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

مصطفى علي عذاب ورقيب عاكف العاني

قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة بغداد، العراق، البريد الالكتروني: maa_adhab@hotmail.com

الملخص

عذاب، مصطفى علي ورقيب عاكف العاني. 2010. تقويم كفاءة الترحيل الكهربائي على هلام الاكريلامايد وتقنية الأشرطة المناعية في الكشف عن فيروسي موزاييك التبغ وموزاييك الخيار في العراق. مجلة وقاية النبات العربية، 28: 181-189.

أجريت هذه الدراسة بهدف تقويم كفاءة تقنيتي الترحيل الكهربائي على هلام الأكريلامايد 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 الأكريلامايد 10% مع 0.1% SDS لعينة من فيروس موزاييك الخيار حزمتين بروتينيتين وزنهما الجزيئي 24 و 26 كيلو دالتون. وظهرت الحزم نفسها 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. وأظهر 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 تفاعلاً موجباً مع مستخلص نباتات التبغ والطماطم/البندورة المصابة بفيروس موزاييك التبغ. ولم يظهر مستخلص النباتات السليمة لهذه الأنواع تفاعلاً موجباً مع هذه الأشرطة. وكانت النتائج متطابقة مع نتائج دراسة الأعراض على النباتات المشخصة عند إصابتها بهذين الفيروسين.

كلمات مفتاحية: أشرطة مناعية، ترحيل كهربائي، فيروس موزاييك التبغ، فيروس موزاييك الخيار، طرق كشف.

المقدمة

إن من أهم المعايير في دراسة الفيروسات، إيجاد طريقة دقيقة في تشخيصها. وقد اعتمدت طرائق عديدة لتشخيص الفيروسات كان أولها دراسة الأعراض على النباتات الكاشفة وتعدّ من الطرائق الأساسية والمعتمدة في تشخيص الفيروسات والكشف عن سلالاتها (8، 11، 29).

اعتمدت الاختبارات المصلية في تشخيص الفيروسات، ومن أهم هذه الاختبارات اختبار إليزا ELISA (5) وهو ما زال شائعاً حتى الآن. وقد خضعت تقنية إليزا للعديد من التحويرات كان آخرها تجهيز التقنية بشكل أشرطة مناعية (21، 25) وهي على درجة عالية من التخصص والدقة.

استعملت حديثاً تقنية PCR وهي من الطرائق السريعة والموثوق بها والمعتمدة والحساسة في الكشف عن الفيروسات النباتية مقارنة مع اختباري اليزا والنباتات الكاشفة (18)، وأضحى بالامكان بواسطتها الكشف عن تركيزات منخفضة جداً من الفيروسات في النسيج النباتي. وما زالت من أكثر التقنيات اعتماداً ودقة في الكشف عن الفيروسات وتحديد سلالاتها (13، 29). وقد اعتمدت معظم البحوث في هذا المجال على تسلسل القواعد النتروجينية في الحامض النووي المسؤولة عن تصنيع الغلاف البروتيني للفيروس (CP). من هنا جاءت فكرة اعتماد الوزن الجزيئي وعدد البروتينات المكونة للغلاف البروتيني للفيروس مباشرة بتحليله على هلام متعدد الأكريلامايد بوجود دوديسيل سلفات الصوديوم (SDS) بتقنية الترحيل الكهربائي كأحد المعايير المهمة في تشخيصه (1، 7). تهدف هذه الدراسة إلى محاولة تقويم كفاءة تقنيتين في تشخيص الفيروسات هما: الوزن الجزيئي وعدد بروتينات الغلاف البروتيني الفيروسي بتقنية الترحيل الكهربائي على هلام متعدد الأكريلامايد بوجود SDS، والثانية اعتماد الأشرطة المناعية كأحد الاختبارات المصلية في هذا المجال ومقارنتهما بالطريقة الحيوية/البيولوجية وهي استعمال النباتات الكاشفة في التشخيص، واختبر فيروسان هما فيروس موزاييك الخيار (CMV، جنس *Cucumovirus*، عائلة *Bromoviridae*) وفيروس موزاييك التبغ (TMV، جنس *Tobamovirus*) لهذا الغرض.

مواد البحث وطرائقه

تحضير نباتات الاختبار

ملئت أصص بلاستيكية ذات أبعاد 22×20 سم، معقمة بواسطة هيبوكلورايت الصوديوم 30%، بخليط من تربة مزيجية وبيتموس بنسبة 1:1 معقمة بالمؤصدة/الأوتوكلاف عند 121 °س 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 أسبوعياً بسماد متعادل (20، 20، NPK 20) وفق التوصية السمادية للشركة المجهزة 200 غ/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 200 غ/ليتر) المجهز من شركة Bayer حسب التوصية 1–1.25 مل/لتر ماء. وبمبيد الحلم نيوتكس سوبر 0.5 مل/لتر ماء لضمان إبادة الحشرات والحلم.

