الكشف المناعي والجزيئي لفايروس البطاطا أم potato virus M على نباتات البطاطا في بعض مناطق العراق

د. ليلى جبار صبر حسام صباح يونس

كلية الزراعة

الملخص

اجريت الدراسه في مختبري امراض النبات كلية الزراعه / جامعة بغداد و شركة جسر المسيب بهدف التحري الجزيئي لفايروس البطاطا أم (Potato Virus M) على نباتات البطاطا (*Solanum tuberosum*) في المنطقة الوسطى من العراق ، واعتمد فيها تقانة النسخ العكسي لتفاعل البلمرة المتسلسل (Reverse Transcriptase- polymerase chain reaction) باعتماد البوادئ Car f1، Carla cp، Carla uni ، Uligo dt ، M4t ، PVM (F) و PVM (R)والاختبار المناعي المرتبط بانزيم - double antibody sandwish enzyme linked immunosorbent assay استخدم فيه مصل مضاد متخصص لفايروس البطاطا أم (PVM) .

اظهرت نتائج الفحص السريولوجي (ELISA) للمصل المضاد المتخصص على الفايروس وجود الفايروس وذلك بوجود قراءات متفاوته للمناطق موضوع البحث بعد يوم واحد من الاختبار حيث كانت اعلى قراءه في قضاء الصويرة والتي بلغت 3.318 وادنى قراءه كانت ضمن نفس القضاء والتي بلغت 0.380 وان اعلى متوسط قراءه كان في قضاء الصويرة 1.0826 وادنى متوسط قراءه كان في قضاء المحموديه 0.622 .

في حين اكدت نتائج الاختبارات الجزيئيه (RT-PCR) وجود حزم من النيوكلوتيدات في جل الترحيل والتي كانت في الغالب 300 pb باعتماد البوادئ Uligo dt 17 ، Carla uni، PVM(F)، PVM (R) كما تكونت حزم 300 pb و400 و500 كباندات مزدوجه للعينات التي جمعت في قضاء ابي غريب باستخدام البوادئ Car f1 ، Carla cp ، Carla uni ، Uligo dt 17 ، M4t ، PVM (F) و PVM (R) بينما كانت الحزم المتكونه للعينات التي تم جمعها من قضاء المسيب هي 400 pb باعتماد البادئ PVM F+R اما العينات في قضاء الصويرة فقد كانت الحزم المتكونه فيها هي 300 و400 و500 pb بصورة باندات مزدوجه ومفرده للعينات ،في حين تكونت حزم بحجم 300 pb في قضاء المحموديه و 300 400 و500 بصورة مزدوجه ومفرده في ناحية اليوسفيه.

المقدمة:

يتعرض محصول البطاطا (Solanum tuberosum) التابع للعائلة الباذنجانيه (Solanacea) للعديد من مسببات الامراض في جميع مناطق زراعته في العالم وبما انه من المحاصيل المهمه اقتصاديا التي تزرع على عروتين (الربيعيه والخريفيه) وله دور في تحقيق الامن الغذائي فهو يحتل المركز الرابع عالميا بعد القمح والرز والذرة الصفراء (Mumford واخرون :2000 ، Ravscher واخرون :2006) ولما يحتويه من قيمه غذائيه عاليه اذ تعتبره بعض الدول العربيه من المحاصيل الستراتيجيه حيث كانت المساحه المزروعه في العراق لعام 2016 من محصول البطاطا (31786) دونماً وكان الحاصل لنفس العام (190702) طن حسب احصائيات وزارة التخطيط العراقيه لعام 2017 في حين بلغ الانتاج العالمي للمحصول في عام 2014 (368.096.768) طن حسب منظمة الاغذيه العالميه (FAOSTAT 2017) .

إن أهم المسببات المرضيه التي تصيب محصول البطاطا في العالم هي الفايروسات حيث يصاب محصول البطاطا بما لايقل عن 37 فايروس التي تصيب البطاطا المزروعه بشكل طبيعي (Beemster و Debokx :1987 ، Salazar :1996 ، Jeffries :1998) والتي من اهمها مجموعة فايروسات البطاطا Potyviruses .

تعد الامراض الفايروسيه هي السبب الرئيس لتدهور وازالة الدرنات (Singh :1999 ،Whitworth واخرون :2006) كما تعتبر الامراض الفايروسيه اهم المشاكل التي تواجه انتاج التقاوي في العالم حيث تنتقل معظم ان لم تكن جميع هذه الفايروسات عبر الدرنات المستعمله كتقاوي في الزراعه اذ تشكل الدرنات المستودع لهذه الفايروسات وتلعب دورا مهما في وبائية الامراض الفايروسيه .

تنتشر مجموعة فايروسات البطاطا بواسطة عدة طرق منها التطعيم والتقاوي والبذور او تنتقل مكانيكيا عن طريق العصاره النباتيه او تنتقل عن طريق الحشرات حيث تنقل هذه الفايروسات بواسطة حشرة المن myzes Prisca بالطريقه غير الباقيه كما في فايروس البطاطا Y (PVY) وفايروس البطاطا M (PVM) وان كل نوع من انواع المن يمكن ان ينقل العديد من انواع فايروسات البطاطا وكذلك فان كل فايروس من هذه المجموعه يمكن ان ينتقل باكثر من نوع من حشرات المن (Gibbs واخرون :2008) ممايجعل من الصعوبه السيطره عليها ومنعها من العدوى والانتشار .

تعود فايروسات البطاطا الى مجموعة Potyviruses وصنفت عالميا على انها ثاني اكبر مجموعه فايروسيه بعد الفايروسات التوأمية (Geminiviridae) وثالث اكبر عائلة فايروسيه (Potyviridae) بعد عائلتي (Partitiviridae) و (Totiviridae) (King

واخرون :2012 ، Roossinck :2012) وتضم عائلة (Potyviridae) 7 اجناس حاويه على اهم الفايروسات النباتيه التي تصيب المحاصيل الزراعيه والتي هي منتشره على نطاق واسع في جميع انحاء العالم ولكن الدراسات الجينيه الحديثه ذكرت ان هذه المجموعه وجدت بوفره في النباتات البريه (Roossinck :2012) كما اكدت اللجنه الدوليه لتصنيف الفايروسات (ICTV) ان عائلة Potyviridae هي ثاني اكبر عائله فايروسيه تصيب النباتات بعد عائلة Geminiviridae في النباتات البريه حيث يكون توزيعها واسع في جميع انحاء العالم وتتالف من العديد من الانواع القادرة على اصابة النباتات وتسبب خسائر اقتصادية عليها .

