تشخيص وتنقية فايروس موزائيك الطماطة (ToMV) وتحضير مصله المضاد باستعمال مح بيض الدجاج الممنع .

نبيل عزيز قاسم أناهيد وعد الله دحام

*أستاذ - قسم وقاية النبات - كلية الزراعة والغابات - جامعة الموصل، dr_nabel2@yahoo.com.

**رئيس مهندسين - دائرة بحوث السدود - وزارة الري.

المستخلص

شخص فايروس موزائيك الطماطة باستعمال مجموعة مختارة من النباتات الكاشفة. نجحت طريقة التنقية بالانتباذ الواطئ والعالي والترسيب بكبريتات الأمونيوم بعد الترشيح الهلامي بعمود الاكاروز في تنقية فايروس موزائيك الطماطة من أوراق التبغ المحلي المصابة على مستحضر فايروسي نقي، بلغت نقاوته 1.3 ومقدار تركيزه في الأوراق المصابة 1.3 ملغم/غم عصير نباتي، كما ثبتت فاعلية الفايروس النقي في إحداث الإصابة على نبات التبغ البري وكانت درجة التعادل الكهربائي للفايروس المنقى عند الاس الهيدروجيني 4.4 حيث ترسب الفايروس بشكل عكورة واضحة في المستحضر الفايروسي.

امكن تحضير مصل مضاد كفوء باستعمال بيض الدجاج الممنع بالفايروس بالحصول على مصل مضاد ثبتت كفاءته بالكشف عن الفايروس باختباره بالانتشار المناعي المزدوج في الأكار والتلازن على الشريحة الزجاجية .

الكلمات المفتاحية: فايروس موزائيك الطماطة، بيض الدجاج الممنع.

المقدمة

يعد نبات الطماطة (Tomato) واسمه العلمي (Mill) *Lycopersicon esculentum* من نباتات العائلة الباذنجانية Solanaceae، والتي تضم 90 جنسا وما يقرب من 2000 نوع من النباتات. تزرع الطماطة في المناطق الجافة والمعتدلة، ويعتقد أن الطماطة المزروعة ترجع في نشأتها إلى صنف الطماطة البري ذي الثمار الصغيرة *L.esculentum* var. cerasiform الذي ينمو في أمريكا الجنوبية، وقد كانت بداية زراعتها في المكسيك. (شريف، 2004) .

يصاب محصول الطماطة بالعديد من الفايروسات التي تتباين في شدتها على النبات وهناك ما يقرب من عشرة فايروسات هي الأخطر على الطماطة إذ تنتشر عالميا وتسبب خسائر كبيرة في المحصول، وتعد من محددات زراعة الطماطة في العديد من مناطق العالم (Gooding، 2008 ؛ Kucharek وآخرون، 2009) ويعد فايروس موزائيك الطماطة (ToMV) *Tomato mosaic virus* الذي سجل في عدة دول عربية هي مصر وعمان والجزائر والأردن والسودان ولبنان وتونس واليمن وسورية وعدد كبير من دول العالم من بين أكثرها انتشارا (مكوك وآخرون، 2008) وتعود خطورته إلى سعة انتشاره وما يسببه من خسائر كبيرة حيث يؤثر على الإنتاجية ونوعية وأعداد الثمار، فقد وصلت نسبة الإصابة به في بعض دول العالم الى 50% وهو ينتشر بشكل وبائي في بعض المواسم (Duarte وآخرون،2001).

أمكن تنقية الفايروس بالاستخلاص في محلول منظم فوسفاتي ذي أس هيدروجيني (pH) 7.4 باستعمال المذيب العضوي البيوتانول ثم الترسيب بالانتباذ التناوبي والترسيب بالبولي اثيلين كلايكول (PEG) 6000 (Sadik وآخرون، 2000). وأشار Holling و Huttinga (1976) إلى نجاح تنقية الفايروس من النبات إذ تم الحصول على 60 ملغم فايروس لكل غم نسيج نباتي طازج، وأن معظم طرائق التنقية لا تحتاج إلى انتباذ عالٍ ومنها الطريقة التي اقترحها Gooding وHebert (1967) والتي

تاريخ استلام البحث 23 / 6 / 2013 .
تاريخ قبول النشر 13 / 11 / 2013 .

تلخصت بتجميد الأوراق لمدة 24 ساعة ثم سحقها مع المنظم الفوسفاتي مع إضافة مواد مانعة للتأكسد والترسيب باستعمال البولي اثيلين كلايكول. كما نجحت تنقية فايروس ToMV بأنواع من اعمدة الفصل بتقانة الترشيح الهلامي ومنها هلام الاكاروز 1% ، كما استعملت أيضاً أعمدة الحبيبات الزجاجية التي بحجم ثقوب 70 نانوميتر (Duarte وآخرون، 2001 ؛ Kramberger وآخرون، 2004 ؛ Boben وآخرون ، 2007 ؛ Cherian وآخرون، 2009).

المواد وطرائق البحث

جمعت أوراق من نباتات مصابة من حقول الطماطة في منطقة الرشيدية ظهر عليها اعراض موزائيك وتشوه طفيف للأوراق مع التفافها قليلا للأعلى وتقزم عام للنبات. حفظت العينات في اكياس ورقية في المجمدة عند (-18مْ) لحين الاستعمال .

