DOI: https://doi.org/10.54172/mjsc.v24i1.535

عزل ودراسة عزلات من فيروس الموزايك المعتدل المخضر للتبغ (Tobamovirus) على نبات التبغ البري Nicotiana glauca Graham في ليبيا

محجوب علي اجمال[1] عمر موسى السنوسي[2] صلاح سعيد العماري[3]

الملخص

من الشائع إصابة الدخان البري Nicotiana glauca بأعراض الموزاييك في الشريط الساحلي من ليبيا . وللتعرف على الفيروس المسبب لهذا المرض تم اختيار 25 عينة عشوائياً من خمس مناطق مختلفة بالجزء الغربي للشريط الساحلي . وباستخدام اختبار ELISA وجد أن عزلة واحدة في الدراسة لفيروس يتبع مجموعة توبامو فيرس Tobamovirus بصورة منفردة بينما في العديد من العينات وجد هذا الفيروس مصاحباً لفيروس Cucumber Mosaic Virus (CMV) . دراسة المدى العوائلي والأعراض أوضحت أن هذه العزلات تتبع الفيروس Tobacco Mild Green Mosaic virus (TMGM) من الجنس توبامو . كما وجد أن هذه العزلات تتفق في الأعراض التي تحفزها على 13 صنف نباتي وتختلف فيما بينها على 10 عوائل ولا تصيب 10 أصناف نباتية . دراسة خواص الفيروس في العصارة الخام بينت أن كل عزلات الفيروس لها درجة حرارة مثبطة تقع بين 84 و 88م° وأن نقطة التخفيف النهائية ما بين 10^{-5} و 10^{-6} ، أما مدة بقاء الفيروس في العصارة كانت أكثر من سنة لكل العزلات .

[1] كلية الزراعة ، جامعة التحدي ، سرت – ليبيا .

[2] كلية الزراعة ، جامعة عمر المختار ، البيضاء – ليبيا ، ص.ب. 919 .

[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 من النباتات دائمة الخضرة وهو منتشر في العديد من المناطق على طول الساحل الليبي . في العديد من مناطق العالم سجلت إصابة هذا النبات بالعديد من الفيروسات والتي من ضمنها إصابة التبغ البري بفيروس التبقع المصفر لنبات الخرشوف (Rana et al, 1983) وفيروس موزيك الخيار (Vovlas and Di franco, 2004) فيروسان من مجموعة التوبامو هما فيروس موزيك التبغ Tobacco Mosaic Virus frail وآخرون (1997) و (Blad and Goodchild 1960) وفيروس الموزايك المعتدل المخضر للتبغ Tobacco Mild Green Mosaic Virus (TMGMV) . (McKinney 1929)

أعراض الموزاييك لوحظت على نبات التبغ البري في العديد من المناطق في ليبيا وعلى أساس الأعراض والانتقال الميكانيكي كان المتوقع أن هذه الأعراض يمكن أن تكون ناتجة عن فيروس أو عدة فيروسات . وفي دراسة مبدئية باستخدام اختبار اليزاتبين وجود فيروس من مجموعة التوبامو تفاعل مع المصل المضاد لفيروس موزايك التبغ بالإضافة إلى فيروس موزييك الخيار ، لذا كان الهدف من هذه الدراسة هو التعرف على هذا الفيروس من مجموعة التوبامو وتحديد الجنس وخواصه من خلال دراسة عزلات مختلفة من هذا الفيروس .

المواد وطرق البحث

تجميع العينات

تم جمع أوراق مصابة من نباتات التبغ البري تظهر أعراض الموزاييك (شكل 1) في خمس مناطق مختلفة في ليبيا هي : سرت ، مصراته ، الخمس ، طرابلس والزاوية وبواقع خمس عينات من كل منطقة وكل هذه العينات تم الاستدلال عن وجود الفيروسات فيها باستخدام اختبار إليزا غير المباشر .

