

وصف لعزلة جديدة من فايروس موزائيك الخيار Cucumber mosaic virus في العراق (CMV)

مروة صباح حميد عباس الجميلي*
نورس عبد الإله صادق الكويتي
كلية علوم الهندسة الزراعية _ جامعة بغداد

*المراسلة الى: مروة صباح حميد، قسم وقاية النبات، كلية علوم الهندسة الزراعية، جامعة بغداد، بغداد، العراق.
البريد الالكتروني: marwa.sabbah1204a@coagri.uobaghdad.edu.iq

Article info

Received: 2022-04-02

Accepted: 2022-05-15

Published: 2022-06-30

DOI-Crossref:

10.32649/ajas.2022.175421

Cite as:

Al-Jumaily, M. S. H., and N. A. S. Alkuwaiti. (2022). Description of a new isolate of cucumber mosaic virus in Iraq. Anbar Journal for Agriculture Science, 20(1): 48-62.

©Authors, 2022, College of Agriculture, University of Anbar. This is an open-access article under the CC BY 4.0 license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



الخلاصة

اجريت هذه الدراسة بهدف عزل فايروس موزائيك الخيار Cucumber mosaic virus وتشخيصه اعتماداً على خصائصه المصلية والبايولوجية والجزيئية. اذ جمعت عينات من اوراق نباتات خيار ظهرت عليها اعراض موزائيك من البيوت البلاستيكية العائدة لقسم وقاية النبات-كلية علوم الهندسة الزراعية/جامعة بغداد في الجادرية وتم استعمالها في اجراء عدوى على نباتات الخيار ونباتات مشخصة اخرى. كذلك فحصت العينات مصليا بوساطة تقانة ELISA وباستعمال عدة فحص تجارية متخصصة بفايروس موزائيك الخيار. شخص الفايروس جزيئياً باستعمال تقانة تفاعل انزيم البلمرة والنسخ الرجعي RT-PCR بوجود بوادئ متخصصة بفايروس موزائيك الخيار تستهدف جين الغلاف البروتيني للفايروس وحدد التسلسل النيوكليوتيدي لقطع DNA المضخمة وحللت باستعمال برامجيات الحاسوب. اكدت نتائج اختبارات العدوى تشخيص فايروس موزائيك الخيار في عينة خيار ظهرت عليها اعراض الموزائيك والتي تمثلت بظهور اعراض بقع موضعية متخثرة على اوراق نباتات اللوبياء المعدة. أمكن تشخيصها بواسطة عدة فحص اليزا التجارية من الكشف عن الفايروس في العينة المختبرة عندما حققت شدة التغير في اللون اعلى قيمة امتصاص على طول موجي 405 نانومتر بلغت 2.907. جزيئياً، تم تضخيم قطع DNA المستهدفة ذات الوزن الجزيئي ~500 زوج قاعدي والمتخصصة بفايروس موزائيك الخيار باستعمال طقم البوادئ CMV-F/ CMV-R المتخصص. اكدت نتائج التحليل النيوكليوتيدي ان قطعة DNA ذات الوزن الجزيئي ~500 المضخمة من عينة الخيار بوساطة CMV-F/CMV-R تعود الى

جين الغلاف البروتيني لفايروس موزائيك الخيار لدى مقارنتها مع التسلسلات المكافئة المودعة في بنك الجينات NCBI عند مستوى التسلسلين النيوكليوتيدي والحامض الاميني، اذ حققت هذه العزلة اعلى نسب تطابق نيوكليوتيدي واميني وصلت الى 95% و91% على الترتيب مع عزلات الهند واليابان والصين والولايات المتحدة الامريكية العائدة الى فايروس موزائيك الخيار (عزلات الهند (MN380719.1) واليابان (AB119091.1)، LC066446.1، LC066431.1، LC500133.1) والصين (MH119158.1)، MG025949.1، MT108233.1، EF159146.1، KT302175.1، KT302193.1، MH119170.1، MH119154.1) والولايات المتحدة الامريكية (AF523345.1). وضعت شجرة الأصول الوراثية من نوع الضامة بالتجاور التي تم بناؤها من التسلسلات النيوكليوتيدية الجزئية لجين الغلاف البروتيني لعزلة فايروس عينة الخيار مع نظيراتها في بنك الجينات مما يشير الى انها قد انحدرت من أصل مشترك مؤكدة ان عزلة الخيار قيد الدراسة تعود الى فايروس موزائيك الخيار Cucumber mosaic virus.

كلمات مفتاحية: RT-PCR، قرعيات، ELISA، بوادئ، فايروسات النبات

DESCRIPTION OF A NEW ISOLATE OF CUCUMBER MOSAIC VIRUS IN IRAQ

N. A. S. Alkuwaiti

M. S. H. Al-Jumaily*

Plant Protection Dept., College of Agricultural Eng. Sc., Univ. of Baghdad

*Correspondence to: Marwa Sabah Hameed, Plant Protection Dept, College of Agricultural Eng. Sc., Univ. of Baghdad, Baghdad, Iraq.

E-mail: marwa.sabbah1204a@coagri.uobaghdad.edu.iq

Abstract

This study was initiated to isolate and characterize Cucumber mosaic virus based on serological, biological and molecular approaches. Leaf samples were collected from symptomatic cucumber plants grown in protected fields at Plant Protection Dept., College of Agricultural Engineering Sciences, University of Baghdad at Al-Jhdryaa and used for biological assays. ELISA using CMV specific commercial kit was used to detect the virus in collected samples. RT-PCR using CMV specific primer set targeting CP gene was used to confirm CMV infection. DNA fragment amplified were sequenced and analyzed using computer software packages. Bioasys showed *Vigna unguiculata* exhibited necrotic local lesions when inoculated with cucumber samples. ELISA indicated that cucumber sample was CMV infected scoring 2.907 highest absorbance

at 405 nm. RT-PCR using CMV-F/ CMV-R primer set could amplify the targeted ~500 bp DNA fragments from cucumber samples only. Sequence analyses confirmed the detection when CMV isolated shared 95 and 91% maximum nucleotide (nt) and deduced amino acid (aa) sequence identities with the equivalent gene bank sequences of CMV CP from India, Japan, China and USA. Neighbor joining (NJ) phylogenetic tree, concentrated from partial CP gene nt and aa sequences, confirmed the relatedness when gouged CMV isolated to other CMV sequences suggesting common origin. These findings confirmed the symptomatic cucumber sample collected from protected culture was CMV infected.

Keywords: RT-PCR, Cucurbitaceae, ELISA, Plant Viruses, Initiator.

