق البذرة وكانت نسبة انتقال فيروس OYDV (12-18 ٪) بين الاصناف جيزة 6 ,20 والصنف بحيرى, أما فيروس TRV فكانت النسبة (8-13٪) . كما ينتقل فيروس TRV عن طريق نيماتودا تعقد الجذور مع الصنف بحيرى. تم تطبيق الطرق السيرولوجية المختلفة باستخدام الانتيسيرم الخاص لكلا الفيروسين فى التعريف وأعطت نتائج ايجابية ومؤكدة. كما أكدت الدراسة وجود محتويات داخلية أمورفية فى سيتوبلازم نباتات البصل المحقونة بفيروس OYDV ونباتات الدخان المحقونة بفيروس TRV كما لوحظ الاجسام المحتواة لفيروس تقزم واصفرار البصل وهى عبارة عن Pinwheel و Laminated bundles. من دراسة التغيرات الهستولوجية لأوراق البصل الأنبوبية المصابة بفيروس OYDV تبين انتظام الخلايا العمادية فى بعض المناطق وصغرها وعدم انتظامها فى مناطق أخرى, صغر حجم الخلايا الإسفنجية, عدم وجود غرف هوائية بين الخلايا الإسفنجية فى بعض المناطق ووجودها فى مناطق أخرى بالإضافة إلى قلة البلاستيدات الخضراء فى النباتات المصابة مقارنة بالسليمة. كما أجريت نفس الدراسة مع فيروسTRV. وأظهرت القطاعات التشريحية حدوث اختزال واضح للنسيج الميزوفيلى و حدوث انضغاط للنسيج الاسفنجى مع قلة المسافات البينية و قلة البلاستيدات الخضراء وتحلل بعضها ووجود نكروزس فى أنسجة اللحاء بالمقارنة بالأنسجة السليمة. أظهرت نتائج الفحص باستخدام الميكروسكوب الالكترونى أن جزيئات فيروسOYDV خيطية الشكل بأبعاد حوالى 770×12نانوميتير, بينما جزيئات فيروسTRV عصوية طويلة وقصيرة بأبعاد حوالى 190-114×22 نانوميتر. تم تقدير بعض التغيرات البيوكيميائية المصاحبة للإصابة بفيروس OYDV أدت الإصابة إلى نقص فى محتوى الاوراق من الكلوروفيل و الكاروتين فى الأوراق فى الصنف بحيرى. أيضاً زيادة فى محتوى الأبصال من السكريات غير المختزلة والسكريات المختزلة و السكريات الكلية نتيجة الإصابة, وعلى العكس من ذلك ظهر نقص فى محتوى الأوراق المصابة من السكريات غير المختزلة والسكريات المختزلة و السكريات الكلية. وتبين أيضاً وجود نقص فى محتوى الأبصال من الفينولات الحرة والفينولات المرتبطة والفينولات الكلية, وزاد محتوى الأوراق من الفينولات الحرة والفينولات الكلية, وحدث اختزال للفينولات المرتبطة. كما أجرى تقدير لنشاط انزيمات البيروكسيديز والبولى فينول اوكسيديز ووجد زيادة فى نشاط انزيمات البيروكسيديز والبولى فينول اوكسيديز فى الأوراق والأبصال المصابة بالفيروس.

الكلمات الدالة: فيروس تقزم واصفرار البصل, فيروس خشخشة الدخان, الطرق السيرولوجية, طرق النقل ,الأجسام المحتواة , التغيرات الهستولوجية , الميكروسكوب الالكترونى والتغيرات البيوكيميائية.

