مجلــة الكوفــة للعلــوم الزراعيــة 9 (4) : 73 – 91 2017

تشخيص فايروس موزائيك الخيار CMV على الفلفل باستخدام النباتات الكاشفة والأشرطة المناعية وتقنية تفاعل البلمرة التسلسلي العكسي (RT- PCR)

[1]عمار سعدي ناصر الحارس [2] فضل عبد حسين الفضل

قسم وقاية النبات – كلية الزراعة - جامعة الكوفة - جمهورية العراق

المستخلص :

اجريت هذه الدراسة بهدف تشخيص فايروس موزائيك الخيار Cucumber Mosaic Virus (CMV) على الفلفل وتحديد المدى العائلي ومصدر الإصابة الأولية لة باستخدام النباتات الكاشفة Indicator Plants والاشرطة المناعية Immunostrip فضلا عن تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي العكسي (RT-PCR) Reverse , Transcriptase - Polymerase Chain Reaction . اجريت العدوى باستخدام عصير نبات فلفل مصاب بفايروس CMV على عدد من النباتات الكاشفة من الادغال وبعض المحاصيل الاقتصادية ومنها الفلفل *Cucumis sativus* L.)، الطماطة (*Lycopersicon esculentum* Mill.) ، قرع الكوسا (*Cucurbita pepo* L.) ، اليقطين (*Cucurbita maxima* L.)، الباذنجان (*Solanum melongena* L.) ، اللوبيا (*Vigna unguiculata* L.) ، التبغ (*Nicotiana tabacum* cv.samsun) ، *Nicotiana rustica*). ، الرغيلة (*Chenopodium murale* L.) .

اظهرت النتائج اصابة جميع هذه النباتات بالفايروس CMV اذ كانت الاعراض على نبات الفلفل هي تحزم العروق وتشوه الأوراق مع ظهور أعراض موزائيك وتبرقش وانحناء الأوراق الحديثة للأسفل واختزال في أعناق الأوراق بينما كانت على شكل موزائيك مع تشوه وتقزم في نبات الخيار بينما تحولت اوراق الطماطة الى الشكل الخيطي نتيجة الاصابة . في حين ظهرت الاعراض على نبات قرع الكوسا واليقطين والباذنجان بشكل موزائيك جهازي مع تقزم نباتات الباذنجان، بينما كانت الاعراض بشكل بقع موضعية شاحبة على اوراق نبات اللوبيا وبقع غير منتظمة الشكل على نباتات الرغيلة ،اما التبغ بنوعية فكانت الاعراض على شكل توضح لعروق الاوراق vein clearing .

وكان اختبار الاشرطة المناعية Immunostrips Test موجبا للعينات المصابة بفايروس CMV في كل من نباتات الخيار، اللوبياء ، الفلفل ، الطماطة وعلى شكل خط ترسيب واضح مقارنة مع النباتات السليمة .

البحث جزء من رسالة ماجستير الباحث الاول

تــم تاكيــد تشــخيص الفــايروس بواســطة تفاعــل البلمــرة العكســي (RT-PCR) اذ ان جميــع النباتــات المستخدمة فـي الدراسـة كانـت موجبـة للاختبـار المـذكور حيـث وجـد عنـد تضـخيم قطعـة مسـتقيمة لجينـات الحـامض النـووي التـي تكـون غـلاف فـايروس CMV مـع برايمـر CM2,CM1 ظهـور حـزم DNA واضــحة بحجــم (bp 486- 488) مقارنــة مــع النباتــات الســليمة التــي لــم تعطــي اي حزمــة للحــامض النـووي المـذكور، ممـا يؤكـد ان الفـايروس المسـتخدم فـي الدراسـة هـو فـايروس موزائيـك الخيـار CMV علـى الفلفـل والـذي يقـع تحـت المجموعـة (I) للفـايروس المـذكور، وتعدهـذه الدراسـة الاولـى فـي العـراق التي استخدمت التشخيص الجيني لفايروس CMV على الفلفل.

الكلمات المفتاحية: فايروس CMV ,الاشرطة المناعية، PCR ، المدى العائلي

المقدمة Introduction :

يعد الفلفل pepper احد اهم محاصيل الخضر من العائلة الباذنجانية solanaceae في العالم ويعد ثالث محصول بعد الطماطة والبطاطا من حيث الأهمية الغذائية وينتمي الفلفل الى جنس capsicum (1) . والذي يضم حوالي 22 نوعا بريا فضلا عن 5 أنواع اخرى مزروعة اشهرها *capsicum annuum* (8).

