جامعة الموصل
كلية الزراعة والغابات

التشخيص المناعي و الجزيئي لسلالة تنخر عروق التبغ لفايروس واي البطاطا PVY^N و استجابة بعض اصناف البطاطا

دينا محمد زهير الحديدي

رسالة ماجستير
وقاية النبات

بإشراف
الدكتور حميد حمود علي الكنو
استاذ مساعد

1444هـ
2022م

الخلاصة

تبين من الدراسة من خلال الاعراض التي ظهرت على أوراق نباتات البطاطا المصابة في مناطق جمع العينات المختلفة في الحقل كانت بشكل موزاييك طفيف واضحة في الأصناف الحساسة (سيفرا) واقل وضوحاً في الأصناف الأقل حساسية منها (مونتريال). وأكد اختبار الاليزا الثنائية (DAS- ELISA) وجود تفاعل موجب فقط في حفر طبق الاليزا الحاوية على مستخلص من عينات بطاطا مصابة في حين كان التفاعل سالباً في الحفر الحاوية على عينات بطاطا سليمة، وذلك عند استعمال اجسام مضادة متعددة النسيلة لفايروس واي البطاطا السلالة الشائعة PVY^{o} ، ولقد ظهر اعلى تركيز للفايروس تحت الدراسة في العينات التي كانت تحوي اعراضاً من صنف البطاطا (سيفرا) إذ وصلت قيمة الامتصاصية عند الطول الموجي 405 الى 0.606 مقارنة بالعينة الموجبة Positive الحاوية على الفايروس والمجهزة من الشركة المنتجة والتي كانت 0.790 ، اما نسبة امتصاص العينة السالبة السليمة فبلغت 0.047. بينما اظهر اختبار الاليزا الثلاثية (TAS- ELISA) وجود تفاعل موجب في حفر طبق الاليزا الحاوية على مستخلص من عينات بطاطا مصابة والحاوية على اعراض تتخر في حين كان التفاعل سالباً في الحفر الحاوية على عينات بطاطا سليمة، وذلك عند استعمال اجسام مضادة احادية النسيلة سلالة تتخر عروق التبغ من فايروس واي البطاطا PVY^{N} ، ولقد ظهر اعلى تركيز للفايروس تحت الدراسة في العينات التي كانت تحوي اعراض في صنف البطاطا (سيفرا) إذ وصلت قيمة الامتصاصية عند الطول الموجي 405 الى 0.793 مقارنة بالعينة الموجبة Positive الحاوية على الفايروس والمجهزة من الشركة المنتجة والتي كانت 0.790، اما نسبة امتصاص العينة السالبة السليمة فبلغت 0.047. وهذا يؤكد احتمال كون الأعراض السابقة ناتجة عن الإصابة بسلالة تتخر عروق التبغ لفايروس Y البطاطا. ولقد ظهرت على الأوراق القمية الحديثة من نبات التبغ *Nicotiana glutinosa* أعراض موزاييك واضح بعد 12 يوماً من اجراء عدوى ميكانيكية على الأوراق السفلية بمستخلص من أوراق نباتات بطاطا مصابة، ورافق هذه الأعراض ظهور تشوهات كانت اقل وضوحاً على الأوراق السفلية الكبيرة، وامتازت الاعراض على نبات التبغ *Nicotiana tabacium* صنف Samsun بعد مرور حوالي 30 يوماً من عدوى الأوراق السفلية من هذا النبات بمستخلص حاوي على الفايروس في ظروف البيت الزجاجي، ظهرت بقع صفراء صغيرة متميزة على الأوراق القمية الحديثة. تمكن اختبار البلمرة المتسلسل بالنسخ العكسي RT-PCR والذي تم اجراؤه

