تشخيص سلالات فايروس موزائيك الفاصوليا الأصفر Bean yellow mosaic (BYMV) virus *potyvirus* على نباتات الفاصوليا *Phaseolus vulgaris* في العراق

Identification strains of Bean Yellow Virus *potyvirus* (BYMV) on bean *Phaseolus vulgaris* in Iraq

رائد رؤوف العاني
مركز بحوث التقنيات الأحيائية/ جامعة النهرين

Raed Raouf Al-Ani
Biotechnology research center/Al-Nahrain university

المستخلص:

شخص الفايروس اعتمادا على الاعراض التي يسببها على العوائل الرئيسية والعوائل المشخصة indicator plant ، الخواص الفيزيائية للفايروس في مستخلص نبات مصاب ، طرق النقل ، اختبار اليزا . وتم تشخيص سلالتين من الفايروس Bean Yellow Mosaic Virus (BYMV) باستخدام اختبار الانتشار المناعي المزدوج حيث اظهرت نتائج الاختبار بالتقاء خطوط الترسيب في الاكار وعدم تقاطعها ، الامر الذي يثبت ان السلالتين تابعتين لنفس الفايروس رغم اختلاف الاعراض التي تسببهما على النبات اذ تظهر السلالة الاولى على نبات الفاصوليا اعراض بقع موضعية ميتة local lesion بينما تظهر السلالة الثانية اعراض انحناء شديد للورقة المصابة نحو الاسفل وتنخر العروق في الاوراق الاولية الملقحة يعقبها تنخر القمة ثم الموت او تبرقش جهازي شديد . كما واظهرت النتائج ان درجة الحرارة المميتة للسلالة الاولى Thermal Inactivating Point (TIP) تقع بين (50-55) م ودرجة التخفيف النهائية (Dillution End Point (DEP) للسلالة الاولى هي 10^{-2} ومدة التعمير في العصير الخام Longevity *In Vitro* (LIV) لها كانت 48 ساعة بينما كانت الخواص الفيزيائية للسلالة الثانية من حيث درجة الحرارة المميتة للفايروس 60م ودرجة التخفيف النهائية للفايروس هي 10^{-2}-10^{-3} ودرجة الحرارة المثبطة هي 60م ومدة التعمير في العصير الخام هي 32ساعة في درجة حرارة المختبر . وقد تميزت الاعراض الظاهرة على العوائل الرئيسية للمرض خصوصا على نبات الباقلاء باصفرار باهت للعروق تليها مناطق صفراء مخضرة لنصل الورقة تتخللها مناطق خضراء داكنة غير منتظمة الشكل اضافة الى تشوه وتجعد الاوراق القمية للنبات اضافة الى اعطاء اعراض موضعية على بعض النباتات المستخدمة الاخرى والتي كانت عبارة عن بقع مصفرة chlorotic lesion على الاوراق الملقحة . وقد شخصت عدة انواع من حشرة المن القادرة على نقل سلالتي الفايروس . و أظهرت نتائج اختبار اليزا (ELISA) لكلا السلالتين نتيجة موجبة عند فحصها بنفس المصل المستورد المتعدد النسيلة polyclonal antibodies فضلا عن التقاء خطوط الترسيب في اختبار الأنتشار المناعي المزدوج double immundiffusion عند استخدام المصل المضاد للسلالة الاولى مع مستخلص عصير خام للسلالتين وهذا ما حصل ايضا عند استخدام المصل المضاد للسلالة الثانية وهذا الاختبار هو مؤشر اضافي ورئيسي على ان السلالتين تتبع لنفس الفايروس .

Abstract

Several methods were used to identify the virus, such as indicator plants, physical properties, manners transmission by aphids and ELISA test and among indicator plants two strains of BYMV were identified. The first one was showed a necrotic local lesion on bean while the second one was showed strong epinasty, veinal necrosis in inoculated leaves then it caused top necrosis at last severe systemic mottle. This two different symptoms gives a positive reaction at ELISA test and this test was indicated that the two symptoms is belong for two strains of bean yellow mosaic virus (BYMV).The physical properties for the first strain about the Thermal Inactivating point (TIP) was 50-55ْc while the second strain

was 60ْc and the dilution end point (DEP)for the first strain was 10^{-2} but it was 10^{-2} -10^{-3} for the second one and the longevity *in vitro* (LIV) for the first strain 48 hrs at room temperature and the main transmission by insect was achieved by several species of aphids.The double immunodiffution test in agar have been showed meeting of two precipitin line without cross in this two lines when used antiserum of the first strain of virus against the two sap of infected plants with both strains of virus and this test was used in the second strain against sap of the both infected plants too with the two strains of the virus and this test was additional indication that the two symptoms in bean were belonged to a two different strains to the same virus.