العزلات الفيروسية

من العينات التي أعطت تفاعل موجب مع مصل فيروس موزيك التبغ تم اختيار عينة عن كل منطقة من مناطق الدراسة الخمس ثم أجريت العدوى الميكانيكية لنباتات التبغ N.glutinosa الذي ينتج بقع موضعية مع فيروسات التوبامو ثم أخذت بقعة موضعية واحدة وحقنت في نبات التبغ N.tobacum cv. Turkish لكي ينتج إصابة جهازية بكون كمصدر للعزلات .

العدوى الاصطناعية والمدى العوائلي

حضر اللقاح لكل من العزلات الخمس بسحق 1 جرام من أوراق مصابة صغيرة لنبات التبغ صنف Turkish في وجود 1 مل من محلول منظم بوتاسيوم فوسفاتي KHPO4 عياريته 0.1 مولار وحموضته 7.0 (pH) ثم حقن على الأقل خمس نباتات من كل صنف من نباتات الاختبار .

شكل 1 أعراض الموزاييك التي شوهدت طبيعياً على نبات التبغ البري

خواص الفيروس في العصارة الخام

استخرجت العصارة من نبات التبغ صنف Turkish في وجود ماء مقطر ثم اختبرت درجة الحرارة المثبطة للفيروس ونقطة التخفيف النهائية ومدة بقاء الفيروس في العصارة .

التنقية

الفيروس تم إكثاره على نبات التبغ N.glauca ثم جمعت أوراق تظهر أعراض الموزاييك واضحة وأجريت التنقية بأتباع طريقة Gooding و Hebert, 1967 .

الدراسة السيرولوجية :

إعداد المصل المضاد

حقن حيوان الأرنب بتحضير فيروس نقي من عزلة سرت تم مزجه بكلوريد الصوديوم (0.85%) عند الحقنة الأولى في وريد الأذن ثم مزج بحجم مساوي له من Freunds complete adjuvant عند الحقن في العضل ثلاث مرات متتالية بفاصل أسبوع بين كل حقنة وأخرى بعد أسبوع من أخر حقنة جمع الدم وفصل منه المصل المضاد وحفظ في المجمد .

الاختبارات السيرولوجية

اختبار الانتشار الثنائي في الآجار تم بإعداد أطباق من الآجار بالطريقة التي وصفها Ball, 1974 لغرض تعيين تركيز الأجسام المضادة في المصل المضاد وكذلك الكشف عن الفيروسات في عصارة النبات . اختبار اليزا غير المباشر تم إجراؤه باستخدام مصل عزلة سرت والأجسام المضادة لفيروس موزاييك التبغ للكشف عن عزلات الفيروس الخمسة .

النتائج والمناقشة

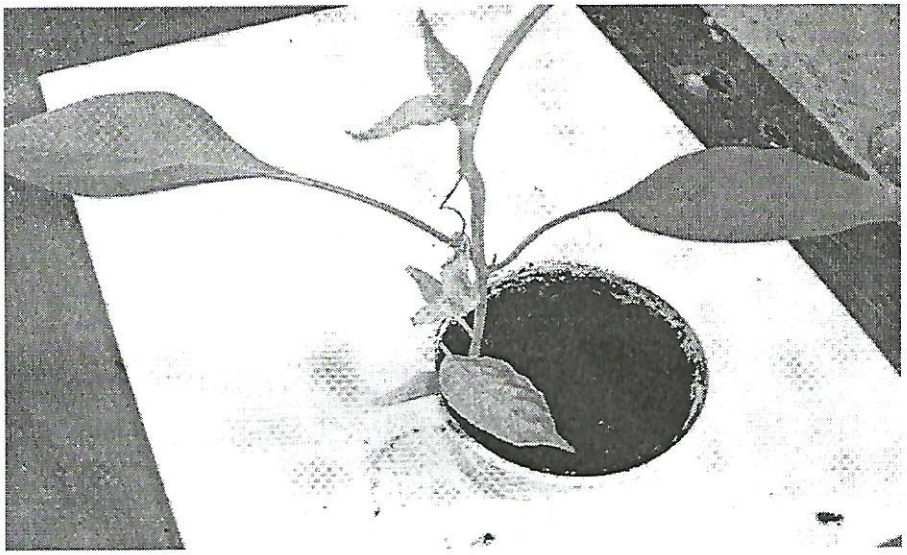
الكشف عن عزلات الفيروس باستخدام اليزا غير المباشر :

تبين من الكشف هذا الاختبار على 25 عينة من 5 مناطق مختلفة أن الفيروس TMGMV موجود بصورة منفردة في عزلة واحدة هي عزلة سرت 1 وموجود بصورة مختلطة مع فيروس موزاييك الخيار في 21 عزلة .