1. التشخيص باستعمال النباتات الكاشفة: اخذت اوراق من العينات المحفوظة بالتجميد وسحقت في هاون خزفي في محلول المنظم الفوسفاتي (Phosphate buffer KH_2PO_4) وبنسبة 1: 2 وزن: حجم (أوراق : محلول منظم) بتركيز 0.01 مولاري وباس هيدروجيني 7.6 مضافٍ إليه 0.2% مادة الكارباميت ثنائي الاثيل ثنائي الكبريت Sodium Diethyl Dithio Carbamet (Na-DECA) بمقدار 1 مل/غم نبات للتخلص من تأثيرات الأنزيمات المحللة للبروتين. رشح المستخلص عبر طبقتين من الشاش وأستعمل الراشح في التلقيح بطريقة الأصبع بوجود مسحوق الكربوراندم (400 مش)، ولقحت بالمستخلص أوراق النباتات الكاشفة المبينة في الجدول (1) بمرحلة نمو 4-6 أوراق على وفق ما ذكره Holling و Huttinga (1976) ؛ Osmond (2006) في اصص بلاستيكية بقطر 15سم تحوي تربة مخلوطة بالبتموس بنسبة 1:3 والمعقمة بالفورمالين. حفظت النباتات في البيت البلاستيكي مع مراعاة السقي والتسميد بالسماد الكيميائي المركب N.P.K (18: 18:18).

جدول1. نباتات الاختبار المستعملة لتشخيص فايروس ToMV.

الاسم العربي	الاسم الانكليزي	الاسم العلمي
الفلفل	Pepper	*Capsicum annum*
الزربيح	Goosefoot	*Chenopodium amaranticolor*
الداتورة	Jimsonweed	*Datura stramonium*
جومفرينا (ورد الدكمة)	Amaranth	*Gomophrena globosa*
الطماطة	Tomato	*Lycopersicon esculentum*
التبغ البري	Wild Tobacco	*Nicotiana glutinosa*
التبغ (صنف محلي)	Tobacco	*N. tabaccum*
الفاصوليا	Bean	*Phaselous vulgaris*
المنطاد	Winter cherry	*Phyalis floridana*
الباذنجان	Eggplant	*Solanum melongena*
اللوبيا	Cowpea	*Vigna sinensis*

2. حفظ عزلة فايروس موزائيك الطماطة:

جمعت أوراق عشرة نباتات من التبغ البري *N. glutinosa* التي ظهرت عليها أعراض البقع الموضعية الميتة. فصلت تلك البقع بوساطة ثاقبة فلين ثم سحقت في هاون خزفي مع حجم ملائم من المحلول المنظم الفوسفاتي (KH_2PO_4) بتركيز 0.01 مولر واس هيدروجيني 7.6. رشح المستخلص من خلال طبقة مزدوجة من الشاش ولقحت به ميكانيكا عشرة نباتات تبغ *N.tabaccum* (صنف محلي) بمرحلة4-6 أوراق وحفظت النباتات في البيت البلاستيكي كنباتات حفظ للعزلة الفايروسية.

3. تنقية فايروس موزائيك الطماطة (ToMV)

أ. الاستخلاص: تمت التنقية وفق طريقتي التنقية بالترشيح الهلامي والانتباذ. وهي طريقة محورة اعتمدت على طرائق التنقية التي استعملها Gooding و Herbert (1967) ؛ قاسم (1997) ؛ Sadik وآخرون (2000). تم جمع 500 غم من أوراق نبات التبغ *N. tabaccum* (صنف محلي) المصابة بالعزلة النقية للفايروس والذي يعد من نباتات الإكثار للفايروس (Holling و Huttinga، 1976؛ Osmond، 2006) والتي ظهرت عليها إعراض موزائيك شديد وذلك بعد تجميدها في مجمدة حوضية عند -18م لمدة 24 ساعة. سحقت الأوراق في خلاط كهربائي لمدة دقيقتين مع المحلول المنظم الفوسفاتي (KH_2PO_4) تركيز 0.01 مولاري واس هيدروجيني 7.6 بنسبة 1:2 (محلول منظم : أوراق) مضافٍ إليه مادة الأثيلين ثنائية الأمين Ethylene diamine tetra acetate (EDTA) بتركيز 0.01 مولاري وحامض الاسكوربيك (Ascorbic acid) بتركيز 0.1 مولاري. كمادة مختزلة وعدة قطرات من مادة Tween-80 كمادة ناشرة. تمت تصفية المستخلص بقطعة مزدوجة من قماش الشاش في بيكر معقم. نقل الراشح مباشرة إلى أنابيب انتباذ وبمقدار 100 مل لكل أنبوبة ثم عرض إلى انتباذ واطئ في جهاز الانتباذ Unic-power spin L وبسرعة 4000 دورة/ دقيقة ولمدة 15 دقيقة، جمع الطافي في بيكر معقم موضوع في حمام ثلجي.

ب. التصفية: تمت تصفية رائق المرحلة السابقة باستعمال عمود السيفادكس الذي تمت تهيئته باستعمال مادة السيفادكس G200 (Sephadex) وهو القياس المستعمل لفصل البروتينات والأحماض النووية اعتمادا على الوزن الجزيئي وحجم المادة ، (Al-Sawaf، 2004). أجريت عملية تنشيط لحبيبات السيفادكس بمزجها مع الماء بمقدار (1غم) سيفادكس لكل 10 مل ماء مقطر في بيكر وعلى درجة حرارة 30مْ مع الرج المستمر كل 10-15 دقيقة ثم وضعت في حمام مائي على درجة 83مْ لمدة ثلاث ساعات مع الرج كل 10-15 دقيقة ثم بردت الى 50مْ. استعمل عمود زجاجي بطول 60 سم وقطر 2.5 سم تم غسله بالماء المقطر ثم وضعت في نهايته قطعة من الصوف الزجاجي لمنع خروج مادة السيفادكس. ملئ العمود بمادة السيفادكس بالاستعانة بقضيب زجاجي وسكب ببطء شديد لمنع تكسر جزيئات الهلام ومنع تكوين فقاعات هوائية. تم غسل الهلام بالماء المقطر ثم بالمحلول المنظم الفوسفاتي KH_2PO_4 تركيز 0.01 مولاري واس هيدروجيني 7.6 وضبط معدل التدفق (Flow rate) عند 3 مل / 15 دقيقة، ملئ العمود بالماء المقطر عند عدم الاستعمال. وكان الحجم النهائي المستعمل للعمود هو 30 مل. أضيف 30 مل من المستخلص النباتي بحذر على الجدار الداخلي للعمود تجنبا لأي تأثير على سطح الهلام ثم استقبلت أجزاء الراشح (Fractions) بعد حساب كمية الماء المقطر الموجود أصلا في العمود ، في قنانٍ زجاجية معتمة ومعقمة بحجم 5 مل (6 قناني لكمية المستخلص الكلية) والتي رقمت حسب تسلسل نزول الراشح ثم فحصت مباشرة طيفيا بجهاز المطياف عند الطول الموجي 260 نانوميتر، واختير الراشح في القنينتين الثالثة والرابعة لأنه حقق أعلى امتصاص طيفي وأهملت الأجزاء الأربعة الأخرى. كررت عملية الترشيح بالعمود 15 مرة وجمعت نواتج الرواشح والتي بلغت 150 مل وهي الكمية التي تمثل ناتج جمع 30 قنينة من القنينتين الثالثة والرابعة.