المقدمة

يعد فايروس موزائيك الخيار CMV من الفايروسات ذات المدى العائلي الواسع جداً إذ له القدرة على إصابة 1200 نوع نباتي تعود الى 101 عائلة نباتية من ذوات الفلقة الواحدة وذوات الفلقتين بضمنها محاصيل ذات اهمية اقتصادية مسببا خسائر معنوية وبخاصة على القرعيات، والعائلة الباذنجانية والبقوليات وغيرها (20). تم تسجيل فايروس موزائيك الخيار لأول مرة عام 1916 على نباتات خيار اكدت اصابتها في الولايات المتحدة الامريكية (12). تصنيفيا يعود فايروس موزائيك الخيار الى جنس Cucumovirus وهو الفايروس الممثل لهذا الجنس ضمن عائلة (6) Bromoviridae. تمتاز جسيمات الفايروس كونها متساوية الابعاد Isometric، غير مغلفة يتراوح قطرها بين 28-30 نانوميتر، من دون ترتيب واضح للكابسوميرات (12). تحتوي جسيمة الفايروس الواحدة على 18% حامض نووي RNA+ و 82% بروتين ولا يوجد فيها دهون، ويتكون الجينوم من ثلاث قطع من الحامض النووي الرايبوسيدي الخيطي، احادي السلسلة، يبلغ العدد الكلي للنوكليوتيدات الداخلة في تركيبه 8621 نوكليوتيدة (9 و20). يسبب الفايروس اعراض مختلفة على الكثير من العوائل النباتية منها العائلة القرعية والباذنجانية والبقوليه تتراوح ما بين ظهور بقع موضعية على الاوراق المعدة فقط الى اصابه جهازية تشمل النبات بأكمله كما تتباين اعراضه من طفيفة الى شديدة تسبب موت النبات بأكمله وتؤدي الاصابة على نباتات الطماطة الى ظهور اعراض تتمثل في تشوه وتقرم الثمار. وينقل الفايروس من النباتات المصابة الى السليمة ميكانيكياً أو بالبذور أو بحشرات المن بالطريقة غير الباقيه (20). سجل هذا الفايروس أكثر من 70 سلالة تم توصيفها ووضعها في مجموعات على اساس الاعراض وخصائص الفايروس خارج الخلية والتفاعلات المصلية والحركة في المجال الكهربائي (12). في العراق، اعتمدت الطرائق الحيوية المستندة على استجابة العوائل النباتية المختلفة للفايروس والطرق المصلية وخاصة اختبار ELISA كثيراً في تشخيص فايروس موزائيك الخيار وتحديد سلالاته على العوائل النباتية المختلفة (2 و3). كما سجلت عدة سلالات لهذا الفايروس في العراق اعتماداً على اعراض النباتات الكاشفة مصليا وفيزيوكمياً عن طريق الترحيل الكهربائي للغلاف البروتيني (1 و13). ان تنوع سلالات الفايروس وانتقاله ببذور بعض الأنواع وكثرة عوائله البديلة والتي تمثل مصادر طبيعية للإصابة به تضمن له التواجد المستمر وتعمل حشرات المن الناقلة إذا ما توافرت الظروف البيئية الملائمة الى انتشاره وبائياً مؤدياً الى خسارة كبيرة. لقد انتشرت في الآونة الأخيرة اعراضاً مرضية على نباتات الخيار في منطقة زراعته في البيوت البلاستيكية في كلية علوم

الهندسة الزراعية جامعة بغداد/الجادرية تشابه تلك التي تسببها فيروسات موزائيك الخيار على القرعيات، إذ تمثلت الاعراض بحدوث تشوهات على الاوراق وظهور تنبغات وشحوب على الاوراق الناضجة وظهور مساحات على الاوراق الحديثة مخضرة النمو وحدوث تشوهات على الثمار وتقرم ، لذا هدفت هذه الدراسة الى عزل فايروس موزائيك الخيار Cucumber mosaic virus وتشخيصه اعتماداً خصائصه المصلية والبايولوجية والجزيئية الذي يسبب العديد من الأمراض على العائلة الباذنجانية والقرعية والبقولية .

المواد وطرائق العمل

جمع العينات: جمعت عدة عينات من المجموع الخضري لنباتات خيار ونباتات اخرى تظهر عليها أعراض مشابهة لتلك التي يسببها فايروس CMV من التشوه والتقرم اثنا عدة زيارات ميدانية لحقول الخيار في موقع جامعة بغداد_ الجادرية/ كلية علوم الهندسة الزراعية، وكذلك جمعت عينات من نباتات خيار وقرعيات اخرى ونباتات باذنجان وفلفل وطماطة من منطقة اليوسفية في محافظة بغداد. ثم وضعت العينات في اكياس قابلة للغلق وتم تعليمها وحفظت على درجات حرارة تحت الصفر لحين فحصها.

تهيئة نباتات الاختبار: نفذت التجربة في جامعة بغداد/كلية علوم الهندسة الزراعية - قسم وقاية النبات في غرفة زجاجية تعود الى مختبر امراض النيات زرعت بذور الكواشف النباتية (خيار، طماطة، لوبيا صنف Black eye، فاصوليا صنف Red Kidney، فاصوليا صنف Pinto، فاصوليا صنف Black turtle) في وسط عضوي (Peatmoss) في اصص بلاستيكية تحت ظروف البيت الزجاجي بدرجة حرارة مناسبة. نقلت البادرات جيدة النمو بعمر الورقتين الأوليتين لنبات الخيار ومرحلة 3_5 اوراق لعوائل اخرى (باذنجان وطماطة وفلفل) الى اصص بلاستيكية ذات ابعاد مختلفة حاوية على خليط من الوسط العضوي. كما تم مراعاة سقي النباتات وتسميدها بسماد اليوريا بنسبة (1غم/ لتر ماء). علاوةً على رش النباتات كل اسبوعين يوماً بالمبيد (Abamectin) بمعدل 0.5 مل/ لتر ماء لمكافحة الحشرات والحلم.

العدوى الميكانيكية: حضر مستخلص من اوراق نباتات مصابة بسحق الاوراق القمية بوساطة هاون خزفي معقم وبنسبة 1غم من الاوراق الى 1مل من الماء المقطر مع الاستمرار بالسحق لغاية الحصول على مستخلص نباتي متجانس. خدشت اوراق النباتات الكاشفة بمسحوق الكاربورندم 400 مش (5)، بعد ذلك مسحت اوراق النباتات بالمستخلص النباتي المتجانس. غسلت النباتات المعدة بالماء المقطر بعد 1-2 دقيقة من العدوى ووضعت في البيت الزجاجي وتم متابعة الاعراض يومياً على النباتات المذكورة.

