تحديد اربع سلالات لفايروس موزائيك الخيار مصلياً وبايولوجياً وعلاقتها بالامراضية

ليلى جبار صبر رقيب عاكف حمد

قسم وقاية النبات – كلية الزراعة – جامعة بغداد

المستخلص

اجريت هذه الدراسة لتحديد سلالات فايروس موزائيك الخيار ، واعتمد في تنفيذ هذه الدراسة الاعراض على النباتات الكاشفة والخصائص المصلية للفايروس . اظهرت نتائج دراسة الاعراض على نباتات الخيار والنباتات الكاشفة : اللوبيا *Vigna unguiculata* Savi Black eye ، ورد الدكمة *Gomphrena globosa* L. Black eye ، الداتورة *Datura stramonium* L. ، وصنف التبغ *Nicotiana tabacum* L. Var. Samsun ، والطماطة *Lycopersicon esculentum* Mill ، وجود اربعة انماط مرضية مختلفة قسمت على اساسها العزلات الى اربع مجاميع : 1- ضعيفة ، 2- متوسطة ، 3- شديدة ، 4- شديدة جداً . اجريت تنقية جزئية لعزلات الفايروس من نباتات تبغ صنف Samsun ، بسحق الاوراق المصابة في محلول دارىء فوسفاتي (0.5 مولاري pH = 8 حاو 2% حامض الاسكوربك Ascorbic acid و 1% Sodium – Diethyl Dithio Carbamate Na-DIECA كمادة مختزلة) ، وتم ترسيب الفايروس باستعمال كبريتات الامونيوم $(NH_4)_2SO_4$ بتركيز 50% (وزن : حجم) . بلغت نسبة الامتصاص لتحضيرة العزلات4 ، 3 ، 2 ، 1المنقاة جزئيا 1.52 ، 1.7 ، 1.73 ، 1.5 على التتابع . وبلغ تركيز الفايروس للعزلات 292 ، 320 ، 195 ، 246 ملغم / كغم اوراق تبغ مصابة على التتابع . وتم الحصول على مصل مضاد للعزلتين 1 و 3 وبعيارية 1024 و 2048على التتابع ، بعد اربع حقنات من الفايروس في ارنب نيوزلاندي ، في عضلة الفخذ وبمعدل 1 مل لكل حقنة تركيز2.4 و3.2 ملغم / مل الثلاث الاولى اسبوعية . ثم حقنه منشطة رابعة بعد اسبوعين من الحقنة الثالثة. وظهر خط ترسيب بين الحفر الحاوية على المصل المضاد وتلك الحاوية على التحضيرات النقية للعزلتين1 و 3 ومستخلصات من اوراق مصابة للعزلات الاربعة بوساطة اختبار الانتشار المناعي المزدوج في وسط الاكاروز الصلب. ومن نمط الخطوط وظهور النهاميز بين الحفر امكن تحديد اربع سلالات للفايروس.

The Iraqi Journal of Agricultural Science 39 (1): 59-68 (2008) Saber & Hamad

SEROLOGICAL AND BIOLOGICAL IDENTIFICATION OF FOUR CUCUMBER MOSAIC VIRUS STRAINS AND ITS RELATION FOR BATHOGENESIS

Abstract

This study was undertaken to determine the existence of cucumber mosaic virus strain. Symptoms on indicator plants and serological characteristics were used to justify this goal. Symptoms manifested on cucumber , Cowpea (Vigna unguiculata Savi. Var Black eye) , globe amaranth (Gomphrena globosa L.) , Jimson weed (Datura stramonium L.).tobacco (Nicotiana tabacum Var Samsun). and Tomato (Lycopersicon esculentum Mill) indicated the presence of 4 different pathotypes , (1) weak , (2) mild , (3) severe , and (4) very severe .Partial purification of CMV from N. tabacum Var Samsun was achieved by grinding infected leaves in phosphate buffer . 0.5 M , pH 8 , containing 2% ascorbic acid and 1% Na-DIECA , and precipitating the virus by addition of 50% (W/V) ammonium sulfate. The absorption ratio of purified prepartions for the isolates (4 , 3 , 2 .1) were found to be 1.73 , 1.5 , 1.52 and 1.7 yielding 292 , 320 , 195 , and 246 mg/kg of virus particles respectively .Antisera for isolates with a titer of 1/1024 , and 1/2048 respectively were obtained to 1 and 3 strains by 4 intramuscular injections of purified virus preparation at 2.4 and 3.2 mg/ml . The first 3 injections were weekly while the 4th injection was performed 2 weeks later.Double immunodiffusion test in agarose gel for the virus showed clear precipitation lines between wells containing the AS and those containing purified virus or leaf extracts from plants inoculated by the 4 isolates . According to these precipitation lines and spurs 4 strains of the virus were identified..

eye . حضر المستخلص بسحق مجموعة من الاوراق المصابة في محلول دارىء فوسفاتي 0.01 مولاري بدالة حامضية (pH = 7) . انتخبت بقعة واحدة مفردة واعدي بمستخلص منها نباتات خيار صنف بيتا الفا الحساس للفايروس. واعتمدت النباتات التي ظهرت عليها اعراضاً مصدراً لعزلات الفايروس.