جدول 1. النباتات الدالة المستخدمة في إجراء الاختبار الحيوي لفيروسي موزاييك الخيار CMV وموزاييك التبغTMV

Table 1. Indicator plants used in biological assay for *Cucumber mosaic virus* and *Tobacco mosaic virus*

Scientific name الاسم العلمي	Indicator plant	اسم النبات الكاشف
Vigna unguiculata var Blackeye L.	Cowpea	اللوبيا
Cucumis sativus L.	Cucumber	الخيار
Chenopodium amaranticolor Coste & Reyn	Goose foot	الزربيح
Lycopersicon esculentum Mill.	Tomato	الطماطم/ البندورة
Cucumis melo L.	Melon	البطيخ
Cucurbita maxima	Winter squash	القرع
Cucurbita pepo	Zucchini	الكوسا/ الشجر
Datura metal L.	Jimson weed	الداتورة
Nicotiana tabacum var Turkish L.	Tobacco	التبغ
Nicotiana tabacum var *Xanthi* L.	Tobacco	التبغ
Nicotiana tabacum var *Xanthi* NN	Tobacco	التبغ
Cucurbita citrullus	Water melon	البطيخ الأحمر/ الرقي

تم الحصول على بذور اللوبياء والخيار والبطيخ الأحمر/الرقي والكوسا/الشجر من الهيئة العامة لفحص وتصديق البذور، وباقي البذور من السوق المحلية.

Cowpea, cucumber, watermelon and zucchini seeds were obtained from the General Authority of Seed Certification. Other seeds were obtained from the local market.

طرائق التشخيص

1. **النباتات الكاشفة وتحضير اللقاح** – جمعت عينات من أوراق نبات طماطم/بندورة تظهر عليها أعراض أوراق شريطية ونباتات تبغ تظهر عليها أعراض موزاييك، ومن أوراق نبات خيار تظهر عليها أعراض موزاييك، من حقول متفرقة في منطقة بغداد في الموسم الزراعي 2007، وحفظت النماذج تحت التجميد لحين الاستعمال. سحق 1غ من الأوراق من كل 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 (pH=7] مبرد (20). رشح المستخلص من خلال طبقتين من قماش الململ المعقم، ومسحت بالراشح أوراق نباتات الاختبار (جدول 1) بوجود الكاربوراندم 600 مش. رشت النباتات المعداة بالماء المقطر بعد 1–2 دقيقة من الإعداء ووضعت في البيت الزجاجي واستمرت متابعة النباتات لحين ظهور الأعراض.

2. **اختبار الأشرطة المناعية** – أجري 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 غ من العينة المراد فحصها في الكيس الحاوي على محلول الاستخلاص المنظم وسحقت جيداً بوساطة 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.

3. **الترحيل الكهربائي**

أ. تحضير العينات البروتينية

فيروس موزاييك التبغ – سحق 100 غ من أوراق تبغ مصابة بفيروس موزاييك التبغ مع محلول منظم الاستخلاص (Na_2HPO_4 + KH_2PO_4) بتركيز 0.5 جزيء وبدرجة حموضة متعادلة (pH=7)، يحتوي 1% ميركبتوايثانول بنسبة (1 : 1) (وزن : حجم) في خلاط/مازج كهربائي مدة خمس دقائق. رشح المستخلص عبر طبقتين من قماش الململ. أضيف للراشح n-Butanol بنسبة 8% مع التحريك لمدة ساعة عند 4°س. اخضع المستخلص لعملية طرد مركزي بسرعة 8000 دورة/دقيقة مدة 30 دقيقة في جهاز طرد مركزي مبرد عند 4°س. أضيف للراشح PEG (Polyethylene Glycol) ذو وزن جزيئي 6000 دالتون بنسبة 4% مع التحريك حتى الذوبان وترك المزيج لمدة ساعة على 4°س. جمع الراسب الفيروسي بعملية طرد مركزي بسرعة 8000 دورة/دقيقة لمدة 30 دقيقة. ذوب

الراسب في محلول منظم فوسفاتي متعادل تركيزه 0.01 جزيىء بنسبة 2%. ترك المستخلص ثلاث ساعات في المختبر وأخضع لعملية طرد مركزي بسرعة 8000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة. بذلك تم الحصول على فيروس نقي جزئياً (9).

