SEROLOGICAL STUDIES ON SOME VIRUSES OF FAMILY FABACEAE

By

HANAN FARAG EL-SAYED ABD-EL SALAM
B. Sc. Agric. Sci. (Plant Pathol.), Fac. Agric., Zagazig Univ., 2003.

THESIS
Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements in the Degree of

MASTER OF SCIENCE

In

Agricultural Sciences
(Plant Pathology)

Department of Plant Pathology
Faculty of Agriculture
Cairo University

EGYPT

2010

APPROVAL SHEET

SEROLOGICAL STUDIES ON SOME VIRUSES OF FAMILY FABACEAE

M.Sc. Thesis
In
Agric. Sci.(Plant Pathol.)

By

HANAN FARAG EL-SAYED ABD-EL SALAM
B. Sc.Agric. Sci.(Plant Pathol.),Fac. Agric.,Zagazig Univ., 2003.

Approval Committee

Dr. NABILA ABD EL ZAHER ABDEL AZIZ ....
Professor of Plant Pathology, Fac. Agric., Minia University

Dr. MOHAMMED FAROUK ATTIA.....
Professor of Plant Pathology, Fac. Agric., Cairo University

Dr.IBRAHIM ABD EL-MONEIM MOHAMMED.....
Professor of Plant Pathology, Fac. Agric., Cairo University

Dr.OM-HASHEIM MOHAMMED EL-BANNA .....
Professor of Plant Pathology, Fac. Agric., Cairo University

Date: / /

SUPERVISION SHEET

SEROLOGICAL STUDIES ON SOME VIRUSES OF FAMILY FABACEAE

M.Sc. Thesis
In
Agric. Sci.(Plant Pathol.)

By

HANAN FARAG EL-SAYED ABD-EL SALAM
B. Sc. Agric. Sci.(Plant Pathol.), Fac. Agric., Zagazig Univ., 2003.

SUPERVISION COMMITTEE

Dr.OM-HASHEIM MOHAMMED EL-BANNA
Professor of Plant Pathol., Fac. Agric., Cairo University

Dr.IBRAHIM ABD –ELMONIAM MOHAMMED
Professor of Plant Pathol., Fac. Agric., Cairo University

Dr.EAMAN AHMED KHATTAB
Senior Researcher of Plant Pathol., Plant Pathol. Res. Inst., ARC

Name of Candidate: Hanan Farag El-sayed Abd-El salam **Degree:** M.Sc.
Title of Thesis: Serological Studies on Some Viruses of Family Fabaceae
Supervisors: Dr. Om-Hashem Mohammed El-Banna, Dr. Ibrahim Abd–Elmoneim Mohammed and Dr. Eman Ahmed Khattab
Department: Plant Pathology **Approval: 4/ 3 / 2010**

ABSTRACT

Two viruses, namely : *Pea seed –borne mosaic Potyvirus* (PSbMV)and *Broad bean mottle Bromovirus* (BBMV) were isolated from pea and faba bean plants collected from Qualubia and from the experimental farm of Agriculture Research Center at Giza, respectively.The two viruses were identified according to host range, virus stability in crude sap, modes of transmission, serological diagnosis, inclusion bodies and particle morphology. Study of host range which included different plant species belonging to eight families: *Amaranthiaceac,Chenopodiaceae, Cucurbitaceae, Fabaceae, Alliaceae, Solanaceae, Compositaceae and Graminaceac* revealed that the reactions of different hosts differed according to tested viruses. Data concerning stability of viruses in crude sap for PSbMV were TIP 55 °C, DEP 10^{-3}-10^{-4} and LIV 1day, but for BBMV were TIP 95°C, DEP 10^{-2} - 10^{-3} and LIV 7 days. Data concerning modes of transmission of the isolated viruses showed that PSbMV was mechanically and aphid transmitted. Three aphid species could transmit PSbMV none persistently and *Myzus persica*e was the most effective vector (60%). However BBMV was mechanically and by *Sitona lineata* which was the most effective vector (6-7%), but not transmitted by any of the tested aphid species. The two viruses produced amorphous inclusion bodies (AIB). Two different methods were used to purify the isolated viruses. The ultraviolet absorption spectra of the purified viruses preparations are typical for nucleoproteins with a minimum at 243 and a maximum at 260, the ratios of A260/A280 and A max/A min were 1.33 and 1.11, respectively. Virus yield was 5.55 mg/100g of *Pisum sativum* fresh leaves calculated on the basis of an extinction coefficient 2.4. On the other hand, data concerning BBMV showed that the ultraviolet absorption spectra of the purified virus preparation revealed typical nucleoproteins with a minimum at 245nm and a maximum at 260 nm. The ratios of A260/A280 and A max/A min were 1.57 and 1.39, respectively. Yield of the purified virus was about 9.9 mg/100g infected faba bean leaves. Antisera for the isolated viruses were obtained by injecting rabbits with high purified virus suspensions. The validity of ELISA reagents was determined by Tissue Blot Immuno Assay (TBIA) and Dot Blot Immuno Assay (DBIA) on nitrocellulose membrane positive reaction was obtained and the prevalence of the two viruses in flowers and seed parts was confirmed.