ان فايروس البطاطا M (PVM) احد الفايروسات التابعه الى مجموعة فايروسات البطاطا(Potyviruses) ضمن جنس Carlavirus التابع الى عائلة Betaflexiviridae ضمن رتبة Tymovirales (Source:ICTV 2009) والذي يمتلك جينوماً خيطياً ذا نوع (ssRNA (+)) (Zavriev واخرون:1991) حيث يكون شكل الجسيمه الفايروسيه خيطيه منحنيه قليلا ذات ابعاد (12× 650) نانومتر (Brandes واخرون:1959) ومن المحتمل انها تكونت بشكل حلزوني كما هو الحال لبقية انواع مجموعة carlavirus (Varma واخرون :1988) تتكون الجسيمة الفايروسيه من حامض نووي محاط بغلاف بروتيني (cp) (Proll واخرون :1981) ويسبب اعراض الترقش والتفافاً للاوراق (التفاف طري) وتقزم في النباتات في حالة الاصابات المشتركه (Kerlan :2008) وتكون اعراضه على نبات البطاطا مشابهه للاعراض التي تسببها فايروسات البطاطا الشائعة (PVX ,PVS, PVY) وتعتمد شدة الاصابة بفايروس PVM على تركيبة اصناف البطاطا وعلى عزلات الفايروس (Ruiz de Galarreta واخرون :1998)، ويعتبر المدمر لانتاج البذور والبطاطا ينتشر في اوربا الشرقيه تمتد اعراضه من اعراض معتدلة الى اعراض حادة حيث يسبب تشوهات الاوراق وشفافية العروق وتنخر الساق واعراض موزاييك على الاصناف الحساسه وقد يقلل من عوائد الدرنه بنسبة (40 – 75 %) وكذلك يسبب انخفاضاً في محصول البطاطا بنسبة (15 – 45 %) (Brunt: 2001) .

تهدف الدراسة الى تشخيص عزلات فايروس البطاطا M (PVM) على البطاطا جزيئيا ولاول مرة في العراق .

المواد وطرائق العمل

أولاً : المسح الحقلي

تم اختيار خمس مناطق مزروعه بمحصول البطاطا للموسم الخريفي 2017 وهي (اقضية ابو غريب ، الصويره ، المسيب ،المحموديه، وناحية اليوسفيه) ،حيث تم مسح ثلاثة حقول لكل منطقه كحد ادنى.

اجري المسح الحقلي من خلال جمع العينات النباتيه (نباتات كامله) من المواقع المذكوره اعلاه وبالشكل غير محدد (النباتات التي تظهر عليها اعراض فايروسيه والتي لاتظهر عليها اعراض) وبواقع ستة عينات كحد ادنى لكل حقل تم مسحه وتم تسجيل تاريخ الجمع لكل عينه والمنطقة التي جمعت منها العينات وطبيعة الاعراض الظاهره على العينات وتم تدوين ارقام العينات ونوع الزراعه واسم الصنف ، حيث تم جمع 92 عينه نباتيه من جميع المناطق .

ثانيا : فحص العينات مختبريا

أ) الفحوصات السريولوجيه :

طريقة الاختبار

1- **تحضير صندوق الرطوبه (prepare humid box):ـــ** وهو عبارة عن حافظه بلاستيكيه تحتوي على غطاء يوضع داخلها طبق الاليزا خلال مدة الحضن حيث تم وضع ثلاث طبقات من ورق التنشيف (الكلينكس)اسفل الحافظه مع وجود الماء لترطيب الطبق ، ان وجود طبق الرطوبه يساعد على اتمام خطوات الاختبار ويمنع جفاف الطبق .

2- **تحضير بفر التغليف (prepare coating buffer):ـــ** محلول مخصص لتغليف طبق الاليزا (carbonate coating buffer) حُضر بالنسب 1 مل من البفر يضاف في 9 مل من الماء المقطر (distilled water) ثم اضيف للمحلول الاجسام المضاده لفايروس البطاطا M وبنسبة 1 مايكروليتر من الاجسام المضاده لكل 100 مايكروليتر من البفر المخفف اي تم اضافة 100 مايكروليتر من الاجسام المضادة الى 10 مل من بفر التغليف . وهذا المحلول يمكن الاحتفاظ به في الثلاجة على درجة 4 م لمدة شهر واحد.

3- **تغليف الطبق Coat plate :** - وهي الخطوة الاولى قمت فيها بتغطية جميع الثقوب الموجودة في الطبق البلاستيك عدد ٩٦ ثقبا بالمصل المضاد المتخصص (بفر التغليف المضاف له الاجسام المضاده) تم اضافة 100 مايكرو ليتر لكل حفرةَ من حفر الطبق باستخدام ماصه دقيقه .

4- **حضنً الطبق Incubate plate :** تم وضع الطبق في صندوق الرطوبه لمدة 24 ساعه على درجة حراره 4 درجه مئويه (في الثلاجه) كما يمكن حضن الطبق لمدة 4 ساعات على درجة حرارة الغرفه او في الحاضنه على درجة (37) درجه مئويه .

5- **تحضير بفر الغسل PBST wash buffer :** تم وزن 10 غم من مسحوق البفر المركز واذابته في 1000 مل من الماء المقطر (distilled water) حسب تعليمات كت البفرات .

6- **غسل الطبق Wash plate :** بعد انتهاء عملية تغليف طبق الاليزا وحضنه تم غسل الطبق باضافة بفر الغسل الى جميع الحفر ثم تفريغه من المحلول عن طرق نفض الطبق بشكل سريع ثم اعادة ملئه مره اخرى ونفضه (تكرار الغسل ثلاثة مرات) ثم قلبت الطبق على ورق التنشيف والضغط عليه وتركه لمدة 30 ثانيه واعادته لوضعه تحضيراً لاضافة العينات .

