------مجلة علوم الرافدين، المجلد 22، العدد 4، ص12-23،2011------

عزل وتشخيص مواد مناعية تضادية لفايروس البطاطا واي

نبيل عزيز قاسم

قسم وقاية النبات

كلية الزراعة والغابات

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 23/ 2 / 2011 ؛ تاريخ القبول 16 / 5 / 2011)

الملخص

أظهرت نتائج التشخيص باستعمال اختبار الاليزا أن فايروس البطاطا واي (PVY) هو الفايروس المعزول من أوراق البطاطا المصابة والذي اختير لإجراء هذه الدراسة، وقد تم تأكيد التشخيص بالاختبار الحيوي وذلك بظهور البقع الموضعية المصفرة على أوراق نبات الزربيح وهو النبات الكاشف الكمي لهذا الفايروس. تم الكشف عن مركبات فينولية وعزل بروتينات مناعية من مستخلص أوراق الزربيح التي ظهرت عليها البقع الموضعية بوصفه نباتا مقاوما لهذا الفايروس، وكشف عن هذه المركبات طيفيا عند المدى الموجي 200-300 نانومتر وقد أعطت ذروتين امتصاصيتين عند الطول الموجي 210 نانومتر للفينولات و280 نانومتر للبروتينات إذ عزلت الأخيرة بالأسيتون والانتباذ والترسيب بكبريتات الامونيوم. ولم تظهر هذه المركبات المناعية في مستخلصي أوراق البطاطا السليمة والمصابة بالفايروس. وقد أكد الاختبار التثبيطي للفايروس PVY هذه النتيجة فقد ثبطت فاعليته خارج النسيج الحي عند مزج عصير النبات المصاب بكميات متساوية من المستخلص الخام لأوراق الزربيح المصابة ولمحلول الراسب البروتيني المعزول من ذلك المستخلص فانخفض كثيرا عدد البقع الموضعية على أوراق نباتات الزربيح الملقحة (7.8بقعة/ورقة) مقارنة بعددها على الأوراق الملقحة بالعصير غير المعامل (29.1 بقعة/ورقة)، وهذا يؤكد وجود الفينولات والبروتينات المناعية في المستخلص الخام لأوراق الزربيح مما يدل على مقاومته للفايروس PVY.

Isolation and Diagnosis of Antagonistic Substances Against Potato Virus Y (PVY)

Nabil A. Kassim
Department of Plant Protection
College of Agric. and Forestry
University of Mosul

ABSTRACT

Potato virus Y (PVY) which isolated from potato leaves, was diagnosed by ELISA test and by *Chenopodium amaranticolor* as indicator plant which respond locally to this virus known by its resistance to it, so phenolic compounds were isolated from its leaves and detected spectrometrically at wavelength ranged 200-300 nm, recorded absorbency peaks at wavelength 210 nm for phenols and 280 nm for antagonistic proteins, isolated by acetone, centrifugation and precipitation by ammonium sulphate, these compounds not present in healthy leaves. This result has been assured by inhibition test of the virus *in vitro* by mixing sap of infected plant with equal amounts of infected *C. amaranticolor* crude sap and proteinecious solution of that extraction which decreased the number of local lesions on inoculated leaves of *C. amaranticolor* compared to leaves inoculated by untreated sap. These results assured that this plant was resistant to PVY.

المقدمة

بذلت جهود علمية كبيرة لمكافحة فايروسات النبات بواسطة الكيماويات المثبطة لتضاعف الفايروسات أو المؤثرة على الإصابة أو إيقاف العمليات الحيوية للفايروس داخل خلايا النبات أو منع حركته في أنـسجة النبات، (Maloy وMurray، 2001 ؛ Hull، 2002)، وذلك بهدف تطوير استعمالها إلـى المجـال الحقلـي لخفض وطأة الأمراض الفايروسية على المحاصيل الاقتصادية، إن هذه ليست بالمهمة الـسهلة وذلـك لان اغلب المواد الكيمائية التي تثبط تضاعف الفايروسات، تتداخل بسلبية مع النشاطات الايضية لخلايـا العائـل وخاصة مع آلية تخليق البروتين وبالتالي فهي ذات تأثير مدمر للخلايا النباتية، ومن أهم هذه المواد مناظرات القواعد النتروجينية ومنها مركبات "2- ثايوويوراسيل" (2-thiouracil) و"8- ازلكـوانين "(8- azaguanine) والترايازول (Triazole) وهو احد مشتقات مركب الاميدازول وهو المركب السلفي للبيورينات والذي يعرف تجاريـا بـالفيرازول(Virazole) (Boyd and Dawson , 1987 ؛ Hansen, 1989 ؛ *et al.*,1998 Verma ؛ Agrios , 2005). لذلك اتجهت الدراسات نحو مواد ترتبط مع الكابـسيد الفايروسـي (الغطـاء البروتيني) لتعيق حركة الفايروس عبر الخلايا أي حركته الجهازية في النبات أو تمنع نزع الكابسيد عند بداية تضاعف الفايروس فتفشل الإصابة، (Mahy and Van Regenmortel, 2008)، واغلب هذه المـواد هـي مركبات طبيعية عزلت من نباتات أو مصادر أخرى، وقد بدا استعمالها منذ منتصف القرن العشرين عنـدما

