مجلة الزراعة العراقية (البحثية) مجلد17 عدد1 ص74- 84 كانون الاول/2012

مقارنة كفاءة تقانات مختلفة في تنقية فايروس موزائيك الفاصوليا الأصفر BYMV ودراسة بعض خصائصه الجزيئية

مصطفى علي عذاب

الملخص

اجريت هذه الدراسة بهدف تقويم كفاءة تقانات مختلفة لتنقية فايروس موزائيك الفاصوليا الاصفر ***Bean yellow mosaic potyvirus*** (BYMV) ودراسة بعض خصائصه الجزيئية. اظهرت النتائج كفاءة عالية للكلوروفورم في ترويق العصارة وتخليصها من المادة الخضراء والبروتينات النباتية ، وان استعمال الانتباذ المركزي بسرعة **15000** دورة/دقيقة لمدة **30** دقيقة ثم الترسيب باستعمال **PEG** (**6000** دالتون) او كبريتات الامونيوم والانتباذ مرة ثانية على **15000** دورة/دقيقة كان الأكفأ من بين الطرق المختبرة. بلغت نسبة الامتصاص للضوء لتحضيرة الفايروس المنقاة جزئياً بهذه الطريقة **1.02** على الطولين الموجيين **260 / 280** مما يشير الى نقاوة جيدة للفايروس. اظهر نمط الترحيل الكهربائي على هلام الاكريلامايد **10%** مع **0.1% SDS** لعينة من التحضيرة المنقاة للفايروس وجود حزمة بروتينية وزنها الجزيئي **34** كيلودالتون تمثل بروتين الغلاف لفايروس **BYMV** ولم تظهر مثل هذه الحزمة في عينة من مستخلص نبات باقلاء سليم اخضع لخطوات التنقية نفسها للمقارنة.

المقدمة

وصف فايروس موزائيك الفاصوليا الأصفر ***Bean yellow mosaic potyvirus*** (**BYMV**، جنس ***Potyvirus*** ، عائلة ***Potyviridae***) لأول مرة من قبل **Pierce** (**27**)، ويعد من الفايروسات المهمة على المحاصيل البقولية الغذائية الشتوية في العالم، اذ سجل في معظم دول العالم (**10**) كما يعد من الفايروسات المهمة في العراق (**17**). تتراوح نسبة الخسائر في محصول الباقلاء نتيجة الإصابة بهذا الفايروس بين **39** و **81%** حسب المرحلة العمرية التي تحدث فيها الإصابة (**24**).

يعد فايروس **BYMV** من الفايروسات صعبة التنقية بسبب ميل جسيمات الفايروس إلى التكتل وكذلك الالتصاق بالبلاستيدات الخضراء مما يؤدي إلى فقدان الفايروس أثناء عملية الطرد المركزي في عملية التنقية ، فضلاً عن التصاق الجسيمات الفايروسية بالبروتينات النباتية الأخرى وخصوصاً في البقوليات (**9** ، **33**)، وان الغلاف البروتيني **Coat Protein** (**CP**) للفايروس يتحطم إذا لم تتم خطوات التنقية بسرعة (**28**).

جرت محاولات عدة لتخطي هذه الصعوبات في تنقية فايروس **BYMV** باستعمال عوائل تكثيرية مختلفة لغرض الحصول على كمية مناسبة من الفايروس فاستعملت الباقلاء ***Vicia faba*** (**25** ، **33**) والرغيلة

كلية الزراعة – جامعة بغداد، بغداد، العراق.
تاريخ تسلم البحث: نيسان/2011
تاريخ قبول البحث:آب /2011

Chenopodium quinoa (31) والتبغ *Nicotiana clevelandii* بسبب قلة محتواه من البروتينات (9). كما استعملت محاليل دارئة

متنوعة في الاستخلاص وأضيف لهذه المحاليل مواد مختلفة لمنع تجمع جسيمات الفايروس، ومن هذه المواد اليوريا و Na_2SO_3 و 2-mercaptoethanol و EDTA (20 ، 25 ، 31 ، 33).

ولترويق العصارة استعملت المذيبات العضوية مثل Triton X-100 (13 ، 25 ، 31) وثالث كلوريد الكاربون Carbon tetra chloride لوحده (33) او ممزوجا مع الكلوروفورم (20). واستعمل Polyethylene glycol (PEG) لترسيب الفايروس من العصارة النباتية (25 ، 31 ، 33) أو كبريتات الامونيوم Ammonium sulfate (3). كما استعملت بموازاة هذه المواد سرع مختلفة للانتباذ المركزي (25 ، 31 ، 33).

أجريت هذه الدراسة بهدف إيجاد أفضل وأسهل طريقة لتنقية فايروس موزائيك الفاصوليا الأصفر BYMV من نبات الباقلاء ودراسة بعض خصائصه الجزيئية.

