تشخيص فايروس موزائيك الخيار (CMV) على نبات الباذنجان *Solanum melongena* L. باستخدام بعض النباتات الكاشفة والاشرطة المناعية وتقنية تفاعل البلمرة التسلسلي العكسي (RT-PCR)

فضل عبد الحسين الفضل شروق ساني سوداي زغير

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

المستخلص :

هـدفت هـذه الدراسـة الـى تشـخيص فـايروس موزائيـك الخيـار ، شـخص فـايروس موزائيـك الخيـار cucumber mosaic virus علـى نبـات الباذنجـان باسـتخدام النباتـات الكاشـفة Indicator Plants واختبـار الاشـرطة المناعيـة Immunostrip Test وتقنيـة تفاعـل البلمـرة التسلسـلي العكسـي Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction,RT-PCR . اسـتخدم عصـير نبـات باذنجـان مصـاب بفـايروس CMV فـي اجـراء العـدوى علـى عـدد مـن النباتـات الكاشـفة التـي شـملت نباتـات محاصـيل اقتصـادية وادغـال منهـا الباذنجـان (.L *Solanum melongena*) والخيـار (. *Cucumis sativus* L) واللوبيـا . (L *Vigna unguiculata*) واليقطـين (.L *Cucurbita maxima*) وقـرع الكوسـا (.L *Cucurbita pepo*) والطماطـة lycopersicum (Solanum) والتبـغ (*Nicotiana tabacum* cv.samsun) ، (*Nicotiana tabacum* cv. *Rustica*) والرغيلـة (*Chenopodium murale* L.) . دلـت نتـائج التشـخيص بواسـطة النباتـات الكاشـفة علـى اصـابة جميـع هـذه النباتـات بفـايروس CMV . واظهـرت نتـائج الاختبـار بالاشـرطة المناعيـة وجـود فـايروس موزائيـك الخيـار CMV فـي كـل مـن نباتـات الباذنجـان ، الخيـار ، الطماطـة ، الرغيلـة وعلـى شـكل خـط الترسـيب الموجـب مقارنـة مـع النباتـات السـليمة . كمـا اثبـت تفاعـل البلمـرة العكسـي (RT-PCR) فـي تاكيـد تشـخيص الفـايروس حيـث وجـد عنـد تضـخيم قطعـة مسـتقيمة لجينـات الحـامض النـووي التـي يتكـون منهـا غـلاف الفـايروس CMV مـع برايمـر CM1، CM2 ظهـور حـزم DNA بحجـم (502 bp) مقارنـة مـع النباتـات السـليمة التـي لـم تظهـر اي حزمـة للحـامض النـووي ، ممـا يـدل علـى ان الفـايروس المسـتخدم في الدراسة هو فايروس موزائيك الخيار Cucumber Mosaic Virus .

كلمات مفتاحية: فايروس CMV ، النباتات الكاشفة ، الاشرطة المناعية ، RT-PCR

البحث جزء من رسالة ماجستير للباحث الثاني

المقدمة Introduction

يعـد نبـات الباذنجـان Eggplant (Solanum *melongena* L.) مـن محاصـيل الخضـر الشائعة والمهمة في كثير من بقاع العالم ومنها منطقة الشرق الاوسط والعراق بصورة خاصة (10) ، قـدر انتـاج محصـول الباذنجـان فـي العـراق بحـوالي (422.3) الـف طـن لسـنة 2012 بانخفـاض قـدر بنسـبة (6.6%)عـن انتـاج السـنة الماضـية الـذي قـدر بحـوالي (452.1) الـف طـن ، احتلـت محافظـة بغـداد المركـز الاول تليهـا محافظـة صـلاح الـدين اذ قـدرت كميـة الانتـاج لكـل منهمـا (235.7) ، (40.2) الـف طـن وبنسـبة (55.8%)،(9.5%) من مجموع الانتاج على التوالي ، في حين قدر اعلـى متوسـط لانتاجيـة الـدونم الواحـد فـي محافظـة بغـداد(8004.1 كغـم) تليهـا محافظـة ديـالى (6922.4 كغـم) (1) ان زيـادة عمليـات الاسـتيراد لبـذور الخضـر مـن مصـادر مختلفـة والتوسـع فـي انتاجيـة محصـول الباذنجـان فـي البلـد ادى الـى ظهـور بعـض الامـراض والافـات التـي تصـيب محصـول الباذنجـان وخاصـة الامـراض الفايروسـية (6)، ومـن اكثرهـا اهميـة فـايروس موزائيـك الخيـار CMV ، اذ ينتشـر فـي جميـع بلـدان العـالم ولـه القـدرة علـى اصـابة اكثـر مـن 1200 نـوع نباتي تعـود الـى اكثـر مـن 100 عائلـة نباتيـة مـن ذوات الفلقـة الواحـدة وذوات الفلقتـين عنـد تلقيحهـا ميكانيكيـاً ومـن بـين هـذه العوائـل محاصـيل ذات اهميـة اقتصـادية مثـل القرعيـات والطماطـة والفلفـل والباذنجـان والبطاطـا وغيرهـا مـن نباتـات العائلـة الباذنجانيـة (14)، وجـد ان فـايروس موزائيـك الخيـار ينقـل بواسـطة التلقـيح الميكـانيكي والبـذور فـي 19 نوعـا مـن النباتـات وبنسـب مختلفـة كمـا ينقـل الفـايروس بواسـطة الحشـرات وبحـدود 60 نوعـا مـن حشـرات المـن ومـن اهمهـا *Acyrthosiphon pisum* و *Aphis craccivora* و *Myzus persicae* بطريقـة النقـل غيـر الباقيـة non – persistent manner (5) . ونظـراً لاهميـة فـايروس موزائيـك الخيـار فقـد هـدفت هـذه الدراسـة الـى تشـخيص الفـايروس موزائيـك الخيـار (CMV) بواسـطة عـدد مـن النباتـات الكاشـفة وكـذلك بواسـطة الاشـرطة المناعيـة واسـتخدام تقنيـة تفاعـل البلمـرة التسلسـلي العكسـي (RT-Reverse Transcriptase – PCR , Polymerase Chain Reaction) فـي تاكيد تشخيص الفايروس .