ج. التنقية النهائية للفايروس: نقل المحلول الناتج من الخطوة السابقة فورا إلى أنابيب جهاز الانتباذ نوع Cryofuge-6-cooling وذلك بعد إضافة مادة كبريتات الامونيوم $(NH_4)_2SO_4$ كمادة مرسبة للفايروس بمقدار نصف حد الإشباع إلى المحلول(Dioxin و Weeb،1961). (تم مسبقا حساب نصف

حد الإشباع للمادة بإضافتها تدريجيا إلى 150 مل من الماء المقطر، لحين توقف الإذابة وظهور راسب المادة). أجري انتباذ بسرعة 13000دورة/دقيقة تحت التبريد (4مْ) لمدة ساعتين، علق راسب كل أنبوبة في 5 مل من المحلول المنظم الفوسفاتي تركيز 0.01 مولاري واس هيدروجيني 7.6 ثم جمعت المعلقات في بيكر نظيف ونقلت إلى كيس الفصل الغشائي (الديلزة).

د. عملية الفصل الغشائي (الديلزة) Dialysis: أجريت هذه العملية للتخلص من ملح كبريتات الأمونيوم في المستحضر الفايروسي عبر غشاء الديلزة بسبب انخفاض وزنه الجزيئي مقارنة بالوزن الجزيئي للفايروس باستخدام غشاء نصف ناضح وهو كيس الفصل الغشائي المصنوع من السيلوفان، وضع 50 مل من المستحضر الفايروسي في كيس الديلزة المحكم الربط من احد نهايتيه، ثم ربطت النهاية الثانية بعد وضع المحلول فيه. غمر الكيس في بيكر يحتوي ماء مقطراً وأجريت العملية بدرجة 4 مْ في حمام ثلجي باستعمال الرجاج المغناطيسي(Magnetic stirrer) واستمرت عملية الفصل الغشائي لمدة 48 ساعة مع مراعاة تبديل الماء المقطر كل ست ساعات. تم التأكد من التخلص الكامل من ايونات الكبريتات بإضافة كلوريد الباريوم بتركيز 1% إلى الماء المقطر اذ يتكون راسب أبيض من كبريات الباريوم عند وجود ايونات الكبريتات، (Harne وآخرون، 1994) نقل كيس السيلوفان إلى بيكر يحوي محلولاً من البولي اثلين كلايكول تركيز30% (PEG-6000) لغرض سحب الماء من داخل كيس الفصل، (الشماع،2001).

هـ. اختبارات فعالية ونقاوة الفايروس المحضر: تم إجراء الاختبار الحيوي للكشف عن فعالية فايروس موزائيك الطماطة في المستحضر الفايروسي النقي باستعمال نباتات التبغ البري *N. glutinosa* كنبات كاشف بمرحلة نمو (4-5) أوراق وبواقع خمسة نباتات (مكررات). لقحت الأوراق ميكانيكيا بجزء من المستحضر الفايروسي النقي مباشرة بعد انتهاء عملية التنقية، وأخذت النتائج بحساب عدد البقع الموضعية لكل ورقة.

قدر امتصاص المستحضر الفايروسي النقي للضوء فوق البنفسجي عند الطولين الموجيين 260 و 280 نانوميتر، باستعمال جهاز المطياف الضوئي نوع APEL,PD-303UVspectrophotometer واستخرجت قيمة نقاوة الفايروس وفق المعادلة الآتية :

$$\text{نقاوة الفايروس} = \frac{\text{الامتصاص للمستحضر الفايروسي قيمة عند 260 نانوميتر}}{\text{قيمة الامتصاص للمستحضر الفايروسي عند 280 نانوميتر}}$$

وكذلك حسب تركيز الفايروس بالملغرام لكل غرام عصير نباتي على وفق المعادلة الآتية :

$$\text{تركيز الفايروس ملغم / غم عصير نباتي} = \frac{\text{قيمة الامتصاص للمستحضر الفايروسي عند 260 نانوميتر}}{\text{معامل انطفاء الفايروس}}$$

وذلك حسب ما ذكره Noordam (1973) ؛ العاني وراثي (1984).

و. قياس درجة التعادل الكهربائي للمستحضر الفايروسي النقي Isoelectric point

أضيف 100 مل من المستحضر الفايروسي النقي إلى بيكر نظيف وتم قياس الاس الهيدروجيني للمستحضر بوساطة جهاز القياس pH meter، ثم أضيف محلول هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) تركيز 1 مولاري تدريجيا بوساطة قطارة إلى المستحضر الفايروسي مع الرج الهادئ باليد لحين وصول الاس الهيدروجيني للمحلول إلى 4.6. نقلت الكمية إلى أنبوبتي انتباذ وعرضت إلى قوة انتباذ 13000

دورة في الدقيقة لمدة نصف ساعة، واخذ الراسب الذي أعيدت إذابته في المحلول الفوسفاتي (KH_2PO_4)، (Hull ،2002).