المواد وطرائق البحث

تشخيص الفايروس: اعدت في تشخيص الفايروس طريقتا الاختبار الحيوي على النباتات المشخصة واختبار الترسيب الدقيق المصلي.

الاختبار الحيوي: جمعت عينات من أوراق نباتات باقلاء تظهر عليها اعراض موزائيك من حقول باقلاء في كلية الزراعة – جامعة بغداد في الموسم الزراعي 2008. سحق 1 غم من الاوراق المصابة مع 4 مل من محلول منظم فوسفاتي ($KH_2PO_4 + Na_2HPO_4$) ، تركيزه 0,01 مولاري بدرجة حموضة 7) مبرد (26). رشح المستخلص من خلال طبقتين من قماش الململ ، ومسحت بالراشح أوراق نباتات باقلاء *Vicia faba* L. وفاصوليا *Phaseolus vulgaris* L. وزربيح *Chenopodium amaranticolor* Cost & Reyn. ولوبيا *Vigna unguiculata* L. ، بوجود الكربورندم 600 مش. رشت النباتات المعداة بالماء المقطر بعد 1–2 دقيقة من العدوى ووضعت في البيت الزجاجي لمتابعة ظهور الأعراض. لقحت خمسة نباتات من كل نوع نباتي وتركت خمسة أخرى مسحت بالمحلول المنظم فقط للمقارنة.

الاختبار المصلي: اعتمد في تنفيذ هذا الاختبار طريقة Wetter (35) بالترسيب على شريحة زجاجية باستعمال مصل مضاد لفايروس BYMV مجهز من الدكتورة صفاء قمري/ المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (ايكاردا) – حلب – سورية ، (صنع في مركز ايكاردا). وضعت قطرة من المصل المضاد حجمها 10 مايكروليتر على الشريحة الزجاجية ووضعت فوقها قطرة بحجم مماثل من العينة المراد فحصها ، وخلطت باستعمال قضيب زجاجي وسجلت النتائج. أجريت العملية نفسها مع قطرة من مستخلص نبات سليم للمقارنة ومع مصل مضاد لفايروس موزائيك الجت *Alfalfa mosaic alfamovirus* (AMV) الذي يصيب محصول الباقلاء في العراق بشكل واسع.

إكثار الفايروس: اعدت أوراق نباتات زربيح بمستخلص من اوراق نبات باقلاء مصاب ، ثم اخذت البقعة الموضعية بواسطة مقص معقم وعمل منها مستخلص. اعدت بالمستخلص اوراق نباتات باقلاء التي اعتمدت كعائل تكثيري للفايروس (33). جمعت الاوراق التي تظهر عليها اعراض موزائيك من النباتات المعداة وحفظت تحت التجميد لحين الاستعمال.

التنقية الجزئية للفايروس: اتبعت في تنقية فايروس BYMV طريقة محورة عن طريقة Dhar و Singh (16) في تنقية سلالة تنخر عروق التبغ لفايروس واي البطاطا PVY الذي يعود لمجموعة *Potyvirus* ايضا ، اذ سحقت اوراق الباقلاء المجمدة المصابة بالفايروس في مازج كهربائي مع محلول منظم فوسفات الصوديوم يحوي 0.01 مولاري EDTA و 0.05% DIECA بدالة حامضية 8 (30)، بنسبة 1 غم اوراق نباتية : 3 مل محلول منظم. مرر المستخلص عبر طبقتين من ورق الترشيح ، وجمع الراشح في دورق حجمي.

قسم الراشح الى ثلاثة اقسام، اضيف للقسم الاول بيوتانول بنسبة 7% (16) وللقسم الثاني كلوروفورم بنسبة 20% (34) وللقسم الثالث اسيتون بنسبة 50% (15). قسّم كل قسم من اقسام العصير الثلاثة الى جزأين، اخضع الاول لعملية انتباذ مركزي بسرعة 15000 دورة/دقيقة مدة 30 دقيقة (16)، واخضع الجزء الثاني لعملية انتباذ مركزي بسرعة 5000 دورة/دقيقة لمدة 30 دقيقة (18). اختيرت افضل نتيجة في ترويق العصارة واجريت عليها العمليات اللاحقة.

اضيف للطافي PEG (6000 دالتون) بنسبة 10% مع كلوريد الصوديوم NaCl بنسبة 3% مع التحريك المستمر حتى الذوبان (16)، وفي تجربة اخرى اضيفت كبريتات الامونيوم بنسبة 51% (3). ترك المزيج بدرجة حرارة 4°س مدة 24 ساعة لضمان الترسيب الكامل. ثم اجريت عليه عملية انتباذ بسرعة 15000 دورة/دقيقة مدة 15 دقيقة (16) وللجزء الثاني 5000 دورة/دقيقة مدة 30 دقيقة (18).

