عزل ودراسة عدة عزلات من فيروس مزاييك الخيار (*virus cucumber mosaic*) على نبات التبغ البري ***nicotiana glauca graham*** في الساحل الغربي من ليبيا

محجوب على اجمال [1] عمر موسي السنوسي [2] صلاح سعيد العمارى [3]

DOI: https://doi.org/10.54172/mjsc.v22i1.1047

الملخص

باستخدام اختبار الاحتواء المزدوج – اليزا (das-Elisa) تم تعريف فيروس موزاييك الخيار (*virus cucumber mosaic*) كمسبب اساسي لاعراض المزاييك على نبات التبغ البري *Nicotiana Glauca* في 25 عينة من 5مناطق من ليبيا (سرت ، مصراته ، الخمس ، طرابلس ، و الزاوية) . و لقد وجد فيروس موزاييك الخيار منفردا في بعض العينات ، ومع فيروس اخر من جنس *Tobamo Virus* في معظمها . وشملت الدراسة المدي العوائلى لخمس عزلات من مناطق مختلفة على 33 نوعاً وصنفا نباتيا والتى اظهرت تفاعلات مختلفة من هذه العزلات .وقد بينت الدراسة ان درجة الحرارة المثبطة للفيروس تقع مابين 50-35 م ، درجة التخفيف النهائية مابين ($10^{-3} - 10^{-2}$) وكانت مدة بقاء الفيروس نشطا في المعمل للعزلات الخمس بين نصف يوم الى يوم كامل . تم تحضير مصل مضاد لعزلة مصراته ، وباستخدام هذا المصل مع اختبار اليزا غير المباشر اوضحت النتائج ان جميع عزلات الفيروس الخمس تتفاعل ايجابيا مع المصل المنتج لعزلة مصراته وكذلك لمصل فيروس موزاييك الخيار CMV المنتج بواسطة شركة BIO-RAD.

[1] كلية الزراعة ،جامعة التحدى ،سرت ، ليبيا

[2] كلية الزراعة ، جامعة عمر المختار ، البيضاء ،ليبيا .

[3] كلية الزراعة ، جامعة قاريونس ، بنغازي ، ليبيا .

© للمؤلف (المؤلفون)، يخضع هذا المقال لسياسة الوصول المفتوح ويتم توزيعه بموجب شروط ترخيص إسناد المشاع الإبداعي CC BY-NC 4.0

المقدمة

نبات التبغ البري كغيره من النباتات دائمة الخضرة يعتبر ذا اهمية حين يكون مأوى للفيروسات التى تصيب النباتا الاقتصادية .ففى العديد من مناطق العالم سجلت اصابة التبغ البري بالعديد من الفيروسات والتى ضمنها فيروس التبقع المصفر لنبات الخرشوف (RANA ET AL 1997) وفيروس موزاييك الخيار (VOVLAS AND DIFRANCO 2004) وفيروس موزاييك التبغ (FRAIL ET AL 1997) فيروس الموزاييك المعتدل المخضر للتبغ (MCKINNEY 1929)

اعراض الموزاييك لوحظت على نبات التبغ البري في العديد من المناطق في ليبيا وعلى اساس الاعراض والنقل الميكانيكي كان المتوقع ان هذه الاعراض يمكن ان تكون ناتجة عن فيروس او اكثر وفى دراسة مبدئية باستخدام اختبار اليزا المباشر مع امصال لفيروس موزييك الخيار وفيروس موزاييك التبغ تبين وجود فيروس موزييك الخيار مع فيروس اخر من مجموعة التوبامو لذا كان الهدف من هذه الدراسة هو التعريف على عزلات مختلفة من فيروس موزييك الخيار

المواد وطرق البحث

تجميع العينات:

تم جمع اوراق مصابة من نباتات التبغ البري تظهر اعراض الموزاييك في خمس مناطق من ليبيا هى : سرت ، مصراته ، الخمس ، طرابلس و الزاوية وبواقع خمس عينات من كل منطقة وكل هذه العينات تم الاستدال عن وجود الفيروسات فيها باستخدام اختبار اليزا غير المباشر .

العزلات الفيروسية :

من العينات التة اعطت تفاعلا موجبا مع مصل فيروس موزاييك الخيار اختيرت عينة واحدة عن كل منطقة من مناطق الدراسة الخمس ثم اجريت العدوى الميكانيكية لنبات التبغ *Nicotiana tabacum* cv .white burley and *N Tabacum* cv .Local variety كعائلان ينتجان اصابة جهازية وبعد وضوح الاعراض اعدي نبات التبغ *N.glutinosa* للتاكد من عدم وجود فيروس توبامو (*tobamovirus*) وبعدها اعدى مجموعة من نباتات التبغ . *N.tabacum* cv Burley gold and *N.tabacum* cv .local variety لكى تنتج اصابة جهازية تكون كمصدر للعزلات .