CONTENTS

	Page
INTRODUCTION	1
REVIEW OF LITERATURE	5
1. *Onion yellow dwarf virus*	5
2. *Tobacco rattle Tobravirus*	21
MATERIALS AND METHODS	39
1. Survey of viruses and nematodes associated with onion plants	39
a. Survey of viruses	39
b. Survey of nematodes	44
2. Isolation of the two viruses	44
3.Identification of the two viruses	45
a. Host range and symptomatology of infecting by OYDV and TRV	45
b. Modes of transmission	46
1. Mechanical transmission	46
2. Seed transmission	46
3. Nematode transmission	47
4. **Serologic diagnosis**	50
a. Viruses in plants sap	50
1. Direct ELISA	50
2. Indirect ELISA	52
3. Tissue blotting immunosorbent assay (TBIA) and Dot blotting immunosorbent assay (DBIA)	52
b. Serological detection of TRV in nematodes	53
5. Cytological effects of OYDV and TRV infection	53
a. Light microscopy of inclusion bodies	53
b. Morphology of virus particles	54
c. Ultrathin and Semi thin sections	54
6. Biochemical changes in onion infected with OYDV	56
a. Photosynthetic pigments and carotene	57
b. sugar contents	57
c. Phenol contents	58
d. Determination of peroxidase activity	59

e. determination of Polyphenoloxidase activity 59
RESULTS 61
1. **Field survey of viruses and nematodes associated with onion plants in Egypt** 61
a. Survey of viruses 61
1. Visual examination 61
2. Serological detection of OYDV and TRV using indirect ELISA 63
b. Survey of nematodes 68
2. **Isolation and identification of OYDV and TRV** 72
a. Isolation 72
b. Identification of OYDV and TRV 72
1. Host range and symptomatology of OYDV and TRV 72
2. Modes of transmission 74
a. Mechanical transmission 74
b. Seed transmission 74
c. Nematode transmission 80
3. **Serological diagnosis** 83
a. Serological detection using DAS-ELISA 83
b. Tissue blotting immunobinding assay (TBIA) and dot blotting immunobinding assay 83
c. TRV detection in viruliferous nematode 83
4. **Cytological effects of OYDV and TRV for onion plant-infection infection** 84
a. Examinatiom of inclusion bodies using Light microscopy 84
b. Semi thin sections 84
5. **Electron microscopy** 95
a. Morphology of virus particles 95
b. Ultrathin sections 97
6. **Biochemical changes in onion infected with OYDV** 99
a. Photosynthetic pigments and carotene 99
b. Sugar contents 100
c. Phenol contents 102
d. Changes in peroxidase and polyphenoloxidase enzymes 103

DISCUSSION..... 107
SUMMARY..... 123
REFERENCES 133
ARABIC SUMMARY.....

ABBREVIATIONS

Ab	Absorbance
Acc.	Accession
AIB	Amorphous Inclusion Bodies
AP	Alkaline Phosphates
ARC	Agriculture Research Center
AS	Antiserum
BCIP	5- Bromo-4chloro-3indolyl phosphate
BSA	Bovine Serum Albumin
C.	*Chenopodium*
cc.	Cubic centimeters
CIP	Cylindrical Inclusion Protein
CIs	Cylindrical Inclusions
CLL	Chlorotic Local Lesion
cm	Centimeter
cv	" "
DAS	Double antibody sandwich
EB	Extraction Buffer
EDTA	Ethylene Diethyle Tri acetic Acid
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FARP	Faculty of Agriculture Research Park
Fig.	Figure
g	Gram
Kg	Kilogram
KHPo4	Potassium Hydrogen Orthophosphate
LSC	Low Speed Centrifugation
LYSV	Leek yellow stripe virus
mg	Miligram
ml	Mililitre
N.	*Nicotiana*
Na Cl	Sodium chloride
Na2SO3	Sodium sulfite
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NLL	Necrotic Local Lesion
No.	Number
PBS	Phosphate Buffer Saline
PBST	PBS-Tween

PEG	Poly Ethylene Glycol
pH	Potential of hydrogen
p-NPP	P-Nitro Phenyl Phosphate
PNW	Pacific Northwest
PPN	plant-parasitic nematodes
PTA	Phospho Tungestic Acid
PVP	Bovine serum albumin
RT-PCR	Teverse-transcription polymerase chain reaction
SDG	Sucrose density gradient
TBRV	*Tomato black ring virus*
UV	Ultra Violet
V/V	Volume per volume
V/W	Volume by whit
var.	Variety
µg	Microgram
µl	Microliter