اذيب الراسب في محلول دارئ البوريت (0.02 مولاري) بدالة حامضية 8.2 يحتوي مادة EDTA بتركيز 1 مليمول ومادة اليوريا بتركيز 0.5 مولاري. اجري للراشح عملية فصل غشائي بالماء المقطر مدة 24 ساعة باستعمال اكياس فصل ذات نفاذية 8000 وزن جزيئي بدرجة حرارة 4°س مع التحريك.

ولتحديد نقاوة التحضيرة قدّرت نسبة امتصاص العينة للضوء على الطول الموجي 260 : 280 نانوميتر (1).

اختبار حيوية الفايروس المنقى جزئيا: تم اختبار حيوية الفايروس النقي باجراء عدوى ميكانيكية على نبات الزربيح *Chenopodium amaranticolor* بكل من التحضيرة النقية التي استعمل فيها البيوتانول والكلوروفورم والاسيتون في ترويق العصارة (كل على حدة). وتركت النباتات في البيت الزجاجي وتوبعت النتائج.

الترحيل الكهربائي على هلام متعدد الاكريلامايد بوجود SDS (SDS-PAGE): اتبعت طريقة Laemmli (22) في فصل بروتينات الفايروس على الهلام اذ تكون الهلام من طبقتين ، الطبقة العلوية (هلام الرص 5% اكريلامايد) ويتكون من 1.25مل Tris-HCl بدرجة حموضة 6.8 ، 0.1 مل SDS تركيز 10% ، 1.66 مل اكريلامايد 30%– بيس اكريلامايد 0.8% ، 0.05 مل TEMED تركيز 5% ، 0.1 مل بيرسلفات الامونيوم

30 ملغم/مل مع 6.8 في ماء مقطر. أما الطبقة السفلية (هلام الفصل 10% اكريلامايد) تتكون من 11.25 مل Tris-HCl بدرجة حموضة 8.8 ، 0.3 مل SDS 10% ، 10 مل اكريلامايد 30% – بيس اكريلامايد 0.8% ، 0.15 مل TEMED تركيز 5% ، 0.3 مل بيرسلفات الامونيوم 30 ملغم/مل ، و 8 مل ماء مقطر.

سكبت الطبقة السفلية بين صفيحتين زجاجيتين بابعاد 20×20 سم تفصلهما مساطر بلاستيكية سمك 1.4 ملم وبعد تصلب الهلام سكب فوقه الطبقة العلوية مع وضع مشط بين الصفيحتين لعمل حفر في الهلام لحقن النماذج البروتينية.

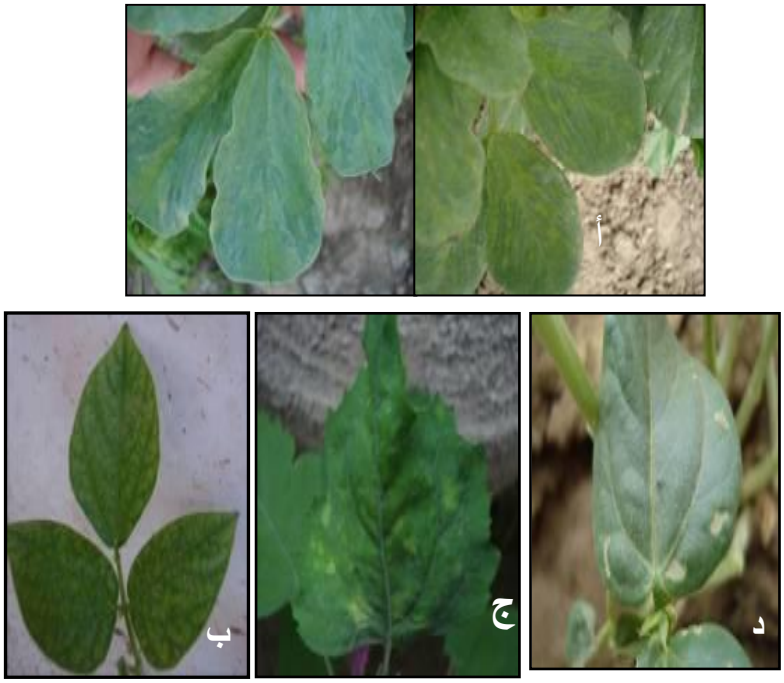
حضرت النماذج البروتينية بإضافة 2 مايكروليتر β-mercaptoethanol (2%) ، 10 مايكروليتر محلول SDS 20 % (2%) ، 15 مايكروليتر كليسرول (15%) لكل 100 مايكروليتر من تحضيرة من الفايروس المنقى ، وأضيف للمحلول عدة قطرات من محلول صبغة الفينول الزرقاء كدليل للترحيل. سخن المحلول بدرجة 100°س مدة دقيقتين وبرد ثم حقن 25 مايكروليتر منه في الحفرة المخصصة على الهلام. أجريت عملية الترحيل في محلول دارئ الترحيل (25 ملي مولاري Tris ، 192 ملي مولاري Glycine بدرجة حموضة 8.3 يحوي 0.1% SDS) بفرق جهد كهربائي 125 فولت مدة 5 ساعات. اوقفت عملية الترحيل عند وصول صبغة الفينول الزرقاء لمسافة 1 سم من قاعدة الهلام، رحلت على الهلام بروتينات قياسية بأوزان جزيئية 6500 – 66000 دالتون مجهزة من شركة Sigma. غطس الهلام في صبغة الكوماسي الزرقاء (0.25 غم لمسافة 1 سم من الصبغة في 100 مل من خليط من الميثانول وحامض الخليك والماء (5 : 1 : 5) مدة 3 ساعات لتصبيغ الحزم البروتينية. نقل الهلام إلى محلول إزالة الصبغة المتكون من 7,5% حامض الخليك و 5% ميثانول مدة 24 ساعة لإظهار الحزم البروتينية ، ثم صوِّرت النتائج.