المـواد وطرائـق العمـل Materials and Methods

1- تشخيص الفايروس :

شـخص فـايروس موزائيـك الخيـار (CMV) باسـتخدام بعـض النباتـات الكاشـفة (Indicator Plants) والاشـرطة المناعيـة (Immunostrip) وكـذلك بواسـطة تقنيـة RT- PCR .

2- مصدر الفايروس :

جمعت عينات من اوراق نباتات الباذنجان التي ظهرت عليه اعراض الموزائيك من عدة مناطق (الحقول المكشوفة في بحر النجف بتاريخ 18- 11-2015 ، الحقول المكشوفة في منطقة القزوينية بتاريخ 19- 11- 2015 ، البيت البلاستيكي التابع للعتبة العلوية المقدسة بتاريخ 24 - 12-2015 ، البيوت البلاستيكية قرب جسر الامام علي (ع) بتاريخ -2015 12-27، البيوت البلاستيكية في منطقة الحيدرية بتاريخ 20-1- 2016 وحفظت العينات بدرجة الحرارة - 40 م^5 في مستشفى الطب البيطري في النجف .

3- العدوى الميكانيكية :

سحق 1غم من الاوراق القمية لنبات الباذنجان المصاب بالفايروس مع 4 مل من محلول دارىء الاستخلاص الفوسفاتي المبرد ، ثم مرر العصير المستخلص من خلال الشاش واعتمد الراشح الذي تم الحصول علية لقاحاً للفايروس ، تم تعفير اوراق نبات الباذنجان بمادة الكاربورانـدم 600 مش (15) ثم مسحت باللقاح الفايروسي ، بعد ذلك رشت النباتات الملقحة بالماء المقطر بعد 1 - 2 دقيقة من العدوى ووضعت في البيت البلاستيكي لمراقبة ظهور الاعراض .

4- طرائق التشخيص :

شخص الفايروس باستخدام النباتات الكاشفة Indicator Plants التي ظهرت عليها الاعراض بعد 15-30 يوما من التلقيح واختبار الاشرطة المناعية Immunostrip وتقنية RT – PCR .

النباتات الكاشفة Indicator Plants :

تم زراعة عدد من النباتات الاقتصادية ونباتات الادغال ثم لقحت بمستخلص من عصير نبات باذنجان مصاب لغرض الاعتماد على الاعراض التي تظهر عليها في التشخيص والكشف عن الفايروس بشكل اولي.

تأكيد تشخيص الفايروس بطريقة الاشرطة المناعية Immunostrip :

استعملت اشرطة مناعية تحتوي على مصل مضاد للفايروس CMV مجهزة من شركة Agdia - biofords الفرنسية ، واجري الاختبار حسب طريقة العمل الموصى بها من قبل الشركة المجهزة والتي تتلخص بالاتي : وضع 0.15 غم من العينات النباتية (اوراق) المشكوك باصابتها بالفايروس والمراد فحصها في الاكياس الحاوية على محلول دارىء الاستخلاص وسحقت جيدا ، ثم غمرت نهاية الشريط (Flash Kits) المعامل بالمصل المضاد لمسافة 0.5 سم في الكيس الحاوي على محلول العينة المراد اختبارها ، وسجلت النتائج بعد 15 – 30 دقيقة وهو الوقت اللازم لحدوث التفاعل ويعد الفحص موجبا اذا ظهر خط ترسيب اسفل خط الحزمة القياسية ، وكررت الخطوات مع مستخلص نبات سليم للمقارنة .

التشـــخيص الجزيئـــي للفـــايروس CMV باستخدام تفاعل البلمرة العكسي RT – PCR :

اســتخدمت برايمــرات مجهــزة مــن شــركة Bioneer الكوريــة امــا سـلم الحــامض النــووي فكان مجهز من شركة KAPA .

البرايمرات وسلم الحامض النووي :

جـدول (1) البـوادىء الاماميـة والخلفيـة المسـتخدمة فـي تفاعـل البلمـرة المتسلسـل (PCR) .

الشـــركة المصنعة	المصدر	تسلسل البادئات	اســـم البرايمر
Bioner	Elbeshehehy) و Sallam (2012،	5 ' GCCGTAAGCTGGATGGACAA3 '	CM1 reverse
		5'TATGATAGAAGCTTGTTTCGC G3'	CM2 forwad
kapa universal ladder		1600، 2000، 3000، 4000، 5000، 6000، 8000، 10000، 1200 ،1000،200،500،400،300،800،600،150،100	Ladder bp

اســتخلاص RNA الفــايروس مــن النباتــات المصابة :

اســتخلص الحــامض النــووي منقــوص الاوكســجين (RNA) للفــايروس مــن نباتــات الباذنجـان المصـابة بفـايروس CMV باسـتخدام عــدة مجهــزة مــن شــركة Geneaid وحســب طريقة العمل الموصى بها من قبل الشركة .

اســتخدمت فــي RT-PCR برايمــرات خاصــة وهــي CM1 و CM2 لتضـخيم قطعـة مسـتقيمة مـن جينـات الغـلاف البروتينـي لفـايروس CMV ، اسـتخدمت عـدة (RT/PCR premix AccuPower @) مجهــزة مــن شــركة Bioneer الكوريــة وتمــت هــذه الخطــوة حســب توصـيات الشـركة المجهـزة . ولغـرض تخليـق cDNA ادخلـت فـي جهـاز الـدورات الحراريـة بدرجـة حـرارة 42 م^{5} ولمـدة 60 دقيقـة ثـم

رفعت درجة الحرارة الى 94 م^5 لمدة خمس دقائق ولتضخيم واستنساخ DNA الناتج ، تطلب اجراء دورات حرارية وفيها تم رفع درجة الحرارة الى 94 م^5 لمدة دقيقتين ثم تبعتها 30 دورة وفي كل دورة ترفع درجة الحرارة الى 94 م^5 لمدة دقيقة ثم تنخفض الى 60م^5 لمدة دقيقة ثم ترفع الى 72 م^5 لمدة دقيقتين ، وبعد 30 دورة ترفع درجة الحرارة في خطوة نهائية الى 72 م^5 لمدة سبعة دقائق .

جدول (2) الدورة الحرارية لتضخيم واستنساخ DNA .