يتعرض محصول الفلفل كغيره من محاصيل العائلة الباذنجانية للإصابة بالعديد من الافات كالفطريات والحشرات والحلم والفايروسات اذ يطلق على نبات الفلفل اسم لاقط الفايروسات (13)، ويمكن للامراض الفايروسية ان تخفض انتاج محصول الفلفل بمقدار 90% فضلا عن صعوبة مقاومتها (17)،وقد أشار Nienhaus(14) الى إصابة محصول الفلفل بحوالي 13 فايروسا بينما أشار كتاب (الوجيز في امراض الفلفل) الصادر عن جمعية امراض النبات الامريكية 2003 الى إمكانية إصابة الفلفل بحوالي 17 فايروسا معظمها مسجلة في ولاية كاليفورنيا (13).وفي دراسة للباحثين Florin,Zitter ,(23) واشارا الى ان فايروس موزائيك الخيار (CMV) هو من اهم الفايروسات التي تصيب الفلفل في ولاية نيويورك فضلا عن فايروسات أخرى منها فايروس موزائيك التبغ TMV وفايروس واي البطاطا PVY .

ونظرا لاهمية فيروس موزائيك الخيار CMV على الفلفل في العراق ولعدم وجود دراسات سابقة علية في العراق هدفت الدراسة الى الكشف عن هذا الفايروس في بعض النباتات الاقتصادية وبعض الادغال وذلك من خلال تشخيص الفايروس باستخدام الأشرطة المناعية وبعض النباتات الكاشفة واستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل العكسي لتشخيص الفايروس من النباتات المصابة مباشرة وإيجاد علاقة القرابة بين فايروس CMV الذي يصيب الفلفل والنباتات الأخرى.

المواد وطرائق العمل Materials and Methods:

تشخيص الفايروس :-

شخص فايروس موزائيك الخيار على الفلفل باستخدام الأشرطة المناعية والنباتات الكاشفة إضافة الى تقنية ال PCR

مصدر الفايروس :-

جمعت عينات من اوراق نباتات الفلفل التي ظهرت عليه اعراض الموزائيك و التشوه والتقزم من عدة مناطق (البيوت البلاستيكية العائدة لمديرية زراعة النجف بتاريخ 12-1-2015 ، البيت البلاستيكي العائد لكلية الزراعة جامعة الكوفة بتاريخ 21-3-2015 ، البيت البلاستيكي التابع لدائرة الارشاد الزراعي في النجف بتاريخ 25-3-2015 ،الحقل العائد لكلية الزراعة جامعة

الكوفـــة بتـــاريخ 1-4- 2015 والحقـــول المكشـوفة فـي المنطقـة الصـحراوية بـين كـربلاء والنجـــف بتـــاريخ 24-3-2015) وحفظـــت العينـات بدرجـة حـرارة C 40 فـي مستشـفى الطب البيطري في النجف الاشرف.

العدوى الميكانيكية :-

سـحق 1 غـم مـن الاوراق القميـة لنبـات الفلفـل المصـاب بالفـايروس مـع 4 مـل مـن محلـول دارئ الاستخلاص

الفوسـفاتي المبـرد وبدالـة حامضـية pH = 7 (3,15) مـرر العصـير المسـتخلص مـن خـلال طبقتـين مـن الشـاش واعتمـد الراشـح لقاحـا للفـايروس ، مسـحت اوراق نباتـات الفلفـل باللقـاح الفايروسـي بعـد تعفيرهـا بمـادة الكاربورانـدم 600 مـش (18) ، رشـت النباتـات الملقحـة بالمـاء المقطـر بعـد 1 -2 دقيقـة مـن العـدوى ووضـعت فـي البيـت البلاسـتيكي لمتابعة ظهور الاعراض

طرائق التشخيص :-

النباتات الكاشفة Indicator Plants:

اسـتعمل فـي التشـخيص النباتـات الكاشـفة المذكورة في الجدول رقم (1)

الأشرطة المناعية Immunostrips:

اسـتعملت اشـرطة مناعيـة تحتـوي علـى مصـل مضـاد لفـايروس موزائيـك الخيـار CMV علـى الفلفـل ، و المجهـز مـن شـركة Agdia – biofords الفرنسـية ، واجـري الاختبـار حسـب طريقـة العمـل الموصـى بهـا مـن قبـل الشـركة المجهـزة والتـي تـتلخص بـالاتي : وضـع 0.15 غـم مـن العينـات النباتيـة (اوراق) المـراد فحصـها والمشـكوك باصـابتها فـي الاكيـاس الحاويـة علـى محلـول دارىء الاسـتخلاص وسـحقت جيـدا ،غمـرت نهايـة الشـريط المعامـل بالمصـل المضـاد لمسـافة 0.5 سـم فـي الكـيس الحـاوي علـى محلـول العينـة المـراد اختبارهـا ، و سـجلت النتـائج بعـد 15– 30 دقيقـة وهـو الوقـت الازم لحـدوث التفاعـل ويعـد الفحـص موجبـا اذا ظهـر خـط ترسـيب اسـفل خـط الحزمـة القياسـية . كـررت الخطـوات مع مستخلص من نبات سليم للمقارنة .

تشـخيص بتقنيـة تفاعـل البلمـرة التسلسـلي العكسي :

اسـتخدمت برايمـرات مجهـزة مـن شـركة Bioner الكوريـة امـا سـلم الحـامض النـووي فكـان مجهـز مـن شـركة kappa والمـذكورة تفاصيلها في الجدول رقم (2)

اسـتخلاص الحـامض الرايبـي للفـايروس RNA وتفاعل البلمرة العكسي:

اسـتخدمت عـدة اسـتخلاص Kit (plant) Total RNA Mini المجهـز مـن شـركة Geneaid لاسـتخلاص الحـامض النـووي الرايبـي RNA مـن عـدة عينـات مـن نباتـات الفلفـل المشـكوك باصـابتها بفـايروس CMV وحسب الطريقة الموصى بها من الشركة .