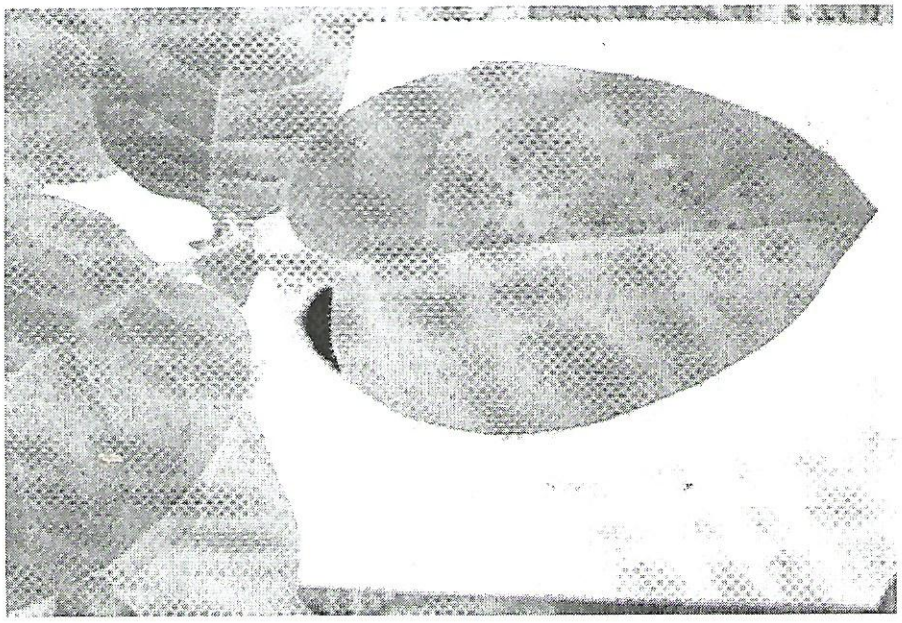
الأعراض والمدى العوائلي :

تبين من إعداء العزلات الخمسة إلى 35 نوع أو صنف نباتي كما هو مبين بالجدول 1 أن كل العزلات تنتج بقع موضعية ميتة متبوعة بالموزاييك وسقوط الأوراق على نبات الفلفل صنف Cayenna (شكل 2) وأنها تحفز إنتاج بقع موضعية شاحبة على نبات Chenopodium amaranticolor وبقع موضوعية ميتة على كل من Chenopodium quinoa, Chenopodium, sp., Datura stramonium, Nicotiana glutinosa, Nicotiana glutinosa, Nicotiana repanda, Nicotiana tabacum cvs. Burley Gold, Burley 21, White Burley وتنتج جميعها أعراض الموزاييك على نبات التبغ Nicotiana tobacum cv. Turksh و N. glauca ، أما على نبات Physalis floridana فإن جميع العزلات تنتج أعراض الموزاييك مع موت جهازي وسقوط الأوراق على نبات الداتورا Datura metel أظهرت عزلتي الخمس والزاوية بقع موضعية ميتة متبوعاً نكرزة جهازية بينما أعطت بقية العزلات فقط بقع موضعية ميتة . نبات الجمفرينا Gomphrena globosa اختلف في تفاعله مع العزلات من عدم إصابته بعزلتي سرت والخمس إلى إصابة بجون أعراض في عزلتي مصراتة والزاوية وبقع موضعية ميتة مع موت العروق في عزلة طرابلس .