Key words: *Pea seed – borne mosaic Potyvirus* (PSbMV), *Broad bean mottle Bromovirus* (BBMV), Host range, Inclusion bodies, Transmission, Purification, ELISA reagents, DBIA and TBIA.

ACKNOWLEDGEMENT

I wish to express my sincere thanks to ***the Ministry of State for Scientific Research; Academy of Scientific Research & Techonology Specialized Councils Sector; Central Department for Projects follow-up*** *for providing me chance to study this work and for providing me with money. As well I wish to express my sincere thanks, deepest gratitude and appreciation to* ***Dr. Om-Hashem Mohammed EL-Banna*** *Professor of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Cairo University for suggesting the problem, her kind supervision, advice scientific help, continued assistance and their guidance throughout the course of this study, valuable guidance, encouragement supply, facilities and for reviewing this thesis. Many thanks to* ***Dr.Ibrahim Abd EL-Moniam Mohammed*** *Professor of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Cairo University for suggesting the search problem and his valuable supervision. Sincere thanks are extended to* ***Dr. Eman Ahmed Khattab****, Senior Researcher of Plant Virus and Phytoplasma Research Department, Plant Pathology Research Institute, ARC, for her valuable assistance, supervising this work and profitable help in this work.*

Great thanks to ***Dr. Manal Ali EL-Shazly,*** *Researcher of Virus and Phytoplasma Department, Plant Pathology Research Institute, ARC, for her valuable assistance in part of purification.*

Finally, I present deepest thanks and great gratitude to my family for their kindness, sacrifice, supporting and encouragement through the whole investigation.

ABBREVIATIONS

A	Absorbance
AP	Alkaline Phosphates
AIB	Amorphous Inclusion Bodies
ARC	Agriculture Research Center
AS	Antiserum
BBMV	Broad Bean Mottle Virus
BCIP	5- Bromo-4chloro-3indolyl phosphate
Bp	Base pair
CP	Coat Protein
Cont	continued
BSA	Bovine Serum Albumin
CIP	Cylindrical Inclusion Protein
CLL	Chlorotic Local Lesion
DEP	Dilution End Point
DBIA	Dot Blot Immuno Assay
Fam	Family
G	Gram
EB	Extraction Buffer
EDTA	Ethylene Diethyle Tri acetic Acid
HSC	High Speed Centrifugation
IGg	Immunogamma globulin
Kg	Kilogram
KHPo4	Potassium Hydrogen Orthophosphate
LSC	Low Speed Centrifugation
LIV	Longevity *Invitro*
MW	Molecular Weight
Na cL	Sodium chloride

Na2SO3	Sodium Sulfite
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NLL	Necrotic Local Lesion
PBS	Phosphate Buffer Saline
PBST	PBS-Tween
PEG	Poly Ethylene Glycol
PSbMV	Pea Seed- borne Mosaic Potyvirus
p-NPP	P-Nitro Phenyl Phosphate
PTA	Phospho Tungestic Acid
SDG	Sucrose Density Gradient
TBIA	Tissue Blot Immuno Assay
TIP	Thermal Inactivation Point
UV	Ultra Violet
V/V	volume by volume

اسم الطالبة: حنان فرج السيد عبد السلام **الدرجة:**الماجستير

عنوان الرسالة:دراسات سيرولوجية على بعض فيروسات العائلة البقولية.