جدول (1): النباتات الكاشفة المستخدمة في تشخيص فايروس CMV على الفلفل

ت	الاسم العربي	الاسم الانكليزي	الاسم العلمي
1	الخيار	Cucumber	*Cucumis sativus* L.
2	اللوبيا	Cowpea	*Vigna unguiculata* L.
3	التبغ	Tobacco	*Nicotiana tabacum* cv.samsun
4	التبغ	Tobacco	*Nicotiana rustica*
5	قرع الكوسا	Zucchini	*Cucurbita pepo* L.
6	اليقطين	Pumpkin	*Cucurbita maxima* L.
7	الباذنجان	Eggplant	*Solanum melongena* L.
8	الطماطة	Tomato	*Lycopersicon esculentum* Mill.
9	الرغيلة	Wall goosefoot	*Chenopodium murale* L.

استخدم في RT-PCR برايمرات مخصصة مصممة حديثا وهي CM2 وCM1 لتضخيم قطعة مستقيمة من جينات الغلاف البروتيني للفايروس . استخدم Kit (RT/PCR AccuPower @ premix) مجهز من شركة Bioneer الكورية وتمت هذه الخطوة حسب توصيات الشركة المجهزة. ولتركيب cDNA (خطوة واحدة RT-PCR) أدخلت في جهاز PCR بدرجة حرارة 42c ولمدة 60 دقيقة ثم رفعت الحرارة الى 94c ولمدة 5 دقائق .ولتضخيم واستنساخ DNA الناتج يتطلب اجراء دورات حرارية حيث يتم رفع درجة الحرارة الى 94c لمدة دقيقة ثم تخفض الى 60c لمدة دقيقة ثم ترفع درجة الحرارة الى 72c لمدة دقيقتين ثم بعد 30 دورة هذه تاتي خطوة نهائية ترفع درجة الحرارة الى 72c لمدة 7 دقيقة (11).

جدول (2): بوادئ الحامض النووي RNA لفايروس الCMV على الفلفل

الشـــــركة المصنعة	المصدر	تسلسل البادئات	اسم البرايمر
Bioner	(11) (15)	5 ' GCCGTAAGCTGGATGGACAA3'	CM1 reverse
		5'TATGATAGAAGCTTGTTTCGC G3'	CM2 forwad
kapa universal ladder		1600،2000،3000،4000 ،5000،6000،8000، 1000 100، 150 ،600،800،300،400،500،200، 1000، 1200	Ladder bp

النتـــائج والمناقشـــة Results and Discussion

تشخيص الفايروس :

دراسة الاعراض على النباتات الكاشفة :-

الاعـراض علـى نبـات الخيـار: *Cucumis sativus* L.

ظهـرت الاعـراض علـى نباتـات الخيـار صـنف Beta-Alfa بعمـر 6 اوراق هولنـدي المنشـأ و الملقحـة بمسـتخلص مـن اوراق نبـات فلفـل مصـاب بالفـايروس كانـت بدايـة ظهـور الاعـراض بعـد اسـبوع مـن اجـراء العـدوى وكانـت الاعـراض علـى شـكل موزائيـك وتشـوه لـلأوراق وانحنـاء حوافهـا للأسـفل والتفافهـا وتقـزم النبـات وقصـر السـلاميات وأعنـاق الأوراق مـع قلـة عـدد الثمـار وظهـور الموزائيـك عليهـا وتشـوهها وتسـاقط الازهـار ، وتحـول الموزائيـك فـي الأوراق القديمـة المصـابة إلـى مسـاحات صـفراء ثـم تتحـول إلـى مسـاحات ميتـة (Necrosis)، وتسـقط الأوراق المصـابة عـادةً صـورة 1 (A) وهـذا يتفـق مـع Eiras,Hull،Cerkauskas (9)(12)(10), . و لم تظهر

هـذه الاعـراض علـى النباتـات السـليمة ،(صـورة B) .

صورة(1): A) اعراض الموزائيك على ورقة الخيار (السهم يشير الى مناطق تحلل الكلروفيل) B) ورقة سليمة

الاعراض على نبات اللوبيا: *Vigna unguiculata* L.

ظهـرت الاعـراض علـى اوراق نبـات اللوبيـا المعـداة ميكانيكيـا بالفـايروس بظهـور بقـع موضـعية شـاحبة علـى الاوراق بعـد 15 يومـا من العدوى كما في الصورة (2- B).في حين لـم تظهـر هـذه الاعـراض علـى اوراق النبـات السليم ،حسب ما موضح في الصورة (2-A) .

صورة(2):اعراض الاصابة نبات لوبيا A) ورقة سليمة B) اعراض البقع الموضعية الشاحبة

الاعراض على نبات قرع الكوسا: *Cucurbita pepo* L.