المقدمة

يصاب محصول الفاصوليا *Phaseolus vulgaris* بفايروسات عديدة في العالم [1] وتنتقل هذه الفايروسات ميكانيكيا بواسطة العصير الخام وبواسطة البذور بصورة نادرة كما تنقل بواسطة الحشرات كأنواع المن وبعض انواع الخنافس وقد شخص في العراق بعض الفايروسات التي تصيب الفاصوليا واخرون قام بتشخيص فايروس موزائيك البزاليا PMV(pea mosaic virus [2] كما وشخص سلالة فايروس موزائيك الجت Alfalfa mosaic virus (AMV) على الفاصوليا [3] ، عزل الباحثين [4] سلالتان تعودان الى فايروس موزائيك الفاصوليا الاصفر (BYMV) من البرسيم الابيض White clover صنف Idino ووجدا بانهما تصيبان العائلة البقولية فقط وان احدى هاتين السلالتين تسبب تنخر شديد مع تبرقش مصفر للورقة على الفاصوليا في حين ان الاخرى تسبب تبرقش مصفر طفيف ، اما على صنف Idino clover فان السلالتين تسببان تقزم بسيط وتظهر على الاوراق بقعا مصفرة Chlorotic spot بين العروق مع تخشن طفيف اما [5] فقد عزل عدة فايروسات تصيب الكلاديولس طبيعيا ومن بينها سلالة تعود الى (BYMV) مكونة تبرقشا مشوبا بمناطق مصفرة بصورة طفيفة واشار [6] الى ان فايروس موزائيك الفاصوليا الاصفر يكون بقعا موضعية ميتة على نبات البرسيم الاحمر صنف kenland بعد 6-4 ايام من تلقيح الاوراق ثم تتطور الاوراق لتصبح البقع الميتة جهازية واخيرا يموت النبات . وشخص [7] سلالة من فايروس موزائيك الفاصوليا الاصفر على نبات الترمس Lupine وتشبه هذه السلالة فايروس موزائيك البزاليا (PMV) في استراليا ونيوزلندا، وكان مداها العائلي مقصورا على العائلة البقولية . واثبت [8] بان جميع سلالات فايروس موزائيك البزاليا PMV مثل PMV-1،2،3 تعود لفايروس موزائيك الفاصوليا الاصفر (BYMV) و قد اعتمدا في دراستهما على المدى العائلي ، الفحص السيرولوجي ، الفحص بالمجهر الالكتروني ولاحظا التشابه الكبير بين BYMV و PMV-1,PMV-2 من الناحية السيرولوجية والمدى العائلي فضلا عن الاعراض التي تكونها هذه السلالات على النباتات الكاشفة ، واشار الى ان اطوال جسيمات فايروس PMV-1 تتراوح بين 800-787 نانومتر اما اطوال جسيمات فايروس BYMV المستخلص من البقع الموضعية لنبات *Chenopodium amaranticolor* فتتراوح بين 800-794 نانوميتر . وقد عزل [9] في بلجيكا سلالة تعود لفايروس موزائيك الفاصوليا الاصفر من نبات الباقلاء تنقل ميكانيكيا الى نبات ورد الدكمة *Gomphrena globosa* و*Chenopodium amaranticolor* *كما*وعزل [10] ايضا سلالة تعود لنفس الفايروس من نبات vetch , *Viciaa sativa* تنقل ميكانيكيا الى عوائل نباتية مختلفة، وعزلت سلالة تعود الى فايروس موزائيك الفاصوليا الاصفر BYMV من قبل [11] من بادرات نبات yellow-wood و *Cladratis lutea* *التي* كانت *بعمر*1-2 سنة في نيويورك وقد اظهرت اعراض اصفرار عروق الاوراق وتبرقش ، تشوه ، تنخر .كما وشخص [12] سلالة اخرى تنتمي الى فايروس موزائيك الفاصوليا الاصفر BYMV تسبب التفاف الاوراق القمية للباقلاء بالأضافة الى اعراض الموزائيك واطلقوا عليها اسم سلالة التفاف القمة Top-rollingstrain . ولهذا الفايروس اسماء مرادفة عديدة مثل canna mosaic virusic و gladulus mosaic virus و glorisa stripemosaic virus و bean mosaic virus2 [13] .

ونظرا لأهمية هذا الفايروس وسلالاته على نبات الفاصوليا والعوائل الأخرى فقد اجريت هذه الدراسة .

المواد وطرق العمل

اولا: تشخيص الفايروس

اعتمد في تشخيص الفايروس عدة طرق مكملة لبعضها وكما هو متبع في تشخيص الفايروسات النباتية وحسب ما اشار اليه كل من [14 , 15] .