اختبار العزلات الفيروسية باستخدام اليزا المباشر :

تم اختيار عزلات الفيروس الخمس باستخدام اختبار الاحتواء المزدوج- اليزا (das-lisa) مستخدما في ذلك مصلا مضادا لفيروس موزاييك الخيار من انتاج شركة BIO –RAD

العدوي الاصطناعية و المدي العوائلي :

حضر اللقاح لكل من العزلات الخمس بسحق 1 جرام من اوراق مصابة غضة لنبات التبغ صنف Burley gold *N.tabacum* cv. او *N.tabacum* cv .local variety في وجود 1 مل من محلول منظم فوسفاتى kh_2po_4 عياريته 0.1 مولار واسه الايدرؤجينى 7 (ph=7) ثم حقن على الاقل خمس نباتات من كل صنف من نباتات الاختبار .

خواص الفيروس في العصارة الخام :

استخرجت العصارة من نباتات التبغ صنف *N.tabacum* cv .local variety في وجود ماء مقطر ثم اختبرت درجة الحرارة المثبطة للفيروس ونقطة التخفيف النهائية ومدة بقاء الفيروس في العصارة الخام .

التنقية :

الفيروس تم اكثاره على نبات التبغ *N.tabacum* cv .local variety ثم جمعت اوراق تظهر اعراض موزاييك واضحة واجريت التنقية باتباع طريقة (1991) walkey.

الدراسة السيرولوجية :

تثبيت الفيروس بالفورمالدهيد :

تم تثبيت الفيروس بقصد تحفيز التاثير المناعي تبعا لطريقة (Franck and habili, 1972) .

اعداد المصل المضاد :

حقن حيوان الارنب ثلاث مرات تحت الجلد بفيروس نقي مثبت بالفورمالدهيد من عزلة مصراته ممزوجا بحجم مماثل من freund's complete adjuvant بين الحقنة و الاخرى مدة اسبوع (wahyuni et al .,1992) .

الاختبارات السيروجولوجية :

اختبار الانتشار الثنائي في الاجار تم باعداد اطباق من الاجار بالطريقة التى وصفها ball (1974) لغرض تعيين تركيز الاجسام المضادة في المصل المضاد .اختبار اليزا بنوعيه المباشر وغير المباشر تم اجراؤه باستخدام مصل عزلة مصراته ومصل فيروس موزاييك الخيار المنتج من شركة bio-rad .

النتائج والمناقشة

الكشف عن عزلات الفيروس باستخدام اختبار اليزا غير المباشر :

تبين من الكشف باستخدام هذا الاختبار على 25 عينة من 5مناطق مختلفة ان الفيروس CMV موجود بصورة منفردة في اربع عزلات هى : (مصراته 1- طرابلس 3 ، 1-الزاوية 1) في حين لم توجد في عزلة سرت 1 وتكرر تواجده بصورة مختلطة مع فيروس مواييك التبغ في بقية العزلات .

اختبار العزلات الفيروسية باستخدام اليزا المباشر :

جميع العزلات الخمس ابدت تفاعلا ايجابيا في اختبار الاحتواء المزدوج –اليزا باستخدام مصل مضاد لفيروس موزاييك الخيار (bio-rad kit) الامر الذي يؤكد انها تابعة لفيروس CMV تحديدا وليس الى اى من فيروسات كوكوموفيرس الاخرى (other cuCMVirus) (Devergne et al ,1981.).

الاعراض والمدي العوائلي :

تبين من اعداد العزلات الخمسة الى 33 نوع او صنف نباتى انها تختلف فيما بينها في الاعراض المنتجة حسب الموضح بالجدول (1).

من دراسة المدى العوائلى تبين ان نبات الفلفل *capsicum annuum* cv.cayenna يتفاعل بطرق مختلفة مع عزلات فيروس موزاييك الخيار فهو ينتج موزييك مع عزلة سرت ، موزييك متبوعا بشكل فنجانى في عزلتى الخمس وطرابلس ، بقع موضعية ميتة متبوعا موت العروق ونكرزة جهازية وموزييك مع عزلة مصراته ولم تصب عزلة الزاوية هذا الصنف من نبات الفلفل .نباتات الزربيح *chenopodium*

amaranticolor و *chenopodium* انتجت بقع موضعية مع جميع العزلات .نبات البطيخ الاحمر (الدلاع *quinoa* و *chenopodium* sp) *citrullus vulgaris cv .klondike* انتج بقع موضعية فقط مع عزلة طرابلس ولم يصب بباقى العزلات .

