Al-Qadisiyah Journal of Agriculture Sciences
(QJAS)
| 2077-5822 |

Molecular Investigation of Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) and Identification its Isolates Disseminated in some Tomato Protected Culture in Al-Qadisiyah Province.

H. H. Shobber* N. Al-Kuwaiti
University of Baghdad / College of Agriculture

Submission Track
Received : 16/3/2017
Final Revision : 11/5/2017
Keywords
Phylogenetic Tree, Plant Viruses, Coat Protein
Corresponding
N.Alkuwaiti@coagri.uobaghdad.edu.iq

Abstract

This study aimed at conducting a molecular investigation of some virus isolates associated with tomato yellow leaf curl disease (TYLCD). Ten tomato samples exhibiting TYLCD are collected from fields and tunnel at certain tomato growing area in Al-Qadisiyah Province (El-HamzaEl-Sharqi district, Al-Sadeer and Al-Sunnia).. Begomoviruses are investigated by Polymerase chain reaction (PCR) using Deng a genus specific primer set in symptomatic samples. The amplified DNA fragments of expected size are sequenced, analyzed and compared to equivalent Gene Bank sequences using MEGA6 software. PCR technique using Deng primers could detect begomoviruses when amplified the 540 bp DNA fragments from 6 out of 10 symptomatic tomato samples. Sequence analysis shows that sequences obtained shared 96 - 99.5% nucleotide (nt) sequence identities with *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) equivalent Gene bank coat protein CP sequences from Cuba (AJ223505), USA (AY530931) and Israel (AB110217). Neighbor-Joining phylogenetic tree constructed from partial coat protein region confirmed the relatedness when grouped all sequences obtained to equivalent sequences belong to TYLCV from Gen Bank but not to other begomovirus species. Sequence comparison shows that TYLCV isolates are variable when share nt sequence 91-100% (approximated)to each other's, which indicates that sequences isolated may belong to different TYLCV strains. The high nucleotide sequence identities suggests that TYLCV may have been introduced to Al-Qadisiyah Provence through infected plant materials, however full length sequence comparisons and biological assays are required to confirm this relatedness and resolve the possible origin of TYLCV isolates in Al-Qadisiyah Province.

المقدمة

تعد الطماطه *Solanum lycopersicum* من أكثر محاصيل الخضر شيوعا في العراق إذ تأتي بالمرتبة الأولى من بين محاصيل الخضر من حيث المساحة المزروعة والانتاج سنوياً (Omer 2011، CSO 2016). تزرع الطماطه في معظم مناطق العراق على مدار السنة في الحقول المكشوفة والمزارع المحمية لما يمثله من قيمة غذائية ومصدراً للدخل (Al-Kuwaiti 2013).لقد دأبت الجهات الزراعية المعنية في العراق على تطوير هذا المحصول وزيادة إنتاجه لما يمثل من قيمة اقتصادية في الوقت الحاضر و دخوله في مجال التصنيع الغذائي (Soppe & Saleh 2012). بلغ إنتاج العراق من محصول الطماطه 903,809 و 770,564 و 338,674 طن وفق إحصائيات منظمة الأغذية والزراعة FAO للأعوام 2013 و 2014 و2015 على الترتيب (FAO 2017، CSO 2016).تزرع الطماطه في محافظة القادسية على نطاق جيد اذ وصلت المساحة المزروعة حوالي 200 دونم بين مغطاة كأنفاق وبيوت محمية (Anonymous 2016).بلغ انتاج الطماطه في محافظة القادسية عام 2010 بحدود 1800 طن من مجموع الانتاج الكلي من العراق البالغ 1,013,177 طن(Al-Fahad & Abbas 2011).تعد الفايروسات أهم المشاكل التي تواجه زراعة الطماطه في البيوت المحمية إذ تؤدي الإصابة الفايروسية إلى خفض إنتاج المحصول ونوعيته نظرا لصعوبة

The research is part of H.Diploma for 1st Author.

Al-Qadisiyah Journal of Agriculture Sciences
(QJAS)
| 2077-5822 |

السيطرة عليها . ان مرض تجعد واصفرار أوراق الطماطه Tomato Yellow Leaf Curl Disease (TYLCD) من اهم الأمراض الفايروسية التي تصيب الطماطه في الزراعة المحمية التي تسبب خسائر كبيرة جدا في منطقة الشرق الأوسط عامة وفي العراق خاصة (Glick et al 2009) وهي أكثر انتشارا في المناطق المعتدلة من العالم (Brown 2009) .

عالمياً تم تسجيل أكثر من عشرة فايروسات تسبب أعراض التجعد والاصفرار على الطماطه تعود جميعها إلى مجموعة فايروسات الفاصوليا الذهبية *Begomovirus* العائد إلى عائلة *Geminiviridae* (Diaz-Pendon et al 2010).

سجل مرض تجعد واصفرار الطماطه لأول مرة في فلسطين المحتلة من قبلCohen وHarpazعام (1964) وتم تحديد المسبب المرضي الذي يسببه فايروس غير مسجل سابقا سمي *Tomato yellow leaf curl virus*,(TYLCV) وان هذا الفايروس يصيب الطماطه والداتورا (Cohen & Harpaz 1964). ينقل فايروس تجعد واصفرار الأوراق على الطماطه بوساطة الذبابة البيضاء *Bemisia tabaci* بكفاءة عالية ، إذ إن حشرة واحدة تستطيع اكتساب الفايروس ونقله إلى نباتات طماطه اخرى (Glick et al 2009، Diaz-Pendon et al 2010) .