دالتون بنسبة 10% وكلوريد الصوديوم 0.1 مولاري ، ويمكن الاستعاضة عن PEG بسلفات الامونيوم 50% (26) مع التحريك . ترك المزيج على درجة 4 س مدة 24 ساعة واجريت عليه عملية انتباذ بسرعة 10000 د/د مدة 15 دقيقة. اذيب الراسب في محلول دارىء البوريت 2% . واخضع المعلق لعملية انتباذ بسرعة 5000 د / د مدة 10 دقائق لازالة المواد غير الذائبة .

4- تقدير تركيز الفايروس : قدر امتصاص تحضيرة الفايروس المنقاة للضوء فوق البنفسجي بطول موجي 260 نانوميتر في جهاز قياس الطيف الضوئي نوع LKB موديل E4050. حسب تركيز الفايروس حسب المعادلة الاتية :

2- الحصول على عزلات الفايروس : اعتمد في الحصول على عزلات الفايروس طريقة البقعة الموضعية المفردة (5) على نباتات اللوبيا Black Savi eyes *Vigna ungiculata* . اعديت بمستخلص من اوراق نباتات خيار مصابة ، جمعت من مناطق مختلفة من بغداد وابوغريب ، نباتات اللوبياء Black *Vigna unguiculata*

3- تنقية الفايروس : اعديت مجموعة من نباتات التبغ *N. tabacum Samsun* بمستخلص من اوراق خيار مصابه لتكثير الفايروس . سحق 100 غم ، جمعت بعد 21 يوماً من العدوى ، (24) في مازجة كهربائية مع محلول دارىء فوسفاتي (0.5 مولاري فوسفات الصوديوم ، 0.2% حامض الاسكوربيك ، 1% DIECA بدالة حامضية pH = 8 بنسبة 1 : 3 (وزن : حجم). مرر المستخلص خلال ثلاثة اوراق ترشيح بوجود الكاربون المنشط (Activated charcoal) . اخضع الراشح لعملية انتباذ على سرعة 5000 دورة / دقيقة مدة 15 دقيقة في جهاز انتباذ نوع Beckman موديل TJ-6 . اضيف للطافي PEG ذو وزن جزيئي 6000

$$\text{التركيز (ملغم / مل)} = \frac{\text{مقدار الامتصاص على طول موجي 260 نانوميتر}}{\text{معامل الانطفاء}} \times \text{مقلوب التخفيف}$$

وحددت نقاوة التحضيرة وفقاً للنسبة الاتية :

$$\text{نسبة الامتصاص} = \frac{\text{الامتصاص على طول 260 نانوميتر}}{\text{الامتصاص على طول 280 نانوميتر}}$$

اخضع لعملية انتباذ بسرعة 2000 دورة / دقيقة مدة 10 دقائق . اضيف للمصل 0.02 غم ازيد الصوديوم ووزع في انابيب بلاستيكية وحفظ تحت التجميد لحين الاستعمال (3). حضر المصل المضاد لعزلتين من الفايروس .

6- تقدير عيارية المصل المضاد : عملت سلسلة من التخافيف 2/1 ، 4/1 ، ..... ، 4046/1) من المصل المضاد في محلول دارىء فوسفاتي ملحي PBS في انابيب زجاجية سعة 5 مل . مزجت قطرة من المصل المضاد مع قطرة من تحضيرة

5- تحضير المصل **المضاد** : اخضع ارنب نيوزلاندي لاربع حقنات من مستحضر الفايروس تركيز 2.5 ملغم / مل مع حجم مساو من مساعد فروند غير الكامل (Incomplete freund adjuvant) في عضلة الفخذ ، الثلاث الاولى اسبوعية والرابعة بعد اسبوعين من الحقنة الثالثة. جمع 20 مل من الدم ، بقطع الوريد الخارجي للاذن بواسطة شفرة حادة ، في كأس زجاجي بعد اسبوع من الحقنة الاخيرة . ترك الدم للتخثر وجمع المصل ثم

قطرة من المصل المضاد مع قطرة من محلول بفر PBs بنفس الطريقة للمقارنة.

7- الاختبارات المصلية

6 ملم والمسافة بين حفرة واخرى 4 ملم او 6 ملم . وضع 40 مايكروليتر من المصل المضاد غير المخفف للعزلة الاولى في الحفرة المركزية ، ووضع 40 مايكروليتر من مستخلص لنباتات تبغ مصابة بكل من العزلات (1 ، 2 ، 3 ، 4) ، ومستخلص نبات سليم وانموذج من تحضيرة الفايروس المنقاة جزئياً للعزلة الاولى او الثالثة للمقارنة. حضرت المستخلصات بسحق 10 غم من اوراق النبات المصاب او السليم في هاون خزفي معقم مع 30 مل من محلول دارئ فوسفاتي مبرد (0.5 مولاري فوسفات الصوديوم ، 0.2% حامض الاسكوربك و 1% DIECA) (pH = 8) . ورشح المستخلص عبر ورق الترشيح ، عوملت المستضدات قبل اخضاعها للاختبار بمحلول 2% SDS في الماء المقطر. كرر الاختبار نفسه مع المصل المضاد غير المخفف للعزلة الثالثة . تركت الاطباق في حمام مائي بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة. بعد ظهور خطوط الترسيب غمر هلام الاكاروز في محلول كلوريد الصوديوم 0.85% لازالة البروتينات غير المترسبة مع مراعاة استبدال المحلول الملحي عدة مرات.