المراحل	درجة الحرارة م°	المدة الزمنية بالدقيقة	عدد الدورات
Initial denaturation	94	2	1
Denaturation	94	1	30
Annealing	60	1	
Extension	72	2	
Final extension	72	7	1

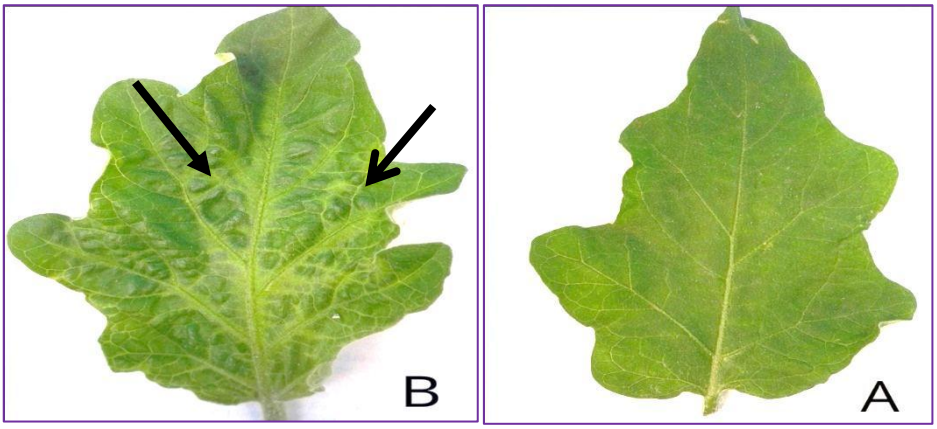
النتائج والمناقشة Results and Discussion

تشخيص الفايروس :

دراسة الاعراض على النباتات الكاشفة :

الاعراض على نبات الباذنجان : *Solanum melongena* L.

ظهرت الاعراض على نباتات الباذنجان صنف JAWAHER F1 بعمر 60 يوم والملقحة بمستخلص من اوراق نبات باذنجان مصاب بالفايروس وكانت بداية ظهور الاعراض بعد 15 يوم من اجراء العدوى على شكل موزائيك وتجعد الاوراق وتقزم النبات في حين لم تظهر هذه الاعراض على النباتات السليمة وهذا ما اكده Takahashi و Ehara (17) والياسري(3) ، صورة (1).

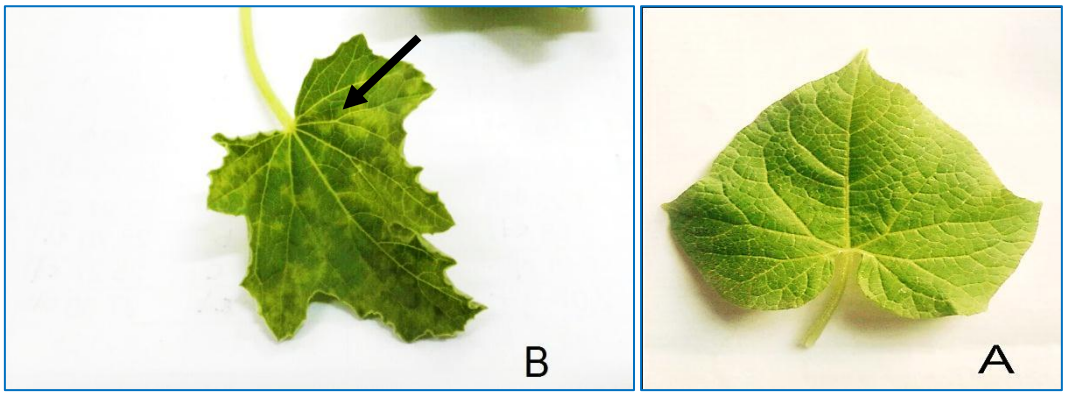


صورة 1: اعراض الاصابة بفايروس CMV على نبات الباذنجان . A) ورقة سليمة

B) اعراض الموزائيك والتجعد على الورقة

الاعـــــراض علـــــى نبـــــات الخيـــــار : *Cucumis sativus* L.

اوضـحت النتـائج ان الاعـراض علـى نباتـات الخيـار كانـت علـى هيئـة اعـراض موزائيـك وتشـوه لـلاوراق وانحنـاء حوافهـا للأسـفل والتفافهـا ، وتحـول الموزائيـك فـي الاوراق القديمـة المصـابة الـى مسـاحات صـفراء ثـم تحـول الـى مسـاحات ميتـة (Necrosis) وعـادةً مايتبعهـا سـقوط الاوراق المصـابة وهـذا مـا اكـده Gianessi واخـــــرون (13) و Anonymous(11) ، صورة (2) .



صـورة 2: اعـراض الاصـابة بفـايروس CMV علـى نبـات الخيـار . A) ورقـة سـليمة .

B) اعراض الموزائيك على ورقة الخيار

الاعـــراض علـــى نبـــات اللوبيـــا : *Vigna unguiculata* L.

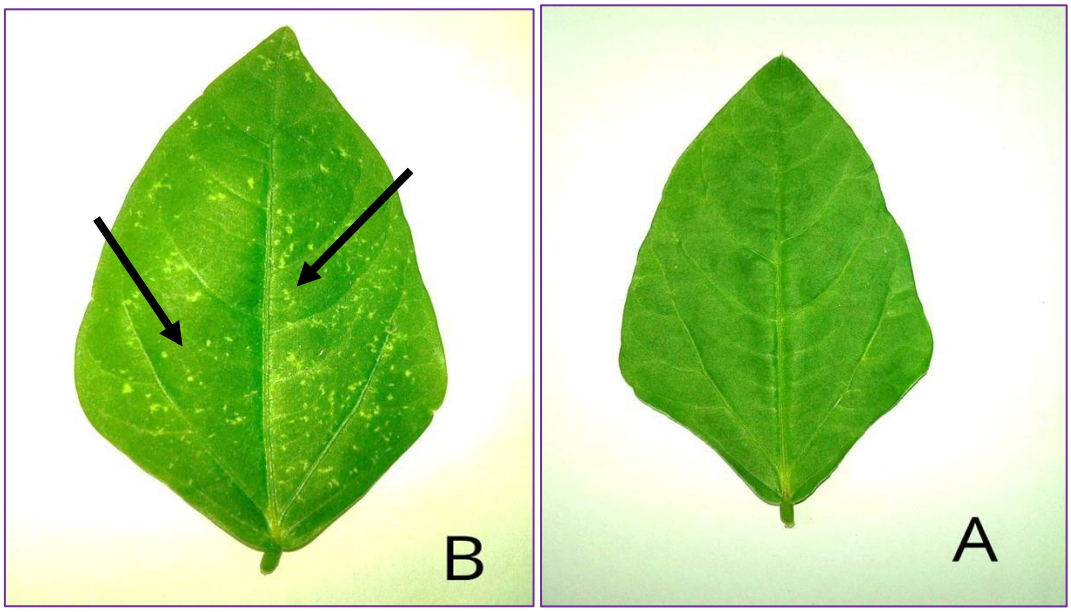
اسـتجابة نباتـات اللوبيـاء للعـدوى الميكانيكيـة بالفـايروس بظهـور بقـع موضـعية شـاحبة علـى الاوراق بعـد 15 يومـا مـن العـدوى ولـم تظهـر هـذه الاعـراض علـى اوراق النبـات السـليم وهـذا يتفـق مـع مـا ذكـره صـبر (7) و عـذاب (9) والياسري (3) ، صورة (3) .

