تقويم كفاءة الترحيل الكهربائي على هلام الاكريلامايد وتقنية الأشرطة المناعية في الكشف عن فيروسي موزاييك التبغ وموزاييك الخيار في العراق

Evaluation of SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis and immunostrip technique for detection of *Tobacco mosaic* virus and *Cucumber mosaic* virus in IRAQ

مصطفى علي عذب رقيب عاكف العاني
كلية الزراعة / جامعة بغداد
Mustafa A. Adhab Rakib A. Al-Ani
College of Agriculture / University of Baghdad

المستخلص

أجريت هذه الدراسة بهدف تقويم كفاءة تقنيتي الترحيل الكهربائي على هلام الاكريلامايد بوجود دوديسيل سلفات الصوديوم (SDS) واستعمال تقنية الأشرطة المناعية Immunostrips ومقارنتها بدراسة الأعراض على النباتات المشخصة في الكشف عن فيروسين هما: فيروس موزاييك التبغ (TMV، جنس *Tobamovirus*) وفيروس موزاييك الخيار (CMV، جنس *Cucumovirus*، عائلة *Bromoviridae*). أظهرت النتائج كفاءة الطريقتين في الكشف عن الفيروسين . إذ اظهر نمط الترحيل الكهربائي على هلام الاكريلامايد 10 % مع 0.1 % SDS لعينة من فيروس موزاييك الخيار حزمتين بروتينيتين أوزانها الجزيئية (24 ، 26)كيلو دالتون . وظهرت نفس الحزم في عينة البروتينات المستخلصة من نبات خيار مصاب بالفيروس وأخرى لمستخلص نبات مصاب حاوي أو خالي من الكلوروفيل تمثل بروتين الغلاف للفيروس . ولم تظهر مثل هذه الحزم في عينة بروتينات مستخلصة من نبات سليم أو مستخلص نبات سليم حاوي أو خالي من الكلوروفيل . وظهرت حزمة بروتينية وزنها الجزيئي 18 كيلو دالتون في نمط الترحيل الكهربائي لعينات فيروس موزاييك التبغ ، ولعينة من البروتين الكلي المستخلصة من نبات مصاب ، ولعينة من مستخلص نبات مصاب أزيل منها الكلوروفيل أو حاوية عليه تمثل بروتين الغلاف الفيروسي ، ولم تظهر مثل هذه الحزمة في نمط الترحيل لبروتينات النبات السليم أو مستخلص منه. واظهر الاختبار المصلي بالأشرطة المناعية الخاصة بفيروس موزاييك الخيار تفاعلاً موجباً مع مستخلص نباتات الخيار والبطيخ والقرع والكوسة ، كما أظهر اختبار الأشرطة المناعية الخاصة بفيروس موزاييك التبغ تفاعلا موجبا مع مستخلص نباتات التبغ والطماطة المصابة بفيروس موزاييك التبغ . ولم يظهر مستخلص النباتات السليمة لهذه الأنواع تفاعلاً موجباً مع هذه الأشرطة . وكانت النتائج مطابقة مع نتائج دراسة الأعراض على النباتات المشخصة بإصابتها بهذين الفيروسين .

Abstract

This study was carried out to evaluate the efficiency of electrophoresis on SDS-poly acrylamide slap gel and immunostrip techniques for detection of *Tobacco mosaic* virus (TMV, genus *Tobamovirus*) and *Cucumber mosaic* virus (CMV, genus *Cucumovirus*, family *Bromoviridae*), compared with symptoms on diagnostic plants for the two viruses. The results obtained showed that the two methods were effective. The analysis of samples of purified CMV, total proteins from infected cucumber plants, and extracts from infected plants with or without chlorophyll, by electrophoresis on 10% polyacrylamide slap gel containing 0.1% SDS showed two bands of 24 and 26 kd in size, and absent in samples of total protein or extracts of healthy plants. These two proteins represent the coat protein (CP) of CMV. In addition, one 18 kd protein band appeared on SDS- polyacrylamide gel profile which represent the CP of TMV, when samples of purified virus, total protein of infected plants, and plant

كلمات مفتاحية : أشرطة مناعية ، ترحيل كهربائي ، فيروس موزاييك التبغ ، فيروس موزاييك الخيار، طرق كشف .
Keywords: Immunostrips, electrophoresis, TMV, CMV, detection methods.

extracts with or without chlorophyll were analyzed. This band was absent in similar samples from healthy plants. The test of immunostrip specific for CMV showed positive reaction with extracts from melon, cucumber, winter squash, and zucchini infected plants. Similarly, a positive reaction with immunostrip specific for TMV appeared with extracts from tobacco, tomato infected with TMV. No reaction was obtained with healthy plants extract. These results were similar to those obtained from indicator plants for the two viruses.

المقدمة

اعتمدت طرائق عديدة لتشخيص الفيروسات كان أولها دراسة الأعراض على النباتات الكاشفة وتعد من الطرائق الأساسية التي اعتمدت في تشخيص والكشف عن الفيروسات وسلالاتها في المراحل الاولى من دراسة الفيروسات النباتية والى الآن [3,2,1] .

واعتمدت الاختبارات المصلية في تشخيص الفيروسات وطورت طرق استعمالها ولعل من أهم هذه الاختبارات اختبار إليزا ELISA وهو ما زال شائعاً حتى الآن ، وقد خضعت تقنية إليزا للعديد من التحويرات كان آخرها تحضير أشرطة مناعية وهي على درجة عالية من التخصص والدقة [2] .