4. تحضير المصل المضاد لفايروس موزائيك الطماطة ToMV

تم تحضير المصل المضاد على وفق الطريقة التي ذكرها Bar- Joseph (1980) حيث استخدمت أربع دجاجات من الصنف البياض (لومان Lohman) بعمر 30 أسبوعاً تم الحصول عليها من حقل دواجن النهرين في الموصل. ويمثل هذا العمر الفترة النشطة للدجاج في وضع البيض، لقحت كل دجاجة بإبرة انسولين بمقدار 2 مل من المستحضر الفايروسي النقي الممزوج مع مساعد فروند غير الكاملIncomplete Freunds' Adjuvant حيث تم تحضير مستحلب فوري منها بتكرار عملية الحقن والتفريغ في الإبرة. وتم الحقن في عضل الرجل اليسرى، كررت الحقنة الثانية بعد ثلاثة أيام من الأولى، وتركت الدجاجات لمدة ثمانية أيام من التمنيع ثم جمعت عشر بيضات وفصل مح البيض بحذر في بيكر وغسل بكمية من الماء المقطر مع المحافظة عليه كاملا مع غشائه الخارجي. نقل المح إلى أنبوبة مدرجة (سلندر) بالاستعانة بقمع لقياس حجمه الكلي الذي بلغ 200 مل ثم أضيف اليه 400 مل من المحلول المنظم الفوسفاتي تركيز 0.01 مولاري واس هيدروجيني 7.6 و30 غم من ملح كلوريد الصوديوم النقي NaCl بتركيز نهائي قدره 0.1 مولاري، وأضيف 10 غم من مادة البولي اثيلين كلايكول (PEG-6000). خلط المزيج في خلاط كهربائي لمدة خمس دقائق وذلك لضمان ذوبان PEG بالكامل ثم نقل إلى أنابيب الانتباذ باستعمال جهاز الانتباذ نوع Cryofuge-6-cooling وعرض إلى انتباذ بسرعة 13000دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق واخذ الرائق المائي وتركت الطبقة الدهنية في أسفل الأنبوبة والتي احتوت على الطبقة الليبيدية الصفراء. رشح الرائق عبر طبقة مزدوجة من الشاش وكان الحجم النهائي له 250 مل. أضيف إليه PEG-6000 بتركيز نهائي 12% ونقل فورا إلى أنابيب الانتباذ الواطئ باستعمال الجهاز نوع Unic powers pin L وعرض لسرعة 4000 دورة/ دقيقة واخذ الراسب الذي كان بحجم 50 مل وأضيف له المحلول المنظم الفوسفاتي KH_2PO_4 تركيز 0.01 مولاري واس هيدروجيني 7.6 بحجم يساوي حجم المح المخفف الأصلي ، وبذلك تم الحصول على المصل المضاد بحجم نهائي 250 مل والذي حفظ في مجمدة حوضية (-18مْ) لحين اختبار كفاءته في تشخيص فايروس موزائيك الطماطة.

5. اختبار كفاءة المصل المضاد المحضر لفايروس موزائيك الطماطة

استعمل الاختباران المناعيان التاليان لمعرفة كفاءة المصل المضاد المحضر.

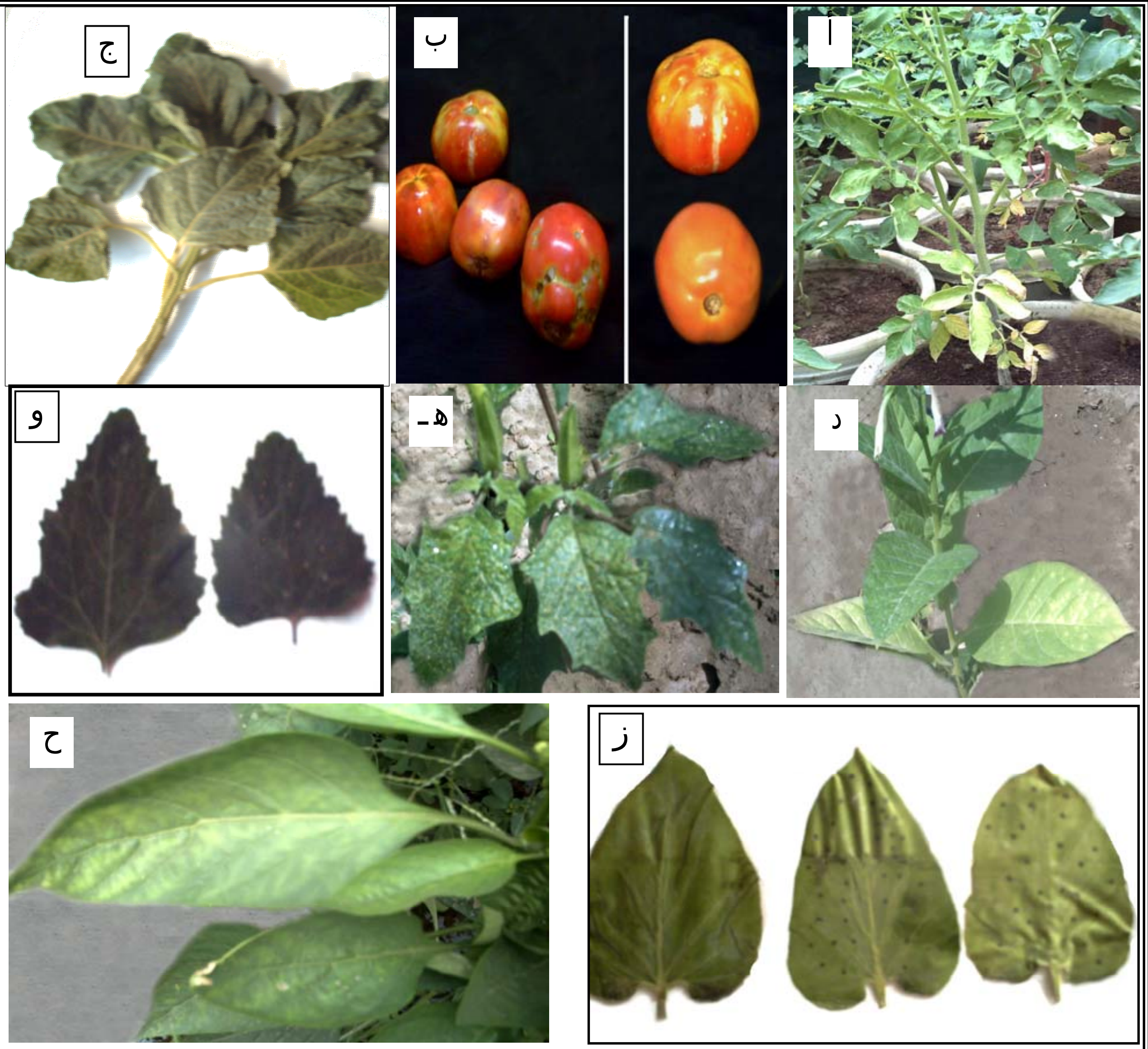
أ. اختبار الانتشار المناعي المزدوج في الاكار

