كشف وتوصيف جزيئي لأهم جينات ضراوة من فيروس ظاهرة البقعة البيضاء (الوحدات البنيوية والغير بنيوية للريبونوكليوتيد ردكتاز) من الروبيان المستزرع في المملكة العربية السعودية

إسم الطالب

علاء الدين حمد محمد حكمي

إسم المشرف

محمد اشتياق قادري

المستخلص

تعتبر صناعة الربيان من أهم القطاعات في المملكة العربية السعودية والذي تنامى الإنتاج فيها بشكل ملحوظ إضافة الى القيمة الاقتصادية الجيدة التي أضافها الاستثمار في هذا القطاع. يعتبر فيروس ظاهرة البقعة البيضاء من أهم الكائنات الدحية الدقيقة الممرضة والتي تسبب النقوق في الروبيان والتي تصل نسبته الى ١٠٠% مع تسببه في خسائر اقتصادية في معظم دول العالم. يوجد في المملكة العربية السعودية نوعين من الروبيان تم استزراعها بشكل واسع وهي الفينيروبينس إنديكس والليتوبينس فانامي. تسبب التوسع الهائل في صناعة استزراع الروبيان إلى ظهور فيروس ظاهرة البقعة البيضاء في النوع المستزرع الفينيروبينس إنديكس ونتج عن ذلك تفشي وباء طال جميع مزارع استزراع الروبيان في المملكة العربية السعودية مع اتخاذ كافة تدابير الأمن الحيوي والذي نفذته وزارة البيئة والمياه والزراعة. إن فيروس ظاهرة البقعة البيضاء هو عبارة عن كائن حي دقيق ممرض وضراوته عالية تصيب عدد كبير من القشريات مثل السلطعون وجراد البحر.

تهدف دراستنا الحالية الى الكشف عن وجود فيروس ظاهرة البقعة البيضاء في الروبيان المستزرع (الفينيروبينس إنديكس والليتوبينس فانامي) في منطقة مختارة من المملكة العربية السعودية مع عزل أهم جينات الضراوة لفيروس ظاهرة البقعة البيضاء التركيبية والغير تركيبية مثل rr1, rr2, VP28, VP26 وذلك باستخدام طرق التشخيص الجزيئي. تم تجميع العينات من منطقة جازان ثم تثبيتها في محلول ايثانول ٩٥% ومن ثم حفظها في درجة حرارة -٨٠ درجة مئوية الى وقت التحليل. تم استخلاص الحمض النووي من العينات التي تم تجميعها ومن ثم فحصها بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي والزمن الحقيقي وذلك للكشف عن وجود فيروس ظاهرة البقعة البيضاء في الربيان المستزرع، تم بعد ذلك تنقية النتيجة الايجابية التي تم الحصول عليها من تفاعل البلمرة المتسلسل وتم تحليل تتابعها النيوكليوتيدي

تحتوي تتابعات الجينات التي تم استهدافها مثل VP28 و VP26 على ٦١٥ قاعدة زوجية و ٦١٢ قاعدة زوجية من إطار قراءة مفتوح والتي ترمز ل٢٠٤ و٢٠٣ من الأحماض الأمينية على التوالي. لا تختلف العزلات السعودية من فيروس ظاهرة البقعة البيضاء لمتواليات الأحماض الأمينية لـ VP26 عن العزلات الأخرى المعروفة في قاعدة بيانات بنك الجينات الدولي. بينما الجين VP28 تأكد لنا وجود حمض أميني واحد مختلف، نتيجة لإحلال G الى D (جلايسين الى حمض الاسبارتيك أسيد). بينما أظهر تحليل النشوء أن الجين VP26 كان له تماثل أكبر مع العزلات الأخرى المعروفة ومع ذلك فان شجرة النشوء أظهرت أن الجين VP28 له تفرع مع السلالات الأخرى المعروفة وخصوصا مع العزلات المصرية والتايلندية.