فيروس موزاييك الخيار – سحق 100 غ من أوراق نبات خيار مصابة بفيروس موزاييك الخيار مع محلول منظم فوسفاتي مبرد [0.5 جزيىء فوسفات الصوديوم، 0.2% حامض الأسكوربيك، 1% DIECA ودرجة حموضة 8، بنسبة 3:1 (وزن : حجم)] في خلاط/مازج كهربائي. مُرّر المستخلص خلال طبقتين من قماش الململ ثم خلال أوراق ترشيح. أضيف للراشح الكلوروفورم بنسبة (1 : 1) مع التحريك لمدة ساعة كاملة عند 4 °س. اجريت للمستخلص عملية طرد مركزي بسرعة 5000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة عند 4°س في جهاز طرد مركزي مبرد. أضيف إلى الطبقة المائية الطافية PEG وزنه الجزيئي 6000 دالتون بنسبة 10% وكلوريد الصوديوم0.1 جزيىء مع التحريك عند ة 4 °س مدة 24 ساعة. اخضع المحلول لعملية طرد مركزي بسرعة 12000 دورة/دقيقة مدة 15 دقيقة عند 4 °س. ذوب الراسب في محلول البوريت 2% بدرجة حموضة 8، ثم اخضع المعلق الفيروسي لعملية طرد مركزي/انتباذ على سرعة 5000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق (26).

ب. استخلاص البروتين الكلي من النبات

سحق 50 غ 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% ميركابتوإيثانول في خلاط/مازج كهربائي. رشح المستخلص خلال ورقة ترشيح وأضيف للراشح 51.6% من كبريتات الأمونيوم مع التحريك حتى الذوبان. ترك المحلول مدة ساعتين عند 4 °س 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 مساوٍ 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 (6). وللمقارنة حضرت عينات من النباتات المصابة والسليمة أزيل منها الكلوروفيل بإمرار المستخلص عبر طبقة من الكربون المنشط أو بوساطة المعاملة بالأسيتون بنسبة 1 : 1 (حجم : حجم) من المستخلص. ركزت العينات بعملية الإنتشار الغشائي بواسطة PEG وزنه الجزيئي 6000 دالتون.

جـ. طريقة الترحيل الكهربائي

تحضير العينات – أضيف لكل 100 ميكروليتر من نموذج البروتين المراد تحليله 2 ميكروليتر β-mercaptoethanol (2%)، 10 ميكروليتر محلول SDS 20% (2%)، 15 ميكروليتر جليسرول (15%). سخنت العينات عند 100 °س مدة دقيقتين ثم بردت مباشرة ووضعت في حفر الهلام بمعدل 25 ميكروليتر لكل عينة. عوملت بروتينات قياسية (Bovine Lung، Aprotinin 6500 دالتون؛ Bovine Milk، α–Lactalbumin 14200 دالتون؛ Soybean، Trypsin Inhibitor 20000 دالتون؛ Bovine Pancreas، Trypsinogen24000 دالتون؛ Bovine Erythrocytes، Carbonic Anhydrase 29000 دالتون؛ Rabbit Muscle، Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase 39000 دالتون؛ Chicken Egg، Ovalbumin 45000 دالتون؛ Bovine Serum Albumin 66000 دالتون) بالطريقة نفسها واستعملت بمعدل 10 ميكروليترات لكل حفرة.

تحضير الهلام – حضر الهلام المكون من طبقتين من الأكريلامايد، 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 و 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 10 مل منه بخلط 1.25 مل محلول منظم ترس حامض الهيدروكلوريك ذي الأس الهيدروجيني 6.8 و 0.1 مل SDS 10% و 1.66 مل Acrylamide 30%– Bis-Acrylamide 0.8% و 0.05 مل TEMED و 0.1 Ammonium persulfate و 6.8 مل ماء مقطر). سكب هلام الفصل بين لوحين من الزجاج تفصلهما مساطر بلاستيكية بسمك 1.4 مم. 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 مليمولار محلول منظم 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 (0.55 غ من صبغة Coomassie Brilliant Blue R250 في خليط من 100 مل ميثانول و 20 مل حامض الخليك و 100 مل ماء مقطر) مدة 30 دقيقة. ثم وضع في محلول إزالة الصبغة (7.5% حامض الخليك و5% ميثانول) مدة 24 ساعة مع مراعاة تبديل المحلول من وقت لآخر لإظهار الحزم البروتينية (16).