الاعـــراض علـــى نبـــات اليقطـــين : *Cucurbita maxima* L.

ظهـرت الاعـراض علـى اوراق نباتـات القـرع بعـد 15 يومـا مـن اجـراء العـدوى بمسـتخلص الفـايروس CMV وكانـت الاعـراض بشـكل موزائيك جهـازي وتجعـد لـلاوراق وتقـزم النبـات ولـم تظهـر هـذه الاعـراض علـى النباتـات السـليمة وقـد اتفقـت هـذه النتـائج مـع مـا ذكـره الياسـري (3) ، صورة (4) .

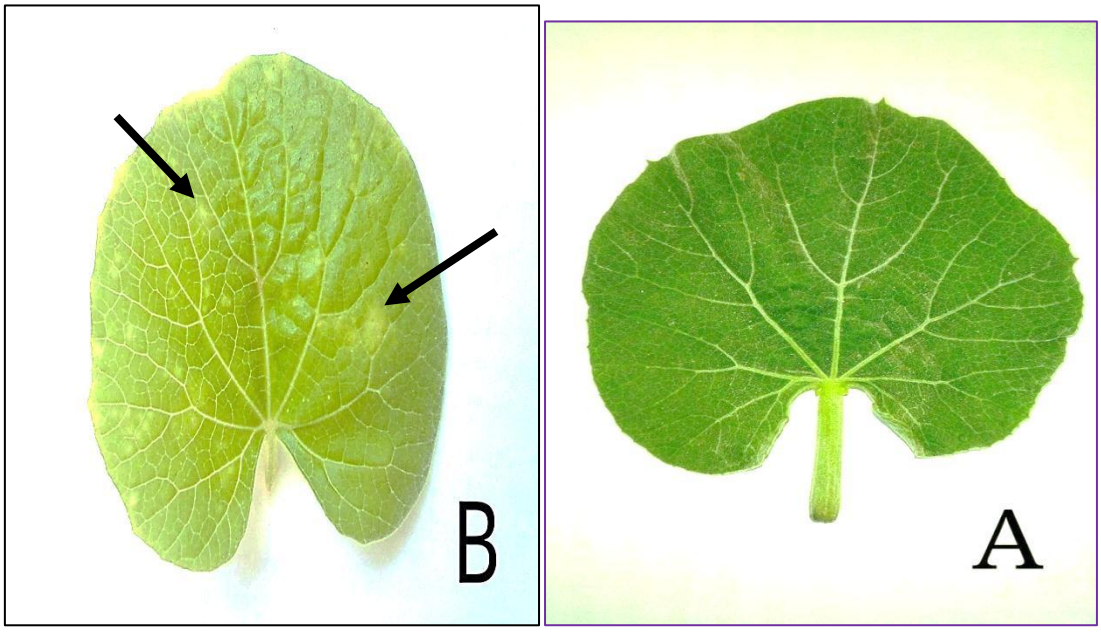
الاعـــراض علـــى نبـــات قـــرع الكوســـا : *Cucurbita pepo* L.

ظهـرت الاعـراض علـى اوراق نبـات قـرع الكوسـا وبعـد اسـبوع مـن اجـراء العـدوى بمسـتخلص الفـايروس CMV علـى هيئـة اعـراض موزائيـك جهـازي مـع صـغر حجـم الورقـة وتشـوهها الـى نصـف حجمهـا الطبيعـي تقريبـاً بينمـا لـم تظهـر هـذه الاعـراض علـى النباتـات السـليمة وهـذا يتفـق مـع مـا ذكـره عذاب(9) والياسري (3).



صورة 3: اعراض الاصابة بفايروس CMV على نبات اللوبيا

A)نبات سليم B) نبات مصاب



صورة 4: اعراض الاصابة بفايروس موزائيك الخيار CMV على نبات اليقطين .