الفحص المصلي بتقانة الاليزا (ELISA Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay): استعملت عدة الفحص المحهزة من قيل شركة Agdia الامريكية واتبعت خطوات الفحص القياسية المعتمدة من قبل الشركة المنتجة مع التحوير المناسب وفق الحاجة وكالاتي: _

تم تهيئة صندوق الرطوبة والذي هو عبارة عن حاوية بلاستيكية يوضع داخلها طبق الأليزا خلال مدة تحضين الطبق إذ تم وضع ثلاث طبقات من المناديل الورقية أسفل الحاوية البلاستيكية واضيف مقدار قليل من الماء

لغرض ترطيب الطبق، إذ يتيح هذا الطبق من اتمام خطوات الاختبار. حضر محلول دارئ الاستخلاص بإذابة 16.5 g غرام من مسحوق الدارئ المجهز مع عدة الفحص في 500 مل ماء مقطر وأضيفت الى المحلول مادة Tween -20 بمقدار 10 غم. وزن 1 غرام من كل عينة نباتية ووضع في هاون خزفي اضيف لها 10 مل من محلول دارئ الاستخلاص المجهز من قبل الشركة لكل عينة مستقلة ثم سحقت العينات جيدا بوساطة ذراع الجفنة واصبحت بشكل محلول متجانس، ثم نقل المحلول من كل عينة الى انبوبة سعة 1.5 مل وحفظت في درجة 4 سيليزيه. اضيفت 100 مايكروليتر من كل عينة من العينات النباتية المسحوقة الى حفر طبق الايلزا المجهز من قبل الشركة المصنعة الحاوي على اجسام مضادة متخصصة ضد فايروس CMV. تم ترميز العينات لتضمين معلومات تبين تسلسل العينة ومكان الجمع وتمت كتابة اسم العينة ضمن جدول يوضح تخطيط الطبق. تم غسل الطبق بمحلول دارئ الغسل لثلاث مرات بمحلول الغسل المحضر مع الانتظار مدة دقيقة في كل مرة. حضر محلول الاجسام المضادة بإضافة 12 مل من الماء المقطر الى العبوة التي حجم مادتها 3 مل من المحلول الدارئ المجهز واطيف اليها 15 مايكروليتر من خليط الاجسام المضادة غير المعلمة المتخصصة ضد CMV والاجسام المضادة المعلمة المحضرة ضد الاجسام المضادة للوصول الى نسبة تخفيف 1000/1 ثم اضيف محلول الاجسام المضادة المخففة الى الحفر بمقدار 100 مايكروليتر لكل حفرة وحفظ الطبق بدرجة حرارة المختبر لمدة ساعة بعد الإضافة. ثم غسل الطبق بمحلول دارئ الغسل كما ذكر مسبقا. تم تخفيف دارئ الركيزة بإذابة 2 مل من محلول الدارئ المجهز مع عدة الفحص في 8 مل من الماء المقطر ومن ثم أذيب قرص واحد من الركيزة المجهزة في المحلول المحضر مع التحريك لغاية ذوبان التام للقرص، مع مراعاة عدم لمس الاقراص باليد او تعريض المحلول للضوء والحرارة، اضيف 100 مايكروليتر من الركيزة المحضرة في كل حفرة اختبار وحضن الطبق مدة 30-60 دقيقة مع مراعاة عدم تعرض الطبق الى الضوء المباشر. بعد عملية تحضين الطبق تم ملاحظه تغير لون المتفاعلات في حفر الطبق أو الشريط بالعين المجردة وتقدير شدة اللون الاصفر بوساطة جهاز قارئ الاطباق ELASA Reader على طول موجي 405 والمصنع من قبل شركة Biotek الامريكية وفق التعليمات الموصى بها.

الاختبارات الجزيئية

استخلاص RNA الفايروسي: تم قطع عدد من الاوراق لنباتات حديثة النمو والتي تبين ظهور اعراض الاصابة الفايروسية عليها، أذ سحقت العينات في جفنة خزفية وتم اضافة لها كمية من النتروجين السائل وبصورة سريعة وطحنت العينات جيدا لحين تطاير النيتروجين السائل. وأستخلص بعد ذلك الحامض النووي الرايبى RNA الكلي للنبات باستخدام عدة فحص تجارية متخصصة (AccuZolTMTotal RNA Extrection) والمصنعة في شركة Bioneer الكورية الجنوبية وأتبع الطريقة القياسية الموصوفة من قبل الشركة المنتجة باستخدام ما يأتي: وزن من العينة المسحوقة حوالي 50 ملغ ووضع في أنبوبة اختبار دقيقة (microtube) سعة 1.5 مل. ثم اضيف اليها 1 مل من محلول استخلاص RNA الكلي لكل من (النبات والفايروس) الى العينة ثم مزجت عن طريق سحب وتفرغ مكونات التفاعل بوساطة ماصة دقيقة micropipette. بعد ذلك تم اضافة 200 مايكروليتر من مادة

الكوروفورم الى العينات ومزجت بوساطة جهاز الهزاز (Vortex). اعقبها وضع العينات في الثلج لمدة 5 دقائق. بعد ذلك وضعت العينات على سرعة 12000 دورة / دقيقة لمدة 15 دقيقة في جهاز الطرد المركزي بدرجة حرارة 4 سليزية، أذ تم جمع السائل ووضع في انبوبة اختبار جديدة وأهمل الراسب المتبقي. أضيف لحجم السائل حجم مكافئ من الخطوة السابقة من مادة (ايزوبروبانول الكحول) ورج الخليط من خلال قلب انبوبة التفاعل الدقيقة سعة 1.5 مل عدة مرات ثم حفظت الانابيب الدقيقة في الثلج مدة 10 دقائق. وضعت الانابيب الدقيقة لمدة 15 دقيقة في جهاز الطرد المركزي وفق السرعة ودرجة الحرارة التي ذكرت سابقاً. ثم أهمل الجزء السائل وأخذت المادة المترسبة والتي تمثل RNA الكلي التي ظهرت على هيئة حبه بيضاء ملتصقة على الجدار في قعر انبوب الاختبار الدقيقة. تمت اضافة مادة الايثانول 1 مل وبتركيز 80% وتم مزجها بوساطة جهاز الهزاز. ثم وضعت بعد ذلك في جهاز الطرد المركزي ولمدة 5 دقائق وفق السرعة والدرجة الحرارية المذكورتين سابقاً. وابقيت الحبه البيضاء الراسبة واتلف بعدها الجزء السائل المتبقي مع ابقاء حجم ضئيل جدا منه. تركت العينات مفتوحة لغايه تطاير المادة السائلة المتبقية في ظروف المختبر مع RNA المترسب. أذ علق الحامض النووي الناتج المترسب بإضافة 50 مايكروليتر من الماء الايوني الى RNA ووضعت الانابيب الدقيقة الحاوية على RNA في حمام مائي بدرجة حرارة 60 سيليزيه لمدة 10 دقائق ثم استعمل RNA لغرض اجراء عملية تصنيع cDNA.