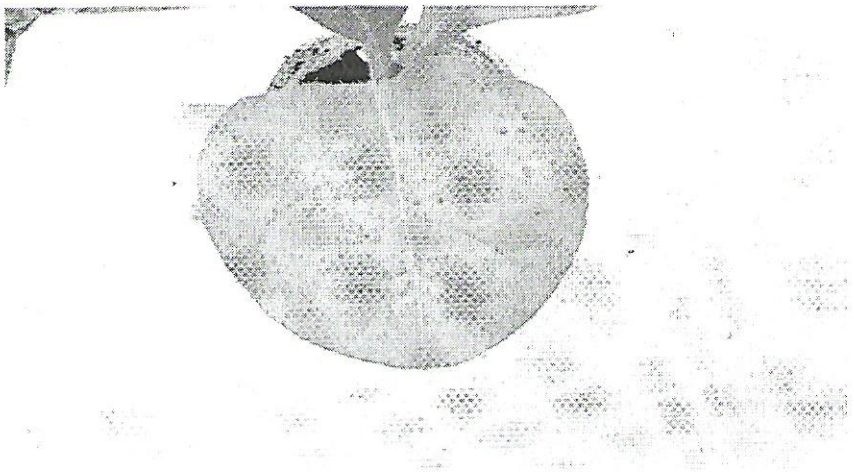
نبات التبغ Nicotiana benthamiana تفاعل بإصابة جهازية بدون أعراض في عزلتي سرت وطرابلس ، ذبول مع عزلتي الزاوية والخمس والشكل الفنجاني للورقة متبوعاً بالموزاييك في عزلة مصراتة .



شكل 2 بقع موضعية متبوعة بالموزاييك وسقوط الأوراق على نبات الفلفل صنف Cayenna



شكل 3 بقع موضعية على نبات التبغ *Nicotiana tabacum* cv. Burley Gold



شكل 4 بقع موضعية على نبات التبغ *Nicotiana tabacum* cv. Burley 21

جدول 1 استجابة نباتات الاختبار للعدوى الميكانيكية بالعزلات الفيروسية الخمسة

نبات الاختبار	استجابة نباتات الاختبار لعزلات الفيروس الخمس				
	عزلة سرت	عزلة مصراتة	عزلة الخمس	عزلة طرابلس	عزلة الزاوية
Alcea rose	0	0	0	0	0
Capsicum annuum cv. Cayenna	NLL/ SNM,DF	NLL/ SNM,DF	NLL/ SNM,DF	NLL/ SNM,DF	NLL/ SNM,DF
Chenopodium amaranticolor	CLL	CLL	CLL	CLL	CLL
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	0	0
Datura metel	NLL	NLL	NLL/SN	NLL	NLL/SN
Datura stramonium	NLL	NLL	NLL	NLL	NLL
Gomphrena globosa	0	SYS	0	NLL/VN	SYS
Lycopersicon esculentum cvs. Call J, Heinz 1370F, Midi A and Riogrande	0	0	0	0	0
Matthiola incana	0	0	0	0	0
Nicotiana benthamiana	SYS	LC/M	LW	SYS	W
Nicotiana glauca	M	M	M	M	M
Nicotiana glutinosa	NLL	NLL	NLL	NLL	NLL
Nicotiana repanda	NLL	NLL	NLL	NLL	NLL
Nicotiana tobacum cv. Burley Gold	NLL	NLL	NLL	NLL	NLL
Nicotiana tobacum cv. Burley 21	NLL	NLL	NLL	NLL	NLL
Nicotiana tobacum cv. Local Variety	NLL	NLL	NLL/SNL ,LDFR	NLL/SNL ,LDFR	NLL/SNL ,LDFR

Nicotiana tobacum cv. Turkish	M	M	M	M	M
Nicotiana tobacum cv. White Burley	M	M	0	M	M
Nicotiana tobacum cv. Xanthi	NLL	NLL	NLL	NLL	NLL
Nicotiana tobacum cv. Xanthi-nc	M	M	M	SNL,M	M
Petunia hybrida	NLL/SNL ,LDFR	NLL/SNL ,LDFR	NLL/SNL ,M	NLL/SNL ,M	NLL
Phaseolus vulgaris	0	0	0	0	0
Physalis floridana	M/SN,DF	M/SN,DF	M/SN,DF	M/SN,DF	M/SN,DF
Solanum melongena cv. Black Beauty	NLL	NLL	NLL	NLL	NLL
Solanum nigrum	SYS	MM	SYS	SYS	MM
Vinca rosea	0	SYS	0	SYS	0
Vicia faba	0	0	0	0	0