واستعملت حديثاً تقنية PCR وهي من الطرائق السريعة والموثوق بها والمعتمدة والحساسة في الكشف عن الفيروسات النباتية مقارنة مع اختباري اليزا والنباتات الكاشفة [4] ، وأصبح بالامكان استعمالها للكشف عن التراكيز المنخفضة جداً من الفيروسات في النسيج النباتي . وما زالت من أكثر التقنيات اعتماداً ودقة في الكشف عن الفيروسات وتحديد سلالاتها [5,3] . وقد اعتمدت معظم البحوث في هذا المجال على تسلسل القواعد النتروجينية في الحامض النووي المسؤولة عن تصنيع الغلاف البروتيني للفيروس Coat Protein(CP) . من هنا جاءت فكرة اعتماد الوزن الجزيئي وعدد البروتينات المكونة للغلاف البروتيني للفيروس مباشرة بتحليله على هلام متعدد الاكريلامايد بوجود دوديسيل سلفات الصوديوم (SDS) بتقنية الترحيل الكهربائي كأحد المعايير المهمة في تشخيصه [7,6] . تهدف هذه الدراسة محاولة تقويم كفاءة تقنيتين في تشخيص الفيروسات هما: الوزن الجزيئي وعدد بروتينات الغلاف البروتيني الفيروسي بتقنية الترحيل الكهربائي على هلام متعدد الاكريلامايد بوجود SDS ، والثانية اعتماد الأشرطة المناعية كأحد الاختبارات المصلية في هذا المجال ومقارنتهما بالطريقة البايولوجية وهي استعمال النباتات الكاشفة في التشخيص ، واختبر فيروسين هما فيروس موزاييك الخيار(CMV ، جنس *Cucumovirus* ، عائلة *Bromoviridae*) وفيروس موزاييك التبغ (TMV، جنس *Tobamovirus*) لهذا الغرض .

المواد وطرائق العمل

تحضير نباتات الاختبار

ملئت أصص بلاستيكية ذات أبعاد 22 × 20 سم ، معقمة بواسطة هايبوكلورايت الصوديوم 30% ، بخليط من تربة مزيجية وبيتموس بنسبة 1:1 معقمة بالمؤصدة بدرجة حرارة 121م وضغط 1.5 بار لمدة ساعة . زرعت الأصص ببذور نباتات الاختبار في البيت الزجاجي التابع لقسم وقاية النبات / كلية الزراعة / جامعة بغداد جدول (1) . فردت النباتات بعد الإنبات إلى نباتين في كل أصيص ، وروعي رش النباتات أسبوعيا بسماد متعادل (20، 20، 20 NPK) وفق التوصية السمادية للشركة المجهزة 200غم/ 100 لتر ماء (تغذية ورقية) . غطيت النباتات بقماش الململ لتفادي وصول الحشرات إليها وكانت ترش كل عشرة أيام بمبيد Confidor SL 200 (مادة فعالة Imidacloprid 200غم/ليتر) المجهز من شركة Bayer حسب التوصية 1 1.25 مل/لتر ماء . وبمبيد الحلم نيوتكس سوبر 0.5 مل /لتر ماء لضمان ابادة الحشرات والحلم .

طرائق التشخيص

النباتات الكاشفة وتحضير اللقاح

جمعت عينات من أوراق نبات طماطة تظهر عليها أعراض أوراق شريطية ونباتات تبغ تظهر عليها أعراض موزاييك ، ومن أوراق نبات خيار تظهر عليها أعراض موزاييك ، من حقول متفرقة في محافظة بغداد في الموسم الزراعي 2007 ، وحفظت النماذج تحت التجميد لحين الاستعمال .

سحق (1)غم من الأوراق لكل عينة في هاون خزفي مع 4 مل من محلول منظم فوسفاتي {(Na_2HPO_4+ KH_2PO_4) بتركيز 0.01 جزيء ذو أس هيدروجيني متعادل (pH7) }مبرد [8] . رشح المستخلص من خلال طبقتين من قماش الململ المعقم ، ومسحت بالراشح أوراق نباتات الاختبار جدول (1) بوجود الكاربوراندم 600 مش. رشت النباتات المعدة بالماء المقطر بعد (1 2)دقيقة من العدوى ووضعت في البيت الزجاجي واستمرت متابعة النباتات لحين ظهور الأعراض .

اختبار الأشرطة المناعية

اجري الاختبار باستعمال مصل مضاد لفيروسي موزاييك الخيار وموزاييك التبغ والمجهز على شكل أشرطة من شركة Agdia biofords الأمريكية ، حسب طريقة العمل الموصى بها من الشركة المجهزة . وضع 0.15 غم من العينة المراد فحصها في الكيس الحاوي على محلول داريء الاستخلاص وسحقت جيدا بواسطة مدقة هاون Pestle . غمرت نهاية الشريط المعاملة بالمصل المضاد (الجهة المحمية بشريط ومؤشر عليه بسهم متجه للأسفل) لمسافة 0.5 سم في الكيس الحاوي على محلول العينة المراد اختبارها . سجلت النتائج بعد(3 5) دقائق ، وهو الوقت اللازم لحدوث التفاعل . كررت الخطوات أعلاه مع مستخلص من نبات سليم للمقارنة .

جدول(1) : النباتات الكاشفة المستعملة في إجراء الاختبار الحيوي لفيروسي موزاييك الخيار CMV وموزاييك التبغTMV

ت	اسم النبات الكاشف	Indicator plant	الاسم العلمي Scientific name
1	اللوبيا	Cowpea	*Vigna unguiculata* var Blackeye L.
2	الخيار	Cucumber	*Cucumis sativus* L.
3	الزربيح	Goose foot	*Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn
4	الطماطة	Tomato	*Lycopersicon esculentum* Mill.
5	البطيخ	Melon	*Cucumis melo* L.
6	القرع	Winter squash	*Cucurbita maxima*
7	الشجر	Zucchini	*Cucurbita pepo*
8	الداتورة	Jimson weed	*Datura metal* L.
9	التبغ	Tobacco	*Nicotiana tabacum var Turkish* L.
10	التبغ	Tobacco	*Nicotiana tabacum* var *Xanthi* L.
11	التبغ	Tobacco	*Nicotiana tabacum* var *Xanthi* NN
12	الرقي	Water melon	*Cucurbita citrullus*