النتائج والمناقشة

الاختبار الحيوي: استجابت نباتات الباقلاء *Vicia faba* L. للعدوى بمستخلص من نبات باقلاء مصاب بفايروس BYMV بظهور اصفرار باهت للعروق بعد أسبوع من العدوى أعقبه موزائيك أصفر أو اخضر واضحاً جداً، وقد ظهرت على بعض الأوراق الحديثة التكوين في النباتات المصابة أعراض تشوه وتجعد أوراق طفيف (شكل 1– أ) ، وهذه النتائج مماثلة لما وصفه باحثون آخرون عند دراستهم لاعراض فايروس BYMV على الباقلاء (11، 25، 29، 36). كما استجابت نباتات الفاصوليا *Phaseolus vulgaris* L. للعدوى بمستخلص من أوراق نبات باقلاء مصاب بالفايروس بظهور بقع موضعية شاحبة في البداية على الأوراق الأولية المعداة ، تطورت إلى موزائيك اصفر جهازي (شكل 1– ب) ، وهذا يماثل ما ذكره Yahia وجماعته (36) و Matsumoto وجماعته (25) و Büchen-Osmond (11) في ذكر اعراض الفايروس على الفاصوليا. وظهرت على نبات الزربيح *Chenopodium amaranticolor* المعداة بقع موضعية شاحبة أعقبها اصفرار غير منتظم على العروق وتشوه الورقة بعد مرور أسبوعين على العدوى (شكل 1 – ج)، وهذا يتفق مع ما ذكره باحثون اخرون درسوا الفايروس نفسه (11 ، 25 ، 29 ، 31). وظهرت على نباتات اللوبيا المعداة بقع موضعية متنخرة أعقبها توضح عروق (شكل 1 – د)، وهذا يتفق مع دراسات سابقة (11 ، 25، 36).

عذاب ، م. ع.

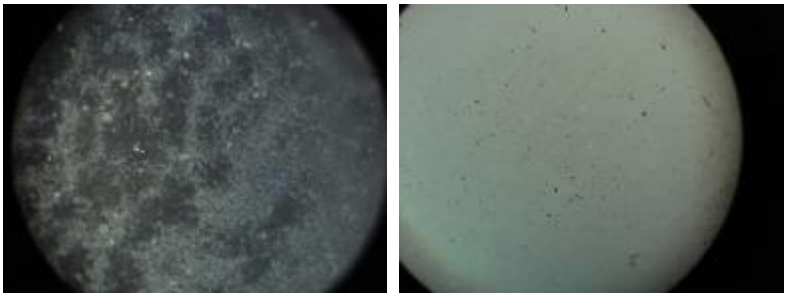
من مجمل النتائج التي حصل عليها نتيجة الاختبار الحيوي يمكن الاستدلال بان الفايروس موضوع الدراسة هو فايروس موزائيك الفاصوليا الاصفر ، وقد تم تاكيد التشخيص باعتماد الاختبار المصلي.



(أ) موزائيك جهازي على اوراق نبات باقلاء ***Vicia faba*** **L.** ، (ب) موزائيك اصفر جهازي على نبات الفاصوليا ***Phaseolus vulgaris*** **L.** ، (ج) بقع موضعية شاحبة على الاوراق المعداة لنبات الزربيح ***Chenopodium amaranticolor*** **Coste & Reyn.** ، (د) بقع موضعية ميتة على الاوراق الاولية المعداة لنبات اللوبيا ***Vigna unguiculata*** **L.**.