كما سجل مؤخراً امكانية انتقال فايروس التجعد والاصفرار على أوراق الطماطه بوساطة بذور الطماطه (Kil et al 2016).تظهر على نباتات الطماطه المصابة أعراض تقزم شديد للنباتات والتفاف حواف الأوراق نحو الأعلى والأسفل واصفرار حواف الأوراق وبين العروق وصغر حجم الأوراق ويسبب الفايروس خسائر كبيرة في محصول الطماطه قد تصل إلى 100% إذا حصلت الإصابة مبكرا(Glick et al 2009).

يشكل فايروس تجعد واصفرار الأوراق على الطماطه مشكلة كبيرة في البيوت المحمية و في الحقول المكشوفة إذ يعد محددا لزراعة هذا المحصول في العراق (Al-Fadhal 2012).

اجريت العديد من الدراسات في العراق بهدف تشخيص الفايروس و تحديد المدى العائلي للفايروس والعوائل التي يمكن ان تمثل مصدرا لإصابة الطماطه وتحديد الناقل وطريقة النقل (Al-Fadhal 2012،Al-Ani et al 2011) كونها إحدى النقاط الأساسية لتحديد طريقة ملائمة وكفوءة لمقاومته.

تم تطبيق تقانة Polymerase chain reaction(PCR) في تشخيص مجموعة فايروسات begomoviruses باستعمال بوادئ متخصصة بالمجموعة لأول مرة من Deng وآخرون عام (1994) (Deng et al 1994). شخص فايروس التجعد والاصفرار على أوراق الطماطه مؤخراً في العراق على المستوى الجزيئي باستعمال برايمرات متخصصة بالجنس وتم تحديد التسلسل القاعدي الكامل لجينومه من قبل Al-Kuwaiti وآخرون عام (2013) (Al-Kuwaiti 2013).

كذلك شخصت سلالات فايروس تجعد واصفرار اوراق الطماطه على المستوى الجزيئي باستعمال بوادئ متخصصة (Al-Jubouri 2014) ولكن لم يتم تحديد تسلسل القواعد النيتروجينية لحامضها النووي.

نظراً للخسائر العالية التي يسببها مرض التجعد والاصفرار على اوراق الطماطه و لعدم وجود دراسة جزيئية لتشخيص الفايروس المسبب في محافظة القادسية ،فقد هدفت هذه الدراسة إلى إجراء تشخيص جزيئي لمرض التجعد والاصفرار على اوراق الطماطه باعتماد تقنية PCR و بواديء متخصصة بمجموعة فايروسات begomoviruses ومن ثم تحديد النوع او الانواع الفايروسية المسببة لهذا المرض في محافظة القادسية من خلال تحليل التتابعات النيوكليوتيدية ومقارنتها مع نظيراتها المتوفرة ومن ثم ايداعها في بنك الجينات لغرض توفير معلومات جزيئية حول هذا الفايروس في العراق.

المواد وطرائق العمل

جمع العينات

جمعت عينات طماطه تظهر عليها اعراض التجعد والاصفرار من مواقع مزروعة بنباتات الطماطة داخل البيوت المحمية والانفاق للموسم 2015-2016 ضمن قضاء الحمزة وناحيتي السدير وغماس في محافظة القادسية ثم نقلت الى مختبر امراض النبات في قسم وقاية النبات / كلية الزراعة/ جامعة بغداد وحفظت بدرجه حرارة 4°سيليزيه لغاية اجراء التجارب اللاحقة.

الفحص الجزيئي لعينات الطماطه المصابة

تم إجراء جميع خطوات الفحص الجزيئي في مختبر شركة جسر المسيب المتخصصة بتجهيز العدد التشخيصية الخاصة بالفحص الجزيئي الواقعة في منطقة الجادرية – بغداد وعلى النحو الآتي-:

استخلاص DNA نباتات الطماطه المصابة

أجريت عملية استخلاص الحامض النووي الكلي DNA من 10عينات أوراق طرية جمعت من نباتات طماطه تظهر عليها أعراض تجعد واصفرار باستعمال عدة استخلاص تجارية خاصة باستخلاص DNA الكلي للنبات AccuPrep® GMO DNA Extraction Kit تم الحصول عليها من شركة Bioneer الكورية الجنوبية على وفق الطريقة القياسية الموصفة من الشركة المصنعة. تم تحديد الكفاءة النوعية للحامض النووي DNA الناتج من عملية الاستخلاص بوساطة الفحص بجهاز قياس الطيف الضوئي Nanodrop ومن خلال عملية الترحيل الكهربائي.

مضاعفة الحامض النووي الفايروسي باستعمال تقانة تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسلPolymerase(PCR) Chain Reaction

اجري فحص PCR على DNA عينات الطماطه الذي تم استخلاصه في الفقرة السابقة باستعمال عدة فحص Accu Power PCR Pre Mix تم الحصول عليها من شركة Bioneerالكورية الجنوبية وبادئين متخصصين بالمجموعة *Begomovirus* تسلسلهما النيوكليوتيدي (5'-TAATATTACCKGWKGVCCSC-3') و(5'-TGGACYTTRCAWGGBCCTTCACA-3') للبادئ Deng A (F) الامامي و الخلفي Deng A (R) على الترتيب واللذين تم تصميمهما من قبل(Deng et al 1994) صنعت من قبل الشركة الكورية نفسها، و بإتباع طريقة العمل الموصفة من قبلها. استعملت ظروف تفاعل تقانة PCR