*** جهزت بذور اللوبياء والخيار والرقي والشجر من الهيأة العامة لفحص وتصديق البذور، وباقي البذور محلية**

الترحيل الكهربائي

تحضير العينات البروتينية

- **فيروس موزاييك التبغ :** سحق 100غم من أوراق تبغ مصابة بفيروس موزاييك التبغ مع محلول منظم الاستخلاص (Na_2HPO_4 + KH_2PO_4) بتركيز 0.5 جزيء وبدرجة حموضة متعادلة (pH7) ، يحتوي 1% ميركبتوايثانول بنسبة (1:1) (وزن:حجم) في مازج كهربائي مدة خمس دقائق . رشح المستخلص عبر طبقتين من قماش الململ . أضيف للراشح n-Butanol بنسبة 8% مع التحريك لمدة ساعة عند درجة 4م . اخضع المستخلص لعملية طرد مركزي بسرعة 8000 دورة/دقيقة مدة 30 دقيقة في جهاز طرد مركزي مبرد عند درجة حرارة 4م . أضيف للراشح PEG (Polyethylene Glycol) ذو وزن جزيئي 6000 دالتون بنسبة 4% مع التحريك حتى الذوبان وترك المزيج لمدة ساعة على 4م . جمع الراسب الفيروسي بعملية طرد مركزي بسرعة 8000 دورة/ دقيقة لمدة 30 دقيقة. ذوب الراسب في محلول منظم فوسفاتي متعادل تركيزه 0.01 جزيء بنسبة 2%. ترك المستخلص ثلاث ساعات في المختبر واخضع لعملية طرد مركزي بسرعة 8000 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة . بذلك تم الحصول على فيروس نقي جزئياً [9] .
- **فيروس موزاييك الخيار :** سحق 100غم من أوراق نبات خيار مصابة بفيروس موزاييك الخيار مع محلول منظم فوسفاتي مبرد {0.5 جزيء فوسفات الصوديوم ، 0.2 % حامض الاسكوربيك ، 1% DIECA ودرجة حموضة 8، بنسبة 3:1 (وزن:حجم)}في مازج كهربائي . مرر المستخلص خلال طبقتين من قماش الململ ثم خلال أوراق ترشيح . أضيف للراشح الكلوروفورم بنسبة (1:1) مع التحريك لمدة ساعة كاملة عند درجة حرارة 4م . اجريت للمستخلص عملية طرد مركزي بسرعة 5000 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة بدرجة حرارة 4م في

جهاز طرد مركزي مبرد . أضيف إلى الطبقة المائية الطافية PEG وزنه الجزيئي 6000 دالتون بنسبة 10% وكلوريد الصوديوم 0.1 جزيىء مع التحريك عند درجة حرارة 4م مدة 24 ساعة . اخضع المحلول لعملية طرد مركزي بسرعة 12000 دورة/دقيقة مدة 15 دقيقة بدرجة 4م . ذوب الراسب في محلول داريء البوريت 2 % بدرجة حموضة 8 ، ثم اخضع المعلق الفيروسي لعملية انتباذ على سرعة 5000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق [10] .

استخلاص البروتين الكلي من النبات

سحق 50 غم من أوراق نبات مصاب بالفيروس في 100 مل منظم فوسفاتي KH_2PO_4 تركيزه 0.01 جزيىء درجة حموضته 7.5 يحوي 0.2 % SDS و 0.1 % ميركابتوايثانول في مازج كهربائي . رشح المستخلص خلال ورقة ترشيح وأضيف للراشح 51.6% من كبريتات الامونيوم مع التحريك حتى الذوبان . ترك المحلول مدة ساعتين بدرجة 4م للترسيب . جمع الراسب بعملية طرد مركزي بسرعة 9000 دورة/دقيقة مدة 30 دقيقة . أذيب في محلول منظم فوسفاتي 0.01 جزيىء درجة حموضته 7.5. أضيف للمحلول حجم مساوي من الأسيتون البارد وترك لمدة ساعة ثم أخضع لعملية طرد مركزي بسرعة 9000 دورة/دقيقة لمدة 30 دقيقة . أذيب الراسب في محلول منظم فوسفاتي 0.01 جزيىء بدرجة حموضته 7.5. أجريت عملية استخلاص البروتينات من النباتات السليمة بالطريقة نفسها [11] .

وللمقارنة حضرت عينات من النباتات المصابة والسليمة أزيل منها الكلوروفيل بامرار المستخلص عبر طبقة من الكربون المنشط أو بواسطة المعاملة بالأسيتون بنسبة 1:1 (حجم:حجم) من المستخلص . ركزت العينات بعملية الإنتشار الغشائي بواسطة PEG وزنه الجزيئي 6000 دالتون .

طريقة الترحيل الكهربائي

تحضير العينات : أضيف لكل 100مايكروليتر من نموذج البروتين المراد تحليله 2مايكروليتر-β mercaptoethanol 2% ، 10 مايكروليتر محلول SDS 20% (2%) ، 15 مايكروليتر جليسرول 15% . سخنت العينات عند درجة حرارة 100م مدة دقيقتين ثم بردت مباشرة ووضعت في حفر الهلام بمعدل 25 مايكروليتر لكل عينة . عوملت بروتينات قياسية (Aprotinin , Bovine Lung 6500 دالتون ، α– Lactalbumin , Bovine Milk 14200 دالتون، Trypsin Inhibitor , Soybean 20000 دالتون، Trypsinogen , Bovine Pancreas 24000 دالتون، Carbonic Anhydrase , Bovine Erythrocytes 29000 دالتون، Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase, Rabbit Muscle 39000 دالتون، Ovalbumin , Chicken Egg 45000 دالتون، Bovine Serum Albumin 66000 دالتون) بنفس الطريقة واستعملت بمعدل 10 مايكروليتر لكل حفرة.