النتائج والمناقشة

دراسة الأعراض على النباتات الدالة

فيروس موزاييك الخيار – استجابت النباتات الدالة 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 الإعداء، تطورت إلى موزاييك على جميع أوراق النبات صاحبه ظهور تقزم وتشوه أوراق النبات (شكل1–A). وهذه الأعراض مماثلة لما ذكره (1، 2). وظهرت على أوراق نباتات اللوبيا صنف Black eye المعداة، بقع موضعية شاحبة مختلفة الأحجام بعد خمسة أيام من الإعداء، لم تتطور إلى إصابة جهازية (شكل 1–C)، وهذا يتفق مع ما وصفه صبر (1) و Cardin وآخرون (3)، وعلى أوراق نباتات التبغ صنف Xanthi المعداة بقع موضعية صفراء صغيرة على الأوراق (شكل 1–B)، وهذا يتفق مع ما ذكره Palukaitis و Garcia-Arenal (22) ولم تشر باقي المصادر إلى إصابة هذا الصنف بالفيروس موضعياً وإنما أشارت إلى إصابته جهازياً بالفيروس وظهور أعراض موزاييك (1، 3). 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–E)، وهذا يتفق مع دراسات أخرى حول الموضوع نفسه (1، 30). استجابت نباتات القرع (اسكله) بظهور أعراض موزاييك، ونباتات الشجر (الكوسة) بظهور أعراض موزاييك طفيف رافقها أعراض تنخر العروق وهذا يتفق مع ما ذكره سابقاً (22). وظهرت على أوراق نباتات الداتوره المعداة بقع موضعية تطورت فيما بعد إلى تبرقش اصفر (شكل 1–D)، وهذا يتفق مع ما ذكره صبر (1)، وعلى نباتات البندورة أعراض شفافية العروق وتحول الأوراق إلى شكل شريطي بعد ثلاثة أسابيع من الإعداء (شكل 1–F)، وهذا يتفق مع ما ذكره صبر (1)، وعلى نباتات البطيخ بظهور أعراض تبرقش وموزاييك (شكل 1–G). في حين لم تظهر أعراض على نباتات البطيخ الأحمر/الرقي المعداة.

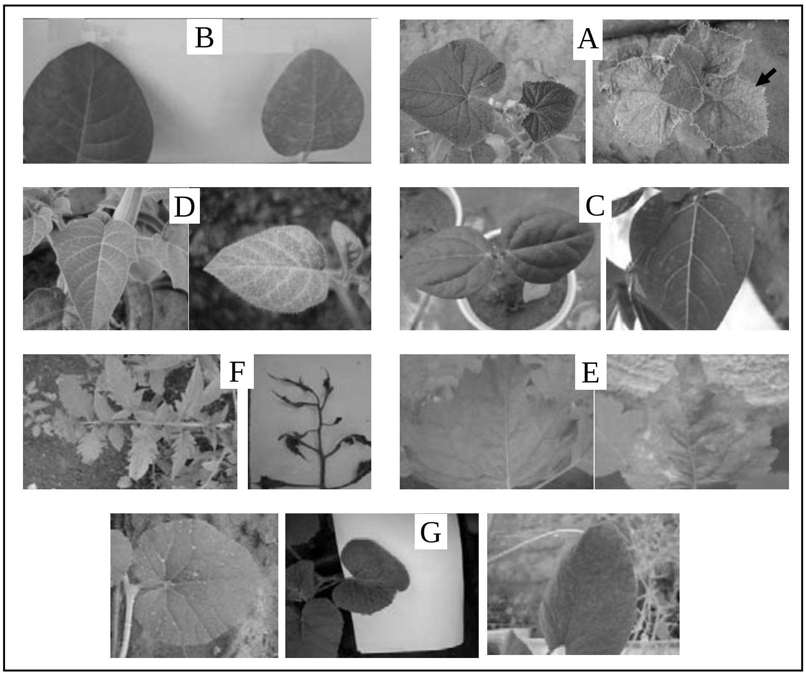
فيروس موزاييك التبغ – استجابت نباتات التبغ صنف *Turkish* المعداة بمستخلص أوراق نبات تبغ مصابة بالفيروس بظهور أعراض شفافية العروق على الأوراق المعداة بعد 3–4 أيام من الإعداء تطورت بعدها إلى موزاييك مصحوبة بانتفاخات خضراء وتشوه طفيف للورقة (شكل 2–A)، وهذا يتفق مع دراسات سابقة (4، 12، 13)، وظهرت على أوراق نباتات التبغ صنف Xanthi NN المعداة بقع موضعية متنخرة NLL اتسع حجمها بمرور الوقت (شكل 2–B)، وهذا يتفق مع دراسات سابقة (12، 13، 28) تحولت إلى إصابة جهازية عند ارتفاع درجة الحرارة. وظهرت على نباتات الطماطم/البندورة 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 ما ذكر في دراسات سابقة (4، 13).