Al-Qadisiyah Journal of Agriculture Sciences
(QJAS)
| 2077-5822 |

الموصوفة من قبل (Deng et al 1994) مع تحوير طفيف في درجة ربط البوادئ والتي هي على درجة 56 ° سيليزية لمدة 30 ثانية بدلاً من 58° سيليزية. تم الكشف عن قطع DNAالناتجة من عملية تضاعف PCR بوساطة الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز بتركيز 2.5% حاوٍ على 3 مايكروليتر اثيديوم بروميد (EtBr) Ethidium bromide بتركيز0.5 مايكروغرام/ مل لمدة 30 دقيقة على 125 ملي أمبير والتي تم وصفها من قبل (Sambrook & Russell (2006). تم تظهير الهلام باستعمال جهاز الأشعة فوق البنفسجية والتصوير بجهاز توثيق الهلام Major science gel documentation system من شركة Major science،USA.

تحليل التتابعات النيوكليوتيدية لفايروسات الطماطه :

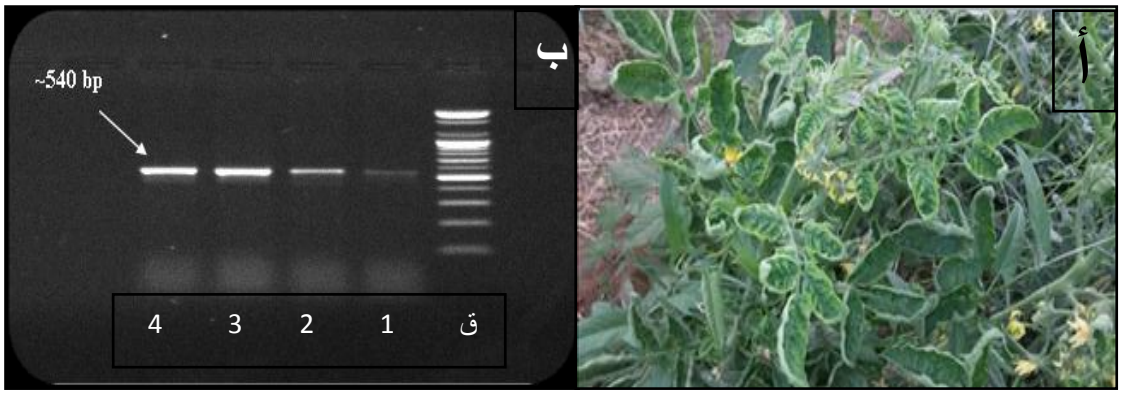
أُرسلت نواتج عملية تضاعف PCR إلى شركة Bioneer الكورية لتحديد التتابع النيوكليوتيدي لقطعDNA ذات الوزن الجزيئي المتوقع باتجاهين 3' و5'. تم تحليل التسلسلات الناتجة بوساطة برنامج الحاسوب MEGA 6 (Tamura et al 2013) ومن خلال مقارنتها مع التتابعات المكافئة التي تم استرجاعها من بنك الجينات. تم ايداع التتابعات النيوكليوتيدية التي تم الحصول عليه ضمن هذه الدراسة في بنك الجينات تحت الرموز البنكية (KY657558-KY657545).

النتائج والمناقشة

الاختبار الجزيئي لمجموعة الفايروسات التوأمية begomoviruses على الطماطه

التفاعل المتسلسل لأنزيم البلمرة Polymerase Chain Reaction(PCR)

اظهرت نتائج فحص PCR باستعمال طقم بادئي Deng تفاعلاً إيجابياً مع عينات الطماطه المفحوصة إذ تم الحصول على قطع DNA ذات وزن جزيئي540 زوجاً قاعدياً تقريباً من ست عينات طماطه من أصل 10 ظهرت عليها اعراض مرض التجعد والاصفرار(شكل1)، مما يشير الى اصابتها بفايروسات تعود لمجموعة begomoviruses ،إذ أن هذا الطقم ذو تخصص عالي .



شكل 1. اصابة طبيعية بمرض التجعد والاصفرار على نبات الطماطه مزروع في البيوت البلاستيكية في قضاء الحمزة / مقاطعة 8 عزيز الله مزرعة السيد رياض فاضل الموسوي .

ب:هلام الاكاروز المصبغ بمادة بروميد الاثيديوم يظهر قطع DNA ذات الوزن الجزيئي 540 زوجاً قاعدياً الناتجة من تفاعل PCR باستعمال بادئي Deng المتخصصين بمجموعة *Begomvirus* تمثل الارقام من 1الى 4 مسار عينات المفحوصة ويمثل ق مسار DNA القياسي 100 زوج قاعدي(شركة Bioneer الكورية الجنوبية).في تشخيص الفايروسات العائدة لمجموعة *Begomovirus* فقط دون بقية المجاميع العائدة لعائلة الفايروسات التوأمية أو فايروسات أخرى عائدة لعوائل أخرى ويستهدف منطقة الغلاف البروتيني لفايروسات مجموعة الفاصوليا الذهبية (Deng et al 1994) والمعتمدة في تشخيص الانواع الفايروسية العائدة لهذه المجموعة من قبل الجمعية الدولية لتصنيف الفايروسات International committee on taxonomy of viruses (ICTV) (Brown et al 2015).