تحضير الهلام: حضر الهلام المكون من طبقتين من الاكريلامايد ، السفلية هي هلام الفصل تركيز 10% (حضر 30 مل من هلام الفصل بخلط 11.25 مل محلول منظم تريس حامض الهيدروكلوريك درجة حموضته(8.8 ، 0.3) مل SDS 10% و 10 مل Acrylamide 30 % - Bis-Acrylamide 0.8 % و 0.15 مل TEMED و 0.3 مل Ammonium persulfate و 8 مل ماء مقطر) . والطبقة العلوية هلام الرص Stacking Gel تركيز 5% (حضر 10مل منه بخلط 1.25مل داريء ترس حامض الهيدروكلوريك ذي الأس الهيدروجيني 6.8 و 0.1 مل SDS 10% و 1.66مل Acrylamide 30% Bis-Acrylamide 0.8% و 0.05مل TEMED و 0.1 Ammonium persulfate و 6.8 مل ماء مقطر) .

سكب هلام الفصل بين لوحين من الزجاج تفصلهما مساطر بلاستيكية بسمك 1.4ملم . أضيفت طبقة رقيقة من البيوتانول لضمان سطح مستوي من الهلام عند التصلب . أزيل البيوتانول بعد بلمرة هلام الفصل وغسل بالماء المقطر عدة مرات . سكب هلام الرص فوق هلام الفصل مع وضع مشط لتكوين الحفر . رفع المشط بعد بلمرة هلام الرص برفق لتجنب تحطم الحفر ورفعت المسطرة السفلى من بين اللوحين. وضع اللوحان الزجاجيان في حوض الترحيل الكهربائي الذي يحوي على محلول منظم الترحيل (192 مليجزيىء Glycine و 25 مليمولاري داريء ترس حامض الهيدروكلوريك و0.1% SDS ، درجة حموضته 8.3) . وصلت أقطاب التيار الكهربائي وجهزت بقدرة 125 فولت مدة 5 ساعات . أوقف التيار عند وصول صبغة الفينول الزرقاء لمسافة 1 سم من قاعدة الهلام . رفع الهلام وفصل عن الألواح الزجاجية برفق ووضع في محلول صبغة الكوماسي الزرقاء (0.55غم من صبغة Coomassie Brilliant Blue R250 في خليط من 100مل ميثانول و 20مل حامض

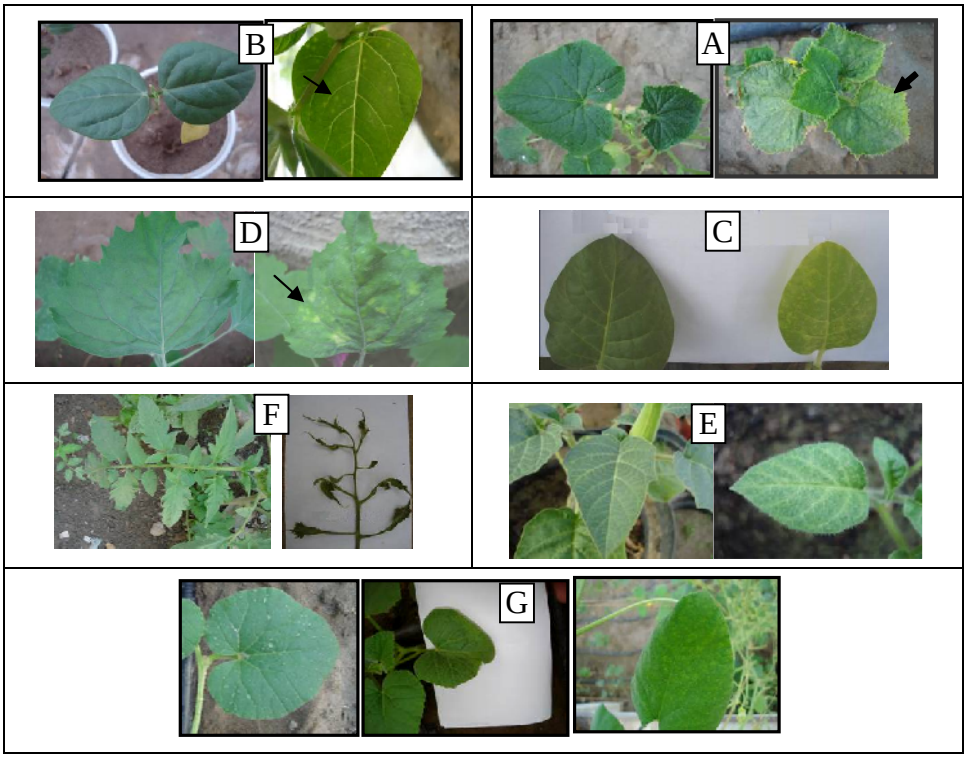
الخليك و 100مل ماء مقطر) مدة 30 دقيقة . ثم وضع في محلول إزالة الصبغة (7.5% حامض الخليك ،5% ميثانول) مدة 24 ساعة مع مراعاة تبديل المحلول من وقت لآخر لإظهار الحزم البروتينية [12] .

النتائج والمناقشة

دراسة الأعراض على النباتات الكاشفة

فيروس موزاييك الخيار: استجابت النباتات الكاشفة المستعملة لتشخيص موزاييك الخيار للعدوى بمستخلص من أوراق نبات مصاب بالفيروس على النحو الآتي: ظهرت مساحات صغيرة مخضره على أوراق الخيار حديثة النمو بعد أسبوعين من العدوى ، تطورت إلى موزاييك على جميع أوراق النبات صاحبه ظهور تقزم وتشوه أوراق النبات شكل(1 A) . وهذه الأعراض مماثلة لما ذكره [6] . وظهرت على أوراق نباتات اللوبيا صنف Black eye المعداة، بقع موضعية شاحبة مختلفة الأحجام بعد خمسة أيام من العدوى ، لم تتطور إلى إصابة جهازية (شكل 1 B) ، وهذا يتفق مع ما وصفه [13,6] ، وعلى أوراق نباتات التبغ صنف Xanthi المعداة بقع موضعية صفراء صغيرة على الأوراق شكل(1 C) ، وهذا يتفق مع ما ذكره [14] ولم تشر باقي المصادر إلى إصابة نبات التبغ صنف Xanthi بالفيروس موضعيا وإنما أشارت إلى إصابته جهازيا بالفيروس وظهور أعراض موزاييك [13,6] . ظهرت بقع موضعية صفراء على أوراق نباتات الزربيح المعداة بعد أسبوع من العدوى تطورت إلى بقع موضعية ميتة NLL مع عدم ظهور أية أعراض جهازية شكل (1 D) ، وهذا يتفق مع دراسات أخرى حول نفس الموضوع [6] .