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 , - MM= Mild mosaic متوسط موزاييك , - N= Necrosis نكرزه , - NLL= Necrotic local Lesions بقع موضوعية شاحبة , - RLL= Reddish Local Lesions بقع موضعية محمرة , - S= Stunting تقزم , - SC= System Chlorosis شحوب جهازي , - SN= Systemic Necrosis نكرزة جهازية , - SNL= Systemic Necrotic Lesions بقع موضعية ميتة جهازيه - , VN= Vein Necrosis نكرزة العروق , - W= Wilting ذبول , - 0= No infection لا توجد إصابة SYS= Symptomless Systemic infection إصابة جهازيه بدون أعراض

أظهرت النتائج أن الصنف المحلي لنبات التبغ Nicotiana tabacum أعطى بقع موضعية ميتة مع عزلات سرت ، مصراته والزاوية وأظهر بقع موضعية ميتة متبوعاً ببقع موضعية ميتة جهازيه وتشوه مع عزلتي الخمس وطرابلس .

نبات التبغ Nicotiana tabacum cv. Xanthi-nc أعطى أعراض الموزاييك مع جميع العزلات عدى عزلة طرابلس التي أنتجت بقع موضعية ميتة جهازيه مع موزاييك .

نبات البتونيا Petunia hybrida تفاعل باستجابات مختلفة حينما أظهر فقط بقع موضعية ميتة مع عزلة الزاويه بقع موضعية ميتة متبوعاً بموزاييك وتشوه للورقة مع عزلة مصراته وبقع موضعية ميتة متبوعاً ببقع موضعية ميتة جهازية وتشوه للورقة مع عزلة سرت .

نبات الباذنجان Solamum melongena cv. Black Beauty أعطى بقع موضعية ميتة مع جميع العزلات عدى عزلة الزاوية التي لم تصيبه .

النبات Solanum nigrum أنتج موزاييك متوسط مع عزلتي مصراته والزاويه وأنتج إصابة جهازيه بدون أعراض مع بقية العزلات على نبات Vinca rosea حدثت إصابة جهازيه بدون أعراض مع عزلتي مصراته وطرابلس بينما لم تحدث

إصابة مع بقية العزلات . كما أظهرت النتائج أن جميع العزلات لم تحدث إصابة مع العوائل الآتية : Alcea rosea, Cucumis melo cv. Melon Pineapple, Cucumis sativus cv. Beit Alpha, Cucurbita pepo cv. White Birginian 3, Cucurbita maxima cv. Etampes Bright Red, Citrullus vulgaris cv. Klondike, Lycopersicon esculentum cvs. Call J, Heinz 1370F, Midi A and Riogrande Matthiola incana, Phaseilus vulgaris vicia faba على نبات التبغ Nicotiana tabacum cv. White Burley فإن جميع العزلات أنتجت بقع موضعية ميتة وهذا يتفق مع ما ذكره Randles وآخرون (1981) الذين بينوا أن فيروس الموزايك المعتدل المخضر للتبغ Tobacco Mild Green Mosaic Virus (TMGMV) يعطي بقع موضعية مع هذا العائل بينما يعطي فيروس موزاييك التبغ أعراض الموزاييك على صنفي نبات التبغ Burly Gold Nicotiana tobacco و Burley 21 ، فإن جميع العزلات أعطت بقع موضعية ميتة وهذا يعزز أن هذه العزلات لا تتبع فيروس موزاييك التبغ الذي يعطي أعراض شفافية العروق مع هذان الصنفان (Zaitlin and Israel, 1975 & Zaitlin, 2000) . العزلات حفزت إنتاج بقع موضعية ميتة متبوعة بالموزاييك وسقوط الأوراق على نبات الفلفل صنف Cayenna وهذا يعزز أن هذه العزلات تتبع الفيروس TMGMV ولا تتبع فيروس موزاييك التبغ الذي يعطي فقط بقع موضعية ميتة (Wetter 1984 and 1989 and Brunt et al, 1996) إن فشل إصابة نبات الفاصوليا بهذه العزلات يبرهن بأنها تتبع الفيروس TMGMV وليس فيروس موزاييك التبغ الذي ينتج بقع موضعية ميتة على نبات الفاصوليا (Zaitlin,2000 & Valverde and Dodds 1986) . نبات الطماطم الذي لم يصاب بهذه العزلات برهان آخر على تبعية هذه العزلات للفيروس TMGMV وليس فيروس موزاييك التبغ الذي ينتج أعراض الموزاييك على نبات الطماطم (Valverde and Dodds 1986, and Wetter 1984 and 1989) .