النتائج والمناقشة

البري *Nicotiana glutinosa* L. اعراض موزائيك على الاوراق المصابة . ان الاعراض التي ظهرت على النباتات الكاشفة تتفق مع ما ذكره عدد من الباحثين (2 ، 9 ، 19 ، 23 ، 24) حول فايروس موزائيك الخيار مما يشير ان الفايروس موضوع البحث يمثل احدى سلالات فايروس موزائيك الخيار . وقد تم تأكيد تشخيص الفايروس مصلياً بمعاملة مستخلص النباتات المصابة مع مصل مضاد للفايروس تم الحصول عليه من د. صفاء قمري / المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (ايكاردا) . فظهر تكتل واضح باستعمال المجهر الضوئي.

الفايروس على شريحة زجاجية نظيفة ولوحظ تكون الراسب تحت المجهر الضوئي ، ومزجت

أ- **اختبار تكتل الكلوروبلاست** : استخدم هذا الاختبار بحسب ما ذكره Moury 2004 فقد وضعت قطرة حجم 50 مايكروليتر من المصل المضاد غير المخفف على شريحة زجاجية نظيفة بوساطة ماصة حجمية دقيقة ثم اضيف نصف حجم المصل من مستخلص العينة النباتية الحاوية على الفايروس ، ومزجت بشكل جيد ، فحص الانموذج تحت المجهر على قوة تكبير 100 X ، ثم اجري الاختبار نفسه مع انموذج من عصارة نبات سليم للمقارنة ثم لوحظ التفاعل ودونت النتيجة .

ب- اختبار الانتشار المناعي المزدوج : اعتمد هذا الاختبار لتحديد العلاقة المصلية بين العزلات المختلفة لفايروس CMV (3). فقد اذيب 0.85 غم اكاروز و 0.85 غم كلوريد الصوديوم و 0.02 غم ازيد الصوديوم في 100 مل من PBS (pH = 7.4) في دورق زجاجي وسخن المزيج الى درجة الغليان . ثم ترك ليبرد الى درجة حرارة 50 م . صبت 20 مل من هذا المحلول في اطباق بلاستيكية قطرها 9 سم بوساطة ماصة زجاجية سعة 10 مل ، وتركت الاطباق لمدة ساعة في المختبر لضمان تصلب الاكاروز. عملت في الوسط حفرة مركزية تحيطها ست حفر بوساطة قعر ماصة باستور معقمة بقطر 4 ملم او

تشخيص الفايروس : ظهرت على اوراق نباتات اللوبياء *Vigna ungiculata* Black eye بقع موضعية متنخرة وعلى اوراق نباتات ورد الدكمة *Gomphrena globosa* L. بقعاً موضعية واستجابت نباتات الخيار *Cucumis sativus* L. بظهور موزائيك على الاوراق المصابة ، وظهرت على اوراق نبات الداتورة *Datura stramonium* L. ونبات الزربيح *Chenopodium amaranticolor* Cost Reyn بقعا موضعية صفراء ، واستجابت نباتات الطماطة *Lycopersicum esculentum* Mill بظهور اعراض توضح العروق وتحول الاوراق الى شكل شريطي اعقبها اختزال نصل الورقة الى ما يشبه الخيط ،وظهرت على اوراق نبات التبغ

eye . حضر المستخلص بسحق مجموعة من الاوراق المصابة في محلول دارىء فوسفاتي 0.01 مولاري بدالة حامضية (pH = 7) . انتخبت بقعة واحدة مفردة واعدي بمستخلص منها نباتات خيار صنف بيتا الفا الحساس للفايروس. واعتمدت النباتات التي ظهرت عليها اعراضاً مصدراً لعزلات الفايروس.

دالتون بنسبة 10% وكلوريد الصوديوم 0.1 مولاري ، ويمكن الاستعاضة عن PEG بسلفات الامونيوم 50% (26) مع التحريك . ترك المزيج على درجة 4 س مدة 24 ساعة واجريت عليه عملية انتباذ بسرعة 10000 د/د مدة 15 دقيقة. اذيب التراسب في محلول دارىء البوريت 2% . واخضع المعلق لعملية انتباذ بسرعة 5000 د / د مدة 10 دقائق لازالة المواد غير الذائبة .