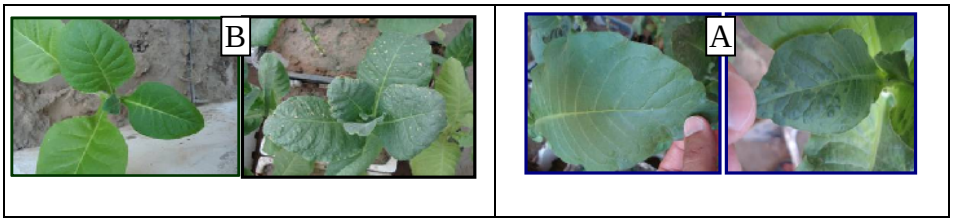
استجابت نباتات القرع (اسكله) بظهور أعراض موزاييك ، ونباتات الشجر (الكوسة) بظهور أعراض موزاييك طفيف رافقها أعراض تنخر العروق وهذا يتفق مع [14] . وظهرت على أوراق نباتات الداتوره المعداة بقع موضعية تطورت فيما بعد إلى تبرقش اصفر شكل(1 E) ، وهذا يتفق مع [6] ، وعلى نباتات الطماطة المعداة أعراض توضح العروق وتحول الأوراق إلى شكل شريطي بعد ثلاثة أسابيع من العدوى شكل(1 F) ، وهذا يتفق مع [6] ، وعلى نباتات البطيخ بظهور أعراض تبرقش و موزاييك شكل(1 G) . في حين لم تظهر أعراض على نباتات الرقي عند إجراء العدوى .



شكل (1) :نتائج عدوى النباتات الكاشفة بمستخلص أوراق نبات خيار مصابة بفيروس موزاييك الخيار

(A) أعراض موزاييك وتشوه الأوراق على نباتات الخيار *Cucumis sativus* صنف بيتا ألفا (اليمين)، نبات خيار سليم (اليسار).
(B)بقع موضعية شاحبة (سهم) على الأوراق الأولية لنبات لوبيا *Vigna unguiculata* صنف Blackeye بعد 5 أيام من العدوى (اليمين). نبات سليم (اليسار).
(C) بقع موضعية شاحبة على أوراق نبات التبغ صنف Xanthi (اليمين)، أوراق سليمة (اليسار).
(D) بقع موضعية شاحبة على أوراق نبات الزربيح *Chenopodium amaranticolor* (سهم) (اليمين) ، ورقة سليمة (اليسار).
(E) أعراض تبرقش على الأوراق الحديثة لنبات الداتورا *Datura metel* (اليمين) ، نبات سليم (اليسار).
(F) أعراض الورقة الشريطية على نبات الطماطة بعد مرور ثلاثة أسابيع من العدوى (اليمين)، نبات طماطة سليم (اليسار).
(G) أعراض تبرقش على نبات البطيخ (اليمين) أعراض موزاييك (الوسط) ورقة سليمة (اليسار).

فيروس موزاييك التبغ: استجابت نباتات التبغ صنف Turkish المعداة بمستخلص أوراق نبات تبغ مصابة بالفيروس بظهور أعراض توضح العروق على الأوراق المعداة بعد (3–4) أيام من العدوى تطورت بعدها إلى موزاييك مصحوبة بانتفاخات خضراء وتشوه طفيف للورقة شكل(2 A) ، وهذا يتفق مع ما ذكره [16,15,5] ، وظهرت على أوراق نباتات التبغ صنف Xanthi NN المعداة بقع موضعية متنخرة NLL اتسع حجمها بمرور الوقت شكل(2 B) ، وهذا يتفق مع دراسة سابقة [17,16,5] تحولت إلى إصابة جهازية عند ارتفاع درجة الحرارة . وظهرت على نباتات الطماطة المعداة أعراض تجعد الأوراق والتفاف نصلها نحو الأسفل ، اختزلت فيما بعد إلى ما يشبه الأشرطة صاحب هذه الأعراض تقزم النبات وتوقف النمو، وهذا يتفق مع [15,5] .
إن ما تم التوصل إليه من دراسة للأعراض على النباتات الكاشفة يوحي إلى أن الفيروس المسبب لأعراض الأوراق الشريطية وتشوهها على الطماطة هو فيروس موزاييك التبغ ، وان الفيروس المسبب لأعراض موزاييك وتشوه أوراق نباتات الخيار هو فيروس موزاييك الخيار .
لقد استخدمت النباتات الكاشفة منذ بداية اكتشاف علم فيروسات النبات ولا زالت تستعمل في تشخيص الفيروسات لحد الآن . فقد استعملت لتشخيص فيروسي موزاييك الخيار وموزاييك التبغ على عوائل متعددة [3,1] .

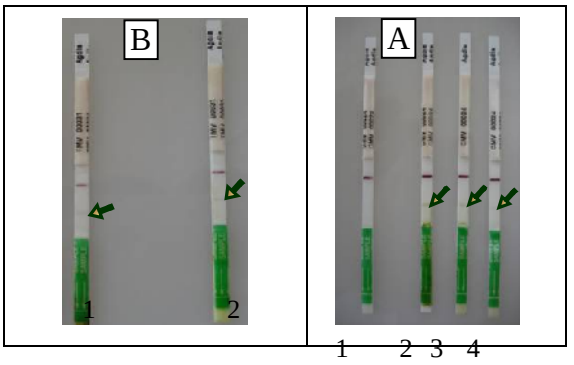


شكل (2) (A): أعراض موزاييك على الأوراق الحديثة لنبات التبغ صنف Turkish المعداة بمستخلص من بقعة موضعية متنخرة مأخوذة من نبات تبغ صنف Xanthi NN (اليمين) ، وتظهر أوراق نفس النبات سليمة للمقارنة (اليسار) . (B) أعراض البقع الموضعية المتنخرة NLL على أوراق نبات التبغ صنف Xanthi NN المعداة بمستخلص من بقعة موضعية متنخرة مأخوذة من نبات تبغ صنف Xanthi NN (اليمين) ، مقارنة بنبات سليم (اليسار) .