اكتشف التأثير التثبيطي لبعض المركبات النباتية ضد أنواع من الفايروسات ، وقد أظهرت قدرتها التثبيطيـة للفايروسات سواء عند استعمالها مخلوطة مع العصير النباتي (خارج النسيج الحي) أو رشـا علـى النبـات (داخل النسيج الحي) فمنعت الإصابة أو أعاقت ظهورهـا(Hirai ,1977 ؛ Hull ,2002). إن اغلـب هـذه المركبات هي موجودة أصلا في النباتات السليمة ولم تتكون بوصفها رد فعل للإصابة الفايروسية لـذا فهـي مركبات عامة التأثير وغير متخصصة تؤثر على مدى واسع من الفايروسات، وهي مركبات متنوعة التركيب إذ تضم مركبات فينولية معقدة (كينونات) أو لكنينية (Lignins) أو تربينويدية (Terpenoids) أو بروتينية أو جلايكوبروتينية، (De Clerq , 2004).

وفي محاولة لفصل وتشخيص مواد تضادية للفايروسات من نباتات مقاومة ، فقد أجريت هذه الدراسة التي استهدفت عزل هذه المواد من النباتات التي استجابت موضعيا لفايروس البطاطا واي , *Potato virus Y* PVY واختبارها ضده والكشف عن نوعية المركبات المثبطة توطئة لإنتاجها ونشرها حقليا، كما تعـد هـذه الدراسة مدخلا لتحديد النباتات التي تمتلك جينات المقاومة ضد الفايروس المذكور والتـي يمكـن أن تكـون مصدرا لتلك الجينات إذا ما أريد إنتاج أصناف مقاومة ضد هذا الفايروس.

مواد وطرائق العمل

عزل فايروس البطاطا واي (PVY) وتشخيصه

تم الحصول على عزلة الفايروس من نباتات بطاطا من حقول منطقة الرشيدية ظهرت عليها أعراض موزائيك وانتصاب لنموات النبات وتنخر للعروق السفلى للوريقات وتقزم عام للنبات. حفظـت الأوراق فـي أكياس ورقية في الثلاجة لحين التشخيص الذي تم باختبار الاليزا المباشرة Das-ELISA وفق طريقة Clark وAdams (1977) ، Anonymous (1994) وذلك باستعمال المصل المضاد الذي تم الحصول عيـه مـن المعهد الألماني DSMZ لإنتاج المصول المـضادة , DSMZ, Plant Virus Collection, Braunschweig (Germany) وكما يأتي:

1- أضيف إلى حفر طبـق الاليـزا (Polystyrene microtiter plate) المخصـصة للاختبـار، 200 مايكروليتر من محلول الجلوبيولينات المناعية النقية طراز IgG المخفـف فـي محلـول التغطيـة المـنظم (Coating buffer) باستعمال الماصة الدقيقة (Micropippete)، وقد استعمل عمودان متجاوران من الطبـق لعصير النباتات المصابة فيما خصص العمودان المجاوران الآخران لعصير النباتات السليمة (المقارنة) وترك العمود الأول فارغا.

2- حضن الطبق على درجة 37م لمدة 2-4 ساعات في حاضنة.

3- غسل الطبق بالمحلول المنظم الفوسفاتي الملحي Phosphate buffer-saline (PBS) ثلاث مرات بواسطة قنينة غسل وبفاصلة أمدها خمس دقائق بين الغسلة والأخرى، مع قلب الطبق وتفريغه من محلول الغسل في كل مرة.

4- أضيف لكل الحفر المستعملة 200 ميكروليتر من عصير أوراق البطاطا المصابة والذي حضر بالاستخلاص مع المحلول المنظم الفوسفاتي تركيز 0.01 مولار واس هيدروجيني 7.6.

5- حضن الطبق على درجة 4م لمدة 24 ساعة في ثلاجة.

6- غسل الطبق كما في الخطوة (3) أعلاه.

7- أضيف لكل الحفر المستعملة 200 ميكروليتر من المحلول المنظم المترابط Conjugate buffer والمكون من المحلول المنظم و الجلوبيولين المناعي النقي نوع IgG المرتبط بأنزيم الفوسفاتيز القاعدي Alkaline phosphatase.

8- حضن الطبق على درجة 37م لمدة أربع ساعات في حاضنة.

9- غسل الطبق كما في الخطوة (3).

10- أضيف 200 ميكروليتر من محلول المادة الأساس P-nitro phenyl phosphate وهي مادة كاشفة عديمة اللون تتحول إلى اللون الأصفر بفعل أنزيم الفوسفاتيز القاعدي والمحضرة بتركيز 5 ملغم من المادة أعلاه / سم^3 من المحلول المنظم للمادة الأساس.