ظهــرت الاعــراض علــى اوراق نبــات قــرع الكوســا المعــداة بمســتخلص اوراق الخيــار المصــاب بالفــايروس بعمــر 6 اوراق بشــكل موزائيك جهـازي بعـد اسـبوع مـن العـدوى وهـذا ايــده عــذاب (6). اذ ادت الاصــابة الــى صــغر حجــم الورقــة وتشــوهها الــى نصــف حجمهــا الطبيعــي تقريبــا وتســاقط الازهــار و لــم تظهــر مثـل هـذه الاعـراض علـى النباتـات السـليمة ،كمـا موضح في صورة (3) .

صورة (3): اعراض الاصابة بفايروس CMVعلى نبات قرع الكوسا

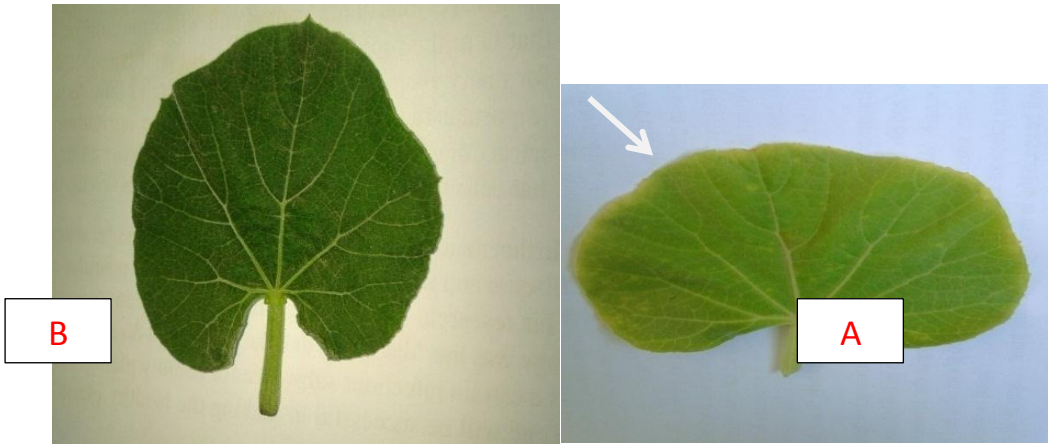
A) ورقة سليمة B) اعراض الموزائيك والتشوه

الاعراض على القرع: *Cucurbita maxima* L.

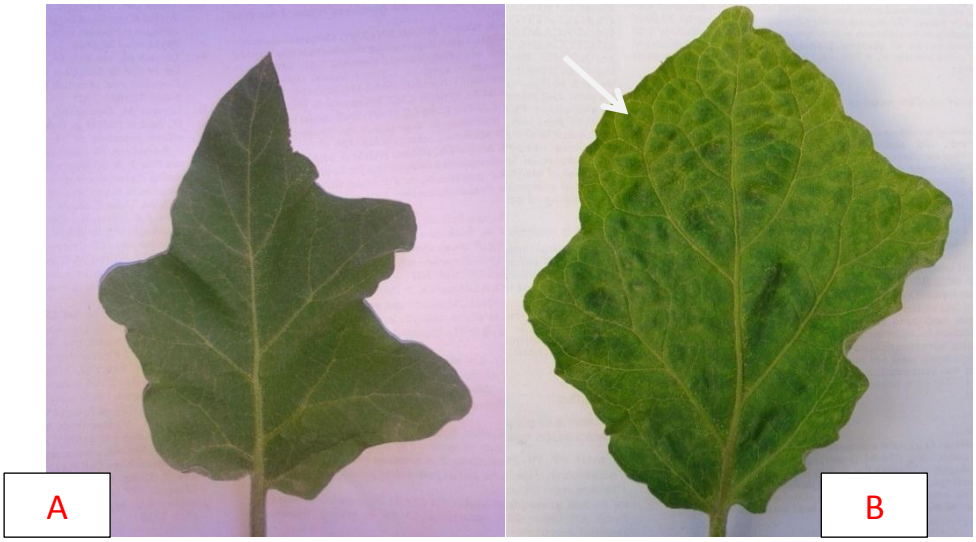
ظهــرت الاعــراض علــى اوراق نبــات القــرع الملقحــة بالفـايروس وهــي بعمـر 4 اوراق بعـد 5 ايــام مــن العــدوى بفــايروس CMV بشــكل موزائيـك جهـازي وتقـزم النبـات وتجعـد الاوراق بينمـا لـم تظهـر مثـل هـذه الاعـراض علـى النبـات السليم ، صورة (4)

الاعــــراض علــــى نبــــات الباذنجــــان: *Solanum melongena* L.

كانــــت الاعــــراض نباتــــات الباذنجــــان أعـراض موزائيـك وتقـزم النبـات Takahashi وEhara (21) ، صورة (5).