من نتائج تفاعل العزلات مع المصل المضاد لفيروس موزاييك التبغ يتضح أن هذه العزلات تتبع مجموعة التوبامو ومن تحفيز تكوين بقع موضعية على نبات التبغ Nicotiana tobacum cv. White Burley وبقع موضعية ميتة متبوعة بالموزاييك وسقوط الأوراق على نبات الفلفل صنف Cayenna ، وعدم إصابة نبات الفاصوليا ونبات الطماطم فيمكن اعتبار أن هذه العزلات تتبع الفيروس TMGMV .

خواص الفيروس في العصارة الخام :

أوضحت النتائج أن كل عزلات الفيروس لها درجة حرارة مثبطة تقع بين 84 و 88 م° وأن نقطة التخفيف النهائية ما بين 10^{-5} و 10^{-6} أما مدة بقاء الفيروس في العصارة كانت أكثر من سنة لكل العزلات . إن درجة حرارة مثبطة بين 84 و 88 م° هي في نفس معدلات الفيروس

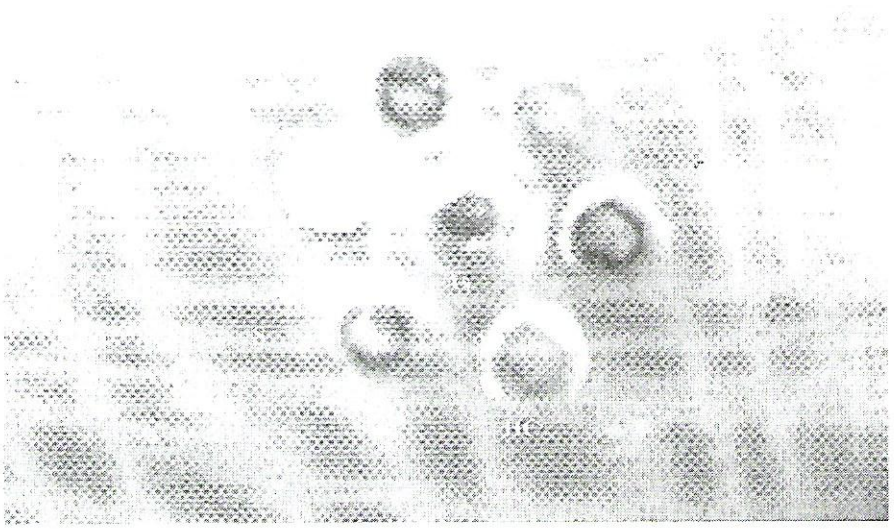
TMGMV والـتي بـين 85 و 90 م° والمـسجلة بواسطة Brunt et al, 1996 و Wetter 1989 .

التنقية :

باسـتخدام الطريقـة الـتي وصـفها Gooding و 1967 Hebert تم الحـصول علـى الفيروس بصورة نقية وكان تركيزه 52.9 مليجرام/100 جرام من الأنسجة النباتية المصابة .