تصنيع cDNA: حول RNA إلى cDNA عن طريق عملية النسخ الرجعي باستعمال عدة فحص RT-primex المصنع في شركة Bioneer الكورية وبأدى خلفي تم تصنيعه من قبل الشركة الكورية ذاتها. اتبعت الخطوات الآتية في تصنيع cDNA وفق توصيات الشركة المصنعة. اذ خففت البوادئ من التركيز الاصلي المجهز من قبل الشركة المصنعة. ثم أضيف 2 مايكروليتر من البادئ الخلفي المتمم إلى 18 مايكروليتر من RNA المستخلص وأضيف إلى أنابيب RT-premix. وضعت أنابيب الـ PCR في جهاز الانتباز exispin لمدة 5 دقائق بسرعة 1000 دورة /دقيقة. بعدها وضعت في جهاز الدوران الحراري (my gen thermalcycler) PCR وضبط التفاعل لمدة 30 دقيقة على درجة حرارة 42 سيليزيه ثم 5 دقائق على درجة حرارة 94 سيليزيه. ثم رُحلت نواتج التفاعل كهربائياً وتم التأكد من اتمام عملية تصنيع cDNA المستسخ عن طريق تظهير نواتج التفاعل المرحلة بجهاز الأشعة فوق البنفسجية وفق الطريقة التي سيتم ذكرها لاحقاً.

تضخيم DNA المستهدف بتقانة تفاعل انزيم البلمرة PCR: في هذه المرحلة تم تضخيم الحامض النووي وذلك باستعمال طقم بوادئ متخصص يستهدف جين الغلاف البروتيني لفايروس موزائيك الخيار اذ كان تسلسل البادئ الامامي CMV-F: TATGATAAGAAGCTTGTTCGCG اما الخلفي فتسلسله CMV-R: GCCGTAAGCTGGATGGACAA مع عدة فحص متخصصة (PCR premix) مصنعة في شركة بايونير الكورية، وتمت عملية تضخيم وفق الخطوات الآتية: اذ اضيف 2 مايكروليتر من كل من البادئ الامامي والبادئ الخلفي مع 11 مايكروليتر من الماء الايوني الى انابيب سعة 0.2 مل حاوية على خليط عدة الاستخلاص Master mix. ثم اضيف للخليط 5 مايكروليتر من cDNA ووضعت العينات في جهاز expispin لمدة عشر دقائق. ثم وضعت الانابيب الحاوية على الخليط التفاعلي في جهاز الدوران الحراري (my gen thrumal) PCR

cyler لتضخيم cdNA المصنع. وبرمج الجهاز وفق الخطوات الآتية دورة واحدة لفصل الاشرطة الاولي امدها دقيقتين على درجة حرارة 94 سيليزيه، 35 دورة لكل من فصل الاشرطة مدة 30 ثانية درجة حرارة 94 سيليزيه، وربط البوداي مدة 30 ثانية درجة حرارة 55 سيليزيه، والاستطالة مدة دقيقة واحدة على درجة حرارة 72 سيليزيه. اما الاستطالة النهائية فكانت لدورة واحدة امدها 7 دقائق على درجة حرارة 72 سيليزيه (18).

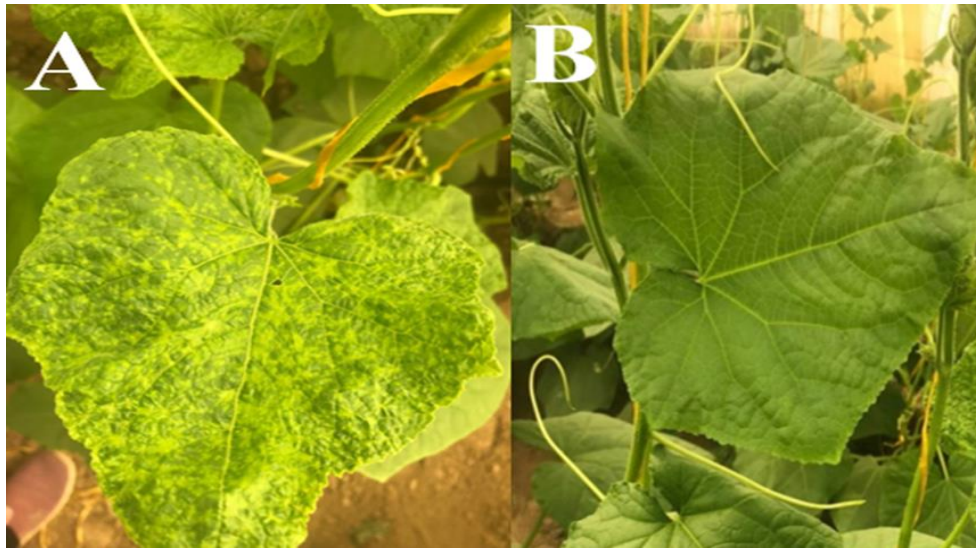
الترحيل الكهربائي بهلام الأكاروز: خفف محلول دارئ الترحيل المجهز تجاريا (TBE (Tris-borate-EDTA (10X) من شركة Bioneer الكورية من 10% إلى 1%. ثم ملئ حوض الترحيل من محلول TBE المخفف. حضر هلام الترحيل عن طريق إذابة 1.5 g من الاكاروز في 100 ml من محلول TBE المخفف ومزجت ثم وضعت في جهاز فرن الترددات الصوتية الفائقة لمدة 2-3 دقائق. برد الهلام وقبل إن يتصلب أضيفت له 5 مايكروليتر من مادة ethidium bromide ثم صب هلام الاكاروز المحضر قبل تصلبه في قالب الجهاز بعدما لفت جوانب القالب بالشريط اللاصق ووضع المشط الخاص بالجهاز لعمل الحفر في الهلام وترك ليتصلب ثم رفع المشط بهدوء للحفاظ على الحفر وأزيل الشريط اللاصق من القالب قبل نقله إلى حوض الترحيل. وضع القالب في جهاز الترحيل الكهربائي ثم صب فوقه محلول TBE المخفف إلى 1% لغاية ارتفاع مستوى المحلول فوق لوح الهلام بمسافة 2 سم لتغطية الحفر بشكل كامل. ثم اضيف الى الحفرة الأولى 3 µl من DNA القياسي والمجهز من شركة Bioneer الكورية وفي بقية الحفر اضيف 5 µl من ناتج الحامض النووي المضخم وضبط جهاز الترحيل الكهربائي على تيار كهربائي قدره 100 فولت لمدة 1 ساعة. بعدها استخرج القالب من جهاز الترحيل وتم تطهير قطع DNA المضخمة المرحلة في جهاز توثيق الهلام (14).