صورة(4): اعراض الاصابة بفايروس CMVعلى اوراق نبات القرع A: ورقة نبات سليم ، B: ورقة نبات مصاب



صورة (5): اعراض الاصابة بفايروس CMVعلى نبات الباذنجان A) ورقة سليمة B) ورقة ظاهر عليها اعراض الموزائيك

الاعــراض علــى نبــات الطماطــة: Mill. *Lycopersicon esculentum*

اســتجاب نبــات الطماطــة وهــو بعمــر اســبوعين الملقــح ميكانيكيــا بمســتخلص اوراق فلفــل مصــاب بالفــايروس بظهــور الاعــراض بعــد مــرور 15 يومــا مــن العــدوى بشــكل

موزائيـــك جهـــازي كمـــا فـــي صـــورة (B-6)(17,12) ثـم تطـورت الاعـراض الـى تقـزم النبـات وتشـوه الاوراق وعنـد تقـدم الاصـابة تتحـول اوراق الطماطـة الـى شـكل خيطـي) كمـا ذكـر العـاني واخـرون (5) وعـذاب (6) مقارنـة بالنباتات السليمة .

صورة (6): اعراض الاصابة بفايروس CMVعلى نبات طماطة: A)ورقة سليمة B)ورقة مصابة

الاعـراض علـى نبـات التبـغ : cv.*Samsun* *Nicotiana tabacum*

ظهـرت الاعـراض بشـكل توضـح العـروق vein clearingعلـى الاوراق القميـة تطـورت فيمـا بعـد الـى اعـراض الموزائيـك بعـد مـرور 14 يومـا مـن العـدوى (3)(4) ولـم يلاحـظ مثـل هـذه الاعـراض فـي نباتـات التبـغ السـليمة ، صورة (7).

الاعـراض علـى نبـات التبـغ: *Nicotiana tabacum* cv. *Rustica*

اسـتجاب هـذا الصـنف للاصـابة بفـايروس موزائيـك الخيـار بشـكل توضـح العـروق بعـد مـرور اسـبوعين وهـذا يتفـق مـع مـاذكره العـاني واخـرون (4) وصـبر والعـاني (5) ولـم تلاحـظ هذه الاعراض في النبات السليم ، (صورة 8)

الاعـــراض علـــى نبـــات الرغيلـــة: *Chenopodium murale* L.

ظهـرت الاعـراض علـى اوراق نبـات الرغيلـة الملقـح بمسـتخلص اوراق فلفـل مصـاب بالفـايروس بعـد 30 يومـا مـن العـدوى بشـكل بقـع موضـعية غيـر منتظمـة الشـكل مقارنـة مـع نبـات رغيلة سليم ،كما في صورة (10) .

صورة (7): اعراض الاصابة بفايروس CMVعلى ورقة نبات التبغ صنف cv.*Samsun* *Nicotiana tabacum* (A ورقة سليمة B) اعراض توضح العروق

صورة(8) : اعراض الاصابة بفايروس CMVعلى نبات تبغ صنف *Nicotiana tabacum* cv. *Rustica*

A) ورقة سليمة B) اعراض توضح العروق

ان ظهـور الاعـراض الجهازيـة علـى النباتـات الكاشـفة المسـتخدمة فـي الدراسـة نتيجـة اصـابتها بفـايروس CMV لا تحـدث الا عنـد انتقـال الفـايروس مـن خليـة لاخـرى اذ يسـلك طريقـه خـلال الـروابط البلازميـة Plasmodesmata (الخيـوط الموصـلة بـين بروتوبلاسـت الخلايـا المتجـاورة) وخـلال حركتـه هـذه فـان الفـايروس لايمكنـه الانتقـال مـن خليـة لاخـرى الا اذا اصـيبت الخلايـا وحـدث لـه تناسـخ بـداخلها ويحـدث تحـرك الفـايروس عـادة بمعـدل 1

مليمتر/يـوم (8-10 خليـة) وبمجـرد دخـول الفـايروس الـى اللحـاء فانـه ينتشـر جهازيـا فـي النبـات ، ولا تظهـر اعـراض الموزائـك الجهـازي الا عنـد بلـوغ تعـداد الفـايروس الـى مـا بـين100000- 10 مليـون جـزيء فايروسـي/ الخلية (7) .

امـا ظهـور اعـراض التقـزم والتشـوه علـى النباتـات الكاشـفة المصـابة بفـايروس CMV فهـي نتيجـة تـاثير الفـايروس علـى الوظـائف الفسـلجية للنبـات اذ يحـدث تغيـرات فـي التـوازن الهرمـوني فـي النباتـات المصـابة بـه وهـذا انعكـس علـى معـدل وطبيعـة نمـو النبـات مثـل ضـعف المجمـوع الجـذري والخضـري وتقـزم النبـات وتشـوهه وايضـا يـؤدي الـى زيـادة معـدل التـنفس لانتـاج الطاقـة الضـرورية لتكـوين مكونـات الفـايروس (2) (22) كـذلك تـاثر الاصـابة الفايروسـية فـي معـدل تركيـب البنـاء الضـوي للنباتـات المصـابة ممـا يـؤدي الـى ظهـور اعـراض الاصـفرار والموزائيـك علـى الاوراق حيـث يقـل تركيـز الكلوروفيـل فيهـا وبالتـالي تـنخفض الكاربوهيـدرات كمـا يصـاحب تضـاعف الفـايروس اسـتهلاك المـواد النتروجينيـة التـي تـدخل فـي صـنع الاحمـاض الامينيـة والقواعـد النتروجينيـة التـي تـدخل فـي تكـوين الحـامض النووي للفايروس(20)(2) .