الدراسة السيرولوجية :

تبين من حقن فيروس نقي من عزلة سرت أن الفـيروس يـستطيع تحفيـز الأجـسام المـضادة في حيوان الأرنب والمصل المضاد يظهر تكوين الراسب إلى التخفيـف 1 : 64 باسـتخدام اختبـار الانتـشار الثنـائي في الآجـار (اختبـار اشـترلوني) وأن المـصل يتفاعـل بتكـوين راسـب مـع عـصارة النبـات المـصاب لكل العزلات كما هو موضح في شكل 5



شكل 5 تكوين راسب للمصل المضاد مع عصارة النبات المصاب لكل العزلات باستخدام اختبار أشترولوني .
As = مصل لعزلة سرت ، HC = عصارة نبات سليم كشاهد Kh = عزلة الخمس ، M = عزلة مصراتة ، S = عزلة سرت ، T = عزلة طرابلس ، Z = عزلة الزاوية

Isolation and study of several isolates of Tobacco mild green mosaic virus (Tobamovirus) on Nicotiana glauca Graham in Libya

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

Abstract

Nicotiana glauca Commonly shows mosaic symptoms along the costal regions of Libya. To identify the causal virus, 25 samples were randomly collected from different areas in the western part of the costal belt region. Using ELISA, one isolate showed the presence of tobamovirus alone whereas in several samples this virus was found together with cucumber mosaic virus. Symptomology and host range studies approved that these isolates belongs, to *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGM). These isolates have ~he simility in symptoms induced on 13 plant species, differences on 10 hosts and not infected other 10 plant species. Properties of the virus in crude sap revealed that all virus isolates have thermal inactivation point was between 84°C and 88°C; dilution end point (DEP) was between 10-2 -10-3 and Longevity *in vitro* (LIV) was more than one year.

[1] Faculty of Agriculture, University of AL- Tahaddi, Sirte. Libya.

(2) Faculty of Agriculture, Univer-sity of Omar AI-Mukhtar, EI-Beida.

(3) Faculty of Agriculture, University of Gariouns, Benghazi. Libya.

المراجع

Bald, J. G. and Goodchild, D. J. (1960). Tobacco mosaic virus in *Nicotiana glauca.* Phytopathology 50, 497-499.

Ball, E. M. (1974) Serological tests for the identification of plant viruses. American Phytopathological Soc. 31pp.

Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J. and Watson, L. (1996c) Tobacco mild green mosaic tobamovirus. In Viruses of plant descriptions and lists from the VIDE Database(ed), CAB international.
Fraile, A., Fernando, E., Aranda, M. A., Malpica, J. M., Gibbs, A. J. and Garcia-Arenal, F. (1997) A century oftobamovirus evolution in an Australian population of *Nicotiana glauca.* J. Virol. 71(11):8316-8320.

Gooding, G. V. and Hebert, T. T. (1967) A simple technique for purification of tobacco mosaic virus in large quantities. Phytopathology 57: 1285

McKinney, H. H. (1929) Mosaic disease in the Canary Islands, West

Africa, and Gibraltar. Journal of Agriculture Research 39, 557.

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

Randles, J. W., Palukaitis, P. and Davies, C. (1981) Natural distribution, spread, and variation, in the tobacco mosaic virus infecting *Nicotiana glauca* in Australia. Annals of Applied Biology 98: 109-119.

Valverde, R. A. and Dodds, J. A. (1986) Evidence for a satellite RNA associated naturally with the V5 strain and experimentally with the VI strain of tobacco mosaic virus. J. gen. virol. 67:1875-1884.

Vovlas, C. and Di Franco, A. (2004). Cucumber mosaic virus in Nicotiana gluca in Greece. Disease Note, Journal of plant pathology, 86 (1) 91-92

Wetter, C. (1984) Antigenic relationships between isolates of Mild Dark-Green Tobacco Mosaic Virus, and the problem of host- Induced Mutation. The American Phytopathological Society, 74, (11): 1308-1312.

Wetter, C. (1989) Tobacco mild green mosaic virus CMI/AAB. Description of Plant Viruses, No. 351, 7pp.

Zaitlin, M. (2000) Tobacco mosaic virus CMI/ AAB Description of Plant Viruses No. 370, 8 pp.

Zaitlin, M. and Israel H. W. (1975) Tobacco mosaic virus (type strain) CMI/AAB Description of Plant Viruses No. 151,6 pp.