إن ما تم التوصل إليه من دراسة للأعراض على النباتات الدالة يوحي إلى أن الفيروس المسبب لأعراض الأوراق الشريطية وتشوهها على الطماطم/البندورة هو فيروس موزاييك التبغ، وان الفيروس المسبب لأعراض موزاييك وتشوه أوراق نباتات الخيار هو فيروس موزاييك الخيار.

لقد استخدمت النباتات الدالة 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 (2، 8، 29).

اختبار الأشرطة المناعية Immunostrips

فيروس موزاييك الخيار – أظهرت نتائج الاختبار المصلي بوساطة 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 تفاعلاً موجباً مع الـ FlashKits 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.



شكل 1. نتائج إعداء النباتات الدالة 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 على أوراق نبات التبغ صنف Xanthi (اليمين)، أوراق سليمة (اليسار)، (C) بقع موضعية شاحبة (سهم) على الأوراق الأولية لنبات لوبياء *Vigna unguiculata* صنف Blackeye بعد 5 أيام من الإعداء (اليمين). نبات سليم (اليسار)، (D) أعراض تبرقش على الأوراق الحديثة لنبات الداتورا *Datura metel* (اليمين)، نبات سليم (اليسار)، (E) بقع موضعية شاحبة على أوراق نبات الزربيح *Chenopodium amaranticolor* (سهم) (اليمين)، ورقة سليمة (اليسار)، (F) أعراض الورقة الشريطية على نبات الطماطم/البندورة بعد مرور ثلاثة أسابيع من العدوى (اليمين)، نبات طماطم/بندورة سليم (اليسار)، (G) أعراض تبرقش على نبات البطيخ (اليمين) أعراض موزاييك (الوسط) ورقة سليمة (اليسار).

Figure 1. Results of inoculation with a cucumber leaf extract infected with CMV (A) Mosaic and leaf deformation symptoms on *Cucumis stivus*, Beta-alfa variety (right), healthy plant (left), (B) Chlorotic local lesions on *N. tabacum* cv. *Xanthi* leaves (right), healthy plant (left), (C) Chlorotic local lesions (arrow) on primary leaves of *Vigna unguiculata*, cv Black eye, 5 days after inoculation (right), healthy plant (left), (D) Mottle symptoms on young *Datura metel* leaves (right), healthy plant (left), (E) Chlorotic local lesions on *Chenopodium amaranticolor* leaves (arrow) (right), healthy plant (left), (F) Narrow leaf symptoms on tomato, 3 weeks after inoculation (right), healthy plant (left). (G) Mottle symptom on melon (right), mosaic symptom (mid), healthy leaf (left).

فيروس موزاييك التبغ – أظهرت نتائج الاختبار المصلي بوساطة الأشرطة احتواء نباتات التبغ *Nicotiana tabaccum* var *Turkish* والطماطم/البندورة *Lycopersicon esculentum* Mill. المختبرة على فيروس موزاييك التبغ، إذ أظهرت هذه النباتات تفاعلاً موجباً مع الـــ FlashKits 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 الـــ Flashkits في التشخيص، مما يشير إلى إمكانية استعمال هذا الاختبار في تشخيص العزلات العراقية من فيروسي موزاييك الخيار وموزاييك التبغ بكفاءة ودقة وسرعة عالية.

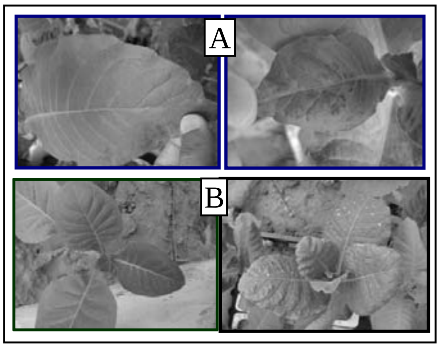
لقد استعملت الطرائق المصلية كثيراً في الكشف عن الفيروسات وخصوصا تقنية اليزا، فقد بدأ استعمالها عام 1977 (5)، ولا زالت تستعمل لحد الآن إذ استعملت لتشخيص فيروسي موزاييك التبغ وموزاييك الخيار (2، 8، 21، 29). وتعدّ من الطرائق الدقيقة في التشخيص.

الترحيل الكهربائي لبروتينات الغلاف الفيروسي على هلام متعدد الاكريلامايد بوجود SDS

أظهر نمط الترحيل الكهربائي لنماذج مأخوذة من نباتات خيار مصابة بـــ CMV وأخرى من نباتات سليمة على هلام الأكريلامايد 10% والحاوي على 0.1% SDS، وجود حزمة بروتينية رئيسية مكونة من حزمتين بروتينيتين في العمود 2 الحاوي على عينة الفيروس النقي،

تمثل بروتين الغلاف الفيروسي قدر وزنها الجزيئي بـــ24 و 26 كيلودالتون تقريباً على التوالي (شكل 4-A).