في هذه الدراسة ، كانت هناك محاولة للحصول على الجينات المتعلقة بالضراوة والتي يرمز لها بالوحدة الصغيرة (rr1) والكبيرة (rr2) من الريبونوكليوتيد ردكتاز وذلك من العزلات السعودية لفيروس ظاهرة البقعة البيضاء. لقد تم تجميع العينات للروبيان المستزرع الفينيروبينس إنديكس والليتوبينس فانامي من منطقة جازان وتخزينها في درجة حرارة -٨٠ درجة مئوية للتحليل. لقد قمنا بتأكيد الإصابة بفيروس ظاهرة البقعة البيضاء بواسطة البروتوكول الخاص بمنظمة الصحة الحيوانية. تم تضخيم وتسلسل جينات rr1 عند ٢٥٥٠ قاعدة زوجية وكذلك جينات rr2 عند ١٢٤٢ قاعدة زوجية وذلك من خلال استخدام بادئات محددة للجين. لقد تم تحديد الوحدات الفرعية للجينات rr1 و rr2 من العزلات وذلك للمرة الأولى. حيث كانت تسلسلات rr1 و rr2 تطابق كبيرة يصل الى (٩٨-١٠٠٪) مع التسلسلات الأخرى المعروفة في BLASTX وتمت مطابقة التتابعات مع مجموعة المجال المحفوظة من Ribonucleotide reductase. لقد كشف تحليل النشوء أن تسلسلات العزلات السعودية لفيروس ظاهرة البقعة البيضاء كانت أكثر تجانسًا مع العزلات الأخرى لعائلة الريبونوكليوتيد ردكتاز من فيروس ظاهرة البقعة البيضاء وأنها قد تشكلت كعائلة وحيدة النسل.

Molecular Identification and Characterization of WSSV Genes Encoding Two Major Structural Proteins (vp28 & vp26) and Two Nonstructural Protein Subunits of Ribonucleotide Reductase (rr1 & rr2) From Farmed Shrimp in Saudi Arabia

Student name
Alaudeen Hamad Mohammed Hakami

Supervisor
Mohammad Ishtiaq Qadri

Abstract

Shrimp industry is one of the important sectors in the kingdom of Saudi Arabia (KSA) and it has shown steep production with great economic values. WSSV is a major pathogen which causing 100% mortality and economic losses in world wide. In KSA two most important species such *as Litopenaeus vannamei* and *Fenneropenaeus indicus* were cultured widely. Due to the sheer expansion of shrimp culture industry, WSSV occurrences was found in *F. indicus* and followed by White Spot Syndrome Virus outbreak, SPF *L. vannamei* was imported and cultured in KSA with stringent biosecurity measures implied by ministry of water, environment and agriculture (MEWA). WSSV is highly virulent pathogen infect several crustaceans including crab and crayfish. rr1, rr2, VP28 and VP26 are the major structural and non-structural proteins of WSSV have role in WSSV systemic infection as well as pathogenesis in shrimp.

In this study we applied molecular technique to identify the virulence related genes such as VP28 and VP26 from Saudi Arabia subsequently sequence based functionality were derived. The full-length of VP28 and VP26 obtained from SA isolates of WSSV and the sequences showed 99-100% homology with other WSSV known isolates. The identified gene sequences VP28 and VP26 contain an ORF of 615 bp and 612 bp encoding 204 and 203 amino acids respectively. Saudi Arabia WSSV isolates of VP26 amino acid sequences do not differ from known isolates in GenBank data base, whereas VP28 confirmed that a single amino acid differed, as a result of the substitution of G to D (Glycine to Aspartic acid). The phylogenetic analysis revealed that VP26 gene had a greater homology with other isolates of VP26; however, VP28 phylogenetic tree shown a subphylum among the isolates, in particular with Egypt and Thailand isolates. Putative conserved domain which codes for VP28 of WSSV superfamily and 3D form of structural relationships with the VP28 and VP26 amino acid sequences of WSSV Saudi Arabia isolates were generated. We anticipate that the present study will be helpful to reveal the genetic linkage between the isolates and to study the epidemiological relevance in harsh environmental conditions in Saudi Arabia.

In the present study, in an attempt made to obtain the virulence related genes encoding the large (rr1) and small (rr2) subunit of ribonucleotide reductase from WSSV isolates of KSA. Litopenaeus vannamei and Fenneropenaeus indicus samples were collected from Jazan region and stored in -80°C for the analysis. The WSSV infection was confirmed by OIE protocol. Amplification and sequencing of rr1 (2550bp) and rr2 (1242 bp) genes were done using gene specific primers. Subunits of rr1 and rr2 fragments were identified KSA isolates for the first time. The rr1 and rr2 sequences had significant identity (98-100%) with other known sequences in BLASTX and the sequences were matched with conserved domain family of Ribonucleotidereductase (RNR). The phylogenetic analysis revealed that sequences had greater homology with other isolates of WSSV Ribonucleotidereductase family and it was formed as monophylectic clade. The obtained information so for from the sequences of rr1 and RR2, supports that the family of RNR was highly conserved among WSSV isolates.