نفذ الاختبار حسب طريقة Purcifull و Batchelor (1977) بإذابة 0.9 غم من الاكار النقي (Noble Agar) في 100 مل من المحول المنظم الفوسفاتي (KH_2PO_4) تركيز 0.01 مولاري واس هيدروجيني 7.6وأضيف إلى الأكار الذائب مادة كبريتات دودسيل الصوديوم Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) بتركيز نهائي في المحلول 0.5% لغرض تكسير جسيمات الفايروس العصوية والسماح لها بالانتشار في ثقوب الأكار ثم أكمل الحجم بالماء المقطر إلى 100 مل. أدخل إلى جهاز المعقام (ضغط 1.5 كغم / سم^2 وحرارة 121مْ ولمدة 15 دقيقة)، ثم صب الأكار السائل بعد تبريده في ثلاثة أطباق بتري بلاستيكية بقطر 8.5 سم بمقدار 20 مل/طبق، ووضعت الأطباق على سطح مستوٍ لحين التصلب ثم حفظت في الثلاجة لمدة 24 ساعة، عملت ست حفر محيطية وحفرة مركزية بوساطة ثاقبة فلين بقطر 7 ملم في كل طبق. وضع في الحفرة المركزية قطرات من المصل المضاد المحضر ووضع في الحفر المحيطية الخمس، العصير النباتي المحضر من أوراق طماطة مصابة بالعزلة النقية لفايروس (ToMV) ، فيما وضع في الحفرة السادسة عصير أوراق نبات طماطة سليم محضر بالطريقة ذاتها أعلاه. حضنت الأطباق عند درجة 25مْ لمدة 24 ساعة وبعدها تم ملاحظة النتائج بصريا وتصويرها فوتوغرافيا.

ب. اختبار التلازن على الشريحة الزجاجية: وضع 0.2 مل من عصير أوراق نبات الطماطة المصابة والمرشح عبر طبقتين من قماش الشاش، على الجهة اليسرى لشريحة زجاجية نظيفة بعد تأشير موضع القطرة على الشريحة بقلم شمعي للحفاظ على الشد السطحي لقطرة العصير ووضع على الجهة الأخرى المقدار ذاته من عصير نبات طماطة سليم ، أضيف 0.2 مل من المصل المضاد المحضر لكل من قطرتي العصير المصاب والسليم وخلط كل منهما بإبرة معقمة ثم نقلت الشريحة بحذر إلى طبق بتري يحوي ورق ترشيح مبلل بالماء واقفل الطبق وترك في درجة حرارة المختبر ثم أخذت النتائج بعد ساعة بالفحص البصري لقطرتي الشريحة، وصورت فوتوغرافيا، (قاسم و حسين، 2006).

النتائج والمناقشة

1. تشخيص فايروس موزائيك الطماطة: أظهرت نتائج التشخيص باستعمال النباتات الكاشفة المبينة في الجدول (1) ان الفايروس المعزول هو فايروس موزائيك الطماطة (ToMV) حيث كانت الاعراض على النباتات الكاشفة المستعملة كما يأتي : **الطماطة**: موزائيك جهازي اصفر أو اخضر وتشوه والتواء للأوراق وتنخرها وخاصة الأوراق السفلى وتشوه الثمار وتقزمها وظهور خطوط فلينية وبقع بنية. **الفلفل** : موزائيك اخضر مع تشوه وتجعد طفيف للأوراق. **الزربيح** : بقع موضعية بنية ومصفرة بدون إصابة جهازية . **التبغ البري** : بقع موضعية ميتة بدون إصابة جهازية. **التبغ المحلي** : موزائيك معتدل أصفر. **الداتورة** : بقع موضعية ميتة بدون إصابة جهازية. **الجومفرينا :** بقع موضعية ميتة بدون إصابة جهازية. **المنطاد :** موزائيك معتدل جهازي. **اللوبيا :** لم تظهر أعراض جهازية أو موضعية (نبات منيع). **الفاصوليا :** لم تظهر أعراض جهازية أو موضعية (نبات منيع). **الباذنجان :** إعراض موزائيك معتدل دون تشوه.(شكل1). إن الأعراض الموصوفة على النباتات أعلاه مماثلة لتلك التي وصفها Holling و Huttinga (1976) ؛ Osmond (2006) حيث اشاروا الى عدم اصابة الفاصوليا واللوبيا بهذا الفايروس ، وكذلك مماثلة لوصف Benlloch وآخران (2004) ؛ Mukasa وآخرون (2005) ؛ -EL Dougdoug وآخرون (2007) ؛ Kamenova وآخران (2009) للأعراض التي يسببها فايروس موزائيك الطماطة على النباتات الكاشفة المستعملة. إن هذا التوافق في الأعراض المشاهدة على النباتات الكاشفة مع الأعراض الموصوفة في المصادر يدل على أن الفايروس المسبب ToMV.



شكل 1. أعراض فايروس موزائيك الطماطة على النباتات الكاشفة المستعملة.