جدول 1 : استجابة نباتات الاختبار للعدوى الميكانيكة بالعزلات الفيروسية الخمسة

نبات الاختبار	استجابة نباتات الاختبار لعزلات الفيروس الخمس				
	عزلة سرت	عزلة مصراته	عزلة الخمس	عزلة طرابلس	عزلة الزاويه
Alcea rosea	0	0	0	0	0
Capsicum annuum cv. Cayenna	M	NLL/VN,SN	M/LC	M/LC	0
Chenopodium amaranticolor	CLL/NLL	CLL/NLL	CLL/NLL	CLL/NLL	CLL/NLL
Chenopodium quinoa	NLL	NLL	NLL	NLL	NLL
Chenopodium sp.	NLL	NLL	NLL	NLL	NLL
Cucumis melo cv. Melon Pineapple	0	0	0	0	0
Cucumis sativus cv. Beit Alpha	0	0	0	0	0
Cucurbita pepo cv. White Birginian 3	0	0	0	0	0
Cucurbita maxima cv. Etampes Bright Red	0	0	0	0	0
Citrullus vulgaris cv. Klondike	0	0	0	NLL	0
Datura metel	0	0	0	0	0
Datura stramonium	0	0	0	0	0
Gomphrena globosa	M	M	RLL/M	0	M
Lycopersicon esculentum cv. Heinz 1370F	0	0	0	0	0
Matthiola incana	0	0	SYS	0	0
Nicotiana benthamiana	SYS	SYS	SC/N	SC/N	SYS
Nicotiana glauca	SYS	M	SYS	M	M
Nicotiana glutinosa	0	0	0	M,LDFR & S	M & S
Nicotiana repanda	0	0	0	0	0
Nicotiana tabacum cv. Burley Gold	M	M	M & LDFR	M	M
Nicotiana tabacum cv. Burley 21	M	0	M & LDFR	M	M
Nicotiana tabacum cv. Local Variety	M	M	M,LDFR& S	M	SC/M
Nicotiana tabacum cv. Turkish	0	M	M	M	0
Nicotiana tabacum cv. White Burley	M	M	0	M	M
Nicotiana tabacum cv. Xanthi	SYS	M	M,S & SC	M	M
Nicotiana tabacum cv. Xanthi-nc	M	M	M	SYS	M
Petunia hybrida	0	NLL/SNL,M	0	0	0
Phaseolus vulgaris	0	0	0	0	0
Physalis floridana	M & DF	M & DF	M	C,N & DF	0
Solanum melongena cv. Black Beauty	0	0	M	0	0
Solanum nigrum	0	0	0	0	0
Vinca rosea	0	0	0	0	0
Vicia faba	0	0	NLL	0	M

Abbreviation of symptoms: C= Chlorosis, شحوب CLL= Chlorotic local lesions , بقع موضعية شاحبة DF= Defoliation , تساقط LC= Leaf cupping الأوراق فنجانية, LDFR= Leaf deformation تشوه الأوراق , M=Mosaic موزاييك , N= Necrosis نكرزه, NLL= Necrotic local lesions , بقع موضعية شاحبة RLL= Reddish local lesions , بقع موضعية محمرة S= Stunting , تقزم SC= Systemic chlorosis , شحوب جهازى SN= Systemic necrosis , نكرزة جهازية SNL= Systemic necrotic lesions , بقع موضعية جهازية SYS= Symptomless systemic infection , إصابة جهازية بدون أعراض VN= Vein necrosis, نكرزة العروق 0= No infection لا توجد إصابة