4- تقدير تركيز الفايروس : قدر امتصاص تحضيرة الفايروس المنقاة للضوء فوق البنفسجي بطول موجي 260 نانوميتر في جهاز قياس الطيف الضوئي نوع LKB موديل E4050. حسب تركيز الفايروس حسب المعادلة الاتية :

2- الحصول على عزلات الفايروس : اعتمد في الحصول على عزلات الفايروس طريقة البقعة الموضعية المفردة (5) على نباتات اللوبيا Black Savi eyes *Vigna ungiculata* . اعديت بمستخلص من اوراق نباتات خيار مصابة ، جمعت من مناطق مختلفة من بغداد وابوغريب ، نباتات اللوبياء Black *Vigna unguiculata*

3- تنقية الفايروس : اعديت مجموعة من نباتات التبغ *N. tabacum Samsun* بمستخلص من اوراق خيار مصابه لتكثير الفايروس . سحق 100 غم ، جمعت بعد 21 يوماً من العدوى ، (24) في مازجة كهربائية مع محلول دارىء فوسفاتي (0.5 مولاري فوسفات الصوديوم ، 0.2% حامض الاسكوربيك ، 1% DIECA بدالة حامضية pH = 8 بنسبة 1 : 3 (وزن : حجم). مرر المستخلص خلال ثلاثة اوراق ترشيح بوجود الكاربون المنشط (Activated charcoal) . اخضع الراشح لعملية انتباذ على سرعة 5000 دورة / دقيقة مدة 15 دقيقة في جهاز انتباذ نوع Beckman موديل TJ-6 . اضيف للطافي PEG ذو وزن جزيئي 6000

$$\text{التركيز (ملغم / مل)} = \frac{\text{مقدار الامتصاص على طول موجي 260 نانوميتر}}{\text{معامل الانطفاء}} \times \text{مقلوب التخفيف}$$

وحددت نقاوة التحضيرة وفقاً للنسبة الاتية :

$$\text{نسبة الامتصاص} = \frac{\text{الامتصاص على طول 260 نانوميتر}}{\text{الامتصاص على طول 280 نانوميتر}}$$

اخضع لعملية انتباذ بسرعة 2000 دورة / دقيقة مدة 10 دقائق . اضيف للمصل 0.02 غم ازيد الصوديوم ووزع في انابيب بلاستيكية وحفظ تحت التجميد لحين الاستعمال (3). حضر المصل المضاد لعزلتين من الفايروس .

6- تقدير عيارية المصل المضاد : عملت سلسلة من التخافيف 2/1 ، 4/1 ، ..... ، 4046/1) من المصل المضاد في محلول دارىء فوسفاتي ملحي PBS في انابيب زجاجية سعة 5 مل . مزجت قطرة من المصل المضاد مع قطرة من تحضيرة

5- تحضير المصل **المضاد** : اخضع ارنب نيوزلاندي لاربع حقنات من مستحضر الفايروس تركيز 2.5 ملغم / مل مع حجم مساو من مساعد فروند غير الكامل (Incomplete freund adjuvant) في عضلة الفخذ ، الثلاث الاولى اسبوعية والرابعة بعد اسبوعين من الحقنة الثالثة. جمع 20 مل من الدم ، بقطع الوريد الخارجي للاذن بواسطة شفرة حادة ، في كأس زجاجي بعد اسبوع من الحقنة الاخيرة . ترك الدم للتخثر وجمع المصل ثم

تشخيص سلالات الفايروس

الاختبار الاحيائي / دراسة الاعراض

العزلة 4 فقد سببت اعراضاً مماثلة لما سبق الا ان اعراض الموزائيك كانت اكثر شدة من العزلات الثلاث السابقة وبنفس المدة والظروف البيئية. ومن مجمل الاعراض التي ظهرت في هذه الدراسة على نبات التبغ واللوبياء نلاحظ الاتي : ان ثلاث عزلات (3 ، 2 ، 1) سببت اعراضاً جهازية على نباتات التبغ صنف Samsun وبقعاً موضعية متنخرة على اوراق اللوبياء صنف Black eye المعداة . وان عزلة واحدة فقط هي الرابعة قد سببت اعراضاً جهازية اشد على نبات التبغ وبقعاً موضعية متنخرة على اوراق اللوبياء المعداة تطورت فيما بعد الى اعراضاً جهازية . ظهرت على اوراق نباتات ورد الدكمة المعداة بعصارة من اوراق خيار مصابة وللعزلة الضعيفة (1) فقط بقع موضعية حمراء بعد 12 يوماً من العدوى في ظروف البيت الزجاجي ، تطورت الى بقع موضعية ميتة NLL ولم تظهر اية اعراض على الاوراق الحديثة . في حين ظهرت بقع موضعية صفراء CLL على الاوراق المعداة للعزلات المتوسطة (2) والشديدة (3) والاشد (4) بعد مرور 30 يوماً من العدوى. استجابت نباتات التبغ البري المعداة بعصارة من اوراق خيار مصابة ولجميع العزلات بظهور اعراض توضح العروق بعد 12-14 يوماً من العدوى اعقبها ظهور موزائيك شديد ، رافق هذه الاعراض ظهور تشوهات حادة على الاوراق القمية الحديثة كانت