المشرفون : دكتور : أم هاشم محمد البنا
دكتور :إبراهيم عبد المنعم محمد
دكتور :إيمان أحمد خطاب

قسم:أمراض النبات **تاريخ منح الدرجة:** / /

المستخلص العربي

تم عزل الفيروس المنقول ببذور البسلة PSbMV من نباتات بسلة مصابة طبيعياً وكذلك فيروس تبرقش أوراق الفول البلدى BBMV من نباتات الفول المصابة طبيعياً وذلك من حقول مختلفة بمنتطقتى القليوبية ومركز البحوث الزراعية بالجيزة وقد أجرى تعريف الفيروسين على أساس التفاعلات السيرولوجية مع الامصال المضادة نباتية وعلى المدى العوائلى والخواص الفيزيائية وطريقة النقل بواسطة المن والخنافس والبذرة وكذلك إنتاج الاليزا كيت لكل فيروس. تم دراسة المدى العوائلى للفيروسين المعزولين بإستحدام أنواع نباتية مختلفة. ثبت من تجارب الخواص الفيزيائية أن درجة الحرارة التى يفقد عندها الفيروس تأثيرة المرضى كانت٥٥ ؛ ٩٥ درجة مئوية لفيروسات BBMV, PSbMV على الترتيب ونقطة التخفيف النهائية التى بعدها يصبح الفيروس غير قادر على إحداث العدوى لفيروسات BBMV, PSbMV كانت ١٠-٣: ١٠-٤؛ ١٠-٢ :١٠-٣ على الترتيب ومدة بقاء الفيروس حى على درجة حرارة المعمل كانت يوم واحد لفيروس PSbMV و٧ أيام لفيروس BBMV. ثبت من تجارب نقل الفيروسين بالطرق المختلفة أن فيروس PSbMV ينتقل ميكانيكاً بعصارة النباتات المصابة لنباتات سليمة وكذلك بواسطة المن حيث تم نقله بنجاح بواسطة ٣ أنواع من المن هى *Myzus persicae*, *Aphis crassivora* , *Aphis faba* و تراوحت نسبة النقل مابين ٤٥-٦٥% وكان أكثرها كفاءة *Myzus persicae* بينما ثبت أن فيروس BBMV لا ينتقل بواسطة المن ولكن ينتقل بواسطة نوع من الخنافس تسمى *Sitona lineate* بنسبة ٦:٧% . تم انتقال فيروس PSbMV فى بذور البسلة بنسبة ٣٠:٨٠% ،بينما ثبت أن فيروسBBMV فى الفول لا ينتقل بواسطة البذور. أظهر الفحص بالميكروسكوب الضوئى وجود محتويات داخلية أمورفية فى السيتوبلازم وبللورية فى نباتات البسلة ونباتات الفول البلدي . تم تنقية كلا الفيروسين تحت الدراسة بدرجة عالية من النقاوة من نباتات البسلة والفول البلدي المصابة بإستخدام طريقتين مختلفتين من طرق التنقية .وجد أن جزيئات فيروس PSbMV خيطية الشكل بأبعاد حوالى ٧٧٠ نانوميتير (طول)،١٢ نانوميتر (عرض)، بينما جزيئات فيروس BBMV ظهرت كروية الشكل بقطر حوالى ٢٨ نانوميتير بإستخدام الصبغ السالب والفحص بإستخدام الميكروسكوب الالكتروني. أمكن تحضير ELISA kits المتخصصة للفيروسين تحت الاختبار وهى الناتج النهائى لهذه الدراسة وأمكن تطبيقها بنجاح فى الكشف عن هذين الفيروسين وتم الكشف عن وجود الفيروسين فى النباتات المصابة عن طريق اختبارات DBIA, TBIA على أغشية النيتروسليلوز.

الكلمات الدالة: فيروس البسلة المنقول بالبذرة؛ فيروس تبرقش أوراق الفول البلدى؛ المدى العوائلى؛ الاجسام الامورفية الداخلية، الانتقال، التنقية، الاليزاكيت، اختبارات الـ DBIA, TBIA على أغشية النيتروسليلوز .