امـا ظهـور البقـع الموضـعية فـي نبـات اللوبيـا والرغيلـة المصـابة بالفـايروس تشـير الـى وجـود الفـايروس فـي مكـان الاصـابة وهـي نتيجـة مقاومـة هـذه النباتـات للفـايروس حيـث يحـدث تفاعـل فـرط الحساسـية ولكـون الفايروسـات تحتـاج الـى خليـة حيـة لتكاثرهـا فـان النباتـات المـذكورة تقتـل الخلايـا المصـابة بالفـايروس لتحـد مـن انتقالـه داخـل النباتـات المصـابة وهـذا يـرتبط بنشاط جينات المقاومة (2).

الأشرطة المناعية Immunostrips :

اظهـرت نتـائج الاختبـار بالاشـرطة المناعيـة Immunostrips علـى وجـود فـايروس موزائيـك الخيـار CMV فـي نباتـات الخيـار *Cucumis sativus* L. الظـاهر عليهـا اعـراض التقـزم والموزائيـك الشـديد وقلـة الثمـار وتسـاقط الازهـار وايضـا نباتـات اللوبيـا *Vigna unguiculata* L. التـي ظهـرت عليهـا اعـراض البقـع الموضـعية الصـفراء الشـاحبة وكـذلك اعطـت نباتـات الفلفـل *capsicum annuum* التـي كانـت تظهـر اعـراض الموزائيـك والتقـزم عليهـا اختبـارا موجبـا عنـد اختبارهـا بالاشـرطة المناعيـة الخاصـة بالفـايروس المـذكور واظهـرت الطماطـة *Lycopersicon esculentum* Mill. التـي ظهـرت عليهـا اعـراض الموزائيـك والتقـزم وتشـوه الاوراق تفـاعلا موجبـا مـع Flash Kits الحـاوي علـى المصـل المضـاد الكاشـف لفـايروس CMV اذ ظهـر خـط الترسـيب فيمـا لـم تظهـر النباتـات السـليمة اي تفاعـل مـع Flash Kits الحـاوي علـى المصـل المضـاد الكاشـف لفـايروس CMV وذلـك لعـدم وجـود الفـايروس فـي النبـات السـليم ، صـورة (10) .

التشـخيص الجزيئـي للفـايروس باسـتخدام تفاعـل البلمرة العكسيRT-PCR:

اثبتـت تجربـة الكشـف عـن الحـامض النـووي (DNA والنـاتج مـن تحويـل RNA فـايروس موزائيـك الخيـار CMV الـى الحـامض النـووي DNA بتقنية RT- PCR) الى ان نباتات

صورة (9): اعراض الاصابة بفايروس CMVعلى نبات رغيلة

A) ورقة سليمة ; B) اعراض البقع الموضعية غير المنتظمة .

الفلفـل الظـاهر عليهـا اعـراض الموزائيـك الشـديد وتشـوه الاوراق والتفافهـا وتقـزم النبـات انهـا تحتـوي علـى فـايروس CMV وذلـك عنـدما تـم تضـخيم قطعـة مسـتقيمة لجينـات الغـلاف البروتينـي CMV مـع برايمـر CM2,CM1 حيـث كانـت نتيجـة التفاعـل ظهـور حـزم واضـحة Bands بحجـم (488 bp) ، وكمـا فـي الصـورة (11) فـي حـين لـم يظهـر نـاتج تضـخيم PCR لنباتـات فلفـل سـليمة حـزم DNA عنـد عمـل ترحيـل كهربـائي لـنفس العينـات السـابقة مـع نبـات الفلفـل السـليم ، ان نـاتج تضـخيم PCR بـالحجم (488-486 bp) هـو لفـايروس CMV والـذي يقـع تحـت المجموعـة الفرعيـة(I) لفـايروس موزائيـك الخيـار وهـذا يتفـق مـع مـا ذكـره Wylie،Eiras (22)، (10). وتعـد هـذه الدراسـة الاولـى فـي العـراق التـي اسـتخدمت التشـخيص الجينـي لفـايروسCMV علـى الفلفل.

صورة (10) :الاشرطة المناعية وفيها تظهر نتائج التفاعل مع مستخلصات نباتية مصابة ونبات فلفل سليم (المقارنة) مع المصل المضاد للفايروس CMV :

A) التفاعل مع مستخلص نبات فلفل سليم (المقارنة) .