ظهرت أيضاً حزمتان بروتينيتان (مشار إليهما بسهم) في نمط الترحيل الحاوي على البروتين الكلي المستخلص من نبات خيار مصاب (عمود 3)، وفي النمط الحاوي على مستخلص نبات مصاب أزيل منه الكلوروفيل (عمود 5)، في المستوى نفسه 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 (عمود 8) أو نبات سليم خال من الكلوروفيل (عمود 6) أو بروتينات مستخلصة من نبات سليم (عمود 4) وظهرت الحزمة نفسها في مستخلص خام لنبات مصاب (عمود 7) (شكل 4-A).

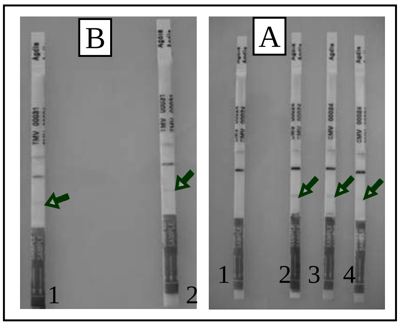


شكل 2. (A) أعراض موزاييك على الأوراق الحديثة لنبات التبغ صنف Turkish المعداة بمستخلص من بقعة موضعية متنخرة مأخوذة من نبات تبغ صنف Xanthi NN (اليمين)، وتظهر أوراق النبات نفسه سليمة للمقارنة (اليسار). (B) أعراض البقع الموضعية المتنخرة على أوراق نبات التبغ صنف Xanthi NN المعداة بمستخلص NLL من بقعة موضعية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

Figure 2. (A) Mosaic symptoms on the young leaves of *N. tabacum* cv. Turkish inoculated with an extract of single lesion from *N. tabacum* Xanthi NN (right), healthy leaves (left). (B) Necrotic local lesions on *N. tabacum* cv. Xanthi NN leaves inoculated with an extract from single lesion from *N. tabacum* Xanthi NN (right), healthy leaves (left).

وتشير المصادر الحديثة إلى أن الغلاف البروتيني لفيروس موزاييك الخيار مكون من جزيئتين بروتينيتين أوزانها الجزيئية 22 و 28 كيلودالتون (15). وتشير مصادر أخرى إلى أن الوزن الجزيئي للغلاف البروتيني لفيروس موزاييك الخيار يبلغ 24.5 كيلودالتون (10، 11، 19، 27) أو 26 كيلودالتون (14، 23) حسب سلالات الفيروس.

أوضحت نتائج الترحيل الكهربائي لعينات من تحضيرة فيروس موزاييك التبغ المنقاة ظهور حزمة بروتينية وزنها الجزيئي 18 كيلودالتون تمثل بروتينات الغلاف (مشار إليها بسهم في العمود 2)، وهذا يتفق مع ما ذكره Cherian وآخرون (4) كما ظهرت الحزمة نفسها في العينات الحاوية على بروتين كلي مستخلص من نبات طماطم/بندورة مصاب بالفيروس (عمود 3) وفي مستخلص نبات مصاب أزيلت منه صبغة الكلوروفيل (عمود 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 (عمود 6) أو مستخلص النبات الخام (عمود 8) (شكل 4-B).



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 طماطم/بندورة مصاب بالفيروس (2). (يشير السهم إلى منطقة حدوث التفاعل بين الفيروس والمصل المضاد).