7- **تحضير بفر استخلاص العينات العام General extract buffer (GEB) :** تم وزن 16.5 غم من مسحوق البفر (GEB) واذابته في 500 مل من الماء المقطر (distilled water)

8- **طحن العينات Grind samples :** تم وزن 1 غم من كل عينه نباتيه ووضعها في الجفنه الخزفيه (هاون خزفي) واُضيف لها 4 مل من بفر الاستخلاص (GEB) لكل عينه وعلى حد ثم سُحقت العينات بواسطه ذراع الجفنه واصبحت على شكل محلول تم تصفية المحلول المتكون بواسطة قطع من الشاش واخذ المحلول النباتي المنقى ووضعه في ابندوف 1.5 مل ووضعت العينات في الثلاجه مباشرةً بعد كل عملية سحق لحين انتهاء السحق لكل العينات.

9 - **توزيع العينات على الطبق Dispense samples :** تم اضافة 100 مايكروليتر من كل عينه من العينات التي تم سحقها في حفر طبق الاليزا كل عينه وضعت في حفره واعطيت رمزاً يبين مكان جمع العينه وتسلسلها وباقي تفاصيل العينه وتمت كتابة هذا الرمز في الرسم البياني الموجود في نهاية التعليمات الخاصه بالكت والذي يوضح تخطيط الطبق .

10- **حضنً الطبق2 Incubate plate :** وضعَ طبق الاليزا مرة ثانيه في صندوق الرطوبه بعد اضافة العينات النباتيه له وتم وضع الصندوق داخل الحاضنه لمدة ساعتين على درجة 37 درجه مئويه ،كذالك يمكن حضن الصندوق على درجة 4 مئويه (في الثلاجه) طول الليل (اقل من 12 ساعه).

11- **تحضير انزيم الربط Prepare enzyme conjugate :** لتحضير انزيم الربط تم تخفيف بفر ECI (enzyme conjugate diluent) حسب النسبه 5:1 حيث تم اضافة 2 مل من البفر ECI المركز الى 8 مل من الماء المقطر (distilled water) وتم اضافة الانزيم الى البفر حسب النسبه 1 مايكروليترانزيم : 100 مايكروليتر ECI .

12- **غسل الطبق 2 Wash plate :** بعد اكتمال عملية حضن الطبق غسل الطبق بمحلول الغسل (بفر الغسل) بنفس طريقة الغسل الاولى ولكن تكررت هنا سبع مرات وتم قلب الطبق على ورق التنشيف كذالك لمدة 30 ثانيه حسب التعليمات

13- **اضافة انزيم الربط (الاجسام المضادة المعلمه بانزيم) add enzyme conjugate :** تم اضافة 100 مايكروليتر من بفر ECI الحاوي على الاجسام المضادة المعلمه بانزيم لكل حفره من حفر الطبق .

14- **حضنً الطبق 3 Incubate plate:** تم وضع الطبق داخل صندوق الرطوبه ووضع الصندوق على درجة حرارة الغرفه لمدة 2 ساعه .

15- **تحضير محلول PNP Prepare PNP solution :** تم تخفيف البفر PNP بنسبة 5:1 بأذابة 2 مل من PNP buffer في 8 مل من الماء المقطر (distilled water) ثم اذابة قرصين من الركيزه (substrate) في المحلول المحضر قبل اضافته الى الطبق ب10 دقائق ، تم مراعاة عدم لمس اقراص الركيزه او تعريض المحلول للاشعه او الحرارة .

16 - **غسل الطبق 3 Wash plate** :كما في عملية غسل الطبق 2 .

17 - **اضافة الركيزه Add PNP substrate :** تم اضافة 100 مايكروليتر من الركيزه لكل حفرة 18 ــ **حضنً الطبق 4 Incubate plate :** كما في عملية حضن الطبق 3 لكن لمدة 60 دقيقه مع مراعاة عدم تعريض الطبق للضوء المباشر او المكثف .

19- **تقييم النتائج Evaluate results :** ملاحظة الطبق بالعين المجرده وقياس النتائج بواسطة جهاز ELISA Reader المصنع من قبل شركة Biotek على طول موجي 405 حسب التعليمات الموصى بها .

ب) الاختبارات الجزيئيه

1. استخلاص الحامض النووي الكلي (للفايروس والنبات)

طحنت العينات (الاوراق النباتيه العليا)بواسطة هاون خزفي وباستخدام النايتروجين السائل (Liquid nitrogen) تم جلبه من شركة الخليج للغازات اذ اخذ عدد من الاوراق النباتيه حديثة النمو من العينات التي جمعت ووضعت في الجفنه الخزفيه (الهاون) كل عينه على حدة واضيف لها كميه من النايتروجين السائل في الجفنه وطحنت باستعمال ذراع الجفنه بصوره سريعه حتى سحقت العينه بالكامل وتطاير النايتروجين فتكون لدينا مسحوق من الاوراق النباتيه وتم مراعاة غسل الجفنه بعد طحن كل عينه لضمان نقاوة العينات والنتائج ، تم اخذ 1 غم من مسحوق العينات المطحونه ووضعت في ابندوف (1.5) مل باستخدام ملعقه صغيره ، اضيف 1 مل من الكت المتخصص لاستخلاص الحامض النووي الرايبي (Accuzol Total RNA extraction Kit) والمنتج من قبل شركة Bioneer الكوريه الى الابندوف الحاوي على العينه وتم مزج الخليط بواسطة pipette تم اضافة 200 مايكروليتر من مادة الكلوروفورم chloroform الى الخليط في الابندوف و مزج الخليط مرة اخرى بواسطة جهاز الهزاز

vigorously لمدة 15 ثانيه حتى يمزج الخليط جيداً ويتحول لونه الى شبه اللون الحليبي ، حفظَ الخليط في الثلج لمدة 5 دقائق .