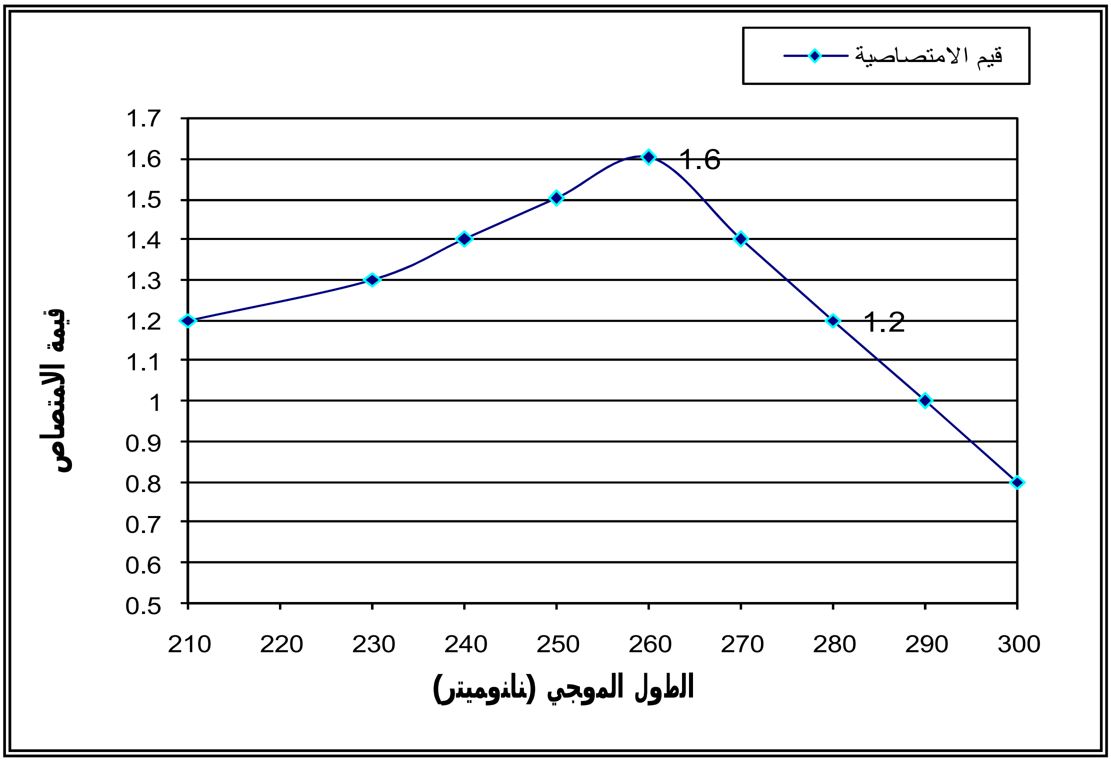
أ. موزائيك جهازي اصفر واخضر وتشوه والتواء الأوراق وتنخر الأوراق السفلى لنبات الطماطة.
ب. تشوه ثمار الطماطة وتقزمها وظهور خطوط فلينية وبقع بنية.
ج. موزائيك معتدل جهازي على نبات المنطاد.
د. موزائيك معتدل اصفر على نبات التبغ المحلي.
هـ. بقع موضعية ميتة بدون إصابة جهازية على نبات الداتورة.
و. بقع موضعية مصفرة بدون إصابة جهازية على نبات الزربيح.
ز. بقع موضعية ميتة بدون إصابة جهازية على أوراق التبغ البري.
ح. موزائيك اخضر وتشوه وتجعد طفيف لأوراق الفلفل.

2. تنقية فايروس موزائيك الطماطة

نجحت طريقة التنقية بالفصل بهلام الاكاروز والانتباذ العالي والديلزة، في تنقية فايروس ToMV ،إذ تم الحصول على فايروس موزائيك الطماطة نقيا في محلوله، وتم إثبات ذلك من خلال إجراء اختبارات النقاوة ،اذ اثبت الاختبار الحيوي الذي اجري للمستحضر الفايروسي النقي باستعمال نبات التبغ

البري كنبات كاشف كمي، وجود فايروس موزائيك الطماطة فعالا قادرا على الإصابة في المحلول، اذ ظهرت البقع الموضعية الميتة على أوراق النبات وبمعدل (24 بقعة / ورقة) ومن المعروف استجابة هذا النبات للفايروس بشكل بقع موضعية ميتة (Osmond، 2006). واظهر الاختبار الطيفي للمستحضر الفايروسي حصول أعلى امتصاص للضوء فوق البنفسجي عند الطولين الموجيين 260 و280 نانوميتر وبقيمة 1.6 و 1.2 على التوالي وكانت ذروة الامتصاص عند الطول الموجي 260 نانوميتر (شكل 2) وهذا دليل ان المستحضر الفايروسي النقي يحوي حامض نووي وبروتين وبالتالي وجود الفايروس.

بلغت قيمة نقاوة الفايروس 1.3 وهي مقاربة لنقاوة فايروس ToMV حسب ما ذكره Holling و Huttinga (1976) والتي بلغت 1.17 فيما أشار Cherian وآخران (2009) الى ان نقاوة فايروس ToMV بلغت 1.4. وهذا دليل على فاعلية طريقة التنقية المستعملة. كما تم حساب تركيز فايروس موزائيك الطماطة بالملغم/غم عصير نبات طماطة مصاب و بلغ 1.3 ملغم/غم عصير نباتي وهي كمية عالية تدل على كفاءة طريقة التنقية المستعملة.