دراسة الأعراض:

وشملت الدراسة الاعراض الخارجية على العائل الرئيسي نبات الفاصوليا والعوائل المشخصة في البيت البلاستيكي .

جمع العينات

جمعت عينات من نباتات الفاصوليا من مناطق مختلفة من الأراضي الزراعية في الرضوانية واليوسفية والمحمودية ومن نباتات الفاصوليا التي تظهرعليها اعراض ظهور بقع موضعية وتلك التي تظهر اعراض التواء شديد للورقة نحو الاسفل وتنخر واعراض تبرقش وكانت توضع في أكياس بلاستيكية يكتب عليها تاريخ ومنطقة الجمع وتحفظ في درجة حرارة -20 م لحين الأستخدام وقد اجريت العدوى الصناعية على النباتات المشخصة بموجب ما اشار اليه [15] وكانت النباتات المشخصة التي استخدمت في التجربة والتي زرعت في بيت محمي كما في ادناه وحسب ما أشار اليه [16]:

Phaseolus vulgaris, Pisum sativum , Vicia faba , Chenopodium amararanticolor , Ch. Quinioa , .Gomphrena globosa , .Nicotiana tabaccum , Spinacea oleracea , Tetragonia expansa

نقل الفايروسات بالمن

اختبرت قابلية عدة انواع من المن على نقل الفايروس حيث جمعت هذه الحشرات من الحقل على نباتات ، الفاصوليا , الباقلاء ، الجت ، السفرمدة ، الدفلة وكانت انواع المن هي:

Ayrthosiphum pisum , Aphis fabae , A. crccivora , A. neri , Myzus persicae , Rhopalosiphum padi

تم تشخيص هذه الانواع من حشرات المن بالاستعانة [17] وتأكيد تشخيصها في متحف التاريخ الطبيعي . وضعت حشرات المن في قفص خشبي ذو ابعاد (50X30X30) سم ونقلت هذه الحشرات على نباتات فاصوليا وتبغ سليمة بالتتابع ونقلت عدة مرات للتأكد من انها غير حاملة للفايروس (non-viruliferous) ثم وضعت الحشرات بعدهاداخل طبق بتري في الظلام مدة ساعتين لغرض تجويعها . اخذت 10 حشرات من كل نوع ووضعت على نباتات فاصوليا مصابة بالشكلين من الاعراض الفايروسية وتركت لمدة (10-15) دقيقة للتغذية واستعملت فرشاة ناعمة في عملية نقل الحشرات من والى النبات . وبعد انقضاء فترة التغذية نقلت الحشرات الى نباتات سليمة وتركت فترة 24 ساعة ورشت بعدها بمبيد الملاثيون بمقدار2.5 مل/لتر و حسب النسب الموصى بها للتخلص من الحشرات وقد استخدمت (5-8) نباتات فاصوليا سليمة لكل اختبار ولوحظ ظهور الاعراض بعد (2-3) اسبوع من اجراء عملية العدوى .

الفحوصات السيرولوجية

تم استخدام فحص اليزا Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) باستخدام مصل مضاد ومصل مضاد مرتبط بالأنزيم متعدد النسيلة Polyclonal antibodies منتج من شركة Switzerland bioreba وبطريقة DAS-ELISA(Double Antibodies Sandwich ELISA) كفحص مكمل للتأكد من ان الاعراض التي ظهرت على نبات الفاصوليا هي تعود لفايروس موزائيك الفاصوليا الاصفر (BYMV) Bean Yellow Mosaic Virus وللشكلين من الاعراض التي ظهرت على نبات الفاصوليا .

تنقية فايروس موزائيك الفاصوليا الاصفر

اعتمدت طريقة [18] و التي اشار اليها [19]عند تنقيته فايروس البطاطا M في تنقية فايروس موزائيك الفاصوليا الاصفر مع اجراء بعض التحويرات وكما يلي :

تمت العدوى لعدة نباتات باقلاء بالعزلتين والتي تظهر عليها اعراض موزائيك عند اصابته بسلالتي هذا الفايروس لغرض تكثيره وبعد ظهور الاعراض، وبعد مرور اربعة اسابيع سحق 100 غم من اوراق الباقلاء مع محلول داريء الاستخلاص Na_2HPO_4-KH2PO4 بتركيز 0.5 مولاري ذو اس هيدروجيني pH=8.2 حاويا 1% 2-mercaptoethanol بنسبة 1 غم اوراق :1 مل من محلول داريء الاستخلاص في خلاط كهربائي .

رشح المستخلص عبر طبقتين من قماش الململ وجمع الراشح في وعاء زجاجي .