شكل 1. الاعراض على النباتات المشخصة نتيجة العدوى بنبات باقلاء تظهر عليه اعراض موزائيك نتيجة اصابته بفايروس موزائيك الفاصوليا الاصفر *Bean yellow mosaic virus* (BYMV)

الاختبار المصلي: ظهر تلازن بين قطرة من المصل المضاد لفايروس موزائيك الفاصوليا الاصفر BYMV المجهز من ايكاردا وبين قطرة من مستخلص نبات باقلاء مصاب بالفايروس. لم يظهر مثل هذا التلازن عند خلط قطرة من المصل المضاد لفايروس موزائيك الجت AMV مع مستخلص من النبات نفسه (شكل 2). وهذا يؤكد ان الفايروس قيد الدراسة هو فايروس BYMV وليس فايروس موزائيك الجت الذي يصيب محصول الباقلاء بشكل واسع في العراق (17).



شكل 2. يوضح التلازن الحاصل بين قطرة من المصل المضاد لفايروس BYMV وتحضيرة من الفايروس النقي (اليسار) مقارنة بتفاعل المصل المضاد لفايروسAMV مع تحضيرة الفايروس النقية (اليمين).

التنقية الجزئية للفايروس: تم الحصول على رائق اصفر بعد عملية الطرد المركزي الاولية بسرعة 15000 دورة/دقيقة للمستخلص المعامل بـ 7% بيوتانول والمستخلص المعامل بـ 20% كلوروفورم ، في حين كان المستخلص المعامل بـ 50% اسيتون ذي لون اخضر فاتح، وفي عملية الطرد المركزي بسرعة 5000 دورة/دقيقة فقد اعطت المستخلصات الثلاثة جميعها سائلاً اخضراً غير مرغوب فيه، وبناءً على هذه النتيجة فقد استبعدت المستخلصات الناتجة بعد عملية الطرد المركزي 5000 دورة/دقيقة من الخطوات اللاحقة. وقد ذكر الكويتي والعاني (2) ان البيوتانول فعال في التخلص من البلاستيدات الخضراء، ووجد Gooding و Hebert (18) النتيجة نفسها. وذكر Van Regenmortel (34) و Al-Bitar و Luisoni (7) ان الكلوروفورم كفوء في ازالة المادة الخضراء والتخلص من الاجزاء النباتية ، الا ان Chang وجماعته (13) و Tsuji وجماعته (31) و Matsumoto وجماعته (25) اشاروا الى ان Triton X-100 هو الاكفأ في ترويق العصارة في حالة التعامل مع BYMV .

حصل ترسيب للفايروس عند استخدام PEG (6000 دالتون) بنسبة 10% مع 3% NaCl ، وكذلك عند استخدام كبريتات الامونيوم بنسبة 51% وهذه النتائج تتفق مع Dhar و Sinhg (16) والكويتي والعاني (2).

بلغت نسبة امتصاص الضوء على الطولين الموجيين 260 : 280 للانموذج من تحضيرات الفايروس المنقاة بعد اخضاعها لعملية انتباذ مركزي بسرعة 15000 دورة/دقيقة لمدة 30 دقيقة للتحضيرات المروقة بالكلوروفورم 20% والبيوتانول 7% والاسيتون 51% ، 1.2 و 1.375 و 1.17 على التوالي مما يشير الى ان عملية الترويق بالكلوفورم كانت الاكفأ في التخلص من البروتينات النباتية والحفاظ على شكل جسيمات الفايروس العصوية ، في حين كانت كمية البروتينات النباتية أعلى في التحضيرة التي استعمل فيها البيوتانول والاسيتون في الترويق، وقد اشار Van Regenmortel (34) الى ان فايروس BYMV يُفقد في حال استعمال البيوتانول في الترويق ووجد الباحث نفسه ان الكلوروفورم اكفأ من البيوتانول.

اما المستخلصات التي اخضعت لعملية الطرد المركزي 5000 دورة/دقيقة مدة 30 دقيقة فقد كانت نسب امتصاصها 1.1 و 0.9 و 0.7 للمستخلص المروق بالكلوروفورم والبيوتانول والاسيتون على التوالي، مما يشير الى عدم كفاءة استخدام هذه السرعة في ترويق الحبة اذ ان الفايروس قد يكون تحطم و فقد اثناء السرعة الواطئة للانتباذ المركزي.