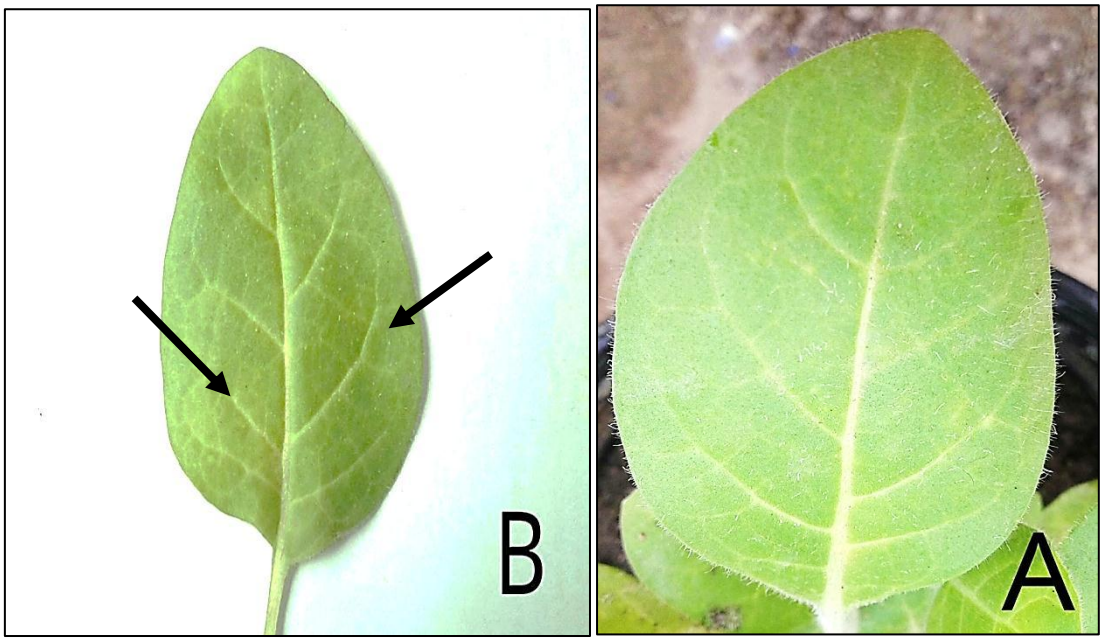
A) ورقة سليمة B) ورقة مصابة

الاعـــراض علـــى نبـــات الطماطـــة : *Lycopersicon esculentum* Mill.

اوضـحت النتـائج قـدرة الفـايروس موزائيـك الخيـار CMV علـى اصـابة نباتـات الطماطـة اذ ظهـرت الاعـراض علـى هـذه النباتـات بعمـر اسـبوعين وبعـد 15 يومـا مـن العـدوى الميكانيكيـة بمسـتخلص اوراق نبـات الباذنجـان المصـاب بالفـايروس CMV بشـكل موزائيـك جهـازي ثـم تطـورت الـى تقـزم النبـات وتشـوه الاوراق وعنـد تقـدم الاصـابة تحولـت الاوراق الـى شـكل خيطـي مقارنـة بالنباتـات السـليمة التـي لـم تظهـر عليهـا هـذه الاعـراض وهـذا يتفـق مـع مـا ذكـره العـاني واخرون (2) وعذاب (9).

الاعـــراض علـــى نبـــات التبـــغ : *Nicotiana tabacum* cv . *Rustica*

اوضـحت النتـائج امكانيـة اصـابة نباتـات التبـغ بالفـايروس CMV اذ كانـت الاعـراض علـى صـنف التبـغ *Nicotiana tabacum* cv . *Rustica* بشـكل توضـح العـروق بعـد اسـبوعين مـن اجـراء العـدوى الميكانيكيـة بمسـتخلص الفـايروس ولـم يلاحـظ ظهـور هـذه الاعـراض علـى النبـات السـليم وهـذا يتفـق مـع مـا ذكـره (صـبر والعـاني (8) والعـاني واخـرون (2) والياسري (3) ، صورة (5).



صورة 5 : اعراض الاصابة بفايروس CMV على نبات التبغ صنف *Nicotiana tabacum* cv . *Rustica* A) نبات سليم B) نبات مصاب

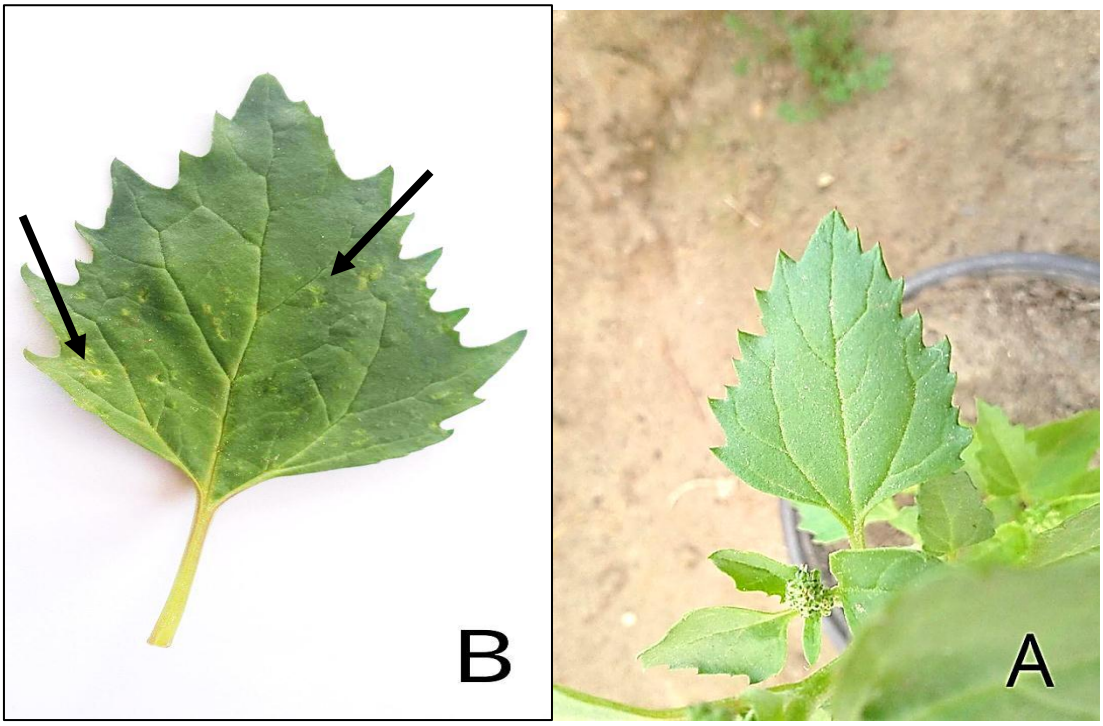
الاعـراض علـى نبـات التبـغ : .

Nicotiana tabacum cv *Samsun*

اظهـرت النتـائج اصـابة صـنف التبـغ . *Nicotiana tabacum* cv *Samsun* بعد 14 يومـا مـن العـدوى بشـكل توضـح العـروق clearing vein علـى الاوراق القميـة ثـم تطـورت الـى اعـراض موزائيـك ولـم تظهـر هـذا الاعـراض علـى النبـات السـليم وهـذا يتفـق مـع مـا ذكـره (صـبر والعـاني (8) و صـبر (7) والياسري (3).

الاعـراض علـى نبـات الرغيلـة : *Chenopodium murale* L.