اختبار الأشرطة المناعية Immunostrips

فيروس موزاييك الخيار: أظهرت نتائج الاختبار المصلي بواسطة الأشرطة احتواء نباتات الخيار *Cucumis sativus* والبطيخ *Cucumis melo* والقرع *Cucurbita maxima* والشجر (الكوسة) *C. Pepo* على فيروس موزاييك الخيار، إذ أظهرت مستخلصات من هذه النباتات تفاعلا موجبا مع الـ Flash Kits الحاوي على المصل المضاد الكاشف لفيروس موزاييك الخيار تمثل بظهور خط ترسيب شكل(3 A) ، فيما لم يظهر الاختبار أي دلالة على وجود تفاعل مع العينة المأخوذة من مستخلص أوراق نبات سليم .
فيروس موزاييك التبغ: أظهرت نتائج الاختبار المصلي بواسطة الأشرطة احتواء نباتات التبغ *Nicotiana tabaccum* var Turkish والطماطة *Lycopersicon esculentum* Mill. المختبرة على فيروس موزاييك التبغ ، إذ أظهرت هذه النباتات تفاعلا موجبا مع الـ Flash Kits الحاوي على المصل المضاد الكاشف لفيروس موزاييك التبغ بظهور خط ترسيب شكل(3 B) ، فيما لم يظهر الاختبار أي دلالة على وجود تفاعل مع العينة المأخوذة من نباتات سليمة .
ومن النتائج التي تم ذكرها لوحظ تطابق نتائج الاختبار الحيوي مع نتائج اختبار ELISA باستعمال أشرطة الـ Flash kits في التشخيص ، مما يشير إلى إمكانية استعمال هذا الاختبار في تشخيص العزلات العراقية من فيروسي موزاييك الخيار وموزاييك التبغ بكفاءة ودقة وسرعة عالية .

لقد استعملت الطرق المصلية كثيرا في الكشف عن الفيروسات وخصوصا تقنية إليزا إذ استعملت لتشخيص فيروسي موزاييك التبغ وموزاييك الخيار [3,1] . وتعد من الطرائق الدقيقة في التشخيص .



شكل (3) :(A) يبين نتائج التفاعل بين المصل المضاد لفيروس موزاييك الخيار CMV مع مستخلص نبات خيار سليم- مقارنة (1) ، ومع مستخلص نبات خيار مصاب بالفيروس (2) ، ومع مستخلص نبات بطيخ مصاب بالفيروس (3) ، ومع مستخلص نبات قرع مصاب بالفيروس (4) . (B) يبين نتائج التفاعل بين المصل المضاد لفيروس موزاييك التبغ TMV مع مستخلص نبات تبغ مصاب بالفيروس (1) . ومع مستخلص نبات طماطة مصاب بالفيروس (2) . (2) (يشير السهم إلى منطقة حدوث التفاعل بين الفيروس والمصل المضاد) .

الترحيل الكهربائي لبروتينات الغلاف الفيروسي على هلام متعدد الاكريلامايد بوجود SDS

أظهر نمط الترحيل الكهربائي لنماذج مأخوذة من نباتات خيار مصابة بـ CMV وأخرى من نباتات سليمة على هلام الأكريلامايد 10% والحاوي على SDS 0.1% ، وجود حزمة بروتينية رئيسة مكونة من حزمتين بروتينيتين في (العمود)2 الحاوي على عينة الفيروس النقي ، تمثل بروتين الغلاف الفيروسي قدر وزنها الجزيئي (24،26) كيلودالتون تقريبا على التوالي شكل (4 A) .