تحليل النتائج النيوكلوتيدي: تم إرسال نواتج تضاعف DNA (قطع DNA المضاعفة) إلى شركة Macrogen الكورية لتحديد النتائج النيوكلوتيدي لفايروس موزائيك الخيار ثم تمت مطابقتها مع بنك الجينات لمعرفة العزلات القريبة جينيا من العزلة المشخصة باستعمال برمجيات الحاسوب (MEGA 11 (16) وSDT 1.2 (10). تم ايداع التسلسلات النيوكليوتيدة للفايروس في بنك الجينات تحت رقم انضمام ON29447.

النتائج والمناقشة

الاختبار الاحيائي (البايولوجي): ظهرت على اوراق نباتات الخيار صنف الشهباء وبعد مرور 10 ايام من اجراء العدوى الميكانيكية بمستخلص من اوراق نباتات الخيار المصابة بالموزائيك (شكل A1) أعراض الموزائيك (مناطق فاتحة وغامقة) (شكل A2) (جدول 1) وهذه النتائج متفقة مع ما ذكره عدد من الباحثين بهذا الخصوص الذين ذكروا استجابة نباتات الخيار للعدوى بفايروس موزائيك الخيار بظهور أعراض الموزائيك (12 و20). واستجابت نباتات اللوبيا عند اجراء العدوى عليها بمستخلص من نباتات خيار مصابة بتكوين اعراض موضعية تمثلت بظهور بقع موضعية منتخرة (Necrotic Local Lesion NLL) بعد مرور 5-7 ايام (شكل A2) (جدول 1) اعقبها ظهور اعراض جهازيه تمثلت بشفافية العروق ثم تطورت بعدها الى اعراض تبرقش اصفر على جميع الاوراق بعد

مرور 14 يوم من إجراء العدوى (12). كما ان هذه النتائج تتفق مع ما ذكره (20) من ان بعض سلالات CMV في العراق تحفز تكوين بقع موضعية على نبات اللوبيا.



شكل A1: نبات خيار مصاب طبيعيا بفايروس موزائيك الخيار تظهر عليه اعراض موزائيك، B: نبات خيار سليم

Figure1 A: Cucumber mosaic virus in naturally infected cucumber plant exhibiting mosaic symptoms, B: Healthy cucumber plant. The results indicated that ten days after the mechanical infection with an extract from the leaves of cucumber plants infected with mosaic (Fig. 1A), symptoms of mosaic (light and dark areas) appeared on the leaves of cucumber plants.



شكل A2: نبات خيار تظهر عليه اعراض الموزائيك بعد اجراء العدوى الميكانيكية على أوراقه الفلقية B. يوضح ظهور بقع على الأوراق اللوبيا نتيجة اجراء عدوى من نبات خيار (الأختبار الحيوي)

Figure 2 A: Cucumber plant exhibiting mosaic symptoms previously inoculated at the cotyledon stage. B Necrotic local lesions on cowpea leaves after inoculation with an infected cucumber sample (Bioassay). Figure 2A refers to how the cowpea plants responded when infected with an extract of infected cucumber plants by producing local symptoms represented by the appearance of the local necrotic lesion (NLL) after 5-7 days.

جدول 1 يوضح نتائج الاختبارات البايولوجية ونقل العدوى على نبات الخيار والنباتات الأخرى.

Indicator plant	Variety	Family	Symptoms	No inoculated plants	No infected plants
<i>Cucumis sativus</i>	Local Shahbaa	<i>Cucurbitaceae</i>	Mosaic, leaf malformation	12	9
<i>Vigna unguiculata</i>	Black eye	<i>Fabaceae</i>	Necrotic local lesions	6	4
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Pinto		_____	6	_____
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Black turtle		_____	6	_____
<i>Solanum melongena</i>		<i>Solanoceae</i>	Leaf chlorosis and malformation	6	4
<i>Solanum lycopersicum</i>			Fean leaf, yellow and green diffused spots, leaf curl	32	30
<i>Capsicum annuum</i>			Leaf spot, malformation, stunting, pale green color	18	15

Table 1 Biological and infectivity tests on cucumber and other assay hosts. After ten days, the mechanical infection with an extract from the leaves of cucumber plants infected with mosaic symptoms (light and dark areas) appeared on the leaves of cucumber plants. While the cowpea plants responded when infected with an extract of infected cucumber plants by producing local symptoms represented by the appearance of the local necrotic lesion (NLL) after 5-7 days. This was followed by the emergence of systemic symptoms, characterized by the transparency of the veins, and then developed into symptoms of yellow mottling on all leaves 14 days after the infection.

الفحص المصلي بتقانة الاليزا (ELISA): تم الحصول على قيم امتصاص مختلفة للعينات المفحوصة على طول موجي 405 نانومتر و كانت أعلى قيمة امتصاص هي اقل او مقارنة لها من العينة الموجبة المجهزة من قبل الشركة المعتمدة المصنعة والتي كانت قيمة امتصاصها المعتمدة هي 3.466 بينما تم تسجيل أعلى قيمة امتصاص للعينات بلغت 2.907 لعينة الخيار تلتها 2.875 لعينة البذنجان (جدول 2) وقد رجحت النتائج التي ذكرت الى عدة اسباب الاول ان تكون العزلات المعتمدة الايجابية من قبل الشركة تختلف عن العزلات المحلية المستعملة في التجربة، والسبب الثاني ان تمثل هذه العزلات في العينات المفحوصة سلالات او طرز مصلية اخرى من هذا الفايروس والسبب الثالث قد يكون تركيز الفايروس في العينة المفحوصة قليل.

جدول 2 يوضح قيم امتصاص الطيف الضوئي على طول موجي 405 نانومتر للعينات المفحوصة باختبارات أليزا جمعت من حقول مختلفة.