التشخيص الجزيئي وتحليل التتابعات النيوكليوتيدية Sequence analyses

أظهرت نتائج تحليل التتابعات النيوكليوتيدية ان جميع التتابعات ذات الوزن الجزيئي 540 زوجاً قاعدياً التي تمت مضاعفتها ببادئي Deng تعود الى فايروس التجعد والاصفرار على الطماطه *Tomato Yellow Leaf Curl Virus*(TYLCV) عند مقارنتها مع التتابعات النيوكليوتيدية المكافئة لها الموجودة في بنك الجينات (جدول1).

وقد بلغت أعلى تطابق نيوكليوتيدي للعزلات قيد الدراسة نسبة 99.5 % مع منطقة الغلاف البروتيني لعزلات بنك الجينات العائدة لفايروسTYLCV من كوباCuba (رمزها البنكيAJ223505) والولايات المتحدة الأمريكيةUSA (رمزها البنكي AY530931) وجمهورية الدومنيكان Dominican (رمزها البنكيAF024715) للتتابعاتTYLCV D1 الى TYLCV D8 (جدول 2).

في حين كانت اعلى نسبة تطابق للعزلاتTYLCV N1 الى TYLCV N3 التي تراوحت ما بين 95.8 و 96% مع عزلات المملكة العربية السعودية (رموزها البنكية

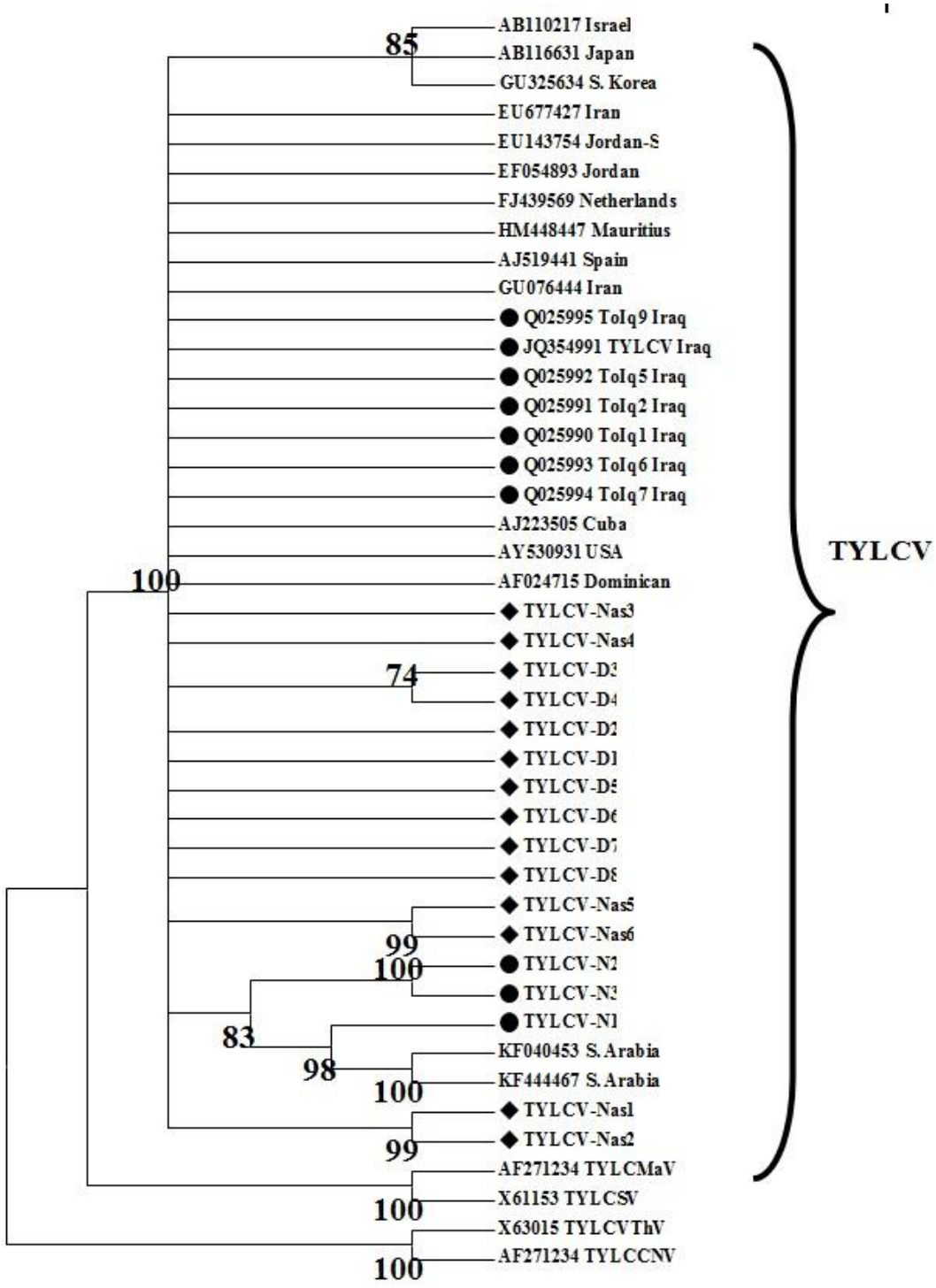
Al-Qadisiyah Journal of Agriculture Sciences
(QJAS)
| 2077-5822 |

KF040453 و KF444467) وعزلة الأرض المحتلة Israel (رمزها البنكيAB110217) على الترتيب.