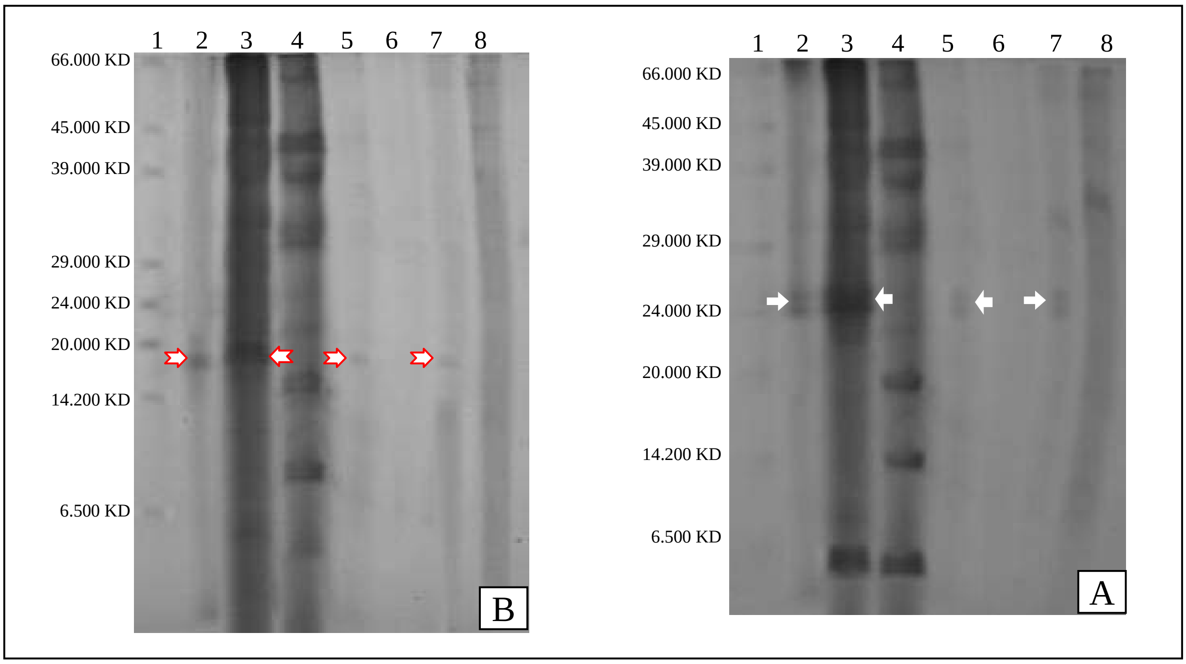
Figure 3. (A) Reaction of CMV antiserum: with healthy cucumber plant extract as control (1), with extract from virus infected cucumber plant (2), with extract from melon infected plant (3), and with extract from winter squash infected plant (4). (B) Reaction of TMV antiserum: with extract from tobacco plant infected with TMV (1), and with extract from tomato plant infected with TMV. (Arrows referred to reaction line between the virus and antiserum)

إن هذه النتائج تشير إلى إمكانية استخدام تقنية الترحيل الكهربائي على هلام متعدد الأكريلامايد بوجود SDS كطريقة كفوءة وسريعة وسهلة في تشخيص الفيروسات النباتية خصوصاً وأنها أظهرت تطابقاً واضحاً مع نتائج الصفات الحياتية،البيولوجية 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 (24). كما أمكن تحديد سلالتين لفيروس موزاييك الخيار من خلال الغلاف البروتيني في بلغاريا حيث حددت السلالة الفرعية II (Subgroup II) معزولة من الطماطم/البندورة والفلفل والسلالة I من الخيار والطماطم/البندورة والفلفل/الفليفلة والفاصولياء والقرع والتبغ (17)، وتمكن Cherian وآخرون (4) من تشخيص فيروس موزاييك التبغ المعزول من الطماطم/البندورة 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 (1) 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 الأكريلامايد 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 الرئيسية الخاصة بالفيروس والظاهرة في معاملات النبات المصاب فقط. (1) البروتينات القياسية المستعملة في تقدير الوزن الجزيئي للبروتين. (2) عينة الفيروس CMV نقي جزئياً (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 الأكريلامايد تركيز 10% بوجود 0.1% SDS، وتشير الأسهم البيضاء الصغيرة إلى الحزمة البروتينية الرئيسية الخاصة بالفيروس والظاهرة في معاملات النبات المصاب فقط. (1) البروتينات القياسية المستعملة في تقدير الوزن الجزيئي للبروتين. (2) عينة فيروس TMV نقي جزئياً (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).

Figure 4. (A) Profile of Slab SDS-gel electrophoresis for samples of CMV on 10% polyacrylamide gel with 0.1% SDS. Arrows referred to principle protein band of the virus observed in samples from infected plants only. (1) Protein markers of known molecular weight used to determine the MW of virus proteins. (2) Sample of partially purified CMV (control). (3) Total proteins extracted from virus infected plants. (4) Total proteins from healthy plant (control). (5) Extract from virus infected plant without chlorophyll. (6) Extract from healthy plant without chlorophyll (control). (7) Crude extract from virus infected plant. (8) Crude extract from healthy plant (control). (B) Profile of Slab SDS-gel electrophoresis for samples of TMV on 10% polyacrylamide gel with 0.1% SDS. Arrows referred to principle protein band of the virus observed in samples from infected plants only. (1) Protein markers of known molecular weight used to determine the MW of virus proteins. (2) Sample of partially purified CMV (control). (3) Total proteins extracted from virus infected plants. (4) Total proteins from healthy plant (control). (5) Extract from virus infected plant without chlorophyll. (6) Extract from healthy plant without chlorophyll (control). (7) Crude extract from virus infected plant. (8) Crude extract from healthy plant (control).