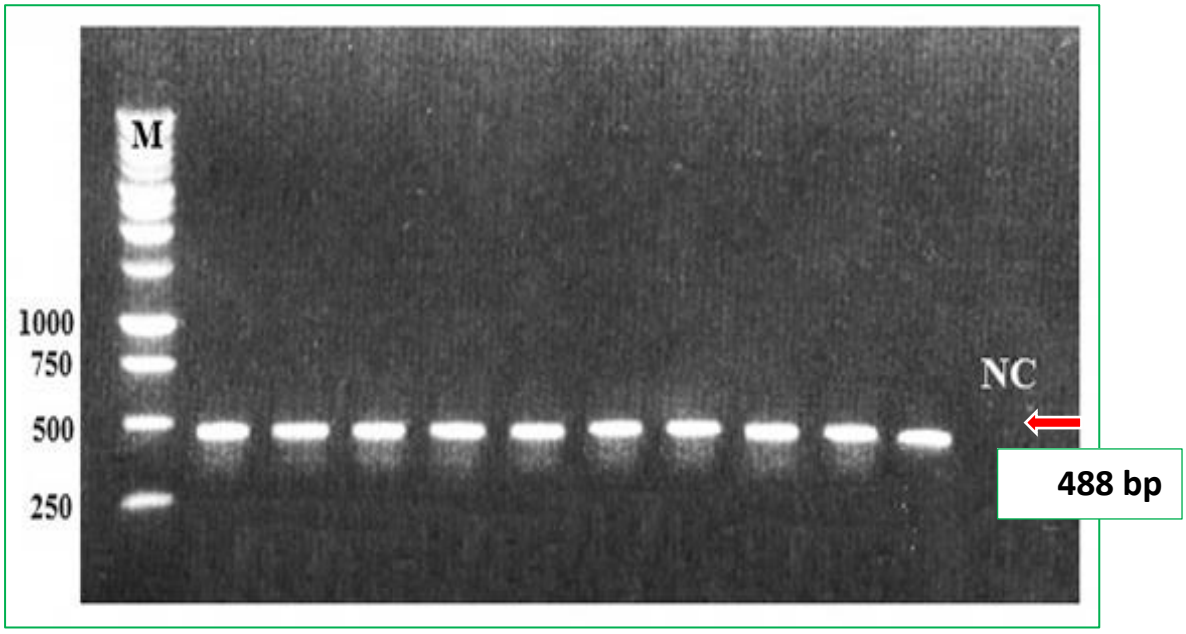
B) التفاعل مع مستخلص نبات الفلفل مصاب بالفايروس CMV

C) التفاعل مع مستخلص نبات خيار مصاب بالفايروس CMV .

D) التفاعل مع مستخلص نبات طماطة مصاب

E) التفاعل مع مستخلص نبات لوبيا .

(السهم يشير ناتج التفاعل للعينات المصابة)



صورة (11) : حزم الحامض النووي (DNA) المضاعفة بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) من نباتات الفلفل المصابة بفايروس موزائيك الخيار (*Cucumber mosaic virus*) (Negative معاملة مقارنة :NC .1Kp DNA ladder marker =M control)

المصادر References

1-حسـن،احمد عبـد المـنعم .2001.انتـاج الفلفـل والباذنجـان. الـدار العربيـة للنشـر والتوزيـع .جمهوريـة مصـر العربيـة صـفحه 336

2- شـريف ، فيـاض محمـد .2012.علـم امـراض النبـات والاسـس الجزيئيـة للاصـابة والمقاومـة.دار الـذاكرة للنشـر والتوزيـع .الطبعـة الاولـى . جمهوريـة مصـر العربيـة 685 صفحة.

3- صـبر، ليلـى جبـار.2013. تحفيـز المقاومـة الجهازيـة فـي الطماطـة ضـد فـايروس موزائيـك الخيـار باسـتخدام خلـيط بكتيـري ومستحضـر البيـون تحـت ظـروف البيـت الزجـاجي . اطروحـة دكتـوراه . كليـة الزراعـة . جامعـة بغداد . جمهورية العراق .

4- صـبر، ليلـى جبـار، رقيـب عـاكف العـاني .2008. تحديـد اربـع سـلالات لفـايروس موزائيـك الخيـار مصـليا وبايلوجيـا وعلاقتهـا بالامراضـية . مجلـة العلـوم الزراعيـة العراقيـة، 39(1):59 -68.

5-العــاني ، رقيــب عــاكف وليلــى جبــار صــبر ومصــطفى علــي عــذاب والاء خضــير حســان .2009. اســتجابة بعــض أصــناف البطــيخ للاصــابة بفــايروس موزائيــك الخيــار تحــت الظــروف الحقليــة . مجلــة العلــوم الزراعيــة،40 (6) 1-8 .

6- عــذاب ، مصــطفى علــي . 2009. دراســة بروتينــات الغــلاف لثلاثــة فايروســات نباتيــة وإمكانيــة اســتخدامها كادلــة فــي الكشــف عنهــا . رســالة ماجســتير . كليــة الزراعــة . جامعــة بغداد .

7-Agriose, G. N. 1997. Plant Pathology. 4th .ed. Academic Press. .SanDiego, Argentina. pp 635.