- نُقل الخليط من الثلج مباشرةً الى جهاز الطرد المركزي (centrifuge) وضبط الجهاز على سرعة 12000 دورة في الدقيقه ولمدة 15 دقيقه وعلى درجة حراره (4°).
- تم اخراج العينات من جهاز الطرد المركزي واخذ الراشح ووضعه في ابندوف جديد بنفس حجم الابندوف السابق واتلف الراسب .
- أضُيف حجم من مادة الايزوبروبيل الكحول مساويه الى حجم الراشح الذي تم اخذه في الخطوه السابقه ومزج الخليط (الراشح + الايزوبروبيل الكحول) عن طريق تحريك الابندوف يدويا من اربع الى خمس مرات ووضعه في درجة حراره 20°ـ لمدة 10 دقائق .
- نقلت العينات مباشرةً من التجميد الى جهاز الطرد المركزي وضبط الجهاز على سرعة 12000 دوره في الدقيقه ولمدة 10 دقائق وعلى درجة 4° .
- ثم تم استخراج العينات من جهاز الطرد المركزي واُتلف الراشح الطبقه السطحيه من الخليط (أزالة جميع السائل الموجود في الابندوف (الانبوبه) والابقاء على بقعه بيضاء تكونت في قعر الانبوبه والتي تمثل الحامض النووي الرايبي الكلي).
- أُضيف 1 مل من الايثانول 80 % ومزجها بواسطة جهاز الهزاز .
- نُقلت العينات الى جهاز الطرد المركزي وضبط الجهاز على نفس السرعه ودرجة الحراره السابقه الذكر ولكن لمدة 5 دقائق .
- أُزيل الراشح مره اخرى واُتلف وتم الابقاء على الراسب (البقعه البيضاء) حيث تم ازالة الراشح بحذر ولكي لايتم فقدان الحامض النووي تم الابقاء على جزء ضئيل جداً من الراشح من الراسب في الابندوف .
- وضعت العينات (الابندوف) مفتوحة الغطاء في اجواء المختبر لكي يتطاير الراشح المتبقي مع الحامض النووي الرايبي .
- بعدما تطاير ماتبقى من الراشح في الابندوف أُضيف 50 مايكرون من الماء الايوني الى الابندوف (الحامض النووي الرايبي المستخلص) ووضعت العينات في حمام مائي على درجة حرارة من 55° الى 60° درجه ولمدة 10 دقائق .
- تم نقل المستخلص من الحمام المائي الى الثلج (المجمده) وخزنه للخطوه اللاحقه .

2- تحويل الحامض النووي الرايبي RNA الى cDNA

في هذه الخطوه تم تحويل الحامض النووي الرايبي الى cDNA عن طريق تكوين شريط مزدوج من الشريط المفرد الاساسي حيث يحتوي الشريط المتكون عـلى بيرمدينات

(Pyrmidines) الثايمين (T) والتي ارتبطت بالشريط الجديد بدلا من بيرمدينات (Pyrmidines) اليوراسيل (U) في الشريط الاساسي RNA حيث تمت هذه العمليه باستخدام كت متخصص **RT- Premix** المنتج من شركة Bioneer الكوريه والبوادئ هي :ــ

1 - Oligo dt 17 mer (5' ــ TTTTTTTTTTTTTTTTT-3')

2− M4t (5' ــ GTTTTCCCAGTCACGACTTTTTTTTTTTTTTT-3')

حيث تم استخدام اكثر من بادئ متمم وحسب الخطوات التاليه :ــ

- خففت البوادئ stock primer المذكوره اعلاه المصنعه من قبل الشركه (Bioneer) بأضافة الماء منزوع الايونات (Deionized water) لها حسب الكميه الموصى بها لكل بادئ فتم اضافة 174.4 مايكروليتر من الماء منزوع الايونات الى البادئ (stock primer Oligo dt) والحصول على تركيز 100 pc بينما اُضيف 144.7مايكروليتر ماء منزوع الايونات الى البادئ (stock primer M4t) والحصول على تركيز 100 pc .
- اُضيف 50 مايكروليتر من البوادئ المذكور في الخطوه السابقه في ابندوف جديد سعة 1.5 مل كل على حدا واضيف لها 50 مايكروليتر من الماء منزوع الايونات لكل بادئ حيث تم الحصول على تركيز 50 pc من البوادئ .
- استخرجت العينات (الحامض النووي الرايبي المستخلص من المرحله السابقه) المخزونه في جهاز التجميد ووضعتها في جو المختبر لتذوب .
- اخذ 18 مايكروليتر من العينات واضفتها الى كت RT- Premix كلً على حدا .
- اضيف 2 مايكروليتر من البادئ المتمم (Oligo dt ، M4t) الى كت RT-Premix .
- وضع المزيج في جهاز الهزاز والطرد المركزي (exispens) لمدة 10 دقائق .
- نقلت العينات الى جهاز PCR (my gen thermal cycle) وضبط الجهاز حسب البرنامج :

Denaturation --------- 95 ---------------------------- 5 min
cDNA ----------------- 42--------------------------- 60 min

ان بقاء العينات في الجهاز يستغرق من 75 الى 90 دقيقه حسب البرنامج الموصى به في الكت (RT- Premix)

- بعدما استخرجنا العينات من الجهاز تم ترحيلها في جل الاكاروز وفحصها في جهاز EZ- capture الموصول بجهاز الحاسبه (اللابتوب) حيث يعمل الجهاز عن طريق تسليط الاشعه فوق البنفسجيه على الجل الحاوي على العينات فظهرت لنا صوره تكون باندات جديده في الجل دليل على تحول الحامض النووي الرايبي .

3- الترحيل الكهربائي (cDNA)

تم ترحيل العينات بعدما تم اخراجها من جهاز(my gen thermal cycle) للتاكد من تحول الحامض النووي الرايبي RNA الى cDNA وحسب الخطوات الاتية :

- تم تخفيف محلول TBE 10 % (stock) الى تركيز 1% اذ تم اخذ 100 مل من TBE ووضعها في دورق كبير واضفت له 900 مل من الماء المقطر .
- تم ملء حوض جهاز الترحيل الكهربائي بمحلول TBE 1 % .
- تم اذابة 1.5 غم من مسحوق الاكاروز في 100 مل من محلول TBE 1% في دورق وتم مزجها ووضعها في جهاز المايكرويف لمدة 3 دقائق لاذابة الاكاروز بشكل كامل مع مراعاة رج الدورق كل 30 ثانيه .
- أُستخرج الدورق (الحاوي على الاكاروز) من المايكرويف ووضع في درجة حرارة المختبر ليبرد وقبل ان يتصلب الجل أُضيف 5 مايكروليتر من مادة Ethidium bromide وصُب الجل في اطار مخصص حاوٍ على حواجزٍ لعمل الحفر المخصصه للعينات في الجل وترك الجل ليتصلب .
- عند تصلب الجل نقل الى حوض الترحيل بعد ازالة الحواجز منه .
- استخرجت العينات من جهاز (my gen thermal cycle) وأُخذ 5 مايكروليتر من كل عينه ومزجت مع 2 مايكروليتر من صبغة DNA loading ووضعت كل عينه في حفره من حفر الجل في حوض الترحيل .
- رُبطت الاسلاك الكهربائيه في حوض الترحيل وحسب الاقطاب وتم تشغيل الجهاز لمدة 50 دقيقه .
- نُقل الجل من حوض الترحيل الى جهاز EZ- capture حيث تمت ملاحظة تكون باندات جديده في الجل من خلال الصور التي اظهرها جهاز الحاسوب دليل على تحول الحامض النووي الرايبي الفايروسي الى cDNA والانتقال الى مرحلة اكثار الحامض النووي المتكون .