ولغرض ترويق العصارة اضيف للراشح 8 مل من البيوتانول لكل 100 مل من المستخلص مع الاستمرار في عملية التحريك الدوراني بواسطة التحريك المغناطيسي لمدة ساعة كاملة في الثلاجة .
اجري للمستخلص عملية طرد مركزي بسرعة 8000 د/د لمدة 30 دقيقة في جهاز طرد مركزي مبرد نوع Sorval وباستعمال الرأس الدوار GSA .
اضيف للراشح 4 غم من Poly Ethylene Glycol (PEG) ذو وزن جزيئي 6000 لكل 100 مل من المستخلص مع التحريك وبعد الذوبان ترك المزيج لمدة ساعة على درجة4م ثم اجريت له عملية طرد مركزي بسرعة 8000 د/د لمدة 30 دقيقة في جهاز طرد مركزي مبرد .
اضيف للراسب 20 مل من محلول داريء فوسفاتي متعادل تركيز 0.01 مول لكل 100 مل من المستخلص الاصلي وبعد ثلاث ساعات اجري للمحلول عملية طرد مركزي بسرعة 8000 د/د لمدة 15 دقيقة .
اضيف للراسب 2مل من المحلول الداريء اعلاه لكل 100 مل من المستخلص واجري له عملية طرد مركزي بسرعة 8000 د/د لمدة 15 دقيقة واضيف للراسب 2 مل من نفس المحلول الداريء اعلاه لكل 100 مل من المستخلص ومن ثم اجري للمحلول عملية طرد مركزي بسرعة 8000 د/د لمدة 15 دقيقة .
اخضع الطافي لعملية طرد مركزي فائق السرعة بسرعة 27000 د/د لمدة 90 دقيقة لترسيب الفايروس بجهاز نوع LBK موديل ultrasopin 2332 .
اذيب الراسب في محلول داريء فوسفاتي تركيز 0.5 مولاري ذو اس هيدروجيني 8.2 وبذلك تم الحصول على مستحضر نقي للفايروس .

تقدير تركيز الفايروس

تم اعتماد المعادلة التالية في تقدير تركيز الفايروس وكما اشار[15] والتي هي :
تركيز الفايروس ملغم/مل = مقدار الامتصاص طول موجي 260 نانومتر / معامل الانطفاء

انتاج المصل المضاد لسلالتي الفايروس

استخدمت ارانب نيوزلندية وزن 6 باوند في انتاج المصل المضاد وتمت عملية الحقن للأرانب بمستحضر الفايروس النقي حسب [20] مع اجراء بعض التحويرات حيث تم اجراء خمسة حقنات لكل عزلة من عزلات الفايروس في ارنب مختبري وكانت الحقنة الاولى في عضلة الفخذ الخلفية حيث كان مجموع حجم المستضد المحقون 1 مل اما الحقنة الثانية فكانت في الوريد الاذني الحافي الخارجي وبقدار 1مل وكانت الحقنة الثالثة في وسادتي الطرفين الخلفيين بمقدار 0.2 مل لكل وسادة والحقنة الرابعة كانت باربعة مواضع لعضلة الكتف بموقعين في الجهة اليمنى بمقدار 0.5 مل لكل موقع وموقعين في الجهة اليسرى بنفس المقدار من المستضد اما الحقنة الخامسة فكانت في اربعة مواقع تحت ادمة الجلد على ظهر الارنب وبواقع 0.2 مل لكل موقع مع مراعاة مزج كمية مساوية لحجم المستضد المحقون مع مادة تحفيز المناعة Freund's incomplete adjuvant عدا تلك المحقونة في الوريد الاذني الحافي فلم يخلط بتلك المادة . وكانت عملية الحقن تجرى لكل عزلة على حده وبنفس طريقة الحقن وكانت الفترة الزمنية بين حقنة واخرى 5 ايام و المجموع الكلي من مستحضر الفايروس المحقون في جسم الارنب ولكل تحضيرة هو 5.2 مل والتي تتكون من مزيج متساو من مستحضر الفايروس النقي مع مادة تحفيز المناعة Freudn's incomplete adjuvant عدا تلك المحقونة في الوريد الاذني الحافي فلم تخلط بتلك المادة كما وتم سحب 10 مل من اذن كل ارنب قبل عملية الحقن للمقارنة .

فحص المصل المضاد

اخذت عينة من مصل الارنب الممنع من الوريد الأذني الحافي الخارجي واختبر احتوائها على الاجسام المضادة للفايروس بطريقة الترسيب microprecipitating كما تمت نفس العملية باستخدام مصل الارنب غير الممنع وكررت العملية ثلاث مرات ودونت النتائج .