8 – Bosland , P . W . 1992 . Chiles : adiverse crop . Hort Technology , 2 : 6- 10

9 -Cerkauskas, R. R. 2004 . Cucumber mosaic virus AVRDC. The World Vegetable Center. Taiwan.

10- Eiras , M.; A.J. Boari ; A, Colariccio; A.L.R ,Chaves; M.R.S, Briones; A.R Figueria and Harakava , R. 2004 . Characterization of isolates of the cucumovirus cucumber mosaic virus present in Brazil . Journal of Plant Pathology. 86 (1), 61-69.

11-Elbeshehy,E.K.F and S. Sallam .2012. Partial characterization of an isolate of cucumber mosaic virus from Ismailia governorate, international Journal of Virology,8(1) : 90-97.

12-Hull, R .2002. Matthews Plant Virology. Fourth edition . Academic press, London , UK. PP .1001.

13-Laemmlen.F.2004.Viruses in Peppers: Langston, Jr, D. 2006. Commercial Pepper Production Handbook. University of Georgia College of Agricultural and Environmental Sciences, Center for Agribusiness and Economic Development.

14-Nienhaus, F. 1981. Virus and similar diseases in tropical and subtropical areas. Published by German Agency for Technical Cooperation(GTZ).16-20P

15-Miura,N.S.,L.O.S, Beriam and Rivas,E.B.2013. Detection Of Cucumber Mosaic Virus In

Commercial Anthurium Crops And Genotypes Evaluation. Horticultura Brasileira, 31:322-327.

16- Noordam , D . 1973 . Indentification Of Plant Viruses. Methods And Experiments.Center For Agriculture Publishing And Documentation, Wageningen . Netherlands , PP. 207 .

17-Palukaitis P. and F. Garcia-Arenal .2003.Cucumo viruses. Adv Virus Res 62: 241–323.

18-Reddick, B. B. and L. F, Habera .1999. New Resistance to Plant Viruses in Pepper. The University of Tennessee, Knoxville, TN, USA.

19-Scott, H.A. 1963.Purification Of Cucumber Mosaic Virus . Virology, 20: 130-106.

20-Song , X.S.; Y.J, Wang; W.H. K. Mao; Y.H Shi; S. Zhou; Nogues and Yu. J.Q. , .2009. Effects Of Cucumber Mosaic Virus Infection On Electron Transport And Antioxidant System In Chloroplasts And Rmitochondria of Cucumber And Tomato Leaves. Physiologia Plantarum, 135:246-257.

21-Takahashi, H. and Y, Ehara . 1993 . Severe chlorotic spot symptoms in cucumber mosaic virus strain Y-infected tobaccos are induced by a combination of the virus coat protein gene and two host recessive genes. MPMI,6 (2): 182-189.

22-Wylie S.; C.R. Wilson; R.A.C. and M.G.K.; Jones 1993. Apolymerase chain reaction assay for cucumber mosaic virus in lupin seeds. Australian Journal Agricultural Research ; 44: 41-51.

23-Zitter, T.A. and D, Florini,.1984. Virus diseases of pepper. Cornell University, Vegetable MD on line, USA. pp3.

Detection of cucumber mosaic virus on pepper by indicator plant immune strip and RT- polymerase chain reaction

Ammar- Alhares [2] Fdhel AL-Fadhel[1]

1-2 Department of Plant Protection. Faculty of Agriculture. University of Kufa. Republic of Iraq

Abstract

This study was conducted to identify cucumber mosaic virus (CMV) on pepper plants and determine the host range and the source of primary infection, by using indicator plants, immune strip test and PCR. The infection was done by using the sap. of pepper plants containing CMV upon of some indicator plants like cucumber (*Cucumis sativus* L),tomato(*Lycopersicon esculentum* Mill) , zucchini (*Cucurbita pepo* L) , Pumpkin (*Cucurbita maxima* L) , eggplant (*Solanum melongena* L.) cowpea (*Vigna unguiculata*) tobacco (*Nicotiana tabacum* cv.samsun , *Nicotiana rustica*)and Wall goosefoot(*Chenopodium murale* L.)

The results showed that all above-mentioned plants were infected with CMV .The symptoms of infection were mosaic , Malformation and stunting in cucumber ,while tomato leaves changed to filiform shape. The symptoms of zucchini , Pumpkin and eggplant were in the form of systemic mosaic and stunting of egg plants , while the symptoms upon cowpea plants were pale local lesion leaves .and in the Wall goosefoot plants the symptoms were unorganized spots. The two varieties of tobacco showed vein clearing. Symptom.

The test of immune strip showed the existence of CMV in cucumber, tomato , pepper and cowpea plants by clear precipitation line compare to control plants.

The diagnosis of CMV virus was confirmed by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). The plant specimens collected from areas under study were gave positive results, the RT-PCR reaction with primer CMV1 and CMV2 for CMV-coat protein gene (CMV-cp Gene) yielded 486-488 base pair DNA bands while the specimens from non-infected plants amplified no bands. These results indicated that the CMV virus detected in present study belong to subgroup I.

keywords : CMV virus, immune strip , PCR , Host range

Part of M.Sc thesis of the first author