11- ترك الطبق عند حرارة الغرفة (25± 2 م) لمدة 1.5 ساعة ثم أوقف التفاعل بإضافة 50 ميكروليتر من محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH تركيز 3 مولار إلى كافة حفر التفاعل.

حفظت عزلة الفايروس بعد تشخيصها باختبار الاليزا على نباتات بطاطا صنف دراكا وذلك بعد تلقيحها ميكانيكيا بلقاح محضر من العينات الورقية التي جلبت من الحقول وذلك بسحقها في هاون خزفي مع المحلول المنظم الفوسفات KH_2PO_4 بنسبة 1:2 (وزن الأوراق:حجم المحلول) بتركيز 0.01 مولار وأس هيدروجيني 7.6 وباستعمال الكاربورندم 600 مش بوصفه مادة مخدشة، حفظت النباتات في البيت البلاستيكي.

الكشف عن المواد التضادية من النباتات المقاومة لفايروس البطاطا واي.

لقح 20 نباتا من نباتات الزربيح *Chenopodium amaranticolor* بلقاح الفايروسPVY وبمرحلة نمو ست أوراق، ميكانيكيا وبالطريقة المذكورة أعلاه إذ حضر اللقاح من نباتات البطاطا التي حفظت عليها عزلة الفايروس، واختير هذا النبات لأنه النبات الكاشف للفايروس المذكور والذي يستجيب موضعيا للإصابة (العباسي، 2008). حفظت النباتات في البيت البلاستيكي وروقبت لحين ظهور الأعراض الموضعية لأخذ العينات الورقية منها.

1- **عزل وكشف المركبات الفينولية** : استخلصت المركبات الفينولية بواسطة الايثانول 96% وذلـك وفـق الطريقة التي استعملها الغبشة والعباجي (1993) و قاسم و مهيدي (2009) من أوراق البطاطـا المـصابة جهازيا ومن أوراق الزربيح المصابة موضعيا بالفايروس ومن أوراق البطاطا السليمة (المقارنة)، إذ جمعـت الأوراق وجففت على ورق جرائد في الظل مع التقليب المستمر في درجة حرارة 30-35 م ولعدة أيام لحـين اكتمال جفافها. طحنت الأوراق في هاون خزفي ووضع 10 غم من مسحوق الأوراق في دورق سـعة 100 سم^3 وإضافة 40 سم^3 ايثانول وترك مقفلا لمدة 24 ساعة في درجة حرارة المختبر وعرض للـرج بجهـاز الرج المنضدي على سرعة 180 دورة / دقيقة لمدة ست ساعات ورشح بقماش الموسلين ووضع فـي دورق مفتوح وغمر في حمام مائي على درجة 80م ولمدة نصف ساعة للتخلص مـن الايثـانول بـالتبخر، وتـم الحصول على 20 سم^3 من المستخلص الذي وضع في قنينة محكمة الإغلاق حفظـت فـي الثلاجـة لحـين الاستعمال.

تم الكشف عن الفينولات طيفيا باستعمال جهاز المطياف نوع (APEL PD-303) بأخذ 1 سم^3 من مستخلص كل نوع من الأوراق وتخفيفه بالايثانول تركيز 99% لغاية التخفيف 1/100 وأجريت قراءة مسحية طيفية امتصاصية له ضمن مدى الأطوال الموجية 200-300 نانومتر بفاصلة كل 10 نانومتر، وتمت المقارنة بمحلول الفينول النقي تركيز 0.01 موار المحضر بإذابة 0.94 غم منه في10 سم^3 ايثانول تركيز 99%.

كما تم الكشف عن الفينولات لونيا بأخذ 3سم^3 من مستخلص كل نوع من الأوراق وضعت في أنبوبـة اختبار بحجم 10 سم^3 مع عدة قطرات من كلوريد الحديديك (FeCl) الأصفر اللون للأنبوبة تـدريجيا لحـين تغير لون المستخلص، (قاسم ومهيدي ، 2009).