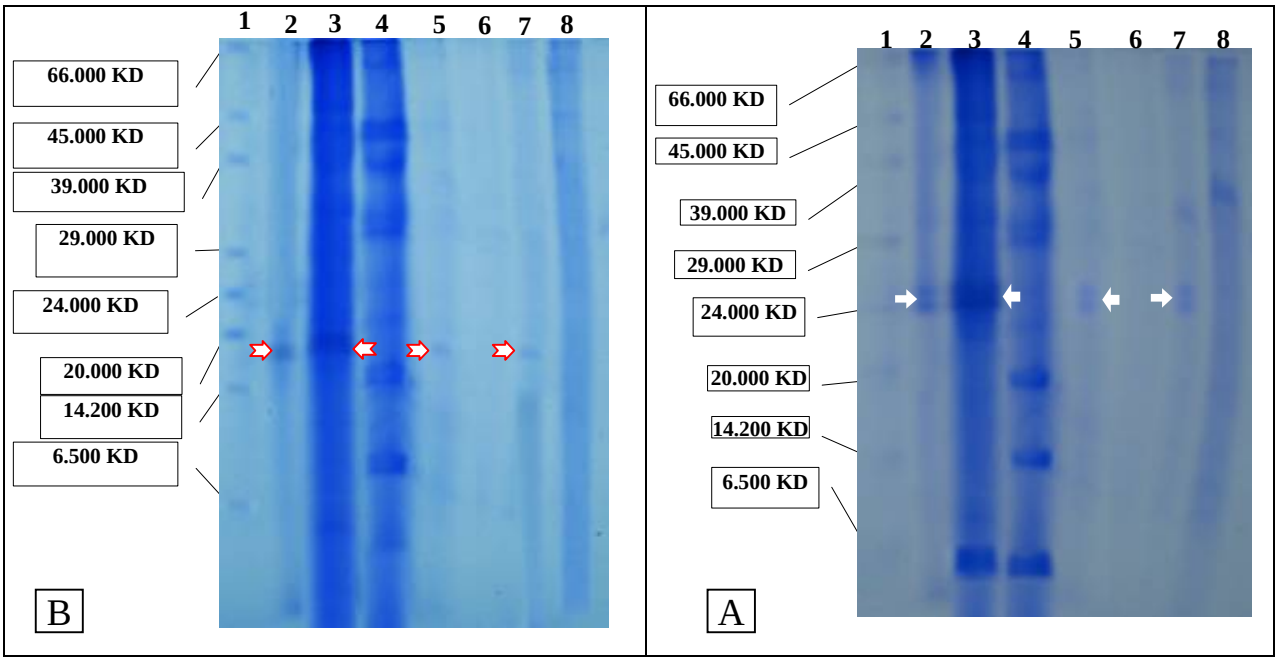
ظهرت أيضاً حزمتين بروتينيتين (مشار إليهما بسهم) في نمط الترحيل الحاوي على البروتين الكلي المستخلص من نبات خيار مصاب (العمود 3) ، وفي النمط الحاوي على مستخلص نبات مصاب أزيل منه الكلوروفيل (العمود 5) ، في نفس المستوى الذي ظهرت فيه حزمتي بروتين الغلاف الناتجة عن ترحيل نموذج من فيروس نقي (24 26) كيلودالتون لم تظهر في الأعمدة الحاوية على مستخلص خام لنبات سليم (العمود 8) أو نبات سليم خال من الكلوروفيل (العمود 6) أو بروتينات مستخلصة من نبات سليم (العمود 4) وظهرت نفس الحزمة في مستخلص خام لنبات مصاب (العمود 7) شكل(4 A) .

وتشير المصادر الحديثة إلى أن الغلاف البروتيني لفيروس موزاييك الخيار مكون من جزيئتين بروتينيتين أوزانها الجزيئية (22 ، 28) كيلودالتون [18]. وتشير مصادر أخرى إلى أن الوزن الجزيئي للغلاف البروتيني لفيروس موزاييك الخيار يبلغ 24.5 كيلودالتون [19,2] أو 26 كيلودالتون [21,20] حسب سلالات الفيروس .

أوضحت نتائج الترحيل الكهربائي لعينات من تحضيرة فيروس موزاييك التبغ المنقاة ظهور حزمة بروتينية وزنها ألجزيئي 18 كيلودالتون تمثل بروتينات الغلاف (مشار إليها بسهم في العمود 2) ، وهذا يتفق مع [15] كما ظهرت نفس الحزمة في العينات الحاوية على بروتين كلي مستخلص من نبات طماطة مصاب بالفيروس (العمود 3) وفي مستخلص نبات مصاب أزيلت منه صبغة الكلوروفيل (العمود 5) ، وفي المستخلص الخام لنبات مصاب بفيروس موزاييك التبغ . لم يلاحظ ظهور هذه الحزمة في تحضيرة البروتينات المستخلصة من نبات سليم (العمود 4) أو مستخلص النبات السليم المزال منه الكلوروفيل (العمود 6) أو مستخلص النبات الخام (العمود 8) شكل(4 B) .

إن هذه النتائج تشير إلى إمكانية استخدام تقنية الترحيل الكهربائي على هلام متعدد الاكريلامايد بوجود SDS كطريقة كفوءة وسريعة وسهلة في تشخيص الفيروسات النباتية خصوصا وأنها أظهرت تطابقا واضحا مع نتائج الصفات البايولوجية والمصلية للفيروسات الثلاثة.

وقد استعملت تقنية SDS-PAGE من قبل الكثير من الباحثين في تشخيص فيروسي موزاييك الخيار وموزاييك التبغ في العالم . إذ استعملت للكشف عن فيروس موزاييك الخيار على نبات *Dianthus barbatus* في الهند عن طريق تقدير الوزن الجزيئي لبروتينات الغلاف والتي بلغت بحدود 26 كيلودالتون [22] . كما أمكن تحديد سلالتين لفيروس موزاييك الخيار من خلال الغلاف البروتيني في بلغاريا حيث حددت السلالة II (Subgroup II) معزولة من الطماطة والفلفل والسلالة I من الخيار والطماطة والفلفل والفاصوليا والقرع والتبغ [23] ، وتمكن [15] من تشخيص فيروس موزاييك التبغ المعزول من الطماطة بواسطة تحليله على هلام SDS-PAGE في الهند حيث بلغ الوزن الجزيئي للغلاف البروتيني 18 كيلو دالتون اثبتوا من خلالها أن الفيروس المدروس هو سلالة من فيروس موزاييك التبغ وأعطوه اسم TMV(Tom-K). وتمكنت صبر [6] من تحديد أربع سلالات لفيروس CMV باستخدام SDS-PAGE في العراق . وتشير النتائج التي تم التوصل إليها في هذه الدراسة إلى إمكانية استعمال تقنية الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريلامايد في الكشف عن الفيروسات .



شكل (4) :(A) نمط الترحيل الكهربائي لعينات فيروس موزاييك الخيار CMV على هلام متعدد الاكريلامايد تركيز 10% بوجود 0.1 % SDS ، وتشير الأسهم البيضاء الصغيرة إلى الحزمة البروتينية الرئيسة الخاصة بالفيروس والظاهرة في معاملات النبات المصاب فقط.