سحب الدم من الارنب وتنقية المصل المضاد

بعد عملية سحب الدم من الارنب حسب طريقة [18] والحصول على المصل المضاد تم اجراء عملية تنقية المصل المضاد من الاجسام المضادة للبروتينات النباتية والمحتمل وجودها مع المصل المضاد للفايروس وذلك بمعاملة المصل المضاد للفايروس مع بروتينات نباتية استحصلت من نبات فاصوليا سليمة وحسب طريقة [21] اذ سخن 10 غم من مستخلص اوراق نبات فاصوليا مع 200 مل من الاسيتون في هاون خزفي ورشح

المستخلص خلال ورق ترشيح واتمان 4 على قمع بخنر بواسطة الاسيتون حتى اصبح المستخلص عديم اللون وغسل مسحوق البروتين النباتي بحجم 750 مل من محلول داريء فوسفاتي ملحي ذو اس هيدروجيني متعادل pH =7 ووضع المسحوق في انبوب اختبار مع 10 مل من المصل المضاد وحضن لمدة ساعتين ونصف بدرجة 40م واخرج المزيج ووضع في الثلاجة الى اليوم التالي على درجة 4م ثم اجريت له عملية طرد مركزي بسرعة 4000 د/د لمدة 15 دقيقة . اهمل الراسب وجمع الطافي الذي يمثل المصل المضاد الخالي من الاجسام المضادة للبروتينات النباتية .

اختبار الانتشار المناعي في الاجار Agar immuno diffution test

اتبعت في هذا الاختبار طريقة [15] اذ تم تحضير 100 مل من الوسط باذابة 0.8 غم من الاجاروز Noble agar، و0.85 غم من كلوريد الصوديوم في 100 مل من 0.01 مولاري داخل حمام مائي وترك حتى الغليان وعندئذ اضيف 0.02 غم من ازيد الصوديوم NaN_3 لمنع التلوث واجري مايلي :

1. صب مقدار 20 مل من الوسط في كل من اطباق بتري البلاستيكية قطر 9 سم باستعمال ماصة زجاجيةوترك حتى يتصلب على سطح مستوي .
2. بعد ساعة من عملية الصب تم عمل حفرة في الوسط المتصلب باستخدام ثاقب فلين قطر 5 ملم وكانت المسافة بين الحفرة المركزية وكل حفرة 7 ملم .
3. اضيف 1 مل من 2% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) لكل 1 غم لكل من النسيج المصاب او السليم بغية تحطيم بروتين الفايروس العصوي الى وحدات بروتينية اصغر لتسهيل انتشارها خلال الاجار .
4. وضع 50 مايكروليتر من مستخلص السلالتين في حفرتين متجاورة من الحفر المحيطية كل واحدة لعزلة من الفايروس ووضع في باقي الحفر مصل مضاد غير ممنع اما في الحفرة المركزية فوضع 50 مايكروليتر من المصل المضاد للعزلة الاولى من الفايروس .
5. اعيدت نفس العملية في 4 اعلاه ولكن بوضع 50 مايكروليتر في الحفرة المركزية من المصل المضاد للعزلة الثانية من الفايروس وفي الحفرتين المحيطية المتجاورة وضع نفس المقدار من مستخلص نبات مصاب بكل عزلة من عزلات الفايروس .
6. كما واجري هذا الاختبار باستخدام نباتات سليمة بالحفر المحيطية ومصل مضاد مستورد بالحفرة المركزية ، واعيد الاختبار باستخدام مستخلص نبات مصاب بسلالة فايروس في كل حفرة محيطية مع مصل غير ممنع في الحفرة المركزية .

فحص العلاقة السيرولوجية بين عزلتي الفايروس

تم اجراء فحص الترسيب الدقيق microprecipitating بين عزلة الفايروس المنقاة الاولى مع الاجسام المضادة المنقاة للعزلة الفايروسية الثانية كما وتم اجراء نفس الاختبار بين عزلة الفايروس المنقاة الثانية مع الاجسام المضادة المنقاة لعزلة الفايروس الاولى وتم تسجيل النتائج .

الخواص الفيزيائية للفايروس

حضر عصير خام معدي لعزلتي الفايروس من نباتات فاصوليا دون اضافة محلول البفر اليه ودرست الخواص الفيزيائية للعزلتين والتي تضمنت درجة الحرارة المثبطة للفايروس Thermal Inactivating Point (TIP) و درجة التخفيف النهائية Dilution End Point (DEP) ومدة التعمير في العصير الخام Longevity In *vitro* (LIV) وكما أشار [22] .