نبات الجمفرينا *Gomphrena glosa* تفاعل باعراض الموزييك مع عزلات سرت ، مصراته والزاوية وبقع موضعية محمرة متبوعا بالموزييك في عزلة الخمس ولم يصب بعزلة طرابلس .النبات *matthiola incana* انتج اصابة جهازية بدون اعراض مع عزلة الخمس وكان منيعا لبقية العزلات .نبات التبغ *nicotiana benthamiana* حفز شحوب متبوعا بنكرزة في عزلتي الخمس وطرابلس اصابة جهازية بدون اعراض مع عزلات سرت ،مصراته والزاوية .نبات التبغ *nicotiana glutinosa* استجاب باعراض المزاييك وتشوه الاوراق والتقزم مع عزلة طرابلس الموزاييك والتقزم مع عزلة الزاوية ولم تصب بقية العزلات هذا النبات .نبات التبغ *Nicotiana tabacum* cv . Burley gold اعطى اعراض الموزاييك مع جميع العزلات عدى عزلة الخمس التي انتجت اعراض التشوه مع الموزاييك من ناحية اخرى اعطى نبات التبغ *Nicotiana tabacum* cv . Burley21 اعراض الموزاييك مع عزلات سرت ،طرابلس و الزاوية واعراض التشوه مع الموزاييك مع عزلة الخمس ولم يصب بعزلة مصراته .الصنف المحلي من التبغ *Nicotiana tabacum* انتج موزاييك مع عزلات سرت ، مصراته وطرابلس وموزاييك وتشوه الاوراق والتقزم مع عزلة الخمس وشحوب متبوعا بموزاييك مع عزلة الزاوية .نبات التبغ *Nicotiana tabacum* cv .turkish اظهر الموزاييك مع عزلات الخمس ، مصراته وطرابلس ولم يصاب بعزلتي سرت والزاوية .نبات التبغ *Nicotiana tabacum* cv. White burley اعطى الموزاييك مع عزلات ، مصراته ، طرابلس ، سرت و الزاوية ولم يصب بعزلة الخمس .نبات التبغ *Nicotiana* cv. xanthi *tabacum* حفز اعراض الموزاييك مع عزلات مصراته ، طرابلس و الزاوية ، وموزاييك وتقزم وشحوب مع عزلة الخمس واصابة جهازية بدون اعراض مع عزلة سرت ، اما نبات التبغ.

Nicotiana tabacum cv. xanthi -nc فقد اظهر الموزاييك مع العزلات الخمس عدا عزلة طرابلس حيث اعطى اصابة جهازية بدون اعراض .

نبات البتونيا *petunia hybirda* لم يصاب الا بعزلة مصراته والتي تفاعل ايجابيا بانتاج بقع موضعية ميتة متبوعا بنكرزة جهازية .نبات *physalis floridana* اظهر موزاييك مع عزلة الخمس ؛ الموزاييك وتشوه الاوراق مع عزلتي سرت ومصراته ، شحوب ، نكرزة وتسلقط اوراق مع عزلة طرابلس وعدم الاصابة بعزلة الزاوية .النبات *solaunum melongena* cv.black beauty اعطى فقط موزاييك مع عزلة الخمس ولم يصاب ببقية العزلات .نبات الفول vicia faba انتج بقع موضعية ميتة مع عزلة الخمس ؛ موزاييك مع عزلة الزاوية ولم يصاب ببقية العزلات .

لم تصب اى من العزلات النباتات الاتية :

Alcea Rosea , Cucumis Melo Cv . Melon Pineapple , *Cucumis Sativus* Cv .Beit Alpha , *Cucurbita* Pepo Cv.White Birginian 3 , *Cucurbita Maxima Cv .Etampes* Bright Red ,Datura Metel ,D. *Stramonium , Lycopersion*

Esculentum Cv . Heinz 1370f, *Nicotiana Repanda* ,*Phaseolus Vulgaris* ,*Solanum Nigrum And Vinca Rose*

لم نتمكن من ايجاد دراسات مستفيضة عن المدى العوائلى لعزلات من فيروس موزاييك الخيار على نبات التبغ البري اما هذا الاختلاف في المدى العوائلي بين العزلات ربما يكون مرجعه الى الاختلاف بين سلالات الفيروس

خواص الفيروس في العصارة :

اوضحت النتائج ان كل عزلات الفيروس لها درجة حرارة مثبطة تقع بين ($50c^0$ - $53c^0$) وان نقطة التخفيف النهائية ما بين (10^{-2} – 10^{-} ^{3}) اما مدة بقاء الفيروس في العصارة فقد كانت مابين ($1/_2$ يوم – يوم كامل) .وعلى الرغم من اختلافها مع ما نشره عيد و اخرون (eid et al .,1984) الا انها تاتى ضمن المدى الذي قرره غير واحد من الباحيش لفيروس (brunt et al ., 1996 ;palukaitia CMV.and garacia-arenal 2003) .