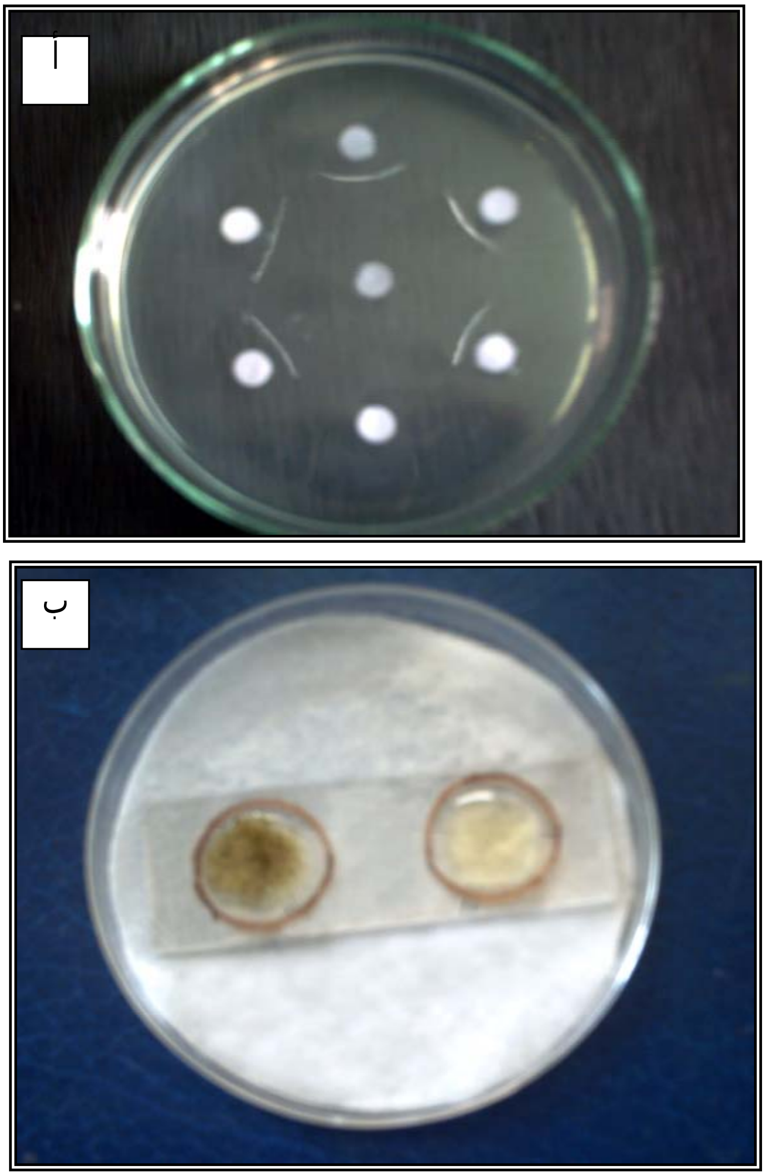
شكل 2. منحنى قيم امتصاص الأشعة فوق البنفسجية لمحلول فايروس موزائيك الطماطة النقي .

3. درجة التعادل الكهربائي لفايروس ToMV

أظهرت النتائج ان درجة التعادل الكهربائي للفايروس المنقى كانت عند الاس الهيدروجيني 4.4 إذ حصلت عكورة واضحة في المستحضر الفايروسي الناتج من التنقية وذلك بسبب ترسب الجسيمات الفايروسية وتكتلها، وهذه القيمة قريبة من التي ذكرها Holling و Huttinga (1976) وهي 4.6. ان هذه الظاهرة تميز البروتينات عموما، حيث تترسب عند نقطة تعادلها الكهربائي بتعادل عدد الشحنات الموجبة مع الشحنات السالبة وبالتالي فقدانها لقابليتها الذوبانية عند درجة تعادلها الكهربائي (Hull، 2002)، ولان الفايروسات النباتية العصوية عموما تحاط بغلاف بروتيني يغلف ما يقرب من 95% من كتلة الفايروس ومنها فايروس موزائيك الطماطة، عليه فان هذه الظاهرة تظهر فيها أيضاً وتعد صفة مميزة لكل فايروس.

4. إنتاج المصل المضاد لفايروس ToMV واختباره

نجحت طريقة تحضير المصل المضاد للفايروس باستعمال مح بيض الدجاج الممنع بفايروس ToMV والتي استعملت لأول مرة في العراق بالحصول على 250 مل من محلول المصل المضاد للفايروس وهي كمية كبيرة لا يمكن الحصول عليها باستعمال الارانب مصدرا للمصل المضاد، علما بان كمية الجلوبيولين المناعي الذي تتكون في مح كل بيضة يصل إلى 75 ملغم حسب ما ذكره Bar-Joseph (1980) وقد ثبت نجاح وفاعلية هذا المصل المحضر في تشخيص فايروس موزائيك الطماطة عند اختباره بالطريقتين المصليتين: الانتشار المزدوج في الأكار والتلازن على الشريحة الزجاجية حيث اظهر الاختبار الاول الاهلة الترسيبية حول حفر عصير النبات المصاب ولم تظهر حول حفرة عصير النبات السليم مما يدل على كفاءة المصل المحضر وكما يبين ذلك شكل (3 أ) ،فيما اظهر الاختبار الثاني تكتلا واضحا في قطرة خليط عصير النبات المصاب مع المصل المضاد ولم يظهر ذلك التكتل في قطرة المقارنة (شكل 3 ب).



شكل 3. اختباري الانتشار المزدوج في الأكار والتلازن على الشريحة الزجاجية لتقييم كفاءة المصل المضاد المحضر لفايروس موزائيك الطماطة .

أ. اختبار الانتشار المزدوج وظهور الأهلة الترسيبية البيضاء حول حفر العينات المصابة الخمسة وعدم ظهور الهلال حول حفرة عصير الطماطة السليمة السادس

ب. اختبار التلازن وظهور التلازن في قطرة عصير الطماطة المصابة (على اليسار) وعدم ظهوره في قطرة عصير الطماطة السليمة (على اليمين).

المصادر

الشماع، سراب داؤود مصطفى سليمان.2001. عزل وتنقية الذيفان المعوي لجراثيم *Salmonella* المعزولة من حالات الاسهال في مدينة الموصل. أطروحة دكتوراه. كلية العلوم. جامعة الموصل.