النتائج والمناقشة:

دراسة الاعراض

لوحظت الاعراض على نبات الفاصوليا والتي استخدمت فيها الاصناف Harvester, Black Turtle, Bountiful, Cotia بظهور اعراض نخر موضعية loca lesion في الأوراق لصنفي الفاصوليا الاولين بعد 10-12 يوم من العدوى اما بقية الاصناف فلم تظهر عليها اية اعراض عند اجراء التلقيح الميكانيكي عليها وفحصها باختبار اليزا اذ ربما تكون مقاومة للأصابة بالنسبة للعزلة الاولى وهذا يتشابه مع 23] بأن هذه الاعراض هي لسلالة من فايروس موزائيك الفاصوليا الاصفر والتي اطلقا عليها اسم (Necrotic Local Lesion strain).وقد ظهرت على الاصناف الاربعة الملقحة بالعزلة الثانية اعراض التواء شديد نحو الاسفل وتنخر العروق في الاوراق الاولية الملقحة يعقبها تنخر في القمة وتبرقش جهازي وهذه الاعراض تشابه مع ما اشار اليه [24] بان هذه الاعراض تعود لسلالة اخرى لفايروس موزائيك الفاصوليا الاصفر اطلقا عليها Sever-

Yellow mosaic virus . اما من دراسة الاعراض على نبات البزاليا للصنفين Mars،Sun blest فقد كانت الاعراض على الصنف الثاني بشكل توضح العروق واخضرار غامق للنصل في الاوراق الاولية الملقحة يلي ذلك موزائيك معتدل mild mosaic بعد 12 يوم من التلقيح ، اما الصنف الاول من البزاليا فلم تظهر على النبات اية اعراض .

الاعراض على النباتات المشخصة

استجاب نبات *Chenopodium amaranticolor* للفايروس باعطاء بقع موضعية صفراء على الاوراق الملقحة بعد 7 ايام من العدوى تلاه اصفرار غير منتظم على العروق ثم تشوه للورقة بعد 12-14 يوم اما النباتين *Chenopodium quinoa , Tetragonia expansa* فقد تميزت باعطاء اعراض بقع موضعية *مصفرة* chlorotic local lesion على الاوراق الملقحة وتتسع هذه البقع فيما بعد وتسقط . اما النبات *Chenopodium murale* *فلم* يستجب للفايروس بتكوين اية اعراض .

الصفات الفيزيائية للفايروس :

اوضحت النتائج بان السلالة الاولى للفايروس والتي تعطي اعراض بقع موضعية ميتة بان درجة الحرارة المثبطة لهذه السلالة من الفايروس تقع بين (60-65) م وان درجة التخفيف النهائية له تقع بين 10^{-2} -10^{-3}التعمير في العصير الخام هي 32 ساعة وهذا ينطبق مع ما اشار اليه [23] . اما السلالة الاخرى التي تسبب التفاف القمة Top –rolling فان درجة الحرارة المثبطة له تتراوح بين (55 – 60) م ودرجة التخفيف النهائية له تقع بين 10^{-2}—10^{-3} ومدة التعمير في العصير الخام له تقع بين 24 -48 ساعة وهذا ينطبق مع [12] .

نقل الفايروس بواسطة حشرات المن

اظهرت النتائج بان انواع حشرات المن التالية كانت قادرة على نقل الفايروس من نبات الفاصوليا الى نباتات اخرى سليمة وبالطريقةغير الباقية non persistent manner اذ لوحظ من النتائج وعند نقل الحشرات من نبات مصاب الى سليم ومن ثم الى سليم مرة اخرى فانها تفقد الفايروس ولا تظهر على النبات الأخير اية اعراض مرضية:

.Aphis fabae , A. craccivora , Myzus persicae , Acrythosiphum pisum , Aphis neri Ropalosiphum padi وهذا يتفق مع [27, 26,25] .

اختبار اليزا : ELISA test

اظهرت نتائج اختبار اليزاباستخدام المصل المستورد المتعدد النسيلة للشكلين من الأعراض التي ظهرت على نبات الفاصوليا نتائج موجبة عند استخدام نفس المصل وهذا يدل على ان الشكلين من الاعراض هي لسلالتين تعود لنفس الفايرس فقد ELISA reader وعلى طول موجي 405 نانومتر قراءة للسلالة الأولى مقدارها 1.12 بينما كانت قراءة الجهاز للسلالة الثانية 1.09في حين كانت القراءة لمستخلص النبات السليم 0.32 .

تركيز الفايروس للعزلتين :

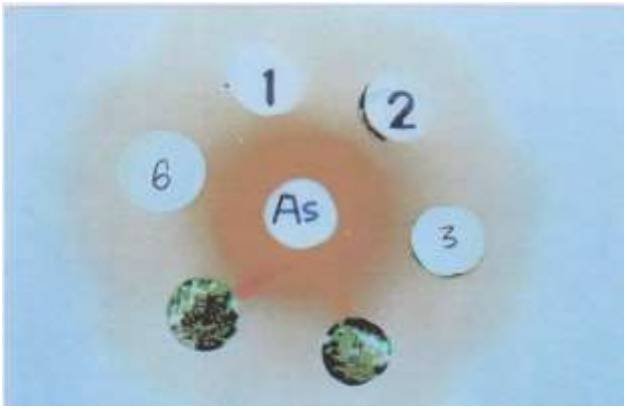
تم اعتماد معامل الانطفاء للعزلتين الفايروسية 2.9 وتم قياس تركيز العزلة الاولى للفايروس فكان 2.8 ملغم/مل بينما كان تركيز العزلة الثانية من الفايروس هو 3.3 باستخدام نفس معامل الانطفاء .