4- أكثار الحامض النووي الفايروسي باستعمال تقانة تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل polymerase chain reaction

تم اكثار قطع الحامض النووي الفايروسي خارج الخليه النباتيه الحيه من خلال عمل نسخ عديده منه (الاف او مئات الالاف) باستخدام كت متخصص MasterMix والمنتج من شركة Bioneer الكوريه وبوجود برايمرات متخصصه :ـــ

Car F1 (forward) (5' - CNRTBTCNAAYAAYATGGC -3') ALKuwaiti .2013
- GGBYTNGGBGTNCCNACNGA-3') ALKuwaiti .2013 'Carla cp (forward) (5
Carla uni (forward) (5'- GGAGTAACYGAGTGATACC-3') ALKuwaiti .2013
PVM-CP(forward) (5'-ATGGGAGATTCAACRAAGAA-3') Tabasine jad.2014

PVM CP(reverse) (5'-CTTCATTTGTTATTCGACTT-3') Tabasine jad.2014
Uligo dt 17 mer (reverse) (5'- TTTTTTTTTTTTTTTT -3') ALKuwaiti .2013
GTTTTCCCAGTCACGACT(15)-3) ALKuwaiti .2013 - reverse) (5 −M4t)

- خففت البوادئ stock primers حسب تعليمات الشركة المنتجه وسحبنا 10 مايكروليتر من البوادئ ووضعها في ابندوف كلٌ على حدة واضفنا 90 مايكروليتر من الماء منزوع الايونات لها حيث تم الحصول على برايمرات بتركيز 10 pc المخصصه لتفاعل البلمره المتسلسل .
- اخذت 2 مايكروليتر من forward primer واضافته الى كت PCR Premix لكل عينه
- اخذت 2 مايكروليتر منreverse primer واضافته الى كت PCR Premix كذالك لكل عينه
- اخذت 5 مايكروليتر من العينات cDNA واضيفت الى المزيج (الكت) .
- اضيف 11 مايكروليتر من الماء منزوع الايونات لكل عينه .
- وضع المزيج في جهاز الهزاز والطرد المركزي exispin لمدة 10 دقائق .
- ثم نقلت العينات (المزيج) الى جهاز my gen thermal cycle وتم ضبط الجهاز حسب البرنامج : - cycle 30

95 c° ----------{5,3 min } denaturation
94 c° ----------{1 min ,30sec} denaturation
49,50,54 c° ----------{1,2 min} annealing
72 c° ----------{1,2 min ,30 sec} extension
72 c°----------{5 min} final extension

حيث استغرقت وجود العينات في الجهاز من ساعتين ونصف الى ثلاث ساعات ونصف حسب درجات الحرارة والوقت من ثم اجري الترحيل الكهربائي للعينات.

5- الترحيل الكهربائي (PCR)

تم ترحيل العينات بعد اخراجها من جهاز(my gen thermal cycle) للتاكد من تضاعف الحامض النووي الفايروسي ووجوده حيث ان عملية الترحيل في هذه المرحله هي مشابهه لسابقتها في ترحيل cDNA ولكن الاختلاف يكمن في ان العينات بعد استخراجها من جهاز my gen thermal cycle اُضيفت مباشرةً الى الحفر المعده في الجل دون مزجها مع صبغة DNA loading واضيفت مادة اللدر (leader) في احد الحفر مع العينات (تحتوي هذه الماده على تسلسل للقواعد النتروجينيه يبدامن 25 الى 2000 قاعدة نيوكلوتيد) تضاف الى الجل لكي تعطي صورة كامله لعدد القواعد المتكونه لمعرفة الفايروس المشخص.

النتائج والمناقشة:

1- الفحوصات السريولوجيه :ــ والتي اعتمدت على اختبار الاليزا المباشره DAS-ELISA

اظهرت نتائج الفحص السريولوجي باعتماد تقنية الاليزا باستعمال كت متخصص على فايروس البطاطا m (PVM) والمستخدم فيه اجسام مضاده وحيدة النسيله monoclonal وجود فايروس البطاطا pvm في المناطق التي شملتها الدراسه (قضاء ابي غريب، قضاء المحموديه ، قضاء الصويره ، ناحية اليوسفيه) وبنسب قراءه متفاوته اذ كانت اعلى قراءه (عينات ايجابيه) للعينات المتحيزه والعشوائيه والتي جمعت من حقول قضاء الصويرة 3.318 وجائت هذه القراءه مرتفعه مقارنةً مع ماذكره Slack (1983) اثناء تشخيصه لعزلات من سلالات الانديز لفايروسات البطاطا باستخدام اجسام مضادة من نوع monoclonal حيث كانت اعلى قراءه للفايروس 1.024، في حين تعتبر هذه النتائج مغايره ايضا لمستويات القراءه للعينات التي جمعها Koenig (1978) والتي سجلت فيها القراءه صفراً على الرغم من استخدام الاجسام المضاده المتخصصه monoclonal ، في حين كانت ادنى قراءه في حقول قضاء الصويره ايضا و بلغت 0.380 في حين كان اعلى متوسط قراءه في قضاء الصويرة وبلغ 1.0826 وادنى متوسط قراءة في قضاء المحموديه وبلغ 0.622 على طول موجي مقداره 405 nm كما في الجدول رقم 1 ، وكذالك اختلفت هذه النتائج عن النتائج التي تحصل عليها Cavileer (1998) في جامعة Idaho اذ بلغت اعلى قراءه لديه 0.51 على ذات الموجه (405 nm) وادنى قراءه 0.02 وقد قارن Cavileer نتائجه ايضا مع دراسات سابقه لموسسات وشركات متخصصه كالتالي :

1- اعلى قراءه ل Agdia Corp 1.76 في حين ادنى قراءه كانت 0.02 والتي هي نفس الشركه التي تم استيراد كت الاليزا منها ،
2- اعلى قراءه ل Idaho Falls اعلى من 2.0 بينما ادنى قراءه كانت 0.16
3- اعلى قراءه لBioreba Corp 0.68 وادنى قراءه كانت 0.18 .