ومما ذكر آنفاً من نتائج، يمكن الاستنتاج بان استعمال الكلوروفورم في ترويق العصارة والانتباذ المركزي بسرعة 15000 دورة/دقيقة لمدة 30 دقيقة ثم الترسيب بـ PEG (6000 دالتون) بنسبة 10% او كبريتات الامونيوم 51% والانتباذ مرة ثانية على 15000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة كان الأكفأ من بين الطرق الاخرى المختبرة التي استعمل فيها الاسيتون او البيوتانول في الترويق ، او تلك التي استعملت فيها السرعة 5000 دورة/دقيقة للمذيبات الثلاثة ، اذ

اشارت نسبة امتصاص الضوء على الطولين الموجيين 260 : 280 ، 1.2 الى جسيمات عصوية بنقاوة جيدة لفايروس BYMV على مستوى التنقية الجزئية مقارنة بـ 1.375 و 1.17 عند استعمال البيوتانول والاسيتون على التوالي.

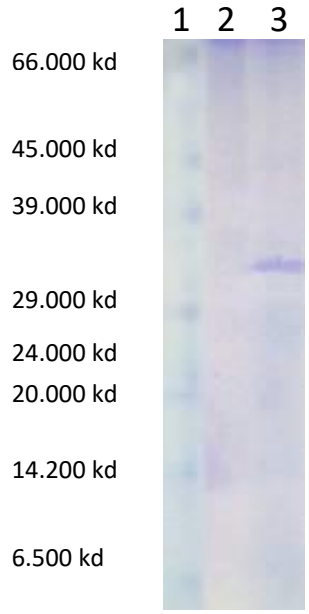
اختبار حيوية الفايروس المنقى: ظهرت بقع صفراء على الاوراق المعداة للزربيح عند اجراء عدوى بالتحضيرة المنقاة التي استعمل فيها الكلوروفورم ، في حين لم تظهر مثل هذه البقع عند اجراء عدوى بالتحضيرة التي استعمل فيها البيوتانول او الاسيتون، وهذا يشير الى احتمال فقدان الفايروس او تحطمه اثناء عملية التنقية وفقدان فعاليته الحيوية.

وقد ذكر Kerlan (21) ان انخفاض قدرة الفايروس على العدوى اثناء عملية التنقية يعود الى تجمع جسيمات الفايروس فضلا عن فقدان نسبة من الفايروس وهذا ما وجد فعلا عند قياس نسبة امتصاص الضوء على الطولين الموجيين 260 : 280 اذ وجدت 1.375 و 1.17 مما يشير الى وجود جسيمات فايروسية متحطمة مع الشوائب النباتية عند استعمال البيوتانول او الاسيتون.

الاختبار المصلي للتحضيرة المنقاة: ظهر تلازن عند خلط قطرة من المصل المضاد لفايروس BYMV مع قطرة من تحضيرة الفايروس المنقاة ، ولم يظهر مثل هذا التلازن عند خلط قطرة من مصل مضاد لفايروس AMV مع التحضيرة المنقاة. وهذا يشير الى ان الفايروس قد احتفظ بخصائصه المصلية بعد عملية التنقية باستعمال الكلوروفورم في ترويق العصارة كما احتفظ بخصائصه الحيوية.

الترحيل الكهربائي لبروتينات الفايروس على هلام الاكريلامايد SDS-PAGE :

أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الاكريلامايد 10% بوجود SDS لعينات من التحضيرة النقية للفايروس ومستخلص من اوراق نبات باقلاء سليم اخضع لخطوات عملية تنقية الفايروس (مقارنة) نفسها ، وجود حزمة بروتينية رئيسة وزنها الجزيئي 34 كيلودالتون (شكل 3) تمثل بروتين الغلاف للفايروس (العمود 3) وهذا يشير الى ان الفايروس ينتمي الى مجموعة *Potyvirus* ، اذ ذكر Hull (19) و Chang وجماعته (12) وChen وجماعته (14) ان الوزن الجزيئي للغلاف البروتيني لفايروسات جنس *Potyvirus* يتراوح بين 30 و 47 كيلودالتون ، وذكر Huttinga (20) و Tsuji وجماعته (31) وعذاب (5) ان الوزن الجزيئي للغلاف البروتيني لفايروس BYMV يقدر بـ 34 كيلودالتون ، ووجد Larsen وجماعته (23) ان الوزن الجزيئي للغلاف البروتيني لفايروس BYMV بلغ 32 كيلودالتون ، في حين أشار Matsumoto وجماعته (25) الى ان الوزن الجزيئي للغلاف البروتيني لفايروس BYMV بلغ 35 كيلودالتون. وقد يعود اختلاف الوزن الجزيئي للفايروس نفسه الى وجود سلالات من الفايروس تختلف باختلاف النبات العائل وكذلك المكان الذي اجريت فيه الدراسة. في حين لم تظهر مثل هذه الحزمة في العمود الحاوي على عينة مستخلص نبات باقلاء سليم اخضع لخطوات التنقية نفسها (شكل 3 ، العمود 2) مما يؤكد ان الحزمة البروتينية الظاهرة في العمود 3 تمثل بروتين الغلاف لفايروس BYMV قيد الدراسة.