فحص المصل المضاد المحضر

اظهرت نتيجة الفحص بالترسيب الدقيق بعد الفحص بالمجهر ظهور راسب عند خلط 50 مايكروليتر من المصل المضاد مع حجم مساو من مستحضر الفايروس النقي ولم يلاحظ هذا الراسب عند استخدام مصل ارانب غير ممنعة لكلا سلالتي الفايروس .

اختبار الانتشار المناعي في الاجار

اظهرت نتائج الفحص في الانتشار المناعي على الاجار ظهور خطوط ترسيب التقت قرب الحفر التي وضع بها المستخلص النباتي من السلالتين دون ظهور اي تقاطع او بروز لخطوط الترسيب احدهما على الاخر وبما ان المستخلصين اللذين وضعا في الحفر هما لنباتين تظهر اعراضا متباينة على نبات الفاصوليا فان هذا يدل على ان العزلتين هما سلالتين تعود لنفس الفايروس [15] . وكما هو ملاحظ في الصورة رقم (1) .



صورة (1) : التقاء خطوط الترسيب في تجربة الانتشار المناعي الخطي

العلاقة السيرولوجية بين العزلتين الفايروسية

اظهرت نتائج اختبار الترسيب الدقيق ظهور راسب عند تفاعل مستخلص نبات مصاب بالعزلة الاولى من الفايروس مع المصل المضاد لعزلة الفايروس الثانية كما لوحظ الراسب عند تفاعل مستخلص نبات مصاب بالعزلة الثانية للفايروس مع المصل المضاد للفايروس الاول وهذه دلالة على ان العزلتين هي سلالتين تعود لنفس الفايروس والذي هو فايروس موزائيك الفاصوليا الاصفر .

تشخيص الفايروس وسلالاته

دلت النتائج التي تم الحصول عليها من دراسة الأعراض التي تسببها عزلات الفايروس على النبات العائل والاعراض على نباتات الاختبار والصفات الفيزيائية وطرق النقل والفحوصات السيرولوجية بان العزلتين اللتان تم الحصول عليها من نباتات الفاصوليا هي سلالتين تعود لنفس الفايروس واذي هو فايروس موزائيك الفاصوليا الأصفر (BeanYellow Mosaic Virus) BYMV .

المناقشة

بما ان الاعراض التي ظهرت على نبات الفاصوليا للعزلتين كانت متباينة وان اختبار اليزا اعطى نتيجة ايجابية على ان العزلتين تعود لنفس الفايروس رغم تباين قيم امتصاص قاريء اليزا والتي هي من صفات المصل المضاد متعدد النسيلة فضلا عن ان الصفات الفيزيائية للعزلتين كانت متباينة اضافة الى ظهور تباين بين العزلتين في بعض الاختبارات فان هذا يدل على ان العزلتين هي سلالتين لنفس الفايروس وهذا ما اثبته اختبار الانتشار المناعي على الاجار من التقاء خطوط الترسيب مع بعضهما دون تقاطعهما عند استخدام مستخلص نبات الفاصوليا للسلالة الاولى في الحفرة رقم4 ومستخلص نبات فاصوليا مصاب بالعزلة الثانية للفايروس في الحفرة رقم 5 والمصل المضاد المستورد في الحفرة المركزية وكما موضح بالصورة رقم (1) في حين لم تظهر خطوط الترسيب في هذا الاختبار عند استخدام مستخلص النباتات السليمة فضلا عن عدم ظهور هذه الخطوط عند استخدام المصل غير الممنع . اضافة الى تفاعل المصل المضاد لعزلة الفايروس الاول مع المصل المضاد لعزلة الفايروس الثانية وبالعكس وكذلك اختبار العلاقات السيرولوجية بين الضد والمستضد للعزلتين الفايروسية . وعلى هذا الاساس ومن النتائج المستحصل عليها فان الفاصوليا في العراق تصاب بسلالتين مختلفة تعود لفايروس موزائيك الفاصوليا الاصفر Bean Yellow Mosaic Virus والتي تكون ذات اعراض مرضية متباينة.