العاني، رقيب عاكف وباش بال راثي.1984. فايروسات النبات. اساسيات التجارب العلمية. مطبعة جامعة بغداد. 274 صفحة.

شريف، جنور هادي محمود.2004. استجابة بعض اصناف الطماطة *Lycopersicon esculentum* للمسافات الزراعية ومستويات النتروجين في منطقة السليمانية. رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة السليمانية.

قاسم، نبيل عزيز.1997. دراسات على فايروسات الحمص والعدس في محافظة نينوى. أطروحة دكتوراه. كلية الزراعة والغابات. جامعة الموصل.

قاسم، نبيل عزيز و نصير كاظم حسين. 2006. مسح وتشخيص بعض فايروسات قرع الكوسة في مركز محافظة نينوى. *مجلة زراعة الرافدين المجلد 34العدد (4): 140– 147*.

مكوك، خالد محي الدين وجابر ابراهيم فجلة وصفاء غسان قمري.2008. الامراض الفايروسية للمحاصيل الزراعية المهمة في المنطقة العربية، دار النهضة العربية، 631 صفحة.

Al-Sawaf, D. 2004. Isolation and purification of glucocer brosibase for human placenta tissue for treatment of jauchars disease. Ph .D.Thesis, Chemistry Dept., Mosul Univ.

Bar- Joseph, J. 1980. Hen egg yolk as source of antiviral antibodies in the enzyme linked immunosorbent assay. *J.Virol. Methods 1: 79-85.*

Benlloch, L., J. S. Soler and F. Nuez. 2004. Yield and fruit quality losses caused by ToMV in pepino (*Solanum muricatum* L.) and search for sources of resistance. *Euphytica 120: 247-256.*

Boben, J., K. Petra, P. Natasa and R. Maja. 2007. Detection and quantification of Tomato mosaic virus in irrigation waters. Eur. J. *Plant Pathol. 118: 59-71.*

Cherian, S., J. Joseph and H.S. Savithr. 2009. Characterization of Tobacco mosaic virus isolated from tomato in India. http://www.iisc.ernet.in/currsci/may.

Dioxin, M. and E.C. Weeb. 1961. "Tools of Biochemistry". JohnWiley and Sons, Inc. 370 PP.

Duarte, K.R., H.G. Luiz , L.G. Jaen, D.L. Jose and C.A.T. Flavio**.** 2001. Monoclonal antibodies to identify Tomato mosaic Tobamovirus. *Braz. J. Microbiol. 32: 240-242.*

El-Dougdoug, K.A., H. Hanaa, A. Gomaa and R.A. Daoud. 2007. Elimination of some viruses infecting Tomato plants by phyto-antivirus. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 3: 994-1001.

Gooding, G.V. and T.T. Herbert. 1967. A simple technique for purification of Tobacco mosaic virus in large quantities. *Phytopathology 57: 1285-1289.*

Gooding, G.V. 2008. Virus diseases of greenhouse tomato and their management. Plant pathology extension. Vegetable Disease Information Note 15(VDIN-0015).

Harne, S.D., V.D. Sharma, and H. Rohman. 1994. Purification and antigenicity of *Salmonella enterotoxin. Indian J. Med. Res. 99: 13-17.*

Holling, M. and H. Huttinga. 1976. Tomato mosaic virus. Descriptions of Plant Viruses, C.M.I / A.A.B. No.85.

Hull, R. 2002. Mathews, Plant Virology. (4th ed.) Academic Press, London, 1037 PP.

Kamenova, I., S. Adkins and D. Achor. 2009. Identification of Tomato mosaic virus infection in Jasmine. http://www.actahort.org.

Kramberger, P., M. Peterka, J boben, M. Ravnikar and A. Strancar. 2004. (Short monolithic columns a breakthrough in purification and fast quantification of Tomato mosaic virus. *Journal of Chromatography 1144:143-149.*

Kucharek, T., D. Purcifull and E. Hiebert. 2009.Viruses that have occurred naturally in agronomic and vegetable crops in Florida. Univ. of Florida IFAS Extension.

Mukasa, S.B., R. Amayo and S. Kyamanywa. 2005. Incidence of viruses and virus like diseases of hot pepper in central Uganda. Department of Crop Science, Makerere University, Kampala, Uganda.

Noordam, D. 1973. Identification of Plant Viruses : Methods and Experiments. Center for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen 207 PP.

Osmond, C. 2006. Tomato mosaic virus. ICTV dB Descriptions 00.010.0.04.003.

Purcifull, D.E. and D.L. Batchelor. 1977. Immunodiffusion test with sodium dodecyl Sulfate (SDS). Treated Plant Viruses and plant viral inclusions. Florida Agricultural Experiment Station. Bull. 788.

Sadik, A. ; H. Soweha; A. El Morsie and M. Enan. 2000. Biological, serological and molecular studies on an Egyptian isolate of Tomato mosaic Tobamovirus. Pages 53-75. In: Proceeding of the 9th. Congress of Phytopathology, Giza, Cairo, Egypt.

IDENTIFICATION AND PURIFICATION OF TOMATO MOSAIC VIRUS (ToMV) AND ANTISERUM PRAPARED BY USING IMMUNIZED CHICKEN EGGS.

N. A. Kassim* **A. W. Alchero ****

*Plant Protect. Dept. -College of Agriculture and Forestry- Mosul Univ. dr_nabel2@yahoo.com.
** Senior Engineer/Ministry of Irrigation

ABSTRACT

Tomato mosaic virus (ToMV) was diagnosed by using indicator plants. ToMV was purified by differential centrifugation, after filtrate by agarose gel filtration, from tobacco leaves its purity and concentration were 1.3 and 1.3 mg/gm. plant juice respectively , and it was effective in inducing infection on leaves of wild tobacco. The isoelectric point of the virus was 4.4 pH. The antiserum of ToMV was prepared by using immunized chicken eggs, and was tested by agar double diffusion and slide agglutination tests.

Key words: Tomato mosaic virus, immunized chicken eggs.