2- **عزل البروتينات المناعية من الأوراق:** استعملت الطريقة التي ذكرها السعدون (2008) والمستندة علـى طريقة Robyte وWhite (1987) إذ وزن 25 غم من كل من أوراق البطاطا الـسليمة والمـصابة جهازيـا بفايروس PVY وكذلك من أوراق الزربيح المصابة موضعيا بالفايروس وقطعت ثم مزجت كل على انفـراد مع 75 سم^3 من الماء المقطر البارد وبنسبة 3:1 (وزن :حجم) وسحقت بالهاون الخزفي، نقل المستخلص إلى المجمدة الحوضية للتجميد لغرض تحطيم الخلايا النباتية واستخراج اكبر كمية من البروتينـات والجـسيمات الفايروسية منها، وبعد أربع ساعات اخرج وأذيب وحرك لمدة ساعتين فـي جهـاز الرجـاج المغناطيـسي (Magnetic stirrer) في حمام ثلجي ورشح المستخلص بقطعة مزدوجة من الشاش وعرض للانتبـاذ علـى سرعة 3000 دورة/دقيقة/ 30 دقيقة للتخلص من المواد النباتية الكبيرة وأخذ الرائق وأهمل الراسب، أضـيف للرائق الأسيتون البارد تركيز 80% بنسبة 1:1 (حجم:حجم) ببطء مع التحريك المستمر في حمام ثلجي عنـد 4م وترك المزيج في الثلاجة لمدة 24 ساعة وفصل البروتين من المستخلص بالانتباذ علـى سـرعة 6000 دورة/دقيقة/ 30دقيقة وذلك بإضافة كبريتات الامونيوم بمقدار نصف حد الإشباع للمستخلص، أهمل الرائـق وأخذ الراسب الذي يحتوي على البروتين، وبذلك تم الحصول على الراسب البروتيني لـثلاث عينـات هـي

أوراق البطاطا المصابة جهازيا بالفايروس PVY وأوراق البطاطا السليمة وأوراق الزربيح المصابة موضعيا بالفايروس.

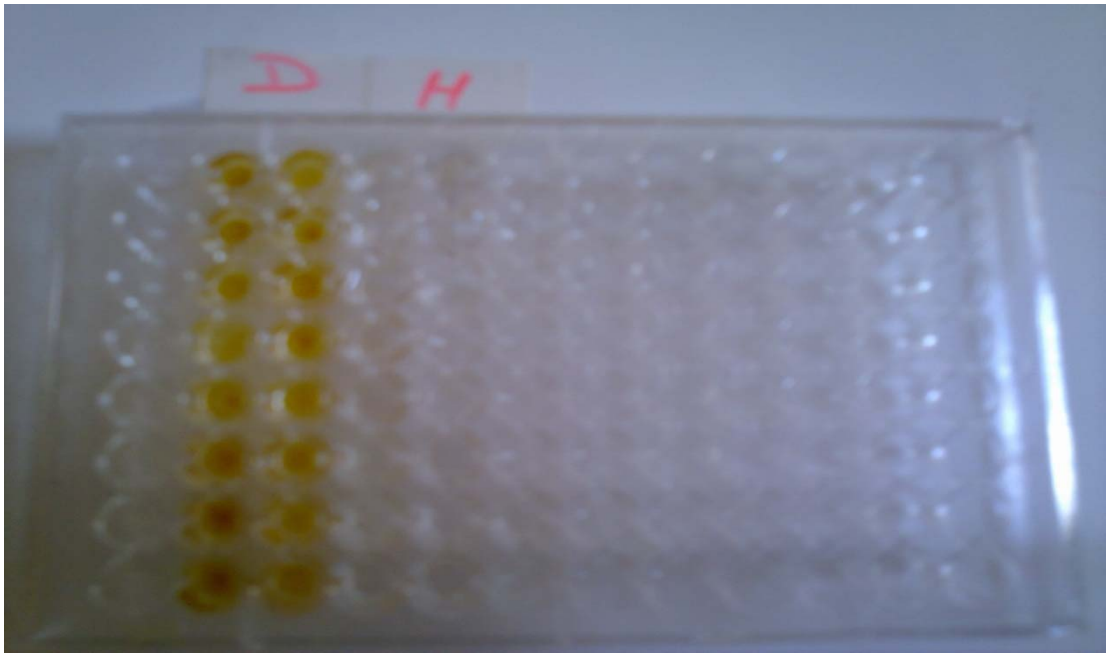
دراسة التأثير التثبيطي لمستخلص أوراق الزربيح المصابة ضد الفايروس PVY

تم تنفيذ التجربة في البيت البلاستيكي وفق تصميم القطاعات العشوائية الكاملة بخمسة مكررات ضم المكرر الواحد أربعة معاملات وهي : (1) تلقيح النباتات ميكانيكيا بلقاح محضر من أوراق البطاطا المصابة عزلة الفايروس الممزوج بنسبة 1:1 مع المحلول المنظم الفوسفاتي KH_2PO_4 وبتركيز 0.01 مولار واس هيدروجيني 7.6 والممزوج بنسبة 1:1 مع مستخلص أوراق الزربيح المصابة (2) التلقيح بعصير أوراق البطاطا المصابة الممزوج بكمية متساوية مع المحلول الفينولي لمستخلص أوراق الزربيح المصابة (3) التلقيح بعصير أوراق البطاطا المصابة الممزوج بكمية متساوية مع محلول الراسب ألبروتيني المعزول من مستخلص أوراق الزربيح المصابة (4) التلقيح بعصير أوراق البطاطا المصابة (معاملة المقارنة). وشملت المعاملة الواحدة خمسة نباتات. وفي نهاية التجربة حسبت أعداد البقع على الأوراق المصابة وحللت إحصائيا باستخدام برنامج SAS واختبرت متوسطاتها حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 0.05.