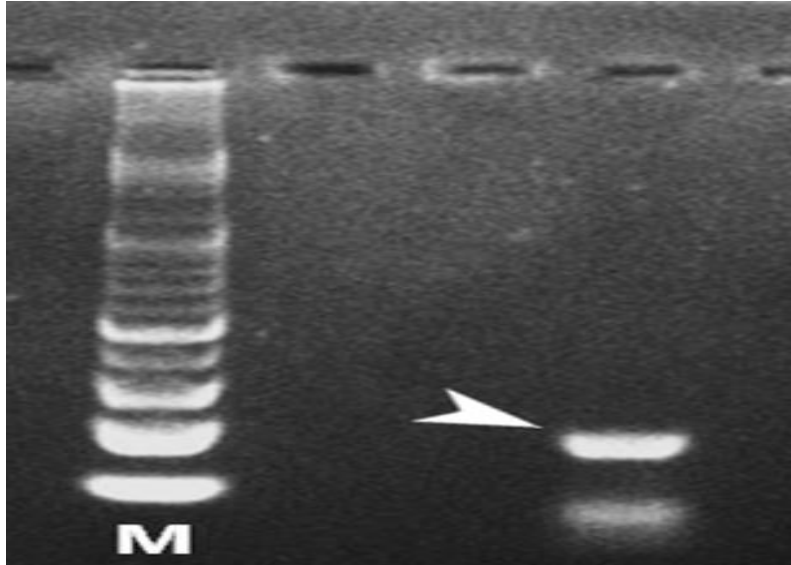
Sample	No. of tested plants	Abs. value
Cucumber Baghdad	21	2.907
Snake cucumber	1	2.737
Cucumber Affack	2	1.427
Bottle gourd	1	0.897
Colocynth	1	1.769
Zucchini	4	2.292
Melon	2	1.168
Tomato	3	0.454
Bell pepper	10	0.932
Eggplant	2	2.875
Christ's thorn jujube	4	1.945
Indian shot	1	0.370
Rapeseed	1	1.723
Nettle-leaved Goosefoot	1	1.572
Positive control	1	3.466
Negative control	1	0.860

Table 2 Absorbance values at 405 nm of samples tested with ELISA, collected from different locations. Different absorption values were obtained for the samples examined at a wavelength of 405 nanometers. The highest absorption value was less or close to it from the positive selection prepared by the approved manufacturer, whose agreed absorption value was 3.466. In contrast, the highest absorption value recorded for the samples amounted to 2.907 for the cucumber sample, Followed by 2.875 for the eggplant sample.

اختبار RT-PCR: بينت نتائج اختبار PCR ومضاعفة الحامض النووي (cDNA) لعدد من العينات من نباتات الطماطة والخيار والبادنجان ظهرت عليها اعراض اصابة فايروسية والتي جمعت من مناطق مختلفة والتي اجريت عليها عملية العدوى البيولوجية وظهرت عليها اعراض اصابة تميز طقم البادئ المتخصص من الكشف عن فايروس موزائيك الخيار في عينات الخيار المصابة بظهور حزمة واضحة ذات وزن جزيئي يصل الى ~500 زوج قاعدي (شكل 4) (18 و 19) تم مضاعفتها من عينة خيار تظهر عليها اعراض موزائيك شديد (شكل A2).

التحليل الجزيئي: اظهرت نتائج التحليل النيوكليوتيدي ان قطعة DNA ذات الوزن الجزيئي ~500 قاعدة نيتروجينية التي تم مضاعفتها من عينة الخيار (شكل 2) بوساطة طقم البودائ المتخصص CMV-F/CMV-R انها تعود الى جين الغلاف البروتيني لفايروس موزائيك الخيار بعد مقارنتها مع التسلسلات المكافئة المودعة في بنك الجينات NCBI عند مستوى التسلسلين النيوكليوتيدي والحامض الاميني، اذ حققت هذه العزلة اعلى نسب تطابق نيوكليوتيدي واميني وصلت الى 95% و 91% على الترتيب مع عزلات الهند (MN380719.1) واليابان (AB119091.1)، LC066446.1، LC066431.1، LC500133.1 والصين

(MH119158.1، MG025949.1، KT302193.1، KT302175.1، EF159146.1، MT108233.1، MH119170.1، MH119154.1) والولايات المتحدة الأمريكية (AF523345.1) (شكل A4 و B) مما يؤكد ان عزلة الخيار قيد الدراسة تعود الى فايروس موزائيك الخيار Cucumber mosaic virus، تشير ضوابط اللجنة الدولية لتصنيف وتسمية الفايروسات الى ان نسبة التطابق النيوكليوتيدي للسلاطات العائدة للنوع الواحد ضمن جنس Cucumovirus على ان لا تقل نسبة التطابق عن 65% (6).



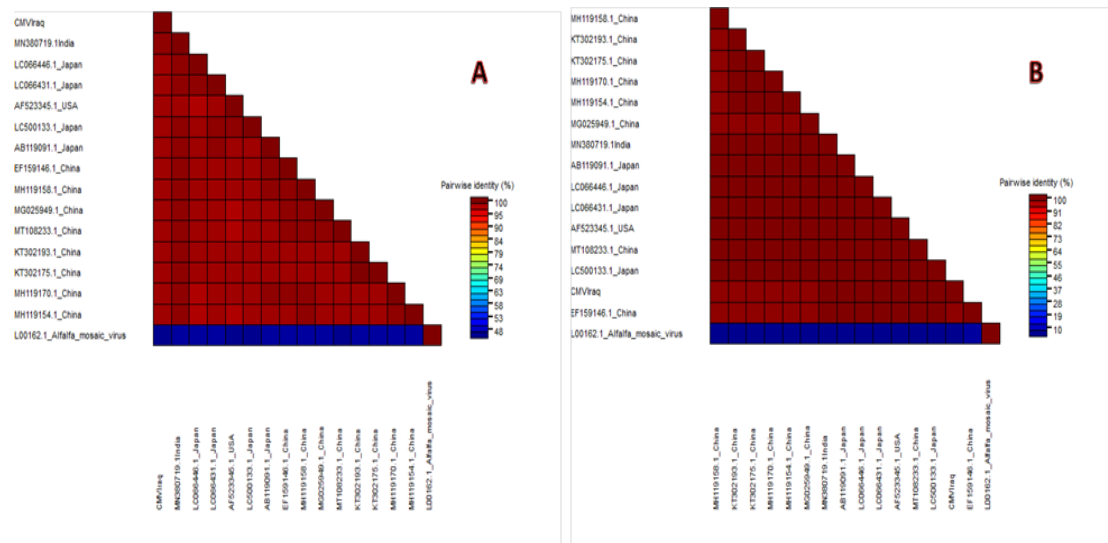
شكل 3 يوضح نمط الترحيل الكهربائي تم تظهيره بصبغة الاثيديوم برومايد لقطع DNA المضخمة ذات الوزن الجزيئي ~500 زوجا قاعديا من عينة الخيار التي ظهرت عليها اعراض الموزائيك (شكل B2) بواسطة طقم البودائ المتخصص CMV-F/CMV-R على درجة ارتباط البادئ 55 سيليزية. M DNA القياسي السلمي (100 زوج قاعده نتروجينية).

Figure 3 refers to how the ethidium bromide gel electrophoresis pattern of ~500 bp DNA fragments amplified from a cucumber sample exhibited mosaic symptoms by CMV-F/CMV-R primer set at an annealing temperature of 55 °C. M 100 bp DNA marker. The results of the nucleotide analysis showed that the DNA segment with a molecular weight of ~500 nitrogenous bases doubled from the cucumber sample.

