دراسة علاقة القرابة بين فايتوبلازما تورق أزهار السمسم وفايتوبلازما بعض النباتات الاخرى باستخدام تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي PCR

[1] ميثم حسين محمد [2] فضل عبد الحسين الفضل [3]عبد الله عبيس الحاتمي

[2-1] قسم وقاية النبات - كلية الزراعة - جامعة الكوفة – جمهورية العراق

[3] قسم الاحياء المجهرية - كلية الطب البيطري - جامعة الكوفة – جمهورية العراق

المستخلص:

هــدفت الدراســة الــى تشــخيص فايتوبلازمــا (Phytoplasma) تــورق الازهــار (Phyllody) الــذي يصــيب محصــول السمســم Sesame (*Sesamum indicum* L.) وبعــض المحاصــيل الاقتصــادية المهمـة الأخـرى وكـذلك الادغـال المرافقـة لـه فـي الحقـول الزراعيـة، ومنهـا ذيـل البـزون Annual beard grass (*Polypogon monspeliensis*)، الرويطــة Darnel (*Lolium temulentum* L.)، الحنــدقوق Melilotus (*Melilotus*) الطرطيــع Suaeda (*Schanginia baccata* MQ.T)، المديــد Cynanchum (*alba*)، الــدهنان Purple panic-grass (*Echinochloa colonum*)، الشــويل Alkali weed (*Cynanchum acutum* L.)، زمــزوم (*Cressa cretica* L.) البرســيم Alfalfa (*Dichanthium annulatum* (Forks) Stapf) Marvel grass (*Medicago sativa*)، القصــب Common read (*Phragmites communis* T.)، الشــيح Wormwood (*Artemisia camperstis* L.) ، السيســبان Sesbania (*Sesbania sesban*)، البــربين Purslane (*Portulaca oleracea*)، ومحصــول الخيــار Cucumber (*Cucumis sativus*) وشــجرة فرشــة البطــل Red bottle brush (*Melaleuca viminalis*) فــي مــزارع محــافظتي الديوانيــة والنجــف الأشــرف باســتخدام تفاعــل البلمــرة التسلســلي Polymerase Chain Reaction (PCR) وايجــاد علاقــة القرابــة بــين الفايتوبلازمــا التــي تصــيب هــذه النباتــات وفايتوبلازمــا محصــول السمســم. تــم تأكيــد تشــخيص الفايتوبلازمــا بواســطة تفاعــل البلمــرة التسلســلي PCR، حيــث اثبتــت تجربــة الكشــف عــن الحــامض النــووي DNA لفايتوبلازمــا تــورق الازهــار أن نباتــات السمســم موضــوع الدراســة تحتــوي علــى الحــامض النــووي DNA وذلــك لظهــور الحــزم الواضــحة بحجــم (bp 558) فــي الترحيــل الكهربــائي لعينــة السمســم. كمــا أثبتــت التجربــة إلــى أن جميــع الأدغــال المرافقــة لمحصــول السمســم كانــت تحتــوي علــى الحــامض النــووي DNA لفايتوبلازمــا تــورق الازهــار، مــا عــدى الرويطــة Darnel (*Lolium temulentum* L.)، المديــد Cynanchum (*Cynan chumacutum* L.) و الشــيح Wormwood (*Artemisia camperstis* L.)، التــي اعطــت نتــائج ســالبة. كمــا إتضــح إحتــواء بــذور السمســم علــى فايتوبلازمــا تــورق الأزهــار والمــأخوذة مــن حاصــل حقــل التجربــة لعــام 2015 باســتخدام تقنية PCR ولكل من المعاملة والمقارنة.

الكلمات المفتاحية : فايتوبلازما تورق الأزهار، السمسم، PCR، المدى العائلي .

البحث جزء من رسالة ماجستير الباحث الاول

المقدمةIntroduction:

يعد محصول السمسم *Sesamum indicum* L. من المحاصيل الزيتية المهمة ذات القيمة الغذائية العالية حيث تعتبر بذور السمسم مصدر غني للبروتين وزيت الطعام والأحماض، يعود اصل نبات السمسم إلى افريقيا ويعتبر أحد اقدم البذور الزيتية المزروعة في مناطق كثيرة من العالم. حيث تعتبر الصين والهند والميانمار والسودان حالياً من اكبر المنتجين للسمسم في العالم (9، 14)، تليها السودان، نيجريا، باكستان، بنكلادش، اثيوبيا، تايلند، تركيا والمكسيك (13).

تقدر المساحة المزروعة بالسمسم في العالم نحو 6.67 مليون هكتار وبانتاج كلي 2.353 مليون طن (12). أما في العراق فقد بلغت المساحة المزروعة بالمحصول لعام 2003 نحو اكثر من 100 الف دونم وبانتاج كلي بلغ 20 الف طن (3).

ويتعرض المحصول كالمحاصيل الزراعية الأخرى إلى عدد من الأفات الحشرية والمسببات المرضية الأخرى ومنها الفطريات والفايروسات والفايتوبلازما(2).

تعد الفايتوبلازما احد أهم المسببات المرضية التي تسبب خسائر كبيرة لمحصول السمسم وهي أحد مجاميع الكائنات بدائية النواة (Prokaryotes) التي اكتشفها لاول مرة الباحث الياباني Doi وآخرون عام 1967 في لحاء بعض النباتات(17). وتعد الفايتوبلازما احد مسببات امراض النبات المهمة في كثير من بلدان العالم لما تسببه من خسائر اقتصادية مهمة ومتنوعة للكثير من المحاصيل الاقتصادية والإستراتيجية(3، 10).

ونظرا للأهمية الاقتصادية لفايتوبلازما تورق ازهار السمسم وقلة الدراسات والتوصيات حولها، هدفت الدراسة إلى الكشف عن فايتوبلازما تورق الازهار على نبات السمسم وفايتوبلازما بعض النباتات الاخرى باستخدام تقنية الـ (PCR) ودراسة علاقة القرابة بين فايتوبلازما تورق الازهار على نبات السمسم وفايتوبلازما بعض الأدغال المرافقة له في الحقل والمحاصيل الإقتصادية الأخرى.

المواد وطرائق العمل Materials and Methods:

المسح الحقلي

أجري المسح الحقلي للنباتات المصابة في مزارع محافظة الديوانية وذلك لتحديد نسبة إصابة محصول السمسم بفايتوبلازما تورق الأزهار، فقد تم زيارة ميدانية لبعض المزارع المتاحة في المحافظة المذكورة في شهري أيلول وتشرين الأول من العام 2014 لغرض إجراء المسح الحقلي.

استخدمت طريقة المربعات لغرض اجراء المسح الحقلي. وتم حساب النسبة المؤية للإصابة بفايتوبلازما تورق الأزهار وفق المعادلة التالية:

$$\text{النسبة المئوية للإصابة} = \frac{\text{عدد النباتات المصابة}}{\text{العدد الكلي للنباتات}} \times 100\%$$

جمع العينات

أولاً- جمــع العينــات مــن مــزارع السمســم فــي محافظة الديوانية عام 2014

جمعـت عينـات مـن نباتـات السمسـم تظهـر عليهـا اعـراض الإصـابة بفايتوبلازمـا تـورق الازهـار بصــورة واضــحة مــن مــزارع السمســم فــي محافظــة الديوانيــة لعــام 2014 اضــافة الــى الأدغـال المتواجـدة فـي تلـك الحقـول وإن لـم تكـن عليهــا اعــراض الاصــابة وهــي (ذيــل البــزون Annual beard grass (*Polypogon monspeliensis*)، الرويطـــــــــة Darnel (*Lolium temulentum* L.)، الطرطيـــــع Suaeda1 (*Schanginia baccata* MQ.T)، الحنـــــــدقوق Melilotus (*Melilotus alba*)، الــدهنان Purple panic - grass (*Echinochloa colonum*)، المديـــــــــــد Cynanchum (*Cynanchum acutum* L.))، كمـا جمعـت عينـات لنباتـات تظهـر عليهـا اعـراض الإصـابة بهـذه الفايتوبلازمـا مـن منـاطق مختلفـة خـارج حقـول السمسـم (فرشـة البطـل Red bottle brush (*Melaleuca viminalis*)، الطرطيـــــع Suaeda2 (*Schanginia baccata* MQ.T)).

وضــعت العينــات فــي اكيــاس نــايلون مســجل عليهــا المنطقــة وتــاريخ الجمــع واســم النبــات، نقلــت النمــاذج الــى مختبــر مستشــفى الطــب البيطـري فـي النجـف الاشـرف حيـث حفظـت فـي مجمـدة (Deep Freeze) علـى درجـة حـرارة -40ْ م لحين اجراء الاختبار عليها.

ثانيــاً- جمــع العينــات مــن حقــل التجربــة فــي محافظة النجف عام 2015

جمعــت عينــات مــن نباتــات السمســم المصــابة والتـي تظهـر عليهـا أعـراض الإصـابة مـن حقـل التجربـة فـي كليـة الزراعـة – جامعـة الكوفـة لعـام 2015 اضـافة الـى الأدغـال المتواجـدة فـي هـذا الحقــل وهــي (الشــويل Alkali weed (*Cressa cretica* L.)، زمـزوم Marvel grass (*Dichanthium annulatum* Stapf (Forks))، البرســــــيم Alfalfa(*Medicago sativa*)، القصــب Common read (*Phragmites communis* T.)، الشــيح Wormwood (*Artemisia camperstis* L.)، السيسـبان Sesbania(*Sesbania sesban*)، البــربين Purslane (Portulacaoleracea)، المديــــد Cynanchum (*Cynanchum acutum* L.)). و جمعــت عينــات لنبــات الخيــار Cucumber (*Cucumis sativus*) والــذي كـان مزروعـاً بجـوار حقـل التجربـة لمحصـول السمسم.

حيــث نقلــت هــذه العينــات الــى مختبــر فــرع الأحيـاء المجهريـة فـي كليـة الطـب البيطـري فـي جامعة الكوفة وأجري عليها الاختبار مباشرة.

ثالثـاً- جمـع البـذور الناتجـة مـن حقـل التجربـة فـي محافظة النجف عام 2015

جمعت بـذور السمسـم الناتجـة مـن كـل مـن الحقـل الـذي تـم تطبيـق البرنـامج الوقـائي فيـه لمحصـول السمســم وحقــل المقارنــة. حيــث نقلــت هــذه العينــات الــى مختبــر الأحيــاء المجهريــة التــابع لفــرع الأحيــاء المجهريــة فــي كليــة الطــب

جدول (1): عينات النباتات التي جمعت لغرض إجراء إختبار تفاعل البلمرة التسلسلي PCR عليها من مزارع محافظة الديوانية ومحافظة النجف الأشرف 2014

ت	إسم النبات	الأعــراض الظاهريــة غيــر الطبيعية	منطقة الجمع
1	السمسم Sesame (*Sesamum indicum* L.)	النمــو المفــرط للبــراعم الورقيــة Proliferation والزهريــة Phyllody يــؤدي فــي النهايــة إلــى اعــراض مكنســة الســاحرة Witches' broom	محافظــة الديوانية
2	ذيــل البــزون Annual beard grass (*Polypogon monspeliensis*)	_	
3	الرويطة Darnel (*Lolium temulentum* L.)	_	
4	الطرطيع$_{11}$Suaeda (*Schanginia baccata* MQ.T)	_	
5	الحندقوق Melilotus (*Melilotus alba*)	_	
6	الــدهنان Purple panic - grass (*Echinochloa colonum*)	_	
7	المديد Cynanchum (*Cynanchum acutum* L.)	_	
8	فرشــة البطــل Red bottle brush (*Melaleuca viminalis*)	النمــو المفــرط للبــراعم الورقيــة Proliferation والزهريــة Phyllody يــؤدي فــي النهايــة إلــى اعــراض مكنســة الســاحرة Witches' broom	الكوفــة / القزوينية
9	الطرطيع$_{2}$Suaeda (*Schanginia baccata* MQ.T)		

جدول (2): عينات النباتات التي جمعت لغرض إجراء إختبار تفاعل البلمرة التسلسلي PCR عليها من حقل تجربة محصول السمسم في كلية الزراعة – جامعة الكوفة 2015

ت	إسم النبات	الأعراض الظاهرية غير الطبيعية	منطقة الجمع
1	السمسم Sesame (*Sesamum indicum* L.)	النمو المفرط للبراعم الورقية والزهرية Proliferation يؤدي في النهاية إلى Phyllody اعراض مكنسة الساحرة Witches' broom	الكوفة / القزوينية
2	الشويل$_{11}$ Alkali weed (*Cressa cretica* L.)	–	
3	زمزوم Marvel grass (*Dichanthium annulatum*) ((Forks) Stapf	–	
4	البرسيم Alfalfa (*Medicago sativa*)	–	
5	القصب Common read (*Phragmites communis* T.)	–	
6	الشيح Wormwood (*Artemisia camperstis* L.)	–	
7	السيسبان Sesbania (*Sesbania sesban*)	–	
8	الشويل$_2$ Alkali weed$_2$ (*Cressa cretica* L.)	–	
9	الخيار Cucumber (*Cucumis sativus*)	–	
10	البربين Purslane (*Portulaca oleracea*)	–	
11	المديد Cynanchum (*Cynanchum acutum* L.)	–	

12	بذور السمسم الناتجة من حقل المعاملة	–	
13	بذور السمسم الناتجة من حقل المقارنة	–	

البيطــري فــي جامعــة الكوفــة وأجــري عليهــا الاختبــار مباشــرة لمعرفــة إحتوائهــا علــى الفايتوبلازما بإستخدام تقنية PCR.

تشخيص الفايتوبلازما باستخدام تقنية PCR:

شــخص فايتوبلازمــا تــورق الأزهــار Phyllody بإســتخدام تقنيــة التفاعــل البلمــرة التسلسلي PCR.

بوادئ الحامض النووي Primers اســتخدمت بــوادئ الحــامض النــووي (4)المجهــزة مــن قبــل شــركة BioSynthesis الأمريكية وكما موضحة في الجدول التالي:

Forward Primer	5’ ACGAAAGCGTGGGGAGGCAAA 3’
Revers Primer	5’ GAAGTCGAGTTGCAGACTTC 3’

اســتخلاص الحــامض النــووي DNA وتفاعــل البلمرة التسلسلي

استخدم عدة الإستخلاص DNA Mini Kit (Plant) المجهــز مــن شــركة Geneaid لإستخلاص الحامض النووي DNA من عدد مــن عينــات السمســم والأدغــال المرافقــة لــه وبعــض النباتــات الإقتصــادية وحســب الطريقــة الموصى بها من قبل الشركة.

إســتخدم فــي PCR برايمــرات مخصصــة ومصــممة لتضــخيم قطعــة مســتقيمة مــن جينــات فايتوبلازمــا تــورق الأزهــار Phyllody.

اســتخدم KAPA3g Plant PCR Kit المجهــز مــن قبــل شــركة KAPABIOSYSTEMS الواقعــة فــي جنــوب افريقيــا وتمــت هــذه الخطــوة حســب توصــيات الشــركة المجهــزة. ولتضــخيم وإستنســاخ الحــامض النــووي DNA يتطلــب إجراء دورات حرارية وحسب الجدول التالي:

Initial denaturation	94º	5 min	
Denaturation	95º	30 sec	30 cycles
Annealing Temp	55º	30 sec	
Extraction temp	72º	30 sec	
Final Extraction	72º	3 min	

النتــائج والمناقشــة Results and Discussion:

تشـــخيص فايتوبلازمـــا تـــورق الأزهـــار Phyllody بإستخدام تقنية PCR

أولا- عينات النباتات التي جمعت عام 2014

أوضـحت نتـائج الفحـص بإسـتخدام تقنيـة PCR للكشـف عـن الفايتوبلازمـا فـي عينـات السمسـم التـي جمعـت مـن حقـول محافظـة الديوانيـة لعـام 2014 وجـــود الحـــامض النـــووي DNA لفايتوبلازمـا تـورق الأزهـار فـي السمسـم وجميـع الأدغـال المرافقـة لهـذا المحصـول بإسـتثناء الرويطـة Darnel (*Lolium temulentum* L.) والمديـد Cynanchum (*Cynanchum acutum* L.) كمـــا أعطـــى نبـــاتي الطرطيـــع $Suaeda_2$ (*Schanginia baccata* MQ.T) وفرشـة البطـل Red bottle brush (*Melaleuca viminalis*) نتيجـة موجبـة حسـب إختبـار PCR رغـم عـدم وجـوده بـالقرب مـن حقـول السمسـم. حيـث تبـين أن حجـم الحـامض النـووي كـان bp 558 مـن خـلال الحـزم الواضـحة والتـي ظهـرت عنـد الترحيـل الكهربـائي لهـلام الأكـاروز والـذي يمثـل الـوزن الجزيئـي للحـامض النـووي للفايتوبلازمـا حسـب المصـادر العالميـة (شـكل 1 و2)، حيـث كانت النتائج كالآتي:

1- نبـــــات السمســـــم Sesame (*Sesamum indicum* L.)

أوضـحت نتـائج الفحـص بإسـتخدام تقنيـة PCR للكشـف عـن الفايتوبلازمـا فـي عينـات السمسـم التـي جمعـت مـن حقـول محافظـة الديوانيـة لعـام 2014 وجـــود الحـــامض النـــووي DNA لفايتوبلازمـا تـورق الأزهـار فـي السمسـم حيـث تبـين أن حجـم الحـامض النـووي كـان bp 558 مـن خـلال الحـزم الواضـحة والتـي ظهـرت عنـد الترحيـل الكهربـائي لهـلام الأكـاروز (شـكل 1). (5، 2).

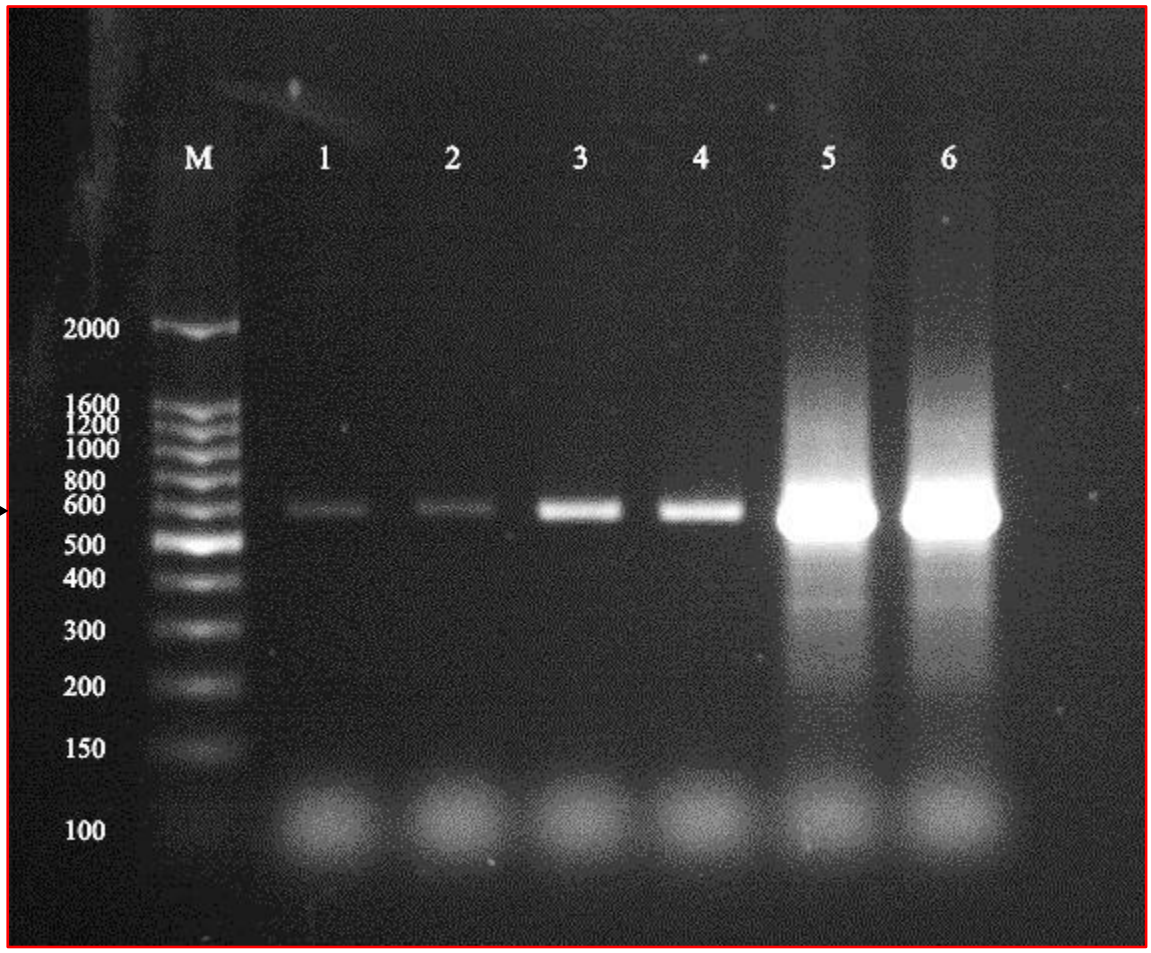
2- الطرطيع$_2$ *Schanginia baccata*) $Suaeda_2$(MQ.T

أثبـت إختبـار PCR أن نبـات الطرطيـع$_2$ الـذي جمـع مـن منـاطق مختلفـة خـارج حقـول السمسـم والـــذي كـــان يُظهـــر أعـــراض الإصـــابة بفايتوبلازمـــا تـــورق الأزهـــار يحتـــوي علـــى تراكيـز عاليـة مـن الحـامض النـووي DNA لهـذا الفايتوبلازمـا وذلـك بعـد ظهـور الحـزم الواضـحة بحجـم (bp 558) فـي الترحيـل الكهربـائي لهـلام الأكاروز (شكل 1) (4؛ 2؛ 15؛ 6).

3- ذيل البزون (*Polypogon monspeliensis*) Annual beard grass

أعطـى إختبـار PCR لهـذا النبـات حزمـة بحـدود (bp 558)، حيـث تؤكـد هـذه النتيجـة وجـود المسـبب المرضـي (الفايتوبلازمـا) فـي نبـات ذيـل البـزون رغـم عـدم ظهـور اعـراض الإصـابة عليهـــا (شـــكل 2) وتعتبـــر هـــذه النتيجـــة اول تسـجيل فـي المنطقـة لتواجـد الفايتوبلازمـا فـي هـذا الـدغل لعـدم وجـود دراسـات سـابقة أو مصـادر تؤكـد أو تنفـي ذلـك مـن خـلال مراجعتنـا لها.

4- الرويطة *Lolium*) Darnel(*temulentum* L.



شـكل (1): يوضـح الترحيـل الكهربـائي علـى هـلام الاكـاروز لنـاتج تضـخيم قطعـة مسـتقيمة مـن جينـات فايتوبلازمـا تـورق الأزهـار فـي عينـات نبـات السمسـم عليهـا أعـراض الإصـابة (Lanes 1-4) ونبـات الطرطيـعSuaeda22 الـذي يبـدي اعـراض الاصـابة (Lanes 5-6) والـذي جمـع مـن منـاطق مختلفـة خـارج حقـول زراعـة محصـول السمسـم. ترتيـب منتجـات PCR لتضـخيم جـزء مـن جينـات فايتوبلازمـا تورق الأزهار لستة عينات بحجم (55bp8):

M: Ladder 1000 bp

Lanes 1, 2, 3, 4: Sesame (*Sesamum indicum* L.) السمسم

Lanes 5, 6: Suaeda$_2$ (*Schanginia baccata* MQ.T) الطرطيع

أظهـر إختبـار PCR عـدم وجـود فايتوبلازمـا تـورق الأزهـار علـى نبـات الرويطـة، حيـث أن الإختبـار لـم يظهـر حـزم DNA علـى هـلام الأكـاروز وأن النبـات خـال مـن المسـبب المرضـي (شـكل 2). وتعـد هـذه النتيجـة اول تسـجيل فـي المنطقـة لتواجـد الفايتوبلازمـا فـي هـذا الـدغل لعـدم وجـود دراسـات سـابقة أو

مصـادر تؤكـد أو تنفـي ذلـك مـن خـلال مراجعتنـا لها.

5- الطرطيع[1]

Schanginia baccata)

Suaeda[1](MQ.T

أعطـى إختبـار PCR لهـذا النبـات حزمـة بحـدود (558 bp)، حيـث تؤكـد هـذه النتيجـة وجـود المسـبب المرضـي (الفايتوبلازمـا) فـي نبـات الطرطيـع[1] المرافـق لمحصـول السمسـم والـذي جمـع مـن محافظـة الديوانيـة، رغـم عـدم ظهـور اعراض الإصابة عليها (شكل 2) (2؛ 6).

6- الحندقوق

Melilotus(*Melilotus alba*)

أظهـر إختبـار PCR وجـود فايتوبلازمـا تـورق الأزهـار (558 bp) علـى نبـات الحنـدقوق مـع عـدم ظهـور الأعـراض علـى النبـات (شـكل 2)، وتعتبـر هـذه النتيجـة اول تسـجيل فـي المنطقـة لتواجـد الفايتوبلازمـا فـي هـذا الـدغل لعـدم وجـود دراسـات سـابقة أو مصـادر تؤكـد أو تنفـي ذلـك من خلال مراجعتنا لها.

7- الدهنان

Echinochloa)

Purple panic - grass(*colonum*

أعطـى إختبـار PCR لهـذا النبـات حزمـة بحـدود (558 bp)، حيـث تؤكـد هـذه النتيجـة وجـود المسـبب المرضـي (الفايتوبلازمـا) فـي نبـات الـدهنان رغـم عـدم ظهـور اعـراض الإصـابة عليها (شكل 2)(28).

8- المديد

Cynanchum)

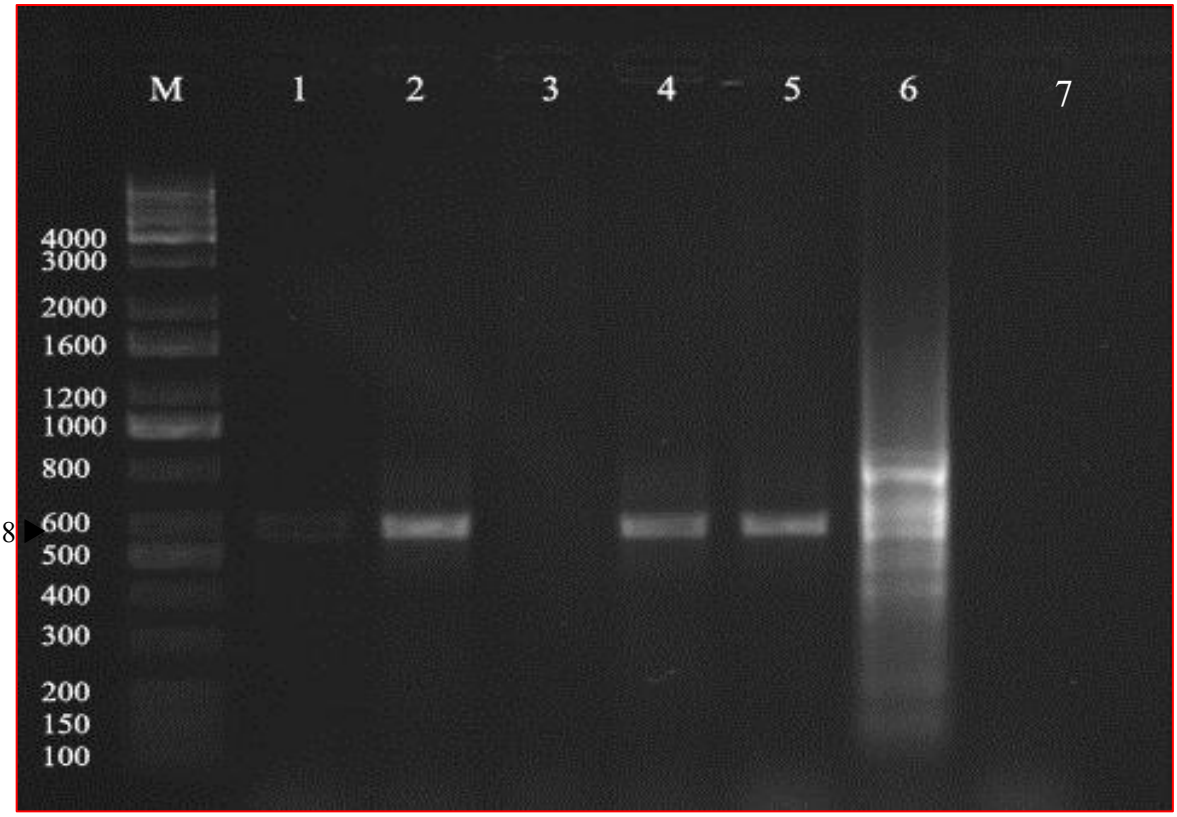
Cynanchum(*acutum* L.

أظهـر إختبـار PCR عـدم وجـود فايتوبلازمـا تـورق الأزهـار علـى نبـات المديـد، حيـث أن الإختبـار لـم يظهـر حـزم DNA علـى هـلام الأكـاروز وأن النبـات خـال مـن المسـبب المرضي(شكل 2).

وهـذا يشـير إلـى أهميـة تواجـد هـذه الأدغـال فـي حقـول السمسـم حيـث تلعـب دوراً مهمـاً كمخـازن للمسـبب المرضـي الفايتوبلازمـا والتـي لا تبـدي أيـة اعراضـاً للمـرض ولكنهـا حاملـة لـه وعليـه يتطلـب إزالـة هـذه الأدغـال عنـد تواجـدها فـي حقـول السمسـم كونهـا تشـكل خطـراً علـى المحصول.

وتؤكـد هـذه النتـائج أهميـة العوائـل الثانويـة التـي يتواجـد فيهـا المسـبب المرضـي (الفايتوبلازمـا) المسبب لأعـراض تـورق الأزهـار فـي محصـول السمسـم حيـث أن هـذه العوائـل تلعـب دوراً مهمـاً وأساسـياً فـي إصـابة محصـول السمسـم فـي الأعـوام القادمـة بعـد إنتهـاء دورة حياتـه وحصـاده فـي شـهر أيلـول وتشـرين الأول. لـذلك يجـب القضـاء علـى هـذه الأدغـال وإزالتهـا حتـى وإن لـم تبـدي أيـة أعراضـاً للمـرض كونهـا حاملـة للمسـبب المرضـي فقـط دون ظهـور الأعـراض وهنا تكمن خطورة هذه النباتات(23).

و يظهـر مـن هـذه النتـائج أن الفايتوبلازمـا لـم تتـأثر بعمليـة الخـزن وحتـى لفتـرات طويلـة اذ وصـل الخـزن لأكثـر مـن خمسـة اشـهر فـي درجـة الحـرارة -40ْم وكانـت النتـائج ايجابيـة Positive عند فحصها بتقنية PCR.



شكل (2): يوضح الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لناتج تضخيم قطعة مستقيمة من جينات فايتوبلازما تورق الأزهار في عينات نبات فرشة البطل عليها أعراض الإصابة والتي جمعت من مناطق مختلفة خارج حقول زراعة محصول السمسم (Lane 1)، ونباتات الأدغال المرافقة لمحصول السمسم في مزارع زراعة هذا المحصول في محافظة الديوانية عام 2014 وهي: ذيل البزون(Lane 2)، الرويطة(Lane 3)، الطرطيع$_1$(Lane 4)، الحندقوق(Lane 5)، الدهنان(Lane 6) والمديد(Lane 7). ترتيب منتجات PCR لتضخيم جزء من جينات فايتوبلازما تورق الأزهار لستة عينات بحجم (bp558):

M: Ladder 1000 bp

Lane 1: Red bottle brush (*Melaleuca viminalis*) فرشة البطل

Lane 2: Annual beard grass (*Polypogon monspeliensis*) ذيل البزون

Lane 3: Darnel (*Lolium temulentum* L.) الرويطة

Lane 4: Suaeda$_1$ (*Schanginia baccata* MQ.T) الطرطيع$_1$

Lane 5: Melilotus (*Melilotus alba*) الحندقوق

Lane 6: Purple panic – grass (*Echinochloa colonum*) الدهنان

Lane 7: Cynanchum (*Cynanchum acutum* L.) المديد

ثانياً- عينات النباتات التي جمعت عام 2015 اثبتت تجربة الكشف عن الحامض النووي DNA لفايتوبلازما تورق الازهار باستخدام