وان جميع القراءات لهذه الشركات كانت ادنى من القراءه التي سجلت لدي وهذا يدل على وجود تركيز عالٍ من الفايروس .

جدول 1 يبين قراءة نتيجة اختبار الاليزا للعينات في الاقضيه والنواحي موضوع الدراسه بعد يوم واحد من الاختبار

القضاء او الناحيه	الصويرة			ابي غريب			المسيب		اليوسفيه		المحموديه	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.255	0.908	0.851	1.012	0.837	0.745	0.693	0.843	0.736	0.544	0.535	0.670
B	0.380	1.014	1.112	0.893	1.000	0.719	0.787	0.651	0.797	0.683	0.611	0.749
C	0.718	0.881	1.232	0.950	0.909	0.835	0.710	0.622	0.705	0.895	0.577	0.681
D	0.964	1.061	0.752	0.955	0.772	0.842	0.735	0.603	0.611	0.601	0.611	0.726
E	0.602	1.129	1.213	1.011	0.911	0.819	0.882	0.769	0.855	0.761	0.637	0.706
F	0.552	1.195	1.204	0.912	1.001	0.829	0.910	0.770	0.893	0.841	0.794	0.698
G	1.244	1.336	1.256	0.965	1.070	0.857	1.071	0.430	0.565	0.510	0.441	0.470
H	1.228	3.318	0.916	0.765	0.636	0.630	0.613	0.565	0.531	0.452	3.595	0.438
متوسط القراءاة لكل قضاء /ناحيه	1.0826			0.869			0.728		0.685		0.622	
اقل فرق معنوي L.S.Dعند مستوى P=0.05	* 0.366			* 0.207			* 0.294		* 0.271		* 0.283	

* العينه A1 تمثل negative . *العينه H11 تمثل positive

جدول 2 يبين قراءة نتيجة اختبار الاليزا للعينات في الاقضيه والنواحي موضوع الدراسه بعد ثلاثة ايام من الاختبار

القضاء او الناحيه	الصويرة			ابي غريب			المسيب		اليوسفيه		المحموديه	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.268	2.486	2.459	2.553	2.060	1.874	1.647	2.078	1.716	1.185	1.152	1.288
B	1.048	2.772	3.026	2.250	2.608	1.779	1.919	1.553	1.933	1.618	1.408	1.586
C	2.221	2.400	3.262	2.394	2.286	2.109	1.702	1.443	1.697	2.251	1.357	1.466
D	2.618	2.789	1.949	2.312	1.916	2.191	1.778	1.410	1.387	1.390	1.439	1.552
E	1.655	2.907	3.217	2.534	2.197	2.084	2.187	1.896	2.089	1.844	1.515	1.526
F	1.526	2.945	3.192	2.210	2.451	2.062	2.291	1.913	2.252	2.113	1.940	1.557
G	3.152	3.562	3.212	2.396	2.605	2.176	2.985	0.982	1.344	1.184	1.014	0.944
H	3.083	3.522	2.557	1.866	1.662	1.594	1.633	1.464	1.336	1.106	3.857	0.970
متوسط القراءاة لكل قضاء /ناحيه	2.6764			2.173			1.805		1.652		1.351	
اقل فرق معنوي L.S.Dعند مستوى P=0.05	* 0.672			* 0.894			* 0.522		* 0.593		* 0.533	

* العينه A1 تمثل negative .* العينه H11 تمثل positive

2- الاختبارات الجزيئيه :

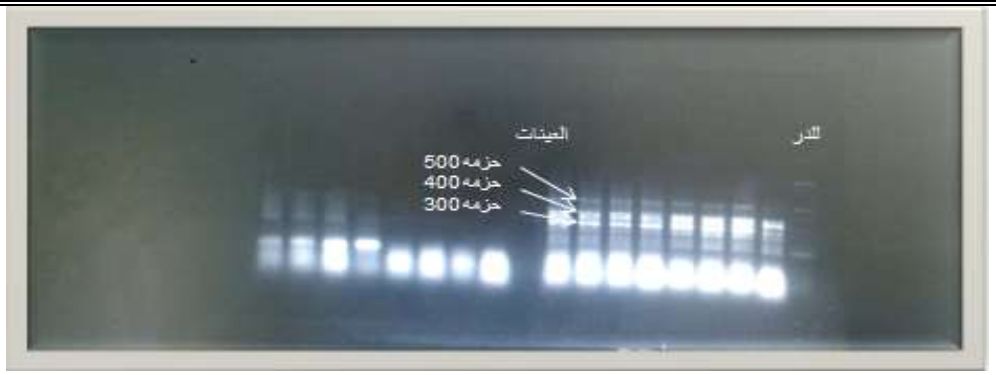
اظهرت نتائج تحويل الحامض النووي RNA الى CDNA من خلال الترحيل الكهربائي على جل الاكاروز الى تكون باندات جديدة دليل على تحول الحامض النووي في اغلب العينات المختبره والمستخدم فيها بادئ Uligo dt كما في الشكل رقم 1

شكل 1 يبين سريان عينات الحامض النووي في جل الترحيل دليل على تحول الحامض النووي الرايبي الى cDNA

تضاعف الحامض النووي الفايروسي

I. اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لتضاعف الحامض النووي للعينات التي تم جمعها من الحقول موضوع الدراسه في الموسم الخريفي 2017 وباستخدام البوادئ Car f1،Carla uni ، Pvm F، Pvm R، M4T، Carla cp، Uligo dt تكون حزم متفرقه منها 280،300،350،400،500 pb منها وجود اكثر من حزمه في العينه الواحد حيث يختلف برنامج RT-PCR عن ماذكره Cavileer (1998) والذي استخدم بادئ uligo dt 18 في النسخ العكسي وتحويل الحامض النووي الرايبي الى CDNA ثم تضخيم الحامض النووي باستعمال زوج من البوادئ : forword primer (5- - GGCGATGGGAGATTCAACGAAGAAAG -3) reverse primer (5-GGAGTAAAGCCACCTTGGTTACGTC -3)