وضعت شجرة الأصول الوراثية من نوع الضامة بالتجاور التي تم بناؤها من التسلسلات النيوكليوتيدية الجزئية لجين الغلاف البروتيني المضخم بواسطة طقم البودائ المتخصص CMV-F/CMV-R عزلة عينة الخيار (شكل 2) مع نظيراتها في بنك الجينات (شكل A4) مما يشير الى انها قد انحدرت من أصل مشترك. كما لم تختلف شجرة الأصول الوراثية المعتمدة في بنائها على تسلسلات الاحماض الامينية الافتراضية في تركيبها عن شجرة الأصول الوراثية النيوكليوتيدية التي وضعت أيضا العزلة قيد الدراسة ضمن المجموعة ذاتها (شكل B4) مما يدعم رجوع التسلسل النيوكليوتيدي المعزول من عينة الخيار (شكل 2) يعود الى فايروس موزائيك الخيار وليس لنوع اخر.

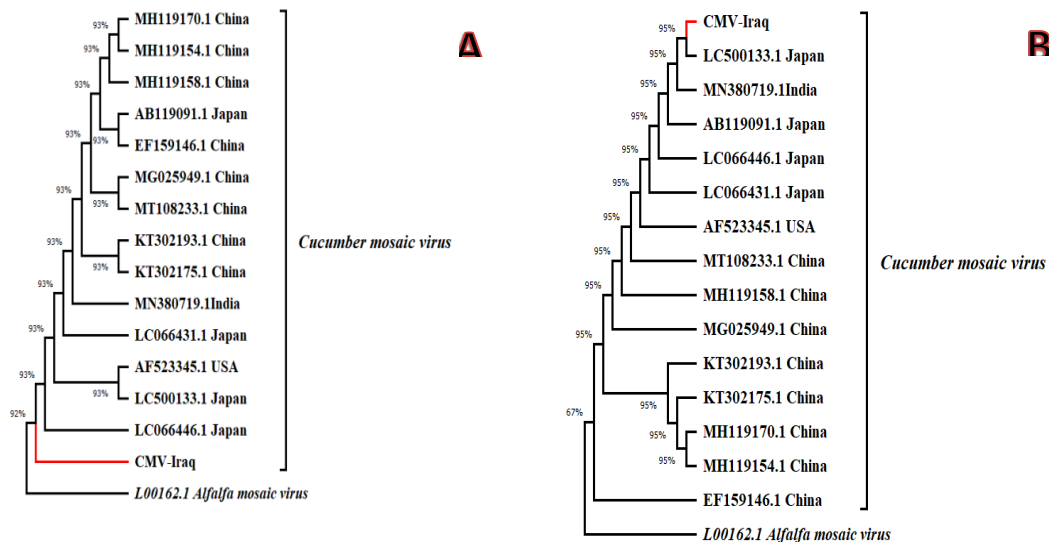
يعد فايروس موزائيك الخيار أحد فايروسات النبات الاكثر تنوعا نتيجة اصابته لاكثر من 1200 عائل نباتي كما تم اعتماد 34 سلالة من قبل NCBI لغاية الان (17 و 20). اعتمادا على نسب التطابق النيوكليوتيدي والاحماض الامينية الافتراضية والعلاقة الوراثية وجد ان عزلة فايروس موزائيك الخيار قيد الدراسة متغايرة نسبيا في منطقة

الغلاف البروتيني عن اقرب عزلات بنك الجينات في منطقة الغلاف البروتيني اعتمادا على اعلى نسبتي تطابق التسلسل النيوكليوتيدي 95% واحماض امينية 91% (شكل A4 وB)، علاوة على ان شجري الاصول الوراثية التين بنيتا من التسلسلات النيوكليوتيدية والامينية لمنطقة الغلاف البروتيني عندما فصلت عزلة فايروس موزائيك الخيار قيد الدراسة في فرع مفرد بعيدا عن بقية العزلات المكافئة من بنك الجينات (شكل A5 وB). ان هذا التغير في منطقة الغلاف البروتيني ربما اثر على الخصائص المصلية الخاصة بجسيمات عزلة فايروس موزائيك الخيار قيد الدراسة نتيجة اختلاف ترتيب وتويع الاحماض الامينية المشفرة بالتالي حدوث تغير في المحددات الانتيجينية epitopes وظهور طراز مصلي محلي ادى الى عدم تمكن الاجسام المضادة المتخصصة من الكشف عنها. وكان هذا جليا عند استعمال تقانة ELISA التي تمكنت من الكشف عن وجود الطرز المصلية الاخرى ذات التراكيز الواطئة على حساب الطراز المحلي الاعلى تركيزا لذا ظهرت قيم الامتصاص الضوئي لشدة اللون اوطأ من العينة الموجبة المجهزة مع عدة الفحص المستوردة. ان التغير في الغلاف البروتيني قد يعزى الى عدة اسباب منها نوع العائل النباتي الرئيسي والبديل الذي قد يؤثر في انتقائية دخول جسيمات الفايروس داخل الخلية عبر المستقبلات الموجودة في الغشاء الخلوي التي قد تتيح التعرف على طراز معين دون اخر او السماح بدخول سلالة دون اخرى عبر المستقبلات (4). كذلك قد يتيح الصنف او النوع النباتي من نقل طراز مصلي او سلالة معينة عبر البذور والتي قد يؤدي الى سيادة سلالة او طراز فايروسي واستبعاد او اقصاء سلالات او طرز اخرى (17). وقد يساهم نوع الناقل الحشري (المن) السائد في الحقول او مناطق وجود الفايروس او سلالاته او طرزه المصلية في نشر سلالة او طراز مصلي دون اخر اذ يعتمد فايروس موزائيك الخيار في نقله عبر المن على غلافه البروتيني (7). علما ان هناك أكثر من ثمانين نوعا من المن تنقل فايروس موزائيك الخيار (20). لذا قد يكون من المجدي استعمال طرائق الكشف الجزيئي التي تستهدف الحامض النووي الفايروسي للكشف عن فايروس موزائيك الخيار وسلالاته او طرزه المصلية بدلا عن الاختبارات السيرولوجية. علاوة على اجراء دراسات مسح لتحديد الطرز المصلية او السلالات السائدة العائدة لهذا الفايروس باعتماد طرائق فحص جزيئي واسعة الطيف مثل تقانات الجيل الجديد لتحديد التسلسل النيوكليوتيدي ومن ثم تحضير مصول مضادة لهذه الطرز المصلية تتيح من الكشف عنها.