النتائج والمناقشة

تشخيص فايروس البطاطا واي (PVY)

أظهر التشخيص المصلي الذي اجري باستعمال اختبار الاليزا المباشر DAS-ELISA أن الفايروس المسبب هو فايروس البطاطا واي (PVY) إذ ظهر اللون الأصفر في حفر العينات المصابة في الطبق والذي لوحظ بالعين المجردة ولم يظهر في حفر العينات السليمة، (الشكل1). كما أن ظهور البقع الموضعية على أوراق الزربيح *C.amaranticolor* الملقحة ميكانيكيا بعزلة الفايروس بهيئة بقع موضعية مصفرة هو تشخيص حيوي اثبت وجود الفايروس وفاعليته، إذ يعد نبات الزربيح من النباتات الكاشفة المهمة المستعملة للكشف عن فايروس PVY كونه يستجيب موضعيا للفايروس (Moran and Knoxfield, 2004 ؛ العباسي 2008).



الشكل 1 : اختبار الاليزا المباشرة للكشف عن فايروس البطاطا واي (PVY) حيث يلاحظ اللون الأصـفر في العمودين الأيسرين (عينات الأوراق المصابة) وعدم ظهوره في العمودين المجاورين (عينات المقارنة).

الكشف عن المواد التضادية من النباتات المقاومة لفايروس والبطاطا واي(PVY).

تم الكشف عن وجود مواد فينولية وبروتينية في نباتات الزربيح التي أظهرت استجابة موضعية فقـط اتجاه الفايروسPVY وكما يأتي:

1- الكشف عن المركبات الفينولية : أظهرت النتائج وجود مركبات فينولية في أوراق الـزربيح المـصابة موضعيا بالفايروس ، وهذا ما أظهره الاختبار الطيفي عند اختبار المستخلص على المدى الموجي 200-300 نانومتر ، (الشكل2) إذ أعطى ذروة امتصاص عند الطول الموجي 210 نانومتر بقيمة امتصاص 2.26 ومن المعروف أن أعلى امتصاص للمركبات الفينولية يكون عند حدود الطول الموجي المذكور (شربة وآخرين ، 1985 ؛ الجواري ،2006) ، وهذا دليل على وجود مركبات فينوليـة فيـه بتركيـز عـالٍ وذلـك مقارنـة بمستخلصات نباتات البطاطا السليمة وتلك المصابة جهازيا بالفايروس إذ لم تظهر ذروة امتـصاصية عنـد المدى الموجي 210 - 220 نانومتر مما يدل على خلو هذين المستخلصين من المركبات الفينولية وهذا متوقع لان النبات الحساس الذي يستجيب جهازيا لا يقاوم الفايروس وبالتالي لا يكون مركبات فينولية .

كما أثبت الاختبار اللوني الذي أجري على مستخلصات النباتات أعلاه وجود المركبات الفينولية بتركيز عالٍ في أوراق نبات الزربيح المصاب إذ تحول اللون الأصفر لمستخلصه إلى اللون الزيتوني المقارب للون المحلول القياسي (محلول الفينول النقي) وذلك عند إضافة كلوريد الحديديك، فيما بقـي لـون مستخلـصات

النباتات المصابة جهازيا بالفايروس والنباتات السليمة، أخضر فاتح. بينت نتائج الاختبارات الطيفية واللونية أن نباتات الزربيح المقاومة التي استجابت موضعيا للفايروس استحثت إنتاج الفينولات بوصفه رد فعل دفاعي للإصابة الفايروسية والتي تركزت في منطقة البقع مما سبب قتل الخلايا المحيطة بالخلايا المصابة ووقف تقدم الفايروس في النبات، فيما كانت مستويات الفينولات في مستخلصات النباتات الحساسة المصابة جهازيا مقاربة لمستوياتها في النباتات السليمة (الشكل 2) مما يدل على عدم استحثاث المقاومة ضد الفايروس في النباتات الحساسة، وهذا ما أكده (Karasava *et al*., 1999 ؛ Mahy and Van Regenmortel, 2008 ؛ قاسم و مهيدي 2009 ؛ قاسم وآخرين ، 2010).