والتي اختلفت عن بوادئ ماتم استخدامها كذلك كان هنالك اختلاف في برنامج التضاعف في عدد الدورات والتي كانت 35 دورة ودرجة حرارة ارتباط الشريط والتي كانت 60 درجه و اختلاف توقيت الخطوات حسب Cavileer في حين اختلف تسلسل البوادئ عما استخدمته Tabasine jad واخرون (2014) وكذالك برنامج التضاعف فقد اختلف في درجات الحرارة والتوقيت وان الحزم المتكونه تختلف عن ماذكرته Tabasine jad في ان الحزمه يجب ان تكون 915 pb في حين ان ماتكون لدينا هي في الغالب 300 pb كما في الاشكال 2،3،4،5،6، بينما اختلفت الحزم التي تكونت عن استخدام زوج من البرايمرات المتخصصه على فايروس PVM من قبل chiunga (2013) حيث استهدفت هذه البرايمرات تضاعف النيوكلوتيدات في جزء الغلاف البروتيني للحامض النووي الفايروسي والتي انتج عنها حزمه بطول 982 pb نستنتج مماذكر في نتائج الفحوصات الجزيئيه تكون حزم مختلفه عن الحزم السابقه في البحوث والذي قد يكون سببه وجود سلاله جديده للفايروس تختلف عن السلالات السابقه اما في حالة وجود اكثر من حزمه واحد قد يعود ذلك لوجود اكثر من فايروس في العينه الواحد .

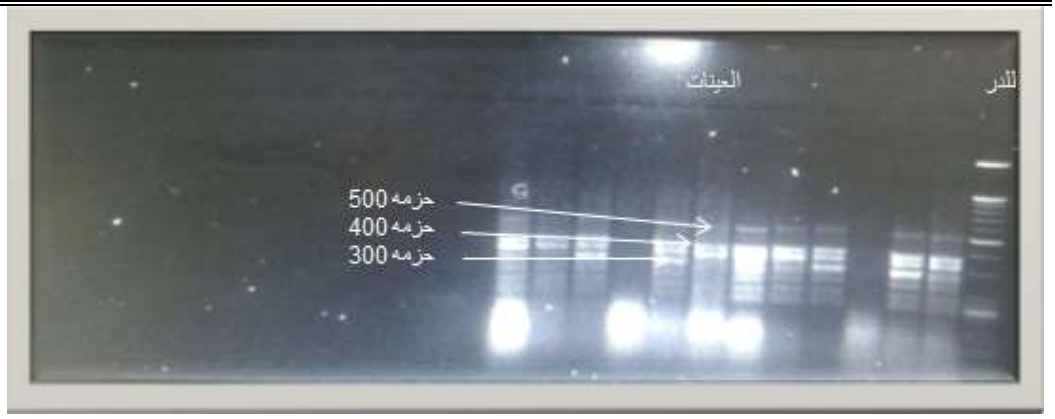


شكل رقم 2 يبين نتائج الترحيل الكهربائي في جل الاكاروز للعينات التي تم جمعها من قضاء أبي غريب

شكل رقم 3 يبين نتائج الترحيل الكهربائي للعينات التي تم جمعها من قضاء المسيب

شكل رقم 4 يبين نتائج الترحيل الكهربائي للعينات التي تم جمعها من قضاء الصويره

شكل رقم 5 يبين نتائج الترحيل الكهربائي للعينات التي تم جمعها من قضاء المحموديه



شكل رقم 6 يبين نتائج الترحيل الكهربائي للعينات التي تم جمعها من ناحية اليوسفيه

المصادر

العاني، رائد رؤوف مصطفى .1995 . تشخيص وتنقية فايروس البطاطا M .المكتبة المركزيه, جامعة بغداد، العراق .

References

AL-Kwaiti,N.A.S. 2013. Molecular Characterization of Viruses Infecting Potato and Vegetables in Iraq. Natural resources institute, ph D thesis , University of Greenwich UK.

Bagnall, L. and Walker, Res.1956 . Bull. agric. Exp. Stn Univ. Wis. 198, pp. 45.

Beemster, A.B.R.and de Bokx, J.A. 1987. Survey of properties and symptoms. Chapter 6. In: de Bokx J.A., van der Want J.P.H. (eds). Viruses of potatoes and seed-potato production. 2nd edition. Pudoc, Wageningen, The Netherlands. Pp. 84-113.

Brunt, A.A. 2001. Potato virus M (PVM; Genus Carlavirus). In: Loebenstein G, Berger PH, Brunt A.A., Lawson R.H. (eds) Virus and virus-like diseases of potatoes and production of seed potatoes. Kluwer, Dordrecht, 101–108.

Cavileer, T. D., Clarke, R. C., Corsini, D. L., and Berger, P. H. 1998. A new strain of potato carlavirus M. Plant Dis. 82:98-102.

Chiunga,E .2013. Viruses Occurring in Potatoes (Solanum tuberosum) in Mbeya Region, Tanzania. Master's thesis. University of Helsinki .Department of Agricultural Sciences. Plant Production Science/ Plant Pathology.

Chrzanowska, M.,M.T.Sieczka and H. Zagórska, 2002. Resistance to PVM in Potato Parental Lines Bred in Mlochow Research Center, IHAR. Plant Breeding and Seed Science Volume 46 , no. 2.

Clark, M.F.and Adams, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J G Virol 34:475–483.

Czupryn,M.,M.Blaszczyk,and S. Skrzeczkowska,1976. Methods for isolation and identification of potato virus M, S,X,Y., ACTA Societatis Botanicorum Poloniae , Poland ,Vol. XLV, No.1- 2.

De Bokx J. A, P. G. M. Pironand E. Cother .1980 .Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of potato viruses S and M in potato tubers. Netherlands Journal of Plant Pathology ,86: p.285-290.

De Bokx, J. A.,1987. Viruses of Potatoes and Seed–Potato Production 2nd edition. J.A. De Bokx and J.P.H. Van der Want,Center for Agricultural publishing and documentation ,Wageningen. pp.58

Fletcher,J.D. 2012. A virus survey of New Zealand fresh, process and seed potato crops during 2010–11. New Zealand Plant Protection. 65: 197-203 .