شكل 4: نسب التطابق ما بين التسلسلات النيوكليوتيدية (A) والاحماض الامينية الافتراضية (B) لجزء من منطقة جين الغلاف العائد لفايروس موزائيك الخبار (CMV) التي تمت مضاعفتها باستعمال طقم البوداي المتخصص CMV-F/CMV-R ونظيراتها من التسلسلات المكافئة لها المسترجعة من بنك الجينات. استعمل التسلسل النيوكليوتيدي لبروتين غلاف فايروس موزائيك الجت بصفة مقارنة خارج المجموعة (outgroup). حلت النتائج باستعمال برنامج SDTv1.2 (10).

Figure 4: Identity percentages of nucleotide (A) and deduced amino acid (B) sequences of partial CMV CP gene amplified by CMV-F/CMV-R primer set and equivalent GenBank sequences. Alfalfa mosaic virus (AMV) nucleotide sequence was used as an outgroup comparison. This tricolor matrix was generated using SDT v1.2 software (10). The macrophage phylogenetic tree was set side by side that was constructed from the partial nucleotide sequences of the CMV-F/CMV-R primer-specific cover protein gene isolate with its GenBank counterparts (Fig. 4A), indicating that it has descended from a common ancestry. The genome tree based on the hypothetical amino acid sequences did not differ in its structure from the nucleotide genetics tree, which also placed the isolate under study within the same group (Fig. 4B), which supports the return of the nucleotide sequence isolated from the cucumber sample (Fig. 2) to a virus—mosaic cucumber and not for another type.



شكل 5: شجرة الاصول الوراثية من النوع الضامة بالتجاور توضح العلاقة الوراثية بين عزلة فايروس موزائيك الخيار قيد الدراسة والعزلات المكافئة المسترجعة من بنك الجينات بنيت على اساس التسلسلات النيوكليوتيدية (A) وتسلسلات الاحماض الامينية الافتراضية (B). تم ادراج فايروس موزائيك الجت Alfalfa mosaic virus بصفة مقارنة خارج المجموعة. رسمت هذه الشجرة بواسطة برنامج MEGA11 (16).

Figure 5 indicates that the neighbor-joining phylogenetic tree shows the relatedness between CMV isolates in this study (CMV-Iraq) and equivalent GenBank sequences constructed from nucleotide (A) and deduced amino acid (B) sequences. Alfalfa mosaic virus (AMV) nucleotide sequence was included as an outgroup comparison. Sequence analysis was performed using MEGA 11 software (16). The two phylogenetic trees were built from the nucleotide and amino sequences of the protein coat region when the cucumber mosaic virus isolates under study were separated into a single branch away from the rest of the equivalent isolates from the GenBank.

المصادر

1. Adhab, M., N. Al-Kuwaiti., and R, Al-Ani. (2021). Biodiversity and occurrence of plant viruses over four decades: Case study for Iraq. In 2021 Third International Sustainability and Resilience Conference: Climate Change (pp. 159-163). IEEE.
2. Alfadhil, F., and Zagier S. S. (2017). Identification of Cucumber Mosaic Virus (CMV) on eggplant by using some of indicator plants, Immunostrip assay and reverse transcriptase - polymerase chain reaction (RT-PCR). Kufa Journal for Agricultural Sciences, 9(4): 92-107.
3. Alhares, A., and AL-Fadhel, F. (2017). Detection of cucumber mosaic virus on pepper by indicator plant immune strip and RT- polymerase chain reaction. Kufa journal for agricultural sciences, 9(4): 73-91
4. Bhardwaj, V. K. and R. Purohit. (2020). Structural changes induced by substitution of amino acid 129 in the coat protein of Cucumber mosaic virus, Genomics, 112: 3729-3738
5. Browning, I. A. (2009). Bioassay for Diagnosis of Plant Viruses. In R. Burns, Methods in Molecular Biology, Plant Pathology (pp. 1-13). New York: Humana Press. doi: DOI: 10.1007/978-1-59745-062-1_1
6. Bujarski, J., Gallitelli, D., García-Arenal, F., Pall s, V., Palukaitis, P., Reddy, M. K., and Wang, A. (2019). ICTV Virus Taxonomy Profile: *Bromoviridae*. Journal of General Virology, 100:1206–1207. DOI 10.1099/jgv.0.001282
7. Gildow, F. E., Shah, D. A., Sackett, W. M., Butzler, T., Nault, B. A., and Fleischer, S. J. (2008). Transmission efficiency of Cucumber mosaic virus by aphids associated with virus epidemics in snap bean. Phytopathology 98(11): 1233-1241.
8. Jayasinghe, W. H., Kim, H., Nakada, Y., and Masuta, C. (2021). A plant virus satellite RNA directly accelerates wing formation in its insect vector for spread. Nature communications, 12(1): 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27330-4>
9. Moyle, R., Pretorius, L. S., Shuey, L. S., Nowak, E., and Schenk, P. M. (2018). Analysis of the Complete Genome Sequence of *Cucumber mosaic virus* Strain K. *Genome announcements*, 6(7), e00053-18. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00053-18>
10. Muhire, B.M., Varsani, A., and Martin, D.P. (2014). SDT: A Virus Classification Tool Based on Pairwise Sequence Alignment and Identity Calculation. PLoS ONE, 9(9): e108277. doi: 10.1371/journal.pone.0108277
11. Nasir, A. A., and Adhab, M. (2021). A biologically distinct isolate of cucumber mosaic virus from Iraq. In 2021 Third International Sustainability and Resilience Conference: Climate Change (pp. 148-150). IEEE.
12. Palukaitis, P., and García-Arenalk F. (2005). Cucumber *mosaic virus*. [CMI/AAB Description of Plant Viruses, DPV No.: 400.](#)

13. Saber L., and Hamad, R. (2008). Serological and biological identification of four Cucumber mosaic virus strains and its relation for pathogenesis. The Iraqi journal of Agricultural Sciences, 38(1): 59--68
14. Sambrook, J.F., and Russell, D. (2006). Condensed protocols: from molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA
15. Scholthof, K. B., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C., and Foster, G. D. (2011). Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology. 12(9): 938–954. doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00752. x.
16. Tamura, K., Stecher, G., and Kumar, S. (2021). Mega 11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. Molecular Biology and Evolution <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
17. ViralZone. (2022). ViralZone current statistics. <https://viralzone.expasy.org/>
18. Wylie S., Wilson C.R., and Jones R.A.C., Jones M.G.K. (1993). A polymerase chain reaction assay for cucumber mosaic virus in lupine seeds. Australian Journal Agricultural Research, 44(1): 41-51.
19. Yeturu, S., Mendez, K., Garrido, P.A., Serrano, S., and Garrido, A. (2016). Serological and molecular identification of *Cucumber mosaic virus* (CMV) infecting banana crops in Ecuador. Revista 180, 3.
20. Zitter, T. A., and J. F. Murphy. (2009). Cucumber mosaic. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2009-0518-01.