2- **الكشف عن البروتينات المناعية :** أظهرت نتائج الفحص الطيفي بالأشعة فوق البنفسجية لمستخلصات النباتات الثلاثة المذكورة عند المدى الموجي 200-300 نانومتر أن مستخلص أوراق البطاطا السليمة أعطى ذروة امتصاصية واحدة فقط عند الطول الموجي 280 نانومتر وهي بقيمة 1.88 (الشكل2) ويدل هذا على احتوائها على البروتين النباتي الطبيعي فقط المتمثل بالبروتينات الوظيفية (الأنزيمات) والبروتينات التركيبية الخلوية، فيما ظهر أن مستخلص أوراق الزربيح المصابة موضعيا احتوى على كميات أعلى من البروتينات مقارنة بمستخلصات النباتات الحساسة والسليمة (الشكل2) ، وهذا دليل على احتمال وجود بروتينات مناعية تكونت رد فعل للإصابة في النباتات المقاومة. فيما أظهر مستخلص أوراق البطاطا المصابة جهازيا ذروتين امتصاصيتين عند 260 و280 نانومتر بقيمة 1.97 و 2.1 على التوالي، وتدل الذروة الأولى أن المستخلص يحوي على مستويات عالية من الحامض النووي الرايبي RNA وهذا متوقع بسبب وجود جسيمات الفايروس PVY بتركيز عالٍ في أوراق البطاطا المصابة به جهازيا علما بأن جينوم هذا الفايروس هو RNA ، ومن المعروف أن أعلى امتصاصية للأحماض النووية تحصل عند 260 نانومتر، (Hull , 2002). أما الذروة الثانية فحصلت عند الطول الموجي 280 نانومتر وهي أعلى من الذروة الامتصاصية لمستخلص الأوراق السليمة مما يدل على تركيز عالٍ للبروتينات في المستخلص وبكميات تزيد عما هو موجود في مستخلص الأوراق السليمة حيث أن كمية البروتين تتناسب طرديا مع المساحة المحصورة تحت الذروة (مساحة المنحنى) ، (Conn and Stumpf, 1972) إن وجود البروتينات بتركيز عالٍ نسبيا في هذا المستخلص هو متوقع بسبب وجود البروتين التركيبي الفايروسي (بروتين الكابسيد) نتيجة التركيز العالي للجسيمات الفايروسية في الخلايا حيث أن هذا البروتين يشكل حوالي 95% من كتلة فايروسPVY (Maloy and Murray , 2001)، فضلا عن البروتين الخلوي. أما مستخلص أوراق الزربيح فقد أظهر ذروة أولى عند الطول الموجي 210 نانومتر مما يدل على وجود مواد فينولية فيه ولم تظهر هذه الذروة في المستخلصين الآخرين، (الشكل2). إن وجود المواد الفينولية والذي أثبت وجودها أيضا بالاختبار اللوني في مستخلص أوراق الزربيح المصابة يدل على استحثاث المقاومة ضد الفايروس إذ أن استجابة أوراق هذا

النبات للإصابة بفايروس PVY بشكل بقع موضعية مصفرة هو شكل من أشكال المقاومة التي يبديها النبات والمتمثلة بظاهرة الحساسية المفرطة (Hypersensitive reaction) والتي تحصل بإنتاج النبات المقاوم لمزيد من المركبات الفينولية التي تتركز في المناطق المحيطة بالبقع (مناطق دخول الفايروس) هذا ما أكده (Hull ,2002 ؛ Agrios , 2005 ؛ Carter and Saunders, 2007 ؛ and Van Regenmortel, 2008 Mahy). كما أظهر المستخلص ذروة ثانية عند الطول الموجي 280 نانومتر وبقيمة امتصاصية عالية وصلت إلى 2.4 وهذا يدل على ارتفاع مستوى البروتينات في المستخلص بما يزيد عن مستواها في مستخلص أوراق البطاطا المصابة إذ يحتمل وجود البروتينات المناعية المسماة PR-proteins (Pathogenesis related proteins) والتي تكونت في أوراق الزربيح المقاومة ردة فعل للإصابة إذ أشار العديد من الباحثين إلى تكون هذه البروتينات بوصفها جزءاً من الآليات الدفاعية التي تكونها النباتات ضد الإصابات الفايروسية (Hull, 2002 ؛ Agrios ,2005 ؛ Carter and Saunders, 2007). أما كمية البروتين التركيبي الفايروسي في المستخلص فمن المتوقع أن تكون منخفضة بسبب انخفاض تركيز الفايروس في الأوراق المقاومة بسبب عدم انتشاره فيها جهازيا لذا فأن البروتينات الموجودة في المستخلص هي المناعية والنباتية.