(**1**) البروتينات القياسية المستعملة في تقدير الوزن الجزيئي للبروتين. (**2**) عينة من نبات سليم اخضع لخطوات التنقية (مقارنة). (**3**) تحضيرة الفايروس **BYMV** المنقاة.

شكل 3 : نمط الترحيل الكهربائي لعينات فايروس موزائيك الفاصوليا الاصفر BYMV المنقاة على هلام متعدد الاكريلامايد تركيز 10% بوجود 1,0 % SDS.

اصبح تقدير الوزن الجزيئي لبروتينات الغلاف الفايروسي من التقانات الشائعة الاستعمال في الوقت الحاضر كأحد طرائق التشخيص والكشف عن الفايروسات في النباتات المصابة ، اذ ان التعرف على الوزن الجزيئي لبروتينات الغلاف الفايروسي ممكن ان يعطي معلومات مهمة عن نوع الفايروس وبعض خصائصه، كما يمكن مع استعمال الطرق الاخرى في التشخيص ، التوصل الى تشخيص دقيق للفايروس المدروس (**4** ، **5** ، **6** ، **8** ، **14** ، **32**).

المصادر

1- العاني، رقيب عاكف وياش بال راثي (**1984**). فايروسات النبات، أساسيات التجارب العملية، مطبعة جامعة بغداد، العراق.

2- الكويتي، نورس عبد الإله ورقيب عاكف العاني (**1999**). التوصل إلى طريقة سهلة لتنقية فايروس **A** البطاطا (**PVA**) ودراسة خصائصه المصلية. مجلة إباء للأبحاث الزراعية **9**: **321 – 330**.

3- صادق، نورس عبد الإله (**1999**). دراسة تشخيصية لفايروس البطاطا **A** في العراق. رسالة ماجستير – كلية الزراعة – جامعة بغداد،العراق.

4- صبر، ليلى جبار **(2005)**. تحديد أربع سلالات لفايروس موزائيك الخيار مصليا وبايولوجيا وعلاقتها بالامراضية. رسالة ماجستير– كلية الزراعة– جامعة بغداد، العراق.

5- عذاب، مصطفى علي (**2009**). دراسة بروتينات الغلاف لثلاثة فايروسات نباتية وإمكانية استخدامها كأدلة في الكشف عنها. رسالة ماجستير – كلية الزراعة – جامعة بغداد، العراق.

6- **Abo El-Ela, A.A.; M.A. Amer and F. Abo El-Abbas (2005). *Celery yellow mosaic potyvirus* affecting Umberlliferae plants in Egypt. Egyptian Journal of Virolology ,2(1): 269-282.**

7- **Al-Bitar, L. and E. Luisoni (1995). *Tomato yellow leaf curl geminivirus*: Serological evaluation of an improved purification method. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 25: 269-276.**

8- **Alper, M.; R. Salomon and G. Loebenstein (1984). Gel electrophoresis of virus-associated polypeptides for detecting viruses in bulbous irises. Phytopathology, 74(8): 960-962**

9- **Bos, L. (1970). *Bean yellow mosaic virus*. Description of plant viruses. No. 40. Association of Applied Biology, Kew, Surrey, England. 4 pages**

10- **Bos, L.; R.O. Hampton and K.M. Makkouk (1988). Viruses and virus diseases of pea, lentil, faba bean and chickpea. Pages: 591-615. In: World Crops: Cool Season Food Legumes. R.J. Summerfield (Ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. 1179.**

11- **Büchen-Osmond, C. (2006). *Bean yellow mosaic virus*. International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTVdB- The Universal Virus Database, version 4. www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdB/ICTVdB/**

12- **Chang, C.A.; C.C. Chen and H.T. Hsu (2002). Partial characterization of two *potyviruses* associated with golden spider lily severe mosaic disease. Acta Horticulturae 568:127-134.**

13- **Chang, C.A.; E. Hiebert and D.E. Purcifull (1988). Purification, and immunological analysis of nuclear inclusions induced by *Bean yellow mosaic* and *Clover yellow vein potyviruses*. Phytopathology 78: 1266-1275.**

14- **Chen, C.C.; H.-T. Hsu; Y.H. Cheng; C.H. Huang; J.-Y. Liao; H.T. Tsai and C.-A. Chang (2006). Molecular and serological characterization of a distinct *potyvirus* causing latent infection in *calla lilies*. Botanical Studies 47: 369-378.**

15- **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.**

16- **Dhar, A.K.; R.P. Singh. (1994). Improvement in the sensitivity of PVY^N detection by increasing the Cdna probe size. J. Virological Methods 5: 197-210.**