(1) البروتينات القياسية المستعملة في تقدير الوزن الجزيئي للبروتين . (2) عينة الفيروس CMV نقي جزئيا (مقارنة) .
(3) بروتين كلي مستخلص من نبات مصاب بالفيروس. (4) بروتين كلي مستخلص من نبات سليم (مقارنة) .
(5) مستخلص نبات مصاب بالفيروس خالي من الكلوروفيل . (6) مستخلص نبات سليم خالي من الكلوروفيل (مقارنة) .
(7) مستخلص عصارة نبات مصاب بالفيروس حاوي على كلوروفيل (8) مستخلص عصارة نبات سليم حاوي على كلوروفيل (مقارنة)

(B) نمط الترحيل الكهربائي لعينات فيروس موزاييك التبغ TMV على هلام متعدد الاكريلامايد تركيز 10% بوجود 0.1 % SDS ، وتشير الأسهم البيضاء الصغيرة إلى الحزمة البروتينية الرئيسة الخاصة بالفيروس والظاهرة في معاملات النبات المصاب فقط .

(1) البروتينات القياسية المستعملة في تقدير الوزن الجزيئي للبروتين . (2) عينة فيروس TMV نقي جزئيا (مقارنة) .
(3) بروتين كلي مستخلص من نبات مصاب بالفيروس . (4) بروتين كلي مستخلص من نبات سليم (مقارنة) .
(5) مستخلص نبات مصاب بالفيروس خالي من الكلوروفيل . (6) مستخلص نبات سليم خالي من الكلوروفيل (مقارنة) .
(7) مستخلص عصارة نبات مصاب بالفيروس حاوي على كلوروفيل . (8) مستخلص عصارة نبات سليم حاوي على كلوروفيل (مقارنة)

المصادر

1. Ghaly, A.E., F. Alkoaik, A. Snow, and R. Singh. (2006). Effective thermophilic composting of crop residues for Inactivation of *Tobacco mosaic virus*. American Journal of Biochemistry and Biotechnology, 2: 111-118.

2. Hull, R. (2002). Matthews' Plant Virology. Fourth edition. Academic Press, London, UK. 1001 pp.

3. Verma, N., B.K. Mahinghara, R. Ram, and A.A. Zaidi. (2006). Coat protein sequence shows that *Cucumber mosaic virus* isolate from geraniums (*Pelargonium* spp.) belongs to subgroup II. Journal of Biological Sciences, 31: 47-54.

4. Menzel, W., W. Jelkmann, and E. Maiss. (2002). Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with co amplification of plant mRNA as internal control. Journal of Virological Methods, 99: 81–92.

5. Jung, H.w., W.S. Yun, Y.I. Hahm, and K.H. Kim. (2002). Characterization of *Tobacco mosaic virus* isolated from Potato showing yellow leaf mosaic and stunting symptoms in Korea. Plant Disease, 86: 112-117.

6. صبر، ليلى جبار. (2005). تحديد أربع سلالات لفيروس موزاييك الخيار مصليا وبايولوجيا وعلاقتها بالامراضية. رسالة ماجستير كلية الزراعة جامعة بغداد. 99 صفحة.

7. Fattouch, S., H. Acheche, S. M'hirsi, M. Marrakchi, and N. Marzouki. (2005). Detection and characterization of two strains of *Grapevine fan leaf nepovirus* in Tunisia. EPPO Bulletin, 35: 265-270.

8. Noordam, D. (1973). Identification of plant viruses: Methods and experiment-center for Agricultural publishing and Documentation Wageningen. 207pp.

9. Gooding, G.V. and T.T. Herbert. (1967). A simple technique for purification of *Tobacco mosaic virus* in large quantities. Phytopathology, 57: 1285.

10. Scott, H.A. (1963). Purification of *Cucumber mosaic virus*. Virology, 20: 103-106.

11. Da Rocha, A., S.T. Ohki, and C. Hiruki. (1986). Detection of viruses and mycoplasma like organisms in situ by indirect immunofluorescence microscopy. Phytopathology, 76: 864-868.

12. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.

13. Cardin, L., A. Poupet and J.P. Onesto. (2003). First report of *Cucumber mosaic virus* in *Tencrium fruticans*. Plant Disease, 87:200.

14. Palukaitis, P. (2003). *Cucumber mosaic virus*. Description of Plant Viruses. PP.23.

15. Cherian, S., J. Joseph, V. Muniyappa and H.S. Savithri. (1999). Characterization of *Tobacco mosaic virus* isolated from tomato in India. Current Science-Bangalore pp-6.

16. Jockush, H. and C. Wiegand. (2003). Misfolded plant virus proteins: elicitors and targets of ubiquitylation. FEBS Letters, 545: 229-232.

17. Stange, C., J.T. Matus, A. Elorza, and P. Arce-Johnson. (2004). Identification and characterization of novel *Tobacco mosaic virus* resistance N gene homologue in *Nicotiana tabacum* plants. Functional Plant Biology, 31: 149-158.

18. Kostova, D., T. Stefanos, Y. Angela, L. Vittoria, and V. Anna-Mariag. (2006). New cucumovirus on beans in Bulgarian attempt for characterization. Journal of Culture Collections, 5: 94-101.

19. Srivastava, K.M., S.K. Raj, and B.P. Singh. (1992). Properties of a *Cucumber mosaic virus* strain naturally infecting chrysanthemum in India. Plant Disease, 76: 474-477.

20. Kim, H.J., S.C. Gug, and K.C. Jang. (2002). Characterization of *Cucumber mosaic virus* subgroup II isolated from paprika (*Capsicum annuum* Var. *grossum*) in Korea. Plant Pathology Journal, 18: 6-11.

21. Raj, S.K., Aminuddin, B.P. Singh, and M. Pal. (1997). Characterization of a *Cucumber mosaic virus* isolate causing leaf crinkle and severe mosaic of *amaranthus* in India. Canadian Journal of Plant Pathology, 19: 97-100.

22. Raj, S.K., Aminuddin, K.M. Srivastava, and B.P. Singh. (1993). Natural infection of *Cucumber mosaic virus* on *Dianthus barbatus* in India. Plant Pathology, 42: 811-813.

23. Mavrodieva, V.A., D.J. Barbara, and N.J. Spence. (1998). Subgroup determination of Bulgarian isolates of *Cucumber mosaic virus* and the presence of satellite RNAs. Plant Disease, 82: 960.