Gibbs, A. J., K. Ohshima, M. J. Phillips, and, M. J. Gibbs .2008. The prehistory of potyviruses: their initial radiation was during the dawn of agriculture. Yarralumla, Australian Capital Territory, Australia PLoS ONE 3:e2523

Jeffries. C.1998. Potato. FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm.Food and Agriculture Organization of the United Nations/International Plant Genetic Resource Institute. Rome No. 19, pp.1 17.

Kerlan, C. 2008. Potato viruses. In: Mahy, B.W and Regenmortel, M.H.V (Eds).201 Desk enciclopedia of plant and fungal virology. San Diego, California, USA 458- 47.

King,A.M.Q., M.J. Adams, E.B. Carstens, E.J. Lefkowitz , (Ed).2012.Virus taxonomy :Classification and nomenclature of viruses Ninth report of the International committee on taxonomy of viruses. Elsevier Academic press : Amsterdam. Pp. X 1327.

Koenig, R . 1978. Elisa in the Study of Homologous and Heterologous Reactions of Plant Viruses, J. gen. Virol., Germany,No. 40 , P. 309-318.

Kostiw,M.2011. The Occurrence of Major Potato Viruses in Poland. Journalnal of Plant Protection Research. Poland. Vol. 51, No. 3.

Kryldakov,R.,R. Akbergenov,T. Hohn and B. Iskakov .2011. Identification of silencing suppressors of potato virus M. Journal of Cell and Molecular Biology. 9(1): 15-20.

Qamar,M.I.,S. Batool,W. Aurangzeb,R. Zainab and S. Menghwar.2016. Different Techniques for Diagnostic of Potato Viruses.World Journal of Biotechnology . Volume 01,Issue 03.

Marczewski ,W.,D.Strzelczyk-Zyta ,J. Hennig ,K. Witek ,C.Gebhardt. 2006. Potato chromosomes IX and XI carry genes for resistance to potato virus M. Theor Appl Genet 112: 1232–1238.

Mumford, R., K. Walsh, I. Barker and N. Boonham . 2000. Detection of potato mop top virus and tobacco rattle virus using a multiplex real-time fluorescent reverse-transcription polymerase chain reaction assay. Phytopathology. 90(5): 448-453.

Plchova,H., P.Vaculik, N. Cerovska, T. Moravec and P. Dedic.2015. Molecular and Biological Analysis of Potato virus M (PVM) Isolates from the Czech Republic. Journal of Phytopathology. Volume 163, Issue 11-12, P. 1031–1035.

Proll .E ., R . M . Leiser, W .D .Osterman , D . Svmm . 1981 . Some Physicochemical properties of potato virus M .Potato Research 24,1-10.

Rauscher, G., C. Smart, I. Simko, M. Bonierbale, H. Mayton, A. Greenland and W. Fry. 2006. Characterization and mapping of r pi-ber, a novel potato late blight resistance gene from solanum berthaultii. Theoretical and applied genetics. 112(4): 674-687.

Roossinck, M. J. 2012. Plant virus metagenomics: biodiversity and ecology. 46: 359–369.

Ruiz de Galarreta, J. I., A. Carrasco, A. Salazar, I. Barrena, E. Iturritxa, R.Marquinez , F.J. Legorburu, and E.Ritter .1998. Wild Solanum species as resistance against different pathogens of potato. Potato Research 41:57-68.

Salazar ,L.F .1996. Potato Viruses and their Control, Lima, Peru ,Intern. Potato Center, pp.214

Schultz,E .S. and D.Folsom. 1923.Transmission variation and control of certain degeneration diseases of Irish potatoes . Journal of Agricultural Research ,25:43 -117

Singh, R.P. 1999. Development of the molecular methods for potato virus and viroid detection and prevention. Genome 42: 592–604.

Slack,S.A.1983.Identification of an isolate of the Andean strain of potato virus S in North America .Plant Disease.67:786-789.

Tabasine jad,F ., B. Jafarpour ,M. Zakiaghl , M.Siampour ,H. Rouhani and M. Mehrvar.2014. Genetic structure and molecular variability of potato virus M populations. Arch Virol .Volume 159, Issue 8, pp 2081–2090.

Varma , A .1988 . The Filamentous Plant Viruses In: The Plant Virus .Vol . 4. P.371.R. G. Milne (ed.). Plenum Press, New York.

Wetter ,C. 1972. Potato Virus M . CMI/ AAB Description of Plant Viruses No.87.Ferry Lane , Kew , Surrey . England.

Whitworth, A.J., P.D. Wes and L.J. Pallanck .2006. Drosophila models pioneer a new approach to drug discovery for Parkinson's disease. Drug Discov. Today 11: 119–126

Zavriev, S.K., Kanyuka, K.V. and Levay, K.E.1991 . The genome organization of potato virus M RNA. Journal of General Virology. 72: 9-14.

Immune and molecular detection of patato virus M on potato plant in some regions of Iraq

The abstract

This study carried out in the laboratory of plant pathology at college of Agriculture / University of Baghdad and Jeser AL-Museb laboratory . It aimed at investigating potato virus M on potato plants (Solanum tuberosum) in some regions of Iraq molecularly by using reverse transcription - polymerase chain reaction depending on the primers (PVM (R) , PVM (F) , Car f1, Carla cp , Carla uni , Uligo dt and M4t) and double antibody sandwish enzyme – linked immunosorbent assay depending on antibodies specialized on PVM .

ELISA antibodies specialized on PVM results indicated that there were different readings in the regions under the study after one day from infection , the highest reading was in ALSuera District at 3.318 , the lowest reading was in the same District too at 3.380 .The highest reading average was in ALSuera District at 1.0826 while the lowest reading average was in ALMahmodia district at 0.622 .

Molecular tests (RT-PCR) results showed nucleotide straps formation in electrophoreses gel at 300 pb by using Uligo dt 17 ، Carla uni ، PVM(F) ، PVM(R) primers and 300 , 400 , 500 pb as double bands for the samples collected from Abo Ghreeb district by using Car f 1 ، Carla cp ، Carla uni ، Uligo dt 17 ، M4t ،PVM(F) ، PVM(R) primers , the straps of samples that are collected from ALMuseeb distract was at 400 pb by using the primer PVM F+R , while the samples collected from ALSuera District recorded 300 , 400 , 500 pb as double and single bands . while bands in Almhmodia district was at 300 pb and 300 , 400 and 500 as single and double band in ALYusifia