17- **El-Muadhidi, M.A.; K.M. Makkouk; S.G. Kumari; M. Jerjees, S.S. Murad; R.R. Mustafa and F. Tarik (2001). Survey for legume and cereal viruses in Iraq. Phytopathologia Mediterranea 40: 224-233**

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

19- **Hull, R. (2002). Matthews' Plant Virology. Fourth edition. Academic Press, London, UK. pp. 100**

20- **Huttinga, H. (1973). Properties of viruses of the *potyvirus* group. I. A simple method to purify *Bean yellow mosaic virus*, *Pea mosaic virus*, *Lettuce mosaic virus* and *Potato virus Y^N*. Netherland Journal of Plant Pathology 79: 125-129**

21- Kerlan, C. (2006). *Potato Virus Y*. CMI\AAB, Description of Plant Viruses. No. 414. pp. 23.

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

23- Larsen, R.C.; W.J. Kaiser; S.D.Wyatt; K.L. Buxton-Druffel and Berger, P.H. (2003). Characterization of a New *Potyvirus* Naturally Infecting Chickpea. Plant Disease 87(11): 1366–1371.

24- Makkouk, K.M.; L. Bos; O.I. Azzam; S.G. Kumari and A. Rizkallah (1988). Survey of viruses affecting faba bean in six Arab countries. Arab Journal of Plant Protection 6: 53-61

25- Matsumoto, J.I.; T. Maeda and N. Inouye (1999). Some properties of *Bean yellow mosaic virus* isolated from *Calanthe* sp. (Orchidaceae) in Japan. Bulletin of Research Institute of Bioresourses, Okayama Univ. 6: 43-51.

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

27- Pierce, D. (1934). Viruses of the beans. Phytopathology, 24: 87-115.

28- Reddick, B.B. and O.W. Barnett. (1983). A comparison of three *potyviruses* by direct hybridization analysis. Phytopathology, 73(11): 1506-1510.

29- Sasaya, T.; T. Shimizu; Y. Nozu; M. Nishiguchi; N. Inouye and Koganezawa, H. (1997). Biological, serological and molecular variabilities of *Clover yellow vein virus*. Phytopathology, 87(10): 1014.

30- Singh, R. and P. Mcdoland (1981). Purification of *potato virus A* and it's detection in potato by Enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA). Amer. Pot. J. 58 :181-189.

31- Tsuji, T.; T. Maeda; H. Kondo and N. Inouye (1996). Characterization of *Bean yellow mosaic virus* from *Ixia hybrida*. Bulletin of Research Institute of Bioresourses, Okayama Univ. 4: 201-213.

32- Turina, M.; M. Ciuffo; R. Lenzi; L. Rostagno; L. Mela, E. Derin and S. Palmano (2006). Characterization of Four Viral Species Belonging to the Family *Potyviridae* Isolated from *Ranunculus asiaticus*. Phytopathology 96(6): 560-566.

33 Uyeda, I., M. Kojima and D. Murayama (1975). Purification and serology of *Bean yellow mosaic virus*. Annals of Phytopathology Society of Japan 41: 192-203.

34- Van Regenmortel, M.H.V. (1964). Purification of plant viruses by zone electrophoresis. Virology 23(4): 495-503.

35- Wetter, C. (1964). Serology in virus disease diagnosis. Annual Review of Phytopathology 3: 19-42.

36- Yahia, A.A.; M.A. Ouada; H. Illoul and M.I. Tair (1997). First occurrence of *Bean yellow mosaic potyvirus* on chickpea in Algeria. EPPO Bulletin, 27(2-3): 261–263.

Iraqi J. Agric. Res. Vol.17 No.1 pp.74 –84 Dec. /2012

EVALUATION THE EFFICIENCY OF DIFFERENT TECHNIQUES FOR PURIFICATION OF *Bean yellow mosaic potyvirus* (BYMV) AND STUDY OF SOME MOLECULAR PROPERTIES

M. A. Adhab

ABSTRACT

This study was carried out to evaluate the efficiency of different techniques for purification of *Bean yellow mosaic potyvirus* (BYMV) and study some of its molecular properties. Results obtained showed that chloroform was more effective in clarification of the sap and elimination of plant proteins as well as chlorophyll. The centrifugation at 15000 rpm for 30 min and precipitation by PEG (6000 Dalton) or ammonium sulfate and repeated at 15000 rpm for 15 min was more effective compared with the other test methods. The absorption ratio at 260/280 nm for the partially purified virus was found to be 1.2 which indicate good purity of virus. The analysis of purified BYMV samples by electrophoresis on 10% polyacrylamide gel containing 0.1% SDS revealed 34 Kd protein band, represent the virus coat protein. This band was absent in extract from healthy faba bean plants submitted to the same steps of virus purification.

College of Agric.- Baghdad Univ.- Baghdad, Iraq.