ظهرت على نباتات الخيار صنف بيتا الفا المعداة ميكانيكياً بمستخلص بقعة موضعية مفردة مأخوذة من نبات لوبيا اعراض موزائيك تدرجت بين الموزائيك الضعيف والمتوسط والشديد والاشد . بدأ ظهور الاعراض على الاوراق الحديثة النمو بمساحات صغيرة مخضرة بعد مرور 6-10 ايام من العدوى تطورت الى موزائيك على جميع اوراق النبات المصاب ، صاحبه تقزم وتشوه النبات (1 ، 5). وبناء على هذه الاعراض تم الحصول على اربعة عزلات مختلفة ، عزلت الثلاث الاولى من البقع الموضعية المتنخرة المفردة لنبات لوبيا وعند اجراء سلسلة من التمريرات لبقعة موضعية للعزلات الاربعة على نباتات الخيار نتج موزائيك شديد وللعزلة الرابعة فقط. ظهرت على نباتات اللوبيا صنف Black eye المعداة ميكانيكياً بمستخلص اوراق خيار مصابة اعراضاً موضعية ولجميع عزلات الفايروس تمثلت بظهور بقع موضعية متنخرة مختلفة في حجمها على الاوراق المعداة ، بعد مرور 14 يوماً من العدوى دون ان تتطور الى اعراض موزائيك للعزلات الثلاثة الاولى في حين تطورت الاعراض الى موزائيك بالنسبة للعزلة الرابعة (الاكثر شدة) (7 ، 12). استجابت نباتات التبغ صنف Samsun المعداة بمستخلص اوراق خيار مصابة وللعزلات الثلاث (3 ، 2 ، 1) بظهور اعراض توضح العروق على الاوراق الحديثة بعد مرور اسبوعين من العدوى في ظروف البيت الزجاجي (24 ، 15 ، 12). اما

جدول 1. :استجابة العوائل الكاشفة لعزلات الفايروس

العائل Host	العزلة 1		العزلة 2		العزلة 3		العزلة 4	
	التفاعل	الاعراض	التفاعل	الاعراض	التفاعل	الاعراض	التفاعل	الاعراض
خيار	+	موزائيك طفيف وتقزم وتشوه الاوراق	+	موزائيك متوسط ، تقزم وتشوه الاوراق	+	موزائيك شديد ، تقزم وتشوه الاوراق	+	موزائيك شديد ، تقزم وتشوه الاوراق
اللوبيا	+	بقع موضعية متنخرة NLL	+	بقع موضعية متنخرة NLL	+	بقع موضعية NLLمتنخرة	+	بقع موضعية حمراء تطورت الى موزائيك
التبغ Samsun	+	توضح العروق ، موزائيك	+	توضح العروق ، موزائيك	+	توضح العروق ، موزائيك	+	توضح العروق ، موزائيك شديدمع ظهور تشوهات على الاوراق
ورد الدكمة	+	بقع موضعية حمراء تطورت الى بقع بنية NLL	+	بقع موضعية صفراء CLL	+	بقع موضعية صفراء CLL	+	بقع موضعية صفراء CLL
نبات الداتورة	–	عدم ظهور اعراض	–	عدم ظهور اعراض	+	بقع موضعية صفراء CLL تطورت الى تبرقش اصفر	–	عدم ظهور اعراض
الطماطة	–	عدم ظهور اعراض	–	عدم ظهور اعراض	–	عدم ظهور اعراض	+	توضح العروق وتحول الاوراق الى شكل شريطي اعقبها اختزال نصل الورقة الى ما يشبه الخيط
التبغ البري	+	موزائيك شديد مع ظهور تشوهات حادة على الاوراق القمية	+	موزائيك شديد مع ظهور تشوهات حادة على الاوراق القمية	+	موزائيك شديد مع ظهور تشوهات حادة على الاوراق القمية	+	موزائيك شديد مع ظهور تشوهات حادة على الاوراق القمية
الزربيح	+	CLL	+	CLL	+	CLL	+	CLL

CLL على الاوراق المعداة بعد مرور 10 ايام من العدوى ، تطورت فيما بعد الى تبرقش اصفر. وهذه الاعراض تتفق مع تلك التي ذكرها (12).واستجابت نباتات الزربيح المعداة بمستخلص من اوراق خيار مصابة ولجميع العزلات بظهور بقع موضعية صفراء CLL بعد مرور 3 ايام من العدوى (2). من مجمل هذه الاعراض على النباتات المختلفة توحي باحتمال وجود اكثر من سلالة للفايروس في المناطق التي خضعت للدراسة ومن المعروف ان الفايروسات اقل وضوحاً على الاوراق السفلية الكبيرة (8 ، 9 ، 24). استجابت نباتات الطماطة المعداة بمستخلص من اوراق خيار مصابة وللعزلة (4) فقط بظهور اعراض توضح العروق وتحول الاوراق الى شكل شريطي بعد مرور ثلاثة اسابيع من العدوى (2 ، 10 ، 23) . في حين لم تستجيب نباتات الطماطة للعدوى بمستخلص من العزلات (1، 2 ، 3) للفايروس.واستجابت نباتات الداتورة المعداة بمستخلص اوراق خيار مصابة وللعزلة (3) فقط بظهور بقع موضعية صفراء

واحد بسيط التركيب .