اسـتجابة نباتـات الرغيلـة للاصـابة بالفـايروس CMV بعـد 30 يومـا مـن اجـراء العـدوى الميكانيكيـة بمسـتخلص اوراق نبـات باذنجـان مصـاب بالفـايروس وكانـت الاعـراض بشـكل بقـع موضـعية غيـر منتظمـة الشـكل فـي حـين لـم تظهـر هـذه الاعـراض علـى النبـات السـليم وهـذا ما اكده الياسري (3) ، صورة (6) .



صورة 6: اعراض الاصابة بفايروس CMV على نبات الرغيلة ، A) نبات سليم B) نبات مصاب .

ان حصول الاصابة الجهازية (Systemic Infection) لايحدث الا عند عبور الفايروس لجدار الخلية النباتية عن طريق الروابط البلازمية (Plasmodesmata) حيث تسمح الروابط البلازمية بعبور بروتينات مشفرة من الفايروس تسمى بروتينات الحركة (MPs) Movment Protiens اذا يمتلك فايروس CMV بروتين b2 والذي يتمكن بواسطته من تثبيط الاخماد الجيني الذي يقوم به النبات عن طريق تخفيض كبير جدا في تراكم ثلاث مجاميع من جزيئات RNA المتداخلة الصغيرة التي يحلل بواسطتها النبات RNA الفايروس (12) عند دخول الفايروس CMV الى اللحاء فانه ينتشر جهازيا في النبات وسرعان ما يصل الى الخلايا النشطة في مناطق الانسجة المرستيمية ومناطق تراكم المواد الغذائية ، ويعود سبب ظهور اعراض الموزائيك والاصفرار على اوراق نباتات التبغ والخيار والطماطة المعداة بفايروس CMV الى تاثير الفايروس على معدل عملية التركيب الضوئي عن طريق خفض كمية الكلوروفيل في الورقة كما يرافق عملية تضاعف الفايروس استهلاك المواد النايتروجينية التي تدخل في تركيب القواعد النتروجينية والتي تدخل في تركيب الاحماض النووية للفايروس (16) وقد تظهر اعراض التشوه والتقزم على

النباتـات نتيجـة تـاثير الفـايروس علـى الوظـائف الفسلجية للنبـات حيـث يحـدث تغيـر فـي التـوازن الهرمـوني فـي النبـات ويـنعكس علـى معـدل وطبيعـة نمـو النبـات مثـل التقـزم والتشـوه وضـعف المجمـوع الخضـري والجـذري وقـد يؤدي الـى زيـادة فـي معـدل التـنفس لانتـاج الطاقـة اللازمـة لتكـوين مكونـات جـزيء الفـايروس ، امـا ظهـور البقـع الموضـعية علـى نباتـات الرغيلـة واللوبيـاء المصـابة بفـايروس CMV فانهـا تـدل علـى وجـود الفـايروس فـي منطقـة الاصـابة ومقاومـة النبـات للفـايروس نتيجـة تفاعـل فـرط الحساسـية وبسـبب كـون الفايروسـات تحتـاج الـى خليـة حيـة لتضـاعفها فـان النباتـات تقـوم بقتـل الخلايـا المصـابة بالفـايروس للحـد مـن انتقالـه داخـل النبـات وهـذا يكـون مـرتبط بنشـاط جينـات المقاومة (4)

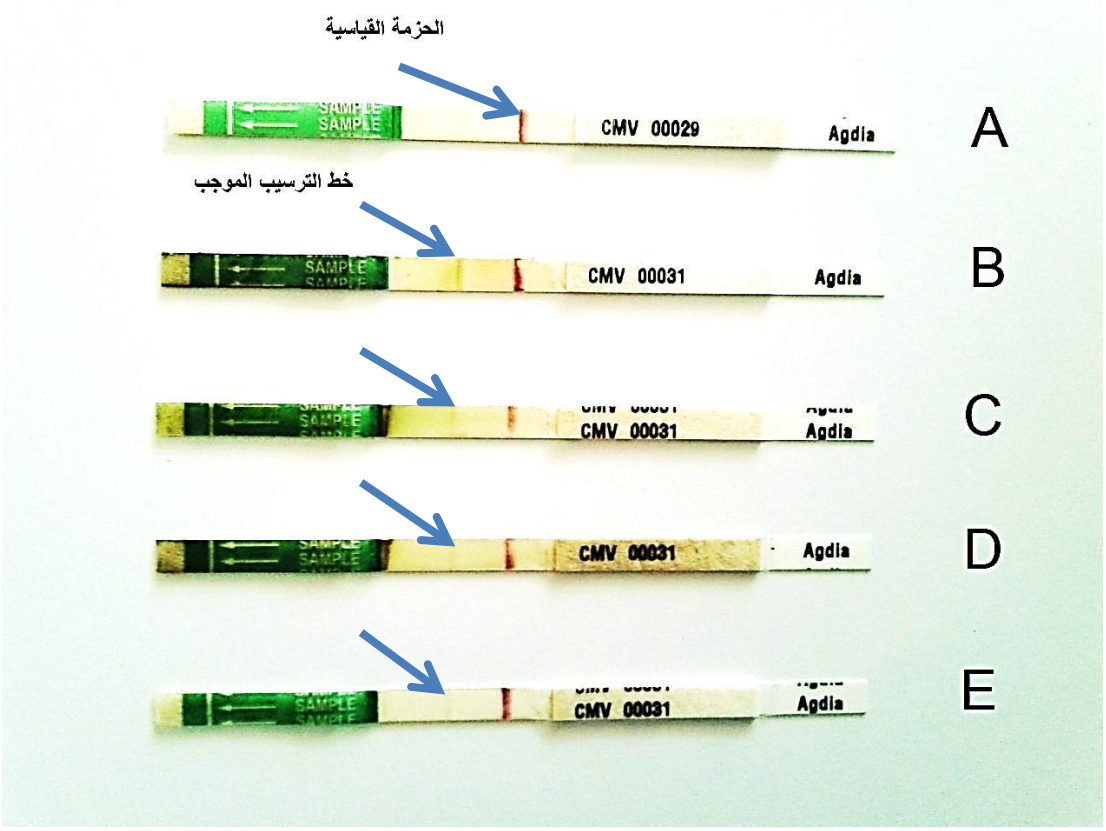
تأكيـد تشـخيص الفـايروس بطريقـة الاشـرطة المناعية Immunostrips :