التأثير التثبيطي لمستخلص أوراق الزربيح المصابة ضد الفايروسPVY

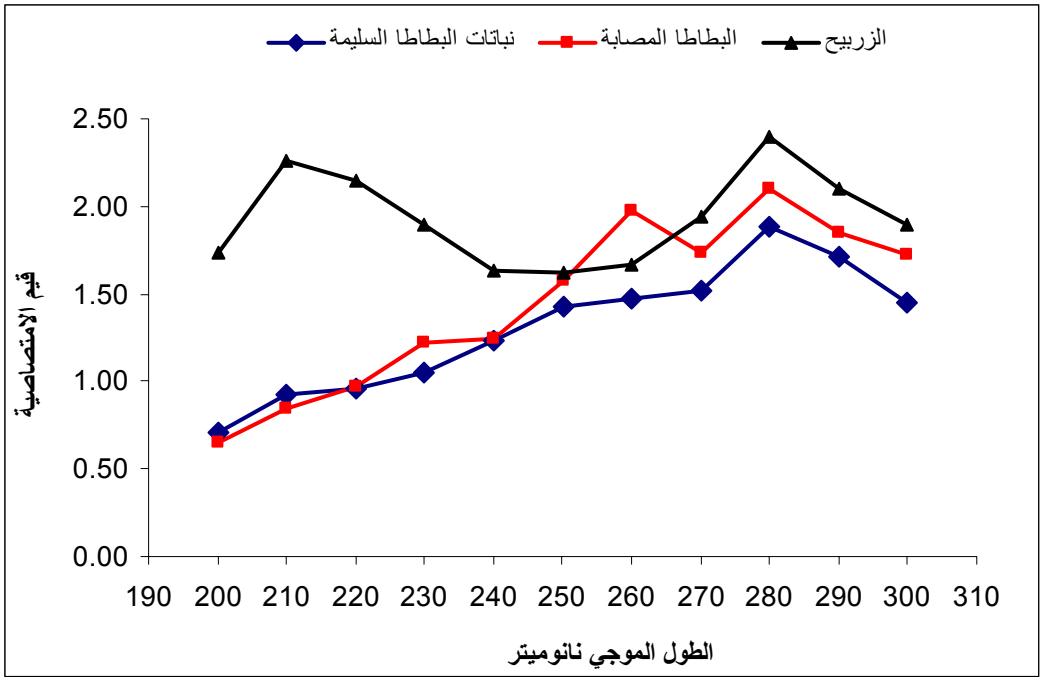
أظهرت النتائج المبينة في الجدول (1) التأثير التثبيطي لكل من المستخلص الخام لأوراق الزربيح المصابة ومحلول الراسب البروتيني والمحلول الفينولي المعزولين من ذلك المستخلص عند مزجها كل على انفراد مع عصير أوراق البطاطا المصابة بعزلة **PVY** إذ أعطى المستخلص الخام لأوراق الزربيح المصابة بعزلة الفايروس أعلى تثبيط للفايروس خارج النسيج الحي فقد وصل معدل عدد البقع الموضعية إلى 7.8 بقعة/ورقة مقارنة بمعدل 29.1 بقعة/ورقة على أوراق الزربيح الملقحة بعصير أوراق البطاطا المصابة الممزوج مع المحلول المنظم الفوسفاتي (المقارنة) وكان الفرق معنويا بينهما، وجاءت نتيجة التأثير التثبيطي للمحلول الفينولي ومحلول الراسب البروتيني للأوراق المصابة مقاربة للنتيجة المستحصلة مع المستخلص الخام لأوراق الزربيح المصابة حيث كان معدل عدد البقع هو 8 و10.6 على التوالي ولم يكن هناك فرق معنوي بين هذه المعاملات الثلاثة على الرغم من أن المعاملة بالمستخلص الخام كانت الأكثر تأثيرا في تثبيط الفايروس ويفسر ذلك باحتواء مستخلص أوراق الزربيح المصابة على كل من الفينولات والبروتينات المثبطة معا مقارنة بتأثير البروتينات لوحدها، (الجدول1). أكدت هذه النتيجة أن مستخلص أوراق الزربيح المصابة يحوي مركبات فينولية وبروتينية مثبطة لفعالية الفايروس PVY خارج النسيج الحي والتي تأكد وجودها في الاختبارات الطيفية واللونية، إذ بات معروفا تأثير المركبات الفينولية والبروتينية التثبيطي للإصابات الفايروسية نتيجة ارتباطها مع البروتين الفايروسي التركيبي (الكابسيد) وإرباك عملية تفكيكه في بدء عملية التضاعف او منع الجسيمات الفايروسية من الدخول إلى الخلايا المجروحة أثناء التلقيح الميكانيكي

(Hull , 2002 ؛ Scholthof , 2005 ؛ Lucas, 2006 ؛ 2006، مجهول ؛ قاسم وآخـرين ، 2010) فيما لم يلاحظ وجود هذه المركبات في مستخلص أوراق البطاطا المصابة ودليل ذلك هو زيادة عـدد البقـع الموضعية على أوراق الزربيح.

الجدول 1 : تأثير المستخلص الخام لأوراق الزربيح المصابة بالفايروس PVY ، والفينـولات والبروتينـات المعزولة منها في تثبيط فعالية الفايروس خارج النسيج الحي.

المعاملات	معدل عدد البقع الموضعية/ ورقة
المستخلص الخام لأوراق الزربيح المصابة	7.8 أ
المحلول البروتيني لأوراق الزربيح المصابة	10.6 أ
المحلول الفينولي لأوراق الزربيح المصابة	8 أ
التلقيح بمستخلص أوراق البطاطا المصابة (المقارنة)	29.1 ب

* حللت النتائج إحصائيا وفق التصميم القطاعات العشوائية الكاملة وقورنت المتوسطات وفق اختبار دنكن عند مستوى احتمـال 0.05 .



الشكل 2 : منحنيات الامتصاصية لمستخلصات أوراق نباتات البطاطا والزربيح المصابة بفايروس البطاطـا واي (PVY) وأوراق البطاطا السليمة.