تنقية سلالات الفايروس

بدرجة 4 م . وهذا يتفق مع نتائج (8 و 26). ووجد ان استعمال كبريتات الامونيوم لترسيب الفايروس اعطى تركيزاً افضل من استعمال PEG لترسيبه ، لذلك فقد اعتمدت كبريتات الامونيوم لترسيب الفايروس في الدراسات اللاحقة . بلغت كمية الفايروس المنقاة من انسجة التبغ صنف Samsun للعزلات 4 ، 3 ، 2 ، 1 (292 ، 320 ، 195 و 246) ملغم / كغم اوراق على التوالي . وبلغت نسبة الامتصاص للضوء UV لنماذج من تحضيرة الفايروس المنقاة للعزلات 4 ، 3 ، 2 ، 1 على الطولين الموجيين 280 / 260 نانوميتر 1.73 ، 1.5 ، 1.52 و 1.7 على التوالي (9 ، 10).

تحضير المصل المضاد

التتابع ، اذ ظهر راسب عند خلط قطرة من تخافيف تصاعدية من المصل المضاد المحضر لعزلتي الفايروس (1 ، 3) وقطرة من مستخلص نبات تبغ مصاب بالعزلتين كلاً على حدة ، تناسبت عكسياً مع تخفيف المصل المضاد حتى التخفيف 1/1024 ، 1/2048 على التوالي ولم يظهر راسب عند استعمال تخافيف من المصل المضاد مع مستخلص نبات تبغ سليم . وتعد هذه العيارية جيدة اذا ما قورنت بما تم الحصول عليه من قبل باحثين اخرين (19 ، 21) وهذه العيارية تشير ان فايروس CMV مستضد ضعيف (10 ، 16).

المزدوج في وسط الاكروز الصلب ولم يظهر خط ترسيب بين الحفرة الحاوية على المصل المضاد وتلك الحاوية على مستخلص نبات سليم (شكل 1).

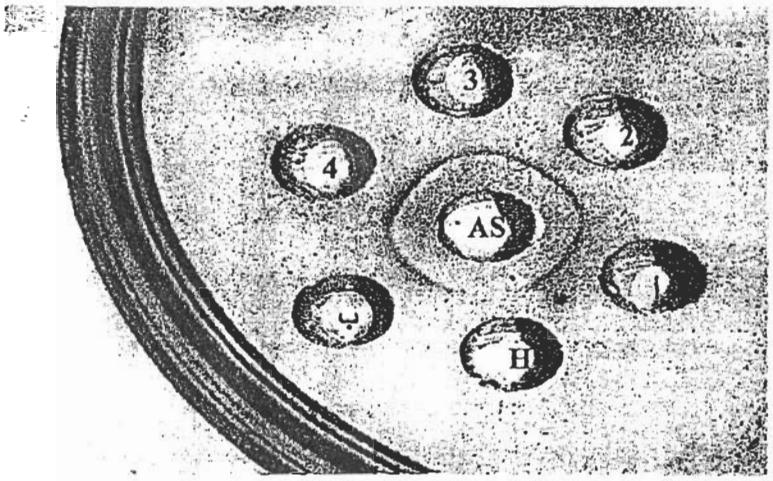
اكثر عرضة للتأثيرات الوراثية وظهور سلالات جديدة لكون الجينوم في معظمها يتكون من شريط

امكن باستعمال دارىء فوسفات الصوديوم Na_2HPO_4 بتركيز 0.5 مولاري (pH = 8) حاو على 0.2% حامض الاسكوربيك و 1% DIECA لاستخلاص الفايروس ، الحصول على فايروس فعال بايولوجياً . وادى استعمال الفحم المنشط الى الحصول على مستخلص رائق خال من الصبغات غير المرغوبة . ظهر راسب ابيض مصفر كثيف القوام عند اضافة PEG ذي وزن جزيئي 6000 دالتون بنسبة 10% و NaCl تركيز 0.1 مولاري الى المحلول الرائق . وهذا يتفق مع ما وجده (4) . وامكن ترسيب الفايروس من المحلول باضافة كبريتات الامونيوم $(NH_4)_2SO_4$ بتركيز 50% (وزن : حجم)

امكن الحصول على مصل مضاد لعزلتين من فايروس CMV هما (1 ، 3) بعد اربع حقنات من تحضيرة الفايروس المنقاة في عضلة الفخذ لارنب مختبري ، اذ ظهر تكتل شديد عند مزج قطرة من كل من المصل المضاد غير المخفف للعزلتين الضعيفة (1) والشديدة (3) على انفراد مع قطرة من العصير الخام لاوراق التبغ صنف Samsun المصابة ولم يظهر اي تكتل مع قطرة من العصير الخام لاوراق التبغ السليمة مما يدل على وجود الاجسام المضادة لبروتينات الفايروس في كلا المصلين. وهذه النتائج تتفق مع نتائج (2 ، 13). بلغت عيارية المصل المضاد للعزلتين (1 ، 3) 1/1024 و 1/2048 على

الاختبار المصلي

ظهر خط ترسيب بين الحفر الحاوية على المصل المضاد وتلك الحاوية على مستحضر نقي للفايروس او مستخلص نبات تبغ مصاب بكل من العزلتين (1 ، 3) في اختبار الانتشار المناعي



شكل 1 : اختبار الانتشار المناعي المزدوج ، يوضح حدوث تفاعل بين المصل المضاد ومستخلصات من نباتات مصابة وتحضيرات نقية من الفايروس وعدم حصوله مع مستخلص نبات سليم.