اظهـرت نتـائج الفحـص بالاشـرطة المناعيـة Immunostrips الخاصـة بالفـايروس CMVاختبـاراً موجبـاً ممـا يـدل علـى وجـود فـايروس موزائيـك الخيـار CMV فـي نباتـات الباذنجـان *Solanum melongena* L. التـي ظهـرت عليهـا اعـراض الموزائيـك والتقـزم وايضـاً نباتـات الطماطـة *Lycopersicon esculentum* Mill التـي ظهـرت عليهـا اعـراض الموزائيـك والتقـزم وتشـوه الاوراق ونباتـات الخيـار *Cucumis sativus* L. التـي ظهـرت عليهـا اعـراض الموزائيـك وتشـوه الاوراق وانحنـاء حوافهـا للاسـفل ونباتـات الرغيلـة *Chenopodium murale* L. التـي ظهـرت عليهـا اعـراض البقـع الموضـعية غيـر المنتظمـة ، اذ اعطـت اوراق هـذه النباتـات تفـاعلاً موجبـاً مـع Flash Kits الحـاوي علـى المصـل المضـاد الكاشـف لفـايروس CMV وذلـك بظهـور خـط الترسـيب الموجـب بينمـا لـم يظهـر خـط الترسـيب عنـد اسـتعمال النباتـات السـليمة التـي لـم تظهـر عليهـا الاعـراض ، صورة (7) .

التشـخيص الجزيئـي لفـايروس موزائيـك الخيـار CMVباستخدام تفاعل البلمرة العكسي . RT-PCR

اثبتـت تجربـة الكشـف عـن الحـامض النـووي DNA (والنـاتج مـن تحويـل RNA فـايروس موزائيـك الخيـار CMV الـى الحـامض النـووي DNA بواسـطة تقنيـة RT-PCR) الـى ان نباتـات الباذنجـان *Solanum melongena L.* الظـاهرة عليهـا اعـراض الموزائيـك وتجعـد الاوراق وتقـزم النبـات تحتـوي علـى فـايروس CMV وذلـك عنـد تضـخيم قطعـة مسـتقيمة لجينـات الغـلاف البروتينـي لفـايروس CMV مـع برايمـر CM1 ، CM2 اذ كانـت نتيجـة التفاعـل ظهـور حـزم واضـحة Bands بحجـم (502 bp) وكمـا فـي الصـورة (10) فـي حـين لـم يظهـر نـاتج تضـخيم PCR لنباتـات الباذنجـان السـليمة حـزم DNA عنـد عمـل ترحيـل كهربـائي لـنفس العينـات السـابقة مـع نبـات الباذنجـان السـليم . ان نـاتج تضـخيم PCR

بـــالحجم (bp 499-502) هـــو لفـــايروس CMV والـذي يقـع تحـت المجموعـة الفرعيـة II لفـايروس موزائيـك الخيـار وهـذا يتفـق مـع مـا ذكره (18) .



صـورة 7: الاشـرطة المناعيـة وفيهـا تظهـر نتـائج التفاعـل مـع مستخلصـات نباتيـة مصـابة ونبـات باذنجان سليم (مقارنة) مع المصل المضاد للفايروس CMV :

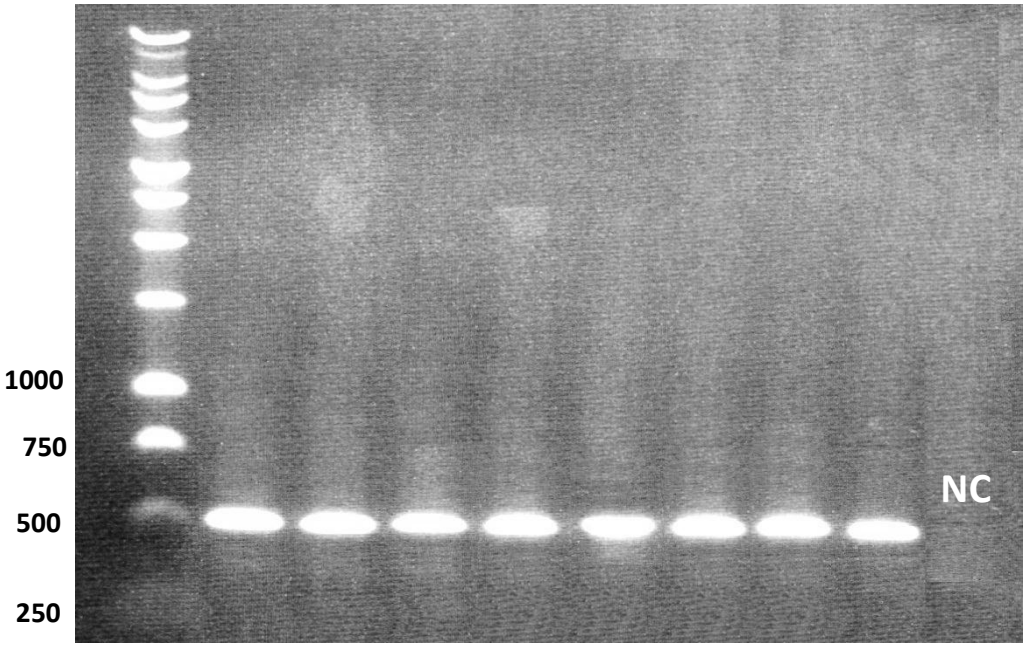
A) التفاعل مع مستخلص نبات باذنجان سليم (مقارنة) .

B) التفاعل مع مستخلص نبات باذنجان مصاب بالفايروس .

C) التفاعل مع مستخلص نبات خيار مصاب بالفايروس .

D) التفاعل مع مستخلص نبات طماطة مصاب بالفايروس .

E) التفاعل مع مستخلص نبات رغيلة مصاب بالفايروس .



صورة 8 حزم الحامض النووي (DNA) المضاعفة بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) من نباتات الباذنجان المصابة بفايروس موزائيك الخيار (*Cucumber mosaic virus*) 1Kp DNA ladder =M

المصادر References

1. الجهـاز المركـزي للاحصـاء .2012. انتـاج المحاصـيل الثانويـة والخضـروات حسـب المحافظـات لسـنة 2012.مديريـة الاحصـاء الزراعـي ،وزارة التخطـيط ،جمهورية العراق.