Abstract

Adhab, M.A. and R.A. Alani. 2010. Evaluation of SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Immunostrip Technique for Detection of *Tobacco mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus* in Iraq. Arab Journal of Plant Protection, 28: 181-189.

This study was carried out to evaluate the efficiency of electrophoresis on SDS-poly acrylamide slab 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 indicator 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 slab 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 extracts with or without chlorophyll were analysed. 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 plant extracts. These results were similar to those obtained from indicator plants for the two viruses.

Keywords: Immunostrips, electrophoresis , TMV , CMV , detection methods

Corresponding author: ***Mustafa Ali Adhab, Plant Protection Department, College of Agriculture, University of Bagdad, Baghdad, Iraq, Email: maa_adhab@hotmail.com***

References

المراجع

1. **صبر، ليلى جبار.** 2005. تحديد أربع سلالات لفيروس موزاييك الخيار مصليا وبايولوجيا وعلاقتها بالامراضية. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة بغداد، العراق. 99 صفحة.
2. **Bhat, A.I., Y.R. Sarma, P. Sreenivasulu and R.P. Pant.** 2004. Occurrence and identification of a Cucumber mosaic virus isolate infecting Indian long pepper (*Piper longum*). Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences, 26: 279-284.
3. **Cardin, L., A. Poupet and J.P. Onesto.** 2003. First report of Cucumber mosaic virus in *Tencrium fruticans*. Plant Disease, 87:200.
4. **Cherian, S., J. Joseph, V. Muniyappa and H.S. Savithri.** 1999. Characterization of Tobacco mosaic virus isolated from tomato in India. Current Science (Bangalore): 76: 1384-1388.
5. **Clark, M.F. and A.N. Adams**. 1977. Characteristics of the Microplate method of enzyme- linked immunosorbent assay for the detection of Plant viruses. Journal of General Virology, 34: 475-483.
6. **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.
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. **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.
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. **Haq, Q.M.R., B.P. Singh and K.M. Srivostava.** 1996. Biological, serological and molecular characterization of a Cucumber mosaic virus isolate from India. Plant Pathology, 45: 823-828.
11. **Hull, R.** 2002. Matthews' Plant Virology. Fourth edition. Academic Press, London, UK. 1001 pp.
12. **Jockush, H. and C. Wiegand.** 2003. Misfolded plant virus proteins: elicitors and targets of ubiquitylation. FEBS Letters, 545: 229-232.
13. **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.
14. **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.
15. **Kostova, D., T. Stefanos, Y. Angela, L. Vittoria and V. Anna-Mariag.** 2006. New cucumovirus on beans in Bulgaria - an attempt for characterization. Journal of Culture Collections, 5: 94-101.
16. **Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.
17. **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.
18. **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.
19. **Nasu, Y., K. Akira, H. Shun and E. Yoshia.** 1996. *Cry*, the resistance locus of cowpea to Cucumber mosaic virus strain Y. Phytopathology, 86: 946-951.

20. **Noordam, D.** 1973. Identification of plant viruses: Methods and experiment. Center for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen. 207pp.
21. **O'keefe, D.C., D.I. Berryman, B.A. Coutts and R.A.C. Jones.** 2007. Lack of seed coat contamination with Cucumber mosaic virus in lupin permits reliable, large-Scale detection of seed transmission in seed samples. Plant Disease, 91: 504-508.
22. **Palukaitis, P. and F. Garcia-Arenal.** 2003. Cucumber mosaic virus. AAB Description of Plant Viruses. No. 400.
23. **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.
24. **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.
25. **Rosa, C., M. Polek, B.W. Falk and A. Rowhani.** 2007. Improved efficiency for quantitative and qualitative indexing for Citrus tristeza virus and Citrus psorosis virus. Plant Disease, 91: 1089-1095.
26. **Scott, H.A. 1963.** Purification of Cucumber mosaic virus. Virology, 20: 103-106.
27. **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.
28. **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.
29. **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.
30. **Verma, N., L. Singh, A.K. Singh, S. Kulshestha, G. Raikh, V. Hallan, R. Ram and A.A. Zaidi.** 2005. *Ornithogalum*: a new host of Cucumber mosaic virus (CMV) from India. Plant Pathology, 54: 256.

Received: December 1, 2009; Accepted: May 6, 2010

تاريخ الاستلام: 2009/12/1؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2010/5/6