المصادر

1. Smith,K.M.(1972).A text book of plant virus, third edition, Longman Group and Ltd.London.
2. Salama,E.A., K.M.El-Adil, A.H.El-Behadili and H.A.Majeed.(1979).Viruses causing mosaic disease on broadbean in Iraq .3rd Egypt phutopatholo. Congress.(1979).pp.75-91.
3. Salama, E.A. and A.H.El-Behadli.(1979).Strains of alfalfa mosaic virus on broadbean in Iraq.Bull.Nat.Hist.Res.CENTER.7:101 –112.

4. Houston,B.R.and J.W.Oswald(1953). The mosaic virus disease complex adino clover.Phytopathology..43:271-276.

5. Barkeley,G.H. (1955). Some viruses affected Gladiolus.Phytopathology ,43:111-115.

6. Diacham,G.H.and ,L.Henson.(1956).Clones of kenland red clover as local lesion hosts for bean yellow mosaic virus.Phytopathology.46:10-11.

7. Corbett,M.K. (1958).A virus disease of Lupines caused by bean yellow mosaic virus and pea mosaic virus. Aust.J.Biol.Sci.21:429-437.

8. Taylor,R.H.and P.R.Smith.(1968) .The relationship between Bean yellow mosaic virus and pea mosaic virus. Aust.J.Biol.Sci.21:429-437.

9. Poland,G.,(1966).Research on a virus causing mosaic field bean (*Vicia faba*)Parasitica .22:277-284. Abstr.Rev.appl.Ent.(A)56-233.

10. Poland, G.(1969).Study on virus disease of vetch *Vicia fabbae* Parrasitica,25:48-51(Abstr.Rev.appl.Ent.(A),58-398.

11. Prowidenti,R.and J.H.Hunter.(1975).Bean yellow mosaic virus infection in *Cladrastis lutea* ; an ornamental leguminous tree plant . Dis..Reprt.59:86-87.

12. Thottappilly,G.K.F.Harris and J.E.Bath.(1976).Identification of top-rolling strain of yellow mosaic virus from Michigan broadbean .Rev.Plant.Path.55:4378.

13. American Society for microbiology report. (1999).

14. Ross,S.(1964). Identification of plant viruses in plant virology.by M.K.Corbett and H.D.Sisler.Univ.of Florida press,Gaineville,U.S.A.

15. Noordam.(1973).Identification of plant viruses methods and experiments ,center for Agricultural publishing and documentation , Wagenining, Nwtherland.

16. Bos,L.(1970).Bean yellow mosaic virus No.40in" Description of plant viruses .Commonwealth mycological institute Association of Applied biologist, Survey England.

17. Kono,T.and C.S.Papp.(1977). Hand book of Agricultural pests (Aphids ,Thrips ,Mites, Snales ,Slugs). Department of food and Agriculture, Division of plant industries state of California.

18. DeBokx,J.A.,(1972). Viruses of potato and seed potato production. Center for Agriculture publishing and documentation.Wagenining,Netherland.

19. العاني , رائد رؤوف مصطفى . (1995) تشخيص وتنقية فايروس البطاطا ام potato virus M وانتاج مصل مضاد له في حقول البطاطا في العراق , رسالة ماجستير/كلية الزراعة/جامعة بغداد.

20. Williamson,D.L.(1982).Serological characterization of spiroplasma and other mycoplasma.pages 240-267."hn plant and insect mycoplasma Techniques .M.J. Daniels and P.G.Markham,eds.Croom Helm,London.

21. daRocha, A. Ohki., S. T.and Hiruki,C. (1986). Detection of viruses and mycoplasma like organismes in situ by indirect immunoflouresence microbiology .Phytopathology.76:864-868.

22. العاني , رقيب عاكف و ياش بال راثي 1984) . فايروسات النبات . أساسيات التجارب العملية , وزارة التعليم العالي والبحث العلمي / كلية الزراعة / جامعة بغداد .

23. Zaumeyer,W.J.and H.H.and Fisher. (1953). A new necrotic-lesion producing strain of yellow bean mosaic. Phytopathology .43:45-49.

24. Thomas,H.R. and W.J.Zaumeyer.(1953). A strains of yellow bean mosaic virus producing local lesion on tobacco. Phytopathology.43:11-15.

25. Nagaich, B.B.and K.S.Vashisth.(1965). Studies on transmision of broadbean mosaic virus by *Aphis craccivora*, Indian.J.Entomol..24:188-189.

26. Allam,E.K. and E.A.El-Kady. (1966).A virus causing a mosaic disease of broadbean and its' vector *Aphis craccivora* in Egypt. Entomologia exp.appl. 9:413-418.(Abst.Rwv.Appl.Ent.(A)55:405)

27. Gaudchau,M.(1978). Studies on the transmission of bean yellow mosaic virus (BYMV) by aphids.Zcitschrift fur pflanzenkrankheiten und P flanzenshutz .85:347-357.