2. العـاني ، رقيـب عـاكف وليلـى جبـار صـبر ومصـطفى علـي عـذاب والاء خضـير حسـان .2009. اسـتجابة بعـض اصـناف البطـيخ للاصـابة بفـايروس موزائيـك الخيـار تحـت الظـروف الحقليـة ، مجلـة العلـوم الزراعيـة العراقيـة ، 40 (6) : 1 –8 .

3. الياسـري ، حـوراء اسـماعيل عبـاس .2016. اسـتخدام الطـرق الجزيئيـة والمناعيـة والنباتـات الكاشـفة فـي تشـخيص فـايروس موزائيـك الخيـار CMV واسـتحثاث المقاومـة فـي نباتـات الخيـار باسـتخدام البكتريـا المحفـزة للنبـات ، رسـالة ماجسـتير ، كليـة الزراعـة ، جامعة الكوفة ، جمهورية العراق .

4. شــريف ، فيــاض محمــد .2012. علــم امــراض النبــات والاســس الجزيئيــة للاصــابة والمقاومــة ، الطبعــة الاولــى ، دار الــذاكرة للنشــر والتوزيــع ، جمهريــة العراق . 685 صفحة .

5. شــريف ، فيــاض محمــد شــريف .2012. امــراض النبــات الفايروســية والفايروديــة ، سلسـلة امـراض النبـات ، مكتبـة الـذاكرة للطباعــة والنشــر والتوزيــع ، جمهوريــة العراق .

6. شــوكت ، عبــد اللطيــف بهجــت .1982. فايروســات النبــات ، خصائصــها ، الامــراض التــي تســببها ، مقاومتهــا . مديريــة دار الكتــب للطباعــة والنشــر . جامعــة الموصــل ، وزارة التعلــيم العــالي والبحث العلمي ، جمهورية العراق .

7. صـبر ، ليلـى جبـار .2013. تحفيـز المقاومـة الجهازيــة فــي الطماطــة ضــد فــايروس موزائيـك الخيـار باسـتخدام خلـيط بكتيـري ومستحضـر البيـون تحـت ظـروف البيـت الزجــاجي ، اطروحــة دكتــوراه ، كليــة الزراعــة ، جامعــة بغــداد ، جمهوريــة العراق .

8. صـبر ، ليلـى جبـار ورقيـب عـاكف العـاني .2008. تحديـد اربــع سـلالات لفـايروس موزائيــك الخيــار مصــليا وبايولوجيــا وعلاقتهــا بالامراضــية ، مجلــة العلــوم الزراعية العراقية ، 39(1) : 59–68.

9. عــذاب ، مصــطفى علــي .2009. دراســة بروتينــات الغــلاف لثلاثــة فايروســات نباتيــة وامكانيــة اســتخدامها كأدلــة فــي الكشــف عنهــا ، رســالة ماجســتير ، كليــة الزراعــة ، جامعــة بغــداد ، جمهوريــة العراق .

10. مطلــوب ،عــدنان ناصــر وعزالــدين ســلطان محمــود وكــريم صــالح عبــدول .1981. انتــاج الخضــروات (الجــزء الثــاني) جمهوريــة العــراق ، وزارة التعلــيم العــالي والبحــث العلمــي ، جمهورية العراق .

11. Anonymous, .2000. Cucumber mosaic virus. Santa Barbara County Agricultural Commissioner's Office 263 Camino del Remedio Santa Barbara CA 93110. (805), 681-5600.

12. Diaz-Pendon , J.A.,F.Li. W-X LI , and Ding S.W.2007. Suppression of antiviral silencing by cucumber mosaic virus 2b protein in Arabidopsis is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering

RNAs. The Plant Cell , 19: 2053-2063 .

13. 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.
14. Gianessi, L., S. Sankula, and Reigner N .2003. Tomato virus resistant case study. Plant Biotechnology: Potential impact for improving pest management in European Agriculture, NCFAP,Washington .USA.
15. Palukaitis , P. .2003. Cucumber mosaic virus. Description of Plant Virsuses . pp. 23.
16. Scott, H.A .1963. Purification Of Cucumber Mosaic Virus . Virology , 20: 130-106.
17. Song ,X.S. Y.J. Wang, W.H. K. Mao, Y.H. Shi, Zhou. S. 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.
18. 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.
19. Wylie S.; C.R.; Wilson; R.A.C.; Jones and Jones M.G.K. 1993. Apolymerase chain reaction assay for cucumber mosaic virus in lupin seeds. Australian Journal Agricultural Research , 44: 41-51.

Identification of Cucumber Mosaic Virus (CMV) on eggplant by using some of indicator plants , Immunostrip assay and reverse transcriptase - polymerase chain reaction (RT-PCR)

Fadhal Abd Alhussein Alfadhal Shrooq Sani Swadei Zagier

Depaetment of Plant Protection – Faculty of Agriculture – University of Kufa – Republic of Iraq

Abstract

This study aimed to diagnose cucumber mosaic virus , The cucumber mosaic virus was detected on eggplants by using indicator plants, Immunostrip assay and Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Inoculation was done using infected eggplant plants sap on some weed and crop indicator plants including eggplant (*Solanum melongena* L.), cucumber (*Cucumis sativus* L.), tomato (*Solanum lycopersicum* L.), squash (*Cucurbita pepo* L.), pumpkin (*Cucurbita maxima* L.), , cowpea (*Vigna unguiculata* L.), tobacco (*Nicotiana tabacum* 'samsun' and *Nicotiana rustica*) and Nettle-leaved Goose foot (*Chenopodium murale* L.). Indicator plants test showed that all tested indictors plant were infected with cucumber mosaic virus. Immunostrip assay showed positive results (sedimentation of clear lines) indicating that samples were infected with cucumber mosaic virus for eggplant and indicator plants (cucumber, tomato and Goose foot plants) compared to no lines at all from healthy plants. cucumber mosaic virus diagnosis was confirmed by RT-PCR as all infected tested plants gave positive results where a Deoxyribo Nucleic Acid of the virus capsid fragment was amplified with CM1 and CM2 primers, the Deoxyribo Nucleic Acid band size was 502 bp compared to healthy plants that gave no band at all. Confirming that the virus used in this study is cucumber mosaic virus.

RT-PCR

Key words : CMV , Indicator Plants , Immunostrip ,

Part of MS . C of the second author