على عينات البطاطا والتبغ التي أعطت نتيجة إيجابية باختباري الاليزا الثنائية والثلاثية بوجود السلالة الشائعة PVY^{o}، وسلالة تنخر عروق التبغ PVY^{N} من فايروس واي البطاطا، في إعطاء نتيجة إيجابية وتمكن هذا الاختبار من اكثار الحامض النووي لتلك العزلات وذلك عند استعمال زوج من البادئات Nib3-R + Nib2-F والمتخصصة والتي تعمل على مضاعفة مناطق مستهدفة من المجين الفايروسي المسؤولة عن تشفير جزء من الغطاء البروتيني لفايروس واي البطاطا والتأكد من وجود الفايروس، إذ أعطت جميع العينات المصابة قطعة من الـ DNA بطول 950 زوج قاعدة نتروجينيه المميز لوجود فايروس البطاطا واي. وعند استعمال بادئات اكثر تخصصية وتعمل على مضاعفة منطقة الجين الخاص بالسلالة الشائعة PVY^{o} وسلالة تنخر عروق التبغ PVY^{N} التباعتين لفايروس واي البطاطا إذ أعطت العينات التي تستعمل فيها زوج البادئات A-R + S2-F والتي تعمل على مضاعفة قطعة الجينوم المسؤولة عن تشفير منطقة تعمل على الجين (P1) لسلالة PVY^{o} بحجم 856 زوج قاعدة نتروجينيه. بينما أعطت العينات التي استعمل فيها زوج البادئات N-868-7-F + N-9236-R والتي تعمل على مضاعفة قطعة الغطاء البروتيني (CP) من جينوم سلالة PVY^{N} 640 زوج قاعدة نتروجينيه. كما أعطت عدد من العينات قطعا من الـ DNA باطوال مختلفة 441 ، 250 و 175 زوج قاعدة نتروجينية وهذا الحجم قد يكون مميزا لمجموعة مختلفة من سلالات فايروس البطاطا واي منها سلالة التنخر الحلقي لدرنات البطاطا PVY^{NTN} والتي قد تكون ناتجة من التصالب الوراثي مابين السلالات الابوية لفايروس واي البطاطا. وعند فحص جودة المقروءات التي تم الحصول عليها باستعمال برنامج Fast QC للقطع الجينومية 856 و 549 زوج قاعدة نتروجينية تبين أن تسلسل القواعد النتروجينية في تلك القراءات كانت ذات جودة عالية في التماثل النيوكليوتيدي وصلت الى 35 وبحسب مقياس جودة المقروءات Phred quality score. هذا يعني ان نسبة دقة تسلسل تلك القواعد هي اكثر من 99% واحتمال وجود القواعد الشاذة (غير صحيحة) ضمن المقروءات لايتجاوز 1000/1 ومعدل الجودة هذا يعدّ من ضمن المعدلات الموصي بها والتي عادة ما تكون اكثر من 30%.

Summary :

The study showed that the symptoms that appeared on the leaves of infected potato plants in the different sampling areas in the field were slight mosaic in the sensitive cultivars (Sifera) and less clear in the less sensitive cultivars (Montreal). The DAS-ELISA test confirmed the presence of a positive reaction only in the wells of the ELISA dish containing extracts from infected potato samples, when using polyclonal antibodies to the common potato virus PVY^{o}. The highest concentration of the virus under study appeared in the asymptomatic samples of the potato variety (Sifera), as the absorbance value at 405 nm reached 0.606 nm compared to the positive sample containing the virus, which was prepared by the producing company, which was 0.790 nm. The healthy negative was 0.047 nm.

While the triple ELISA test (TAS-ELISA) showed a positive reaction in the wells containing an extract of infected potato with necrosis symptoms, when using monoclonal antibodies of the tobacco vein necrosis PVY^{N} , this confirms the possibility that the previous symptoms are caused by infection with a tobacco vein-necrosis strain of the potato virus Y. The apical fresh leaves of the tobacco plant *Nicotiana glutinosa* showed clear mosaic symptoms after 12 days a mechanical infection with an extract of the leaves of infected potato plants. The symptoms were characterized on the tobacco plant *Nicotiana tabacum*, cultivar *Samsun*, about 30 days after infection of the lower leaves of this plant with an extract containing the virus in greenhouse conditions, small yellow spots appeared on the fresh apical leaves.

The RT-PCR test that was carried out on potato and tobacco samples that gave positive results in the ELISA tests in the presence of the common strain PVY^{o} and PVY^{N}, and this test was able to multiply the DNA of these isolates when using a pair of specialized Nib2-F + Nib3-R primers that double target regions of the viral genome responsible for encoding part of the (Nib)

protein of the potato Y virus. Where all infected samples gave a piece of DNA with a length of 295 bp, characteristic of the presence of the potato Y virus .After confirming the presence of the virus in the tested samples, they were retested by RT-PCR reaction, but using more specialized primers and working to double the gene region of the common strains PVY^{o} and PVY^{N} of the PVY, where it gave samples in which the pair of primers S2- F + A-R duplication of the segment of the genome responsible for encoding a region operating on the gene (P1) of the PVY^{o} strain with a size of 856 bp. While samples in which the primer pair N-868-7-F + N-9236-R was used, which encoded the cap protein (CP) segment of the genome of the PVY^{N} strain, gave 549 bp. Some samples also gave pieces of DNA of different lengths: 441, 250 and 175 bp, and this size may be characteristic of a different group of strains of the potato virus Y, including the PVY^{NTN} strain, which may be the result of recombination between the parental strains of the potato Y virus. For the first time locally in Ninawa province and at the level of Iraq, using a single molecular test and one step, it was possible to distinguish between the ancient parental strains (PVY^{o} and PVY^{N}), as well as between the PVYN^{TNT} hybrid strain resulting from recombination between the genome of the parental strains when using the pairs of primers N-868-7-F + N -9236-R, which yielded a genome segment of DNA with a length of 441 bp.

University of Mosul

College of Agriculture and Forestry

Molecular and Immunological Diagnosis of Tobacco Vein Necrosis Strain of Potato Virus Y (PVY-N) and the Response of Some Potato Varieties to It

Dina Mohammed Zuhair Al Hadidi

M.Sc. Thesis in

Plant Prodection

Supervised by

Dr. Hameed Hamoud Ali AL-Kanow

Assist. Prof

2022 A.D. **1444 A.H**