المصادر العربية

الجواري ، رغد نايف (2006). استخدام بعض المستخلصات النباتية والمركبات الكيميائية في تثبيط فايروس موزائيك الخيار. رسالة ماجستير، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل.

السعدون ، محمد بحري (2008). دراسة عدد من المستخلصات والمركبات البروتينية المفصولة من ثمار التفاح في الفئران المعرضة للكرب ألتأكسدي. *مجلة علوم الرافدين*، **19**(1)، 116-133.

شربة ، عبد الحسين خضير و الراوي، جاسم محمد علي و العراقي، محمد أحمد (1985). أطياف امتصاص الجزيئات العضوية. دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل، ص 624.

العباسي ، شذى حسين (2008). حياتية وبيئية من الخوخ الأخضر *Myzus persicae* واختبار كفاءته في نقل فايروس البطاطا واي (PVY) في منطقة الموصل. رسالة ماجستير، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل.

الغبشة ، ثابت سعيد و العباجي ، مؤيد قاسم (1993). أسس الكيمياء التحليلية. دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل ، ص 420.

قاسم ، نبيل عزيز و مهيدي، رغد نايف (2009). دراسة المقاومة المستحثة لنباتات اللوبيا ضد فايروس موزائيك الخيار وتأثير بعض المواد في تثبيطه داخل النسيج الحي. كتاب وقائع المؤتمر العلمي الأول لعلوم الحياة ، بحوث علم النبات : 275-288، كلية العلوم ، جامعة الموصل.

قاسم ، نبيل عزيز و مهيدي ، رغد نايف وزينب فاضل (2010). تأثير حامض السالسلك والسماد الورقي على إنتاجية نباتات البطاطا المصابة بفايروس البطاطا واي (PVY). *مجلة علوم الرافدين*، **21**(1)، 73-83

مجهول (2006) المستخلصات النباتية كبديل للمبيدات الكيماوية لمقاومة الأمراض الفطرية والبكتيرية والفايروسية. نشرة صادرة عن الصندوق المصري لتكنولوجيا المعلومات والاتصالات، جمهورية مصر العربية.WWW. Ictund. org.eg

المصادر الأجنبية

Agrios, G.N.(2005). "Plant Pathology". 5th edn. Elsevier, Academic Press. NewYork. 922p.

Anonymous, (1994). A course on diagnosis of plant viruses. International Center for Agriculture Research in the Dry Area ,(ICARDA).

Carter, J. B. ; Saunders, V. A. (2007). "Virology, Principles and Application". John Wiley and Sons, Ltd, England. 358 p.

Clark, M.F. ; Adams, A.N. (1977). Characteristics of the micro plate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* **34,** 475-483.

Conn, E. E. ; Stumpf, P. K. (1972). "Outlines of Biochemistry". 3rd edn. Wiley International Edition. 535p.

Dawson, W.O. ; Boyd, C. (1987). Modifications of nucleic acid precursors that inhibit plant virus multiplication. *Phytopathology* . **77,** 477-480.

De Clerq. E. (2004). Antivirals and antiviral strategies. *Nature Reviews Microbiology* **2,** 704-720.

Hansen, A. J. (1989). Antiviral chemicals for plant disease control. *Crit. Rev. Plant Sci.* **8,** 45-88.

Hirai, T. (1977). "Action of Antiviral Agents in Plant Disease". In J. C. Horsfall; Cowling, E. B. Plant Dis, Vol.1, Academic Press. pp. 285-306

Hull , R. (2002). "Matthews Plant Virology". Academic Press , 1001 p.

Karasava , A. ; Okada, I. ; Ehara,Y. (1999). One amino acid change in cucumber mosaic virus RNA polymerase determine virulent/ a virulent phenotypes on cowpea. *Phytopathology* . **89 ,** 1186-1192.

Lucas, W. G. (2006). Plant virus movement proteins: Agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology*. **344 ,** 169-184.

Mahy, B.W. ; Van Regenmortel, M. H. (2008). "Encyclopedia of Virology". 3rd edn. Elsevier Ltd. 2865 p.

Maloy , O. ; Murray, T. (2001). " Encyclopedia of Plant Pathology". John Wiley . 589p.

Moran , J ; Knoxfield, B. (2004). Potato Virus Y. Agriculture Notes. State of Victoria , *Dept. Primary Industries* , **13 ,** 16-17.

Robyt, F. J; White, B. (1987). "Biochemical Techniques , Theory and Practice". Brookes Publishing Company , California. 654p.

Scholthof, H. B.(2005). Plant virus transport : Motions of functional equivalence . *Trends in Plant Science*, **10,** 376-382.

Verma, H.N.; Baranwal, V. K. ; Srivastava, S. (1998). "Breeding for Resistance to Plant Viruses"., In: Hadidi, A.; Khetarpal, R. K. ; Koganezawa, H. (eds) Plant Virus Disease Control. APS. Press, St. Paul. pp.154-162