التنقية :

باستخدام الطريقة التى ووصفها walkey (1991) تم الحصول على الفيروس بصورة نقية وكان تركيزه . 5 12 مليجرام/100 جرام من الانسجة النباتية المصابة

الدراسة السيرولوجية :

تعيين تركيز الاجسام المضادة في المصل المضاد :

باستخدام اختبار الانتشار الثنائي في الاجار تبين ان المصل المضاد يظهر تكوين الراسب الى التخفيف 4:1 اما عند استخدام اختبار اليزا غير المباشر فان المصل المضاد يعطى تفاعل ايجابي حتى التخفيف 1024:1 10^3x

الكشف عن عزلات الفيروس باستخدام اختبار اليزا الغير مباشر :

نتائج اختبار اليزا غير المباشر اوضحت ان جميع عزلات الفيروس الخمس تتفاعل ايجابيا مع المصل المضاد لعزلة مصراته وكذلك المصل لفيروس موزاييك الخيار من شركة BIO-Rad.

Isolation and study of different isolates of Cucumber mosaic virus on Wild Tobacco {*Nicotiana glauca* Graham) in the western cost-belt of Libya

Mahjob A. Ejmal[1] **Omar M. EL-Sanousi[2]**
Salah S. EL-Ammari[3]

Abstract

Using DAS-ELISA, Cucumber mosaic virus (CMV) was identified as the main virus causing mosaic symptoms on *Nicotiana glauca* Graham in 25 samples from five areas (Sirte, Misurata, El- Khoms- Tripoli- El-Zawia) in Libya. The CMV was found singly in some of the tested samples and with another *Tobamovirus* in most of them. The study included the host range of five isolates from different regions on 33 plant species or cultivars which shows different response with these isolates. Results showed that the thermal inactivation point (TIP) was between 50◦C-53◦C; dilution end point (DEP) was between 10^{-2} - 10^{-J} and Longevity *in vitro* (LIV) was between $^{1}/2$ - 1 day. Antiserum was prepared to Misurata isolate, using this antiserum in indirect ELISA revealed that all isolates positively reacted with Misurata isolate antiserum as well as to the antiserum of Cucumber mosaic virus produced by Bio-Rad company .

[1]Faculty of Agriculture, University of AL-Tahaddi, Sirte. Libya
[2]Faculty of Agriculture, University of Omar Al-Mukhtar, El-Bayda.
[3]Faculty of Agriculture, University of Gariouns, Benghazi. Libya

المراجع

Ball, E. M. (1974) Serological tests for the identification of plant viruses. Aiuerican Phytopathological Soc. 31pp Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. j. and Watson, L. (1996). Cucumber nrosaic cucumovirus. In viruses of plant descriptions and lists from the VIDE Database(e-d), CAB international.

Devergne, j. c., Cardin, L., Burckard, j. and Van Regenmortel, M. H. V. (1981). Comparison of direct and indirect ELISA for detecting antigenically related Cucumoviruses. Journal of Virological Methods, 3: 193-200

Eid, S. A., Kishtah, A. A. and Abu-Zeid, A. A. (1984). *Nicotiana glauca* a natural host for Cucumber mosaic virus. Agricultural Research Review, 62 (2): 367-378.

Fraile, A., Fernando, E., Aranda, M. A., Malpica, J. M., Gibbs, A. J. and Garcia-Arenal, F. (1997) A century of tobamovirus evolution in an Australian population of *Nicotiana glauca*. J. Virol.

71(1 !):8316-8320.

Francki, R. I. B. and Habili, N. (1972). Stabilization of capsid structure and enhancement of immunogenicity of cucumber mosaic virus (Q strain) by formaldehyde. Virology, 48:309-315.

McKinney, H. H. (1929). Mosaic disease in the Canary Islands, West Africa, and Gibraltar. Journal of Agriculture Research, 39: 557.

Palukaitis, P. and García-Arenal, F. (2003). Cucumber mosaic virus. CMI/AAB Description of Plant Viruses, No. 400, 15 pp.

Rana, G.F., Kyriakopoulou, P.E. and Martelli, G.P. (1983). Artichoke yellow ringspot virus. CMI/AAB Descrip, of Plant Viruses, No. 271, 4 pp.

Vovlas, C. and Di Franco, A. (2004). Cucumber mosaic virus in *Nicotiana glauca* in Greece. Disease Note, Journal of Plant Pathology, 86 (1): 91-92.

Wahyuni, W.S., Dietzgen, R.G. Hanada, K. and Francki, R. I. B. (1992). Serological and biological variation between and within subgroup I and II strains of cucumber mosaic virus. Plant Pathology, 41: 282-297.

Walkey, D. G. A. (1991). Applied plant virology, 2nd edition, Chapman and Hall. London.