جدول1.التتابعات الوراثية المسترجعة من بنك الجينات التي تم استعمالها في هذه الدراسة مع رموزها البنكية ومواقعها الجغرافية

	GenBank acc. code	Isolate/virus names	Location
1.	JQ025990	TYLCV-Iraq1	Iraq
2.	JQ025991	TYLCV-Iraq2	Iraq
3.	JQ025992	TYLCV-Iraq5	Iraq
4.	JQ025993	TYLCV-Iraq6	Iraq
5.	JQ025994	TYLCV-Iraq7	Iraq
6.	JQ025995	TYLCV-Iraq9	Iraq
7.	HM448447	TYLCV-Mauritius	Mauritius
8.	AJ519441	TYLCV-CB1/99	Spain
9.	GU076444	TYLCV-IL	Shiraz-Iran
10.	FJ439569	TYLCV-3181291	Netherlands
11.	AB110217	TYLCV-Ng	Israel
12.	GU325634	TYLCV-Bos	South Korea
13.	EU677427	TYLCV-Abadeh	Iran
14.	AJ223505	TYLCV-Cuban	Cuba
15.	AF024715	TYLCV-Dominican	Dominican
16.	EU143754	TYLCV-Jordan-S	Jordan
17.	EF054893	TYLCV-Jordan	Jordan
18.	AB116631	TYLCV-Japan:Misumi:Stellaria	Japan
19.	AY530931	TYLCV-USA	USA
20.	KF040453	TYLCV- Hail1	Saudi Arabia
21.	KF444467	TYLCV-GB Hail	Saudi Arabia
22.	S53251	*Tomato leaf curl virus-AU* (ToLCV-AU)	Australia
23.	D88773	*Tomato yellow leaf curl China virus* (TYLCCNV)	China
24.	AF271234	*Tomato yellow leaf curl Malaga virus* (TYLCMaV)	Spain
25.	X63015	*Tomato yellow leaf curl Thailand virus* (TYLCVThV)	Thailand
26.	X61153	*Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV)	Italy

Al-Qadisiyah Journal of Agriculture Sciences
(QJAS)
| 2077-5822 |



شكل 2. العلاقة الوراثية لعزلات فايروس التجعد والاصفرار على الطماطة

شجرة الاصول الوراثية من نوع الضامة بالتجاور Neighbor-Joining تظهر العلاقات الوراثية بين العزلات محافظة القادسية قيد الدراسة (الموسومة بالرمز ♦) وعزلات عراقية اخرى تم الحصول عليها من بنك الجينات (الموسومة بالرمز●) والعزلات العالمية المكافئة لها المسترجعة من بنك الجينات.

Al-Qadisiyah Journal of Agriculture Sciences
(QJAS)
| 2077-5822 |

تتفق هذه النتائج مع ضوابط تصنيف الانواع الموضوعة من قبل اللجنة الدولية لتصنيف الفايروسات الخاصة بالانواع الفايروسية العائدة للمجموعة *Begomovirus* والتي تنص على ان لا تقل نسبة التطابق للعزلات الفايروسية العائدة للنوع نفسه لمجموعة فايروسات جنس عن 89% (Brown et al 2015).

كما اظهرت نتائج شجرة الأصول الوراثية تجمع التتابعاتTYLCV D1 الى TYLCV D8 في مجموعة واحدة مع تتابعات بنك الجينات لعزلات كوبا والولايات المتحدة وجمهورية الدومنيكان مما يشير الى وجود درجة قرابة عالية بين هذه التتابعات (شكل 2).

أشارت نتائج تحليل التتابعات الى وجود تباين بين العزلات قيد الدراسة، اذ تراوحت نسب التطابق ما بين 91-100% (جدول 2) مما يشير الى وجود تنوع في عزلات فايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطه في القادسية ضمن مناطق المسح وهذه النتائج تم تأكيدها عندما وضعت شجرة الاصول الوراثية للتتابعات قيد الدراسة في مجموعتين متباعدتين هي مجموعة TYLCV D1 الى TYLCV D8 ومجموعة TYLCV Nas1وTYLCV Nas2،مما يشير الى وجود اكثر من سلالة ضمن مناطق المسح اذ تم تمييز العزلات على انها سلالات عائدة للنوع نفسه ضمن فايروسات المجموعة *Begomovirus* اعتماداً على نسب التطابق اذا قلت عن 94% علاوة على الصفات البايولوجية والمصلية (Brown et al 2015).

كما لم يتم الكشف عن فايروسات أخرى تسبب مرض التجعد والاصفرار عند تطابق جميع التتابعات قيد الدراسة مع تتابعاتTYLCV فقط من بنك الجينات أو فايروسات أخرى تابعة للمجموعة *Begomovirus* مما يشير الى عدم وجود تنوع عالي لهذا الجنس ضمن مناطق المسح.

يمكن الاستدلال من نتائج تحليل التتابعات على ان فايروس التجعد والاصفرار على الطماطه ربما يكون فايروساً وافداً الى محافظة القادسية ، ولم ينشأ فيها نتيجة لوجود تطابق نيوكليوتيدي عالي مع تتابعات بنك الجينات ولكن لتأكيد هذه النتيجة يجب اجراء دراسات أخرى تتضمن الحصول على التتابعات الكاملة للجينوم الكلي الفايروسي للعزلات المنتشرة في محافظة القادسية. واما بالنسبة لآلية اصابة العزلات الوافدة لفايروس تجعد واصفرار اوراق الطماطه وانتشارها في حقول الطماطه في محافظه القادسية ضمن مناطق المسح فما زالت غير واضحة اذ ربما تشكل شتلات الطماطه المصابة التي يتم انتاجها وبيعها في المشاتل المصادر الاولية لهذه العزلات اذ ان نباتات الطماطه في المراحل المبكرة من النمو تكون أكثر حساسية للعدوى بفايروس التجعد والاصفرار(Fauquet & Nawaz-Ul-Rehman 2010) .

كما ان الزراعة المكثفة والمتقاربة تسهل من عملية نقل الفايروس لمسافات قصيرة بوساطة الذبابة البيضاء من النباتات المصابة الى السليمة في المشتل . كما ان هذه العزلات ربما قد تكون دخلت الى العراق من خلال بذور الطماطه او نباتات الزينة المستوردة (Caciagli 2007) التي قد تشكل مستودعاً لهذه العزلات الفايروسية لتنتقل الى نباتات الطماطه في المشاتل المرباة بوساطة الذبابة البيضاء (Al-Kuwaiti 2013)

Al-Qadisiyah Journal of Agriculture Sciences
(QJAS)
| 2077-5822 |

جدول2. نسب التطابق بين العزلات العراقية (اللون الغامق) ونظيراتها في بنك الجينات العائدة لفايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطه

	اسم العزلة/الفايروس	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
1.	TYLCV-D1																																										
2.	TYLCV-D2	99																																									
3.	TYLCV-D3	99	100																																								
4.	TYLCV-D4	99	100	100																																							
5.	TYLCV-D5	99	100	99	99																																						
6.	TYLCV-D6	99	100	100	100	100																																					
7.	TYLCV-D7	99	100	99	99	100	100																																				
8.	TYLCV-D8	99	100	99	99	100	100	100																																			
9.	TYLCV-Nas1	93	94	94	94	94	94	94	94																																		
10.	TYLCV-Nas2	92	93	93	93	93	93	93	93	98																																	
11.	TYLCV-Nas3	99	99	99	99	99	100	100	100	95	94																																
12.	TYLCV-Nas4	96	97	97	97	97	97	97	97	93	95	98																															
13.	TYLCV-Nas5	95	96	96	96	96	96	96	96	92	91	96	94																														
14.	TYLCV-Nas6	96	96	96	96	96	96	96	96	93	92	96	94	98																													
15.	TYLCV-N1	91	91	91	91	91	92	91	91	91	92	92	92	92	93																												
16.	TYLCV-N2	94	95	95	95	95	95	95	95	92	91	95	94	94	95	95																											
17.	TYLCV-N3	94	95	95	95	95	95	95	95	92	91	95	94	94	95	95	100																										
18.	Q025990 ToIq1 Iraq	98	99	99	99	98	99	99	99	94	93	99	97	96	97	91	96	96																									
19.	Q025991 ToIq2 Iraq	98	99	98	98	98	98	99	99	94	92	98	97	95	96	91	95	95	100																								
20.	Q025992 ToIq5 Iraq	92	92	92	92	92	92	92	92	89	87	92	91	89	90	85	89	89	93	93																						
21.	Q025993 ToIq6 Iraq	98	99	99	99	98	99	99	99	94	93	99	97	96	97	91	96	96	100	100	93																					
22.	Q025994 ToIq7 Iraq	98	99	99	99	98	99	99	99	94	93	99	97	96	97	91	96	96	100	100	93	100																				
23.	Q025995 ToIq9 Iraq	98	99	99	99	99	99	99	99	94	93	99	97	96	97	91	96	96	100	100	93	100	100																			
24.	JO354991 TYLCV Iraq	98	99	99	99	99	99	99	99	94	93	99	97	96	97	91	96	96	100	100	93	100	100	100																		
25.	HM448447 Mauritius	99	99	99	99	99	99	99	99	94	93	99	97	96	96	92	96	96	99	99	93	99	99	100	100																	
26.	KF040453 S. Arabia	91	92	92	92	92	92	92	92	91	90	92	92	93	93	95	96	96	92	92	86	92	92	92	92	93																
27.	KF444467 S. Arabia	91	92	92	92	91	92	91	91	91	90	92	92	92	93	95	95	95	92	92	86	92	92	92	92	93	99															
28.	AJ223505 Cuba	99	100	99	99	99	99	99	99	94	93	99	98	96	97	92	96	96	99	99	92	99	99	99	99	100	93	92														
29.	AY530931 USA	99	100	99	99	99	99	99	99	94	93	99	98	96	97	92	96	96	99	99	92	99	99	99	99	100	93	92	100													
30.	AJ519441 Spain	98	99	99	99	99	99	99	99	94	93	99	97	96	96	91	96	96	99	99	92	99	99	99	99	100	93	92	100	100												
31.	GU076444 Iran	98	99	99	99	98	99	98	98	94	93	99	97	95	96	91	96	96	99	99	93	99	99	100	100	100	92	92	99	99	99											
32.	FJ439569 Netherlands	98	99	99	99	99	99	99	99	94	93	99	98	96	96	91	96	96	99	99	93	99	99	99	99	100	93	93	100	100	100	99										
33.	AB110217 Israel	98	99	98	98	98	98	98	98	94	93	98	97	95	96	92	96	96	99	98	92	99	99	99	99	99	93	93	99	99	99	99	99									
34.	GU325634 S. Korea	98	98	98	98	98	98	98	98	94	93	98	96	95	96	92	96	96	98	98	92	98	98	99	99	99	93	93	99	99	99	99	99	100								
35.	EU677427 Iran	98	99	98	98	98	98	98	98	94	92	98	97	95	96	92	96	96	99	98	92	99	99	99	99	99	93	93	99	99	99	99	99	99	99							
36.	AF024715 Dominican	99	100	99	99	99	99	99	99	94	93	99	98	96	97	92	96	96	99	99	92	99	99	99	99	100	93	92	100	100	100	99	100	99	99	99						
37.	EU143754 Jordan-S	98	99	99	99	99	99	99	99	95	93	99	97	96	97	92	96	96	99	99	92	99	99	99	99	100	93	93	100	100	100	99	100	100	99	99	100					
38.	EF054893 Jordan	98	99	99	99	99	99	99	99	95	93	99	97	96	97	92	96	96	99	99	92	99	99	99	99	100	93	93	100	100	100	99	100	100	99	99	100	100				
39.	AB116631 Japan	98	99	98	98	98	98	98	98	94	93	98	97	95	96	92	96	96	99	98	92	99	99	99	99	99	93	93	99	99	99	99	99	100	100	99	99	100	100			
40.	AF271234 TYLCMaV	79	79	79	79	79	80	80	80	81	80	80	79	78	79	77	79	79	80	80	74	80	80	80	80	80	78	79	80	80	80	79	80	80	79	79	80	80	80	80		
41.	X63015 TYLCVThV	72	73	73	73	72	73	72	72	72	71	72	71	71	72	69	71	71	73	72	69	73	73	73	73	73	72	72	73	73	73	73	73	73	73	73	73	73	73	73	70	
42.	X61153 TYLCSV	79	80	79	79	79	80	80	80	80	79	80	79	79	79	77	79	79	80	80	75	80	80	80	80	80	78	79	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	92	71
43.	AF271234 TYLCCNV	73	73	73	73	73	73	73	73	72	72	73	72	71	72	71	72	72	74	74	70	74	74	74	74	74	72	72	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	74	72	75	74

Al-Qadisiyah Journal of Agriculture Sciences
(QJAS)
| 2077-5822 |

إن فايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطه على محصول الطماطه المزروعة تحت البيوت المحمية قد يشكل خطرا على زراعة الطماطه في القادسية في البيوت البلاستيكية عند توفر الناقل الملائم بسبب غياب الاجراءات الوقائية ضد الفايروس في المشاتل عند انتاج شتلات الطماطه، لذا يتطلب اعتماد الفحوصات الجزيئية للشتلات واستبعاد المصاب منها قبل زراعتها بسبب دقتها العالية في تشخيص الفايروس على مستوى السلالة او العزلة بعد نجاحها في تمييز عزلات الفايروس قيد الدراسة .

المصادر

Al-Ani, A. R., A. Adhab, S. A. H. Hamad and S. N. H. Diwan. 2011. Tomatoyellowleaf curlvirus (TYLCV), identification. virus vector relationship,strainscharacterization and a suggestion for its control with plantextracts in Iraq. African Journal of Agricultural Research 6(22):5149-5155.

Al-Fadhal, F. A. 2012. Biological and Serological Properties of Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV).Magazine of Al-Kufa University for Biology4(2): 139-145.

Al-Fahad Y. and T. Abbas. 2011. Atlas of Agriculture statistics road map for agricultural development (Green economy). The Central Statistical Organization, Iraq. pp. 211

Al-Jubouri A.A., F. A. Al- Fadhal and H. M. Samaka. 2014. Detection of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) and its strains on Tomato plants and host rang determine by Polymerase Chain Reaction.Kufa Journal for Agricultural Science 6(4): 99-117.

Al-Kuwaiti N. 2013. Molecular characterisation of plant viruses infecting potato and vegetables in Iraq. Ph.D. Thesis, Natural Resources Institute, University of Greenwich, pp. 292.

Al-Kuwaiti, N., B. Otto, C. Collins, S. Seal and M.N. Maruthi. 2013. Molecular characterization and first complete genome sequence of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) infecting tomato in Iraq. New Dis. Reports 27: 17.

Anonymous, 2016. Potato and tomato statistics production in Al-Qadisiyah 2015-2016. Planning and follow up Department, Al-Qadisiyah agriculture directorate.

Brown, J. K. 2009. Plant resistance to viruses: Geminiviruses. In B. W. Mahyand M. H. VAN Regenmortel, Desk encyclopedia of plant and fungal virology. London: Elsevier Academic press, UK. pp. 52-58.

Brown J.K., F. M. Zerbini, J. Navas-Castillo, E. Moriones, R. Ramos-Sobrinho, H. C. F. Silva,E. Fiallo-Olivé, R. W. Briddon, C. Hernández-Zepeda, A. Idris, V. G. Malathi, D. P. Martin, R. Rivera-Bustamante, S. Ueda and A. Varsani. 2015. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. Archives of Virology 160(6): 1593–1619.

Caciagli, P. 2007. Survival of whiteflies during long-distance transportation of agricultural products and plants. In H. Czosnek, Tomato yellow leaf curl virus disease, management, molecular biology, breeding for resistance. Dordrecht: Springer. The Netherlands. pp.57-63.

Central Statistical Organization, 2016. Area, yield and production for crops and vegetables for the year 2015, Agriculture statistics,Statistical collection.http://cosit.gov.iq/ar/component/content/article/87-aas2016/988-agri

Cohen,S. and I.Harpaz. 1964. Periodic,rather than continual acquisition of new tomato virus by its vector, the tobacco white fly (*Bemisiatabaci* Gen.). Entomology Exp.Appl.7:155–159.

Deng, D., P. F. McGrath, D. J. Robinson and B. D. Harrison. 1994. Detection and differentiation of whitefly-transmitted geminivirus in plants and vector insects by the polymerase chain reaction with degenerate primers. Annals of Applied Biology 125:327-336.

Díaz-Pendón, J.A., M.C. Cañizares, E. Moriones, E.R. Bejarano, H. Czosnek and J. Navas-Castillo. 2010. Tomato yellow leaf curl viruses: ménage à trois between the virus complex, the plant

Al-Qadisiyah Journal of Agriculture Sciences
(QJAS)
| 2077-5822 |

yellow leaf curl virus (TYLCV-IL): a seed-transmissible geminivirus in tomatoes. Sci. Rep. 6: 19013. doi:10.1038/srep19013.

Omer, T.M . A. 2011. Iraq, Country Pasture/Forage Resource Profiles. FAO, Rome, Italy. pp. 34.

Sambrook, J. F. and D. Russell. 2006. Condensed Protocols: From Molecular Cloning: a Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S. pp. 800.

Soppe R. and R. O. Saleh. 2012. Historical agricultural production data in Iraq. Iraq Salinity Project, Technical Report 8, Report B2.1.pp. 25.

Tamura,K., G.Stearch, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version6. 0.Mol. Biol.Evol. 30(12): 2725-2729.

and the whitefly vector. Pathogen profile update. Molecular Plant Pathology 11:441–450.

FAO, 2017. FAO statistical yearbook. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. pp.236.

Fauquet, G.M. and M.S. Nawaz-Ul-Rehman, 2010. Emerging geminiviruses. In B. W. Mahy and M. H. VAN Regenmortel, Desk encyclopedia of plant and fungal virology. Elsevier Academic Press, Oxford, UK. pp. 404-411.

Glick, E., Y. Levy and Y. Gafni. 2009. The viral etiology of tomato yellow leaf curl disease – A. Review. Plant Protection Science 45: 81-97.

Kil,E.-J., S. Kim, Y. –J. Lee, H. -S. Byun, J. Park, H.Seo, C. –S. Kim, J. –K. Shim, J. –H. Lee, J. –K. Kim, K. –Y. Lee, H. –S. Choi and S. Lee. 2016. Tomato

التحري الجزيئي عن فايروس تجعد واصفرار اوراق الطماطه *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) وتحديد عزلاته المنتشرة في بعض مزارع الطماطه المحمية في محافظة القادسية

حسين حديد عبد* نورس عبدالاله صادق الكويتي

كلية الزراعة/ جامعة بغداد

الخلاصة

هدفت هذه الدراسة الى التحري الجزيئي عن عزلات الفايروس المسببة لمرض التجعد والاصفرار على اوراق الطماطه والمنتشرة في بعض مزارع الطماطه المحمية في محافظة القادسية (قضاء الحمزة الشرقي ،ناحية السدير،ناحية غماس وناحية السنية). اجري تشخيص جزيئي للفايروسات العائدة للمجموعة *Begomovirus* بوساطة تقانة Polymerase chain reaction(PCR) و باستعمال طقم بادئي Deng المتخصص بالجنس المذكور ومن تحديد التتابعات النيوكليوتيدية للفايروسات ومقارنتها مع نظيراتها الموجودة في بنك الجينات وتحليلها باستعمال برنامج MEGA6 .أظهرت نتائج فحص PCR باستعمال طقم بادئ Deng تفاعلاً ايجابياً اذ تم الحصول على قطع (DNA) ذات وزن جزئي 540 زوجاً قاعدياً تقريبا من 6 من أصل 10عينات ظهرت عليها أعراض مرض تجعد واصفرار اوراق الطماطه وهذا يشير الى اصابتها بفايروسات تعود الى مجموعة begomoviruses. أظهر تحليل التتابعات النيوكليوتيدية أعلى نسبة تطابق تراوحت بين 99.5– 96% مع عزلات كوبا (AJ223505)والولايات المتحدة الأمريكية (AY530931)وعزلة الارض المحتلة (AB110217). ضمت شجرة الاصول الوراثية المشكلة من التتابع النيوكليوتيدي الجزئي للغلاف البروتيني الفايروسي جميع العزلات قيد الدراسة مع نظيراتها المسترجعة من بنك الجينات العائدة لفايروس (TYLCV). اظهرت نتائج التحليل الجزيئي وجود تغاير في عزلات فايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطه(TYLCV) *Tomato yellow leaf curl virus*ضمن مناطق المسح في المحافظة اذ تراوحت نسب التطابق بين 91-100% للتتابعات قيد الدراسة والذي يشير الى ان هذه التتابعات ربما تعود لسلالات مختلفة. لم يتم الكشف عن فايروسات أخرى ضمن مناطق المسح عند تطابق جميع التتابعات قيد الدراسة مع باقي تتابعات بنك الجينات العائدة الى (TYLCV) فقط من بنك الجينات دون الفايروسات الاخرى . يمكن الاستدلال من نسب التطابق العالية أن فايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطه ربما يكون وافداً الى محافظة القادسية، مما يتطلب إجراء دراسات أخرى تتضمن دراسات الخصائص الحيوية و الحصول على التتابعات الكـــاملة للجينوم الكلي الفايروسي للعزلات المنتشرة لتأكيد هذا التغاير.

الكلمات المفتاحية: شجرة الاصول الوراثية، فايروسات النبات، غلاف بروتيني

البحث جزء من رسالة الدبلوم العالي للباحث الاول.