دراسات سيرولوجية على بعض فيروسات العائلة البقولية

رسالة ماجستير فى العلوم الزراعية
فيالعلوم الزراعية
(أمراض النبات)

مقدمة من

حنان فرج السيد عبد السلام
بكالوريوس فى العلوم الزراعية (أمراض نبات) كلية الزراعة بمشتهر– جامعة الزقازيق، ٢٠٠٣

لجنة الإشراف

دكتور / أم هاشم محمد إبراهيم البنا
أستاذ أمراض النبات ـ كلية الزراعة – جامعة القاهرة

دكتور / إبراهيم عبد المنعم محمد
أستاذ أمراض النبات ـ كلية الزراعة – جامعة القاهرة

دكتور / إيمان أحمد حسن خطاب
باحث أول أمراض الفيروس والفيتوبلازما – معهد أمراض النبات- مركز البحوث الزراعية- الجيزة.

دراسات سيرولوجية على بعض فيروسات العائلة البقولية

رسالة ماجستير فى العلوم الزراعية
فيالعلوم الزراعية
(أمراض نبات)

مقدمة من

حنان فرج السيد عبد السلام
بكالوريوس فى العلوم الزراعية (أمراض نبات) كلية الزراعة بمشتهر– جامعة الزقازيق ،٢٠٠٣

لجنة الحكم

دكتور/ نبيلة عبدالظاهر عبد العزيز.....
أستاذ أمراض النبات- كلية الزراعة – جامعة المنيا

دكتور/ محمد فاروق عطية.....
أستاذ أمراض النبات - كلية الزراعة – جامعة القاهرة

دكتور/ إبراهيم عبد المنعم محمد.....
أستاذ أمراض النبات - كلية الزراعة – جامعة القاهرة

دكتور/ أم هاشم محمد إبراهيم البنا .....
أستاذ أمراض النبات- كلية الزراعة – جامعة القاهرة

دراسات سيرولوجية على بعض فيروسات العائلة البقولية

رسالة مقدمة من

حنان فرج السيد عبد السلام
بكالوريوس فى العلوم الزراعية (أمراض نبات)– جامعة الزقازيق،٢٠٠٣

للحصول على

درجة الماجستير

في

العلوم الزراعية
(أمراض نبات)

قسم أمراض النبات
كلية الزراعة
جامعة القاهرة
مصر

٢٠١٠

CONTENTS

	Page
INTRODUCTION	**1**
REVIEW OF LTERATURE	**5**
MATERIALS AND METHODS	**31**
1. Source of samples	**31**
2. Isolation and propagation of the isolated viruses	**31**
3. Identification of the isolated viruses	**32**
a. Host range and Symptomatology	**33**
b. Virus stability in sap	**33**
c. Modes of transmission	**35**
d. Examination of inclusion bodies by light microscopy	**37**
e. Serological diagnosis of the isolated viruses using indirect ELISA	**38**
4. Serological studies	**39**
a. Virus Purification	**39**
b. Electron microscopy	**42**
c. ELISA reagent production against PSbMV and BBMV	**42**
d. Validity of produced ELISA reagents specific to PSbMV and BBMV	**45**
e. Prevalence of the virus in flowers and mature green pods	**48**
RESULTS	**51**
1. Source of samples	**51**
2. Isolation and propagation of the isolated viruses	**51**
3. Identification of the isolated viruses	**51**
a. Host range and Symptomatology	**51**
b. Virus stability in sap	**60**
c. Modes of transmission	**60**
d. Examination of Virus inclusion bodies by light microscopy	**62**
e. Serological diagnosis of the isolated viruses using indirect ELISA	**65**
4. Serological studies	**66**
a. Virus Purification	**66**
b. Electron microscopy	**68**
c. ELISA reagent production against PSbMV and BBMV	**69**
d. Validity of produced ELISA reagents specific to PSbMV and BBMV	**73**

e. Prevalence of the virus in flowers and mature green pods 77

DISCUSSION..... **81**
SUMMARY..... **93**
REFERNCES..... **97**
ARABIC SUMMARY.....