ASI – المصل المضاد غير المخفف للعزلة الضعيفة (1).

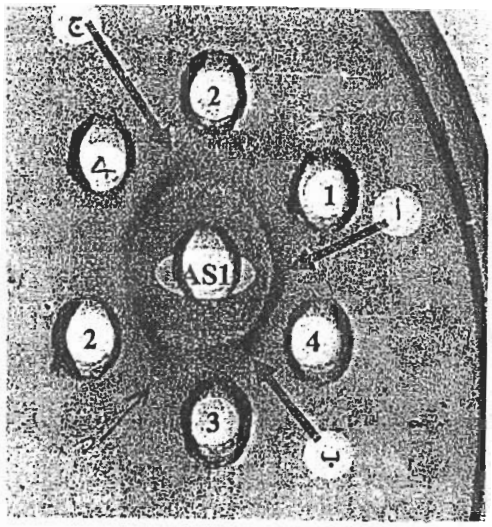
2,3,4 – مستخلصات نبات تبغ صنف Samsun مصابة.

أ ، ب – تحضيرات نقية للفايروس

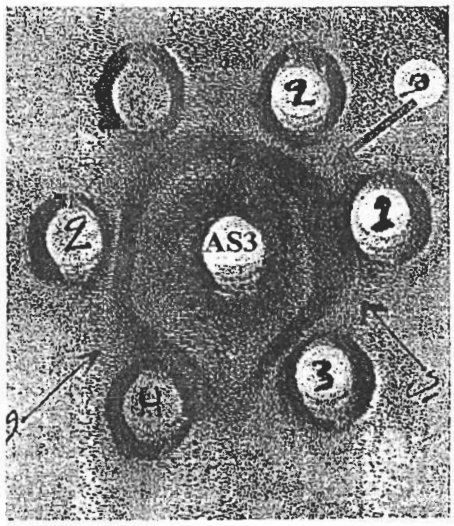
H– مستخلص نبات تبغ صنف Samsun سليم .

والعزلة المتوسطة (2) شكل (3) (السهم هـ) ، وبين العزلة المتوسطة (2) والعزلة الشديدة جداً (4) (السهم و) وبين العزلة الضعيفة (1) والعزلة الشديدة (3) (السهم ي) . ان ظهور المهاميز بين العزلات يشير الى وجود محددات انتيجينية اضافية في عزلة غير موجودة في عزلة اخرى وهذا يعكس تغايراً وراثياً في مستوى الحامض النووي الذي انعكس على تسلسل الحوامض الامينية في بروتين الغلاف الفايروسي نتج عنه اختلاف في عدد المحددات الانتيجية بين العزلات.

وظهرت مهاميز مع خطوط الترسيب بين المصل المضاد للعزلتين (1 ، 3) على انفراد مع مستخلصات من نباتات مصابة بعزلات اخرى للفايروس (شكل 2) ، فقد ظهر مهماز بين العزلة الشديدة جداً (4) وبين العزلة الضعيفة (1) (السهم أ) ، ومهماز اخر بين العزلة الشديدة جداً (4) وبين العزلة الشديدة (3) (السهم ب) ، وبين العزلة الشديدة جداً (4) والعزلة المتوسطة (2) (لسهم ج) وبين العزلة الشديدة والعزلة المتوسطة (2) (السهم د). وظهر مهماز بين العزلة الضعيفة (1)



شكل 2



شكل 3

خطوط الترسيب مع المهاميز في اختبار الانتشار المناعي المزدوج بين المصل المضاد للعزلة (1) و (3) ومستخلصاتها من نباتات مصابة بالعزلات الاخرى.

AS1 = المصل المضاد غير المخفف للعزلة الضعيفة 1
أ- = مهماز بين العزلة الضعيفة 1 والعزلة الشديدة جداً 4
ج- = مهماز بين العزلة المتوسطة 2 والعزلة الشديدة جداً
هـ- مهمازين بين العزلة المتوسطة 2 والعزلة الضعيفة 1
ي- مهماز بين العزلة الضعيفة 1 والعزلة الشديدة 3

AS3 = المصل المضاد غير المخفف للعزلة الشديدة 3
ب- = مهماز بين العزلة الشديدة جداً 4 والعزلة الشديدة 3
د- = مهماز بين العزلة الشديدة 3 والعزلة المتوسطة 2
و- مهماز بين العزلة الشديدة جداً 4 والعزلة المتوسطة 2

تختلف العزلة (1) عن العزلة (3).تطابقت نتائج هذا الاختبار مع نتائج الاختبار الاحيائي لنباتات الخيار والنباتات الكاشفة . وبناء على مجموع هذه النتائج استنتج وجود اربع سلالات لفايروس CMV في المناطق التي خضعت لهذه الدراسة .

استخلص من هذه النتائج ان العزلة الشديدة جداً (4) تختلف عن العزلة الشديدة (3) والعزلة الشديدة جداً (4) تختلف عن العزلة المتوسطة (2) وهذه تختلف عن العزلة (4) وتختلف العزلة الضعيفة (1) عن العزلة الشديدة جداً (4) . كما

المصادر

1- اجريوس ، جورج . 1994. امراض النبات . ترجمة الدكتور محمود موسى ابو عرقوب . المكتبة الاكاديمية . 1451 صفحة .

2- الزبيدي ، محمد عبدالستار كاظم . 1988. تشخيص مصادر اللقاح الاولي لفايروس موزائيك الخيار في منطقة ابوغريب . رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة بغداد .

3- العاني ، رقيب عاكف وياش بال راثي . 1984. فايروسات النبات اساسيات التجارب العملية ، مطبعة جامعة بغداد . 274 صفحة.

4- شوكت ،عبداللطيف بهجت. 1982. فايروسات النبات ، خصائصها. الامراض التي يسببها ومقاومتها . مطابع مديرية دار الكتب للطباعة والنشر . جامعة الموصل.

5-Bos,L.1999.Plant Viruses , Unique and Intriguing Pathogens a Textbook of Plant Virology. Backhuys Publishers , Netherlands , pp360.

6-Cohen , J., G. Loebenstein , and S. Spiegel . 1988. Infection of sweet potato by cucumber mosaic virus depends on the presence of sweet potato feathery mottle virus. Plant Disease. 72 : 583-585.

7-Daniels,J. and R.N. Campbell. 1992. Characterization of cucumber mosaic virus isolates from California. Plant Disease . 76 : 1245-1250 .

8-Eiras , M., A.J. Boari , A. Colariccio , A.L.R. Chaves , M.R.S. Briones , A.R. Figueria , and R. Harakava. 2004. Characterization of isolates of the cucumovirus cucumber mosaic virus present in Brazil .

9-Ford , R.E., L. Beezner , and R.I. Hamilton . 1988. Turnip , Cucumber and ribgrass mosaic viruses isolated from *Hesperis matronnlis* in British Columbia. Plant Disease. 72 : 101-106.
10-Francki , R.I.B., D.W. Mossop and F. Hatta .1979. Cucumber mosaic virus . No. 213 in Description of Plant Viruses. C.M.I. / Assoc. Appl. Biologists , Kew , Surrey , England.
11- Gibbs , A.J. and B.D. Harrison.2001. Cucumber mosaic virus . C.M.I / A.A.B. Descriptions of plant viruses. Hert. For dshire , England ,pp212.
12- Kaza , V .V. Hervent , and Z. Polak .1975. Crop loss assessment in green house cucumber infected with cucumber mosaic virus. Biol. Abstr. 61.
13- Luis – Arteaga , M.,E. Rodriguez – Cerezo,C. Maestro , and F. Garcia – Arenal . 1988. Detection and characterization of an isolate of cucumber mosaic virus (CMV) infecting borage (*Borago officinalis* L.) in Spain . Plant Disease. 72 : 265-267.
14- Mathews , R.E.F. 1970. Plant Virology,Academic Press , New York . pp 778 .
15- Moury , B. 2004. Differential Selection of Genes of cucumber mosaic virus subgroups . Mol. Biol. Evol. 21 (8) : 1602-1611.
16- Noordam , D. 1973. Identification of Plant Viruses : Methods and experiments – center for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen. pp207.
17- Palukaitis , P. 2003.Cucumber Mosaic Virus. Description of Plant Viruses . pp. 23.
18- Palukaitis , P., M. J. Roossinck , R.G. Dietzgen , and R.I.B. Francki. 1992. Cucumber mosaic virus. Adv. Virus Res. 41 : 281-348 . (Medline).
19- Pop , V. 1986. Virusurile plantelor SI Combaterea Lor Loan , Editura ceres , Bucuresti , 216-220.
20- Raj , S.K., A. Srivastava, G. Chandra , and B.P. Singh. 2002. Characterization of cucumber mosaic virus isolate infecting gladiolus cultivars and comparative evaluation of serological molecular methods for sensitive diagnosis . Current Science , 83 (9) : 1132-1137.
21- Roossinck , M.J. 2001.Cucumber mosaic virus , a model for RNA virus evolution . Molecular Plant Pathology . 2 (2) : 59-63.
22- Scott , H.A. 1963. Purification of cucumber mosaic virus. Virology , 20 : 103-106.
23- Shawkat , A.L.B. and G.I. Fegla . 1979. Identification of two viruses from eggplant and *Cucurbiat pepo* in Iraq . Plant Dis. Rept. 63 : 235-238.
24-Shi , B.J., P. Palukaitis. and R.H. Symons. 2002. Differential virulence by strains of cucumber mosaic virus in mediated by the 2b gene. The American Phytopathological Society. 15 (9) : 947-955.
25- Smith , T.J. and K.L. Perry . 2000. The structure of cucumber mosaic virus and comparison to cowpea chlorotic mottle virus. J. of Virology .74 (16) :7578-7586.
26- Van Regenmortel , M.H.V. 1963. Separation of an ntigenic plant protein from preparations of plant viruses . South African J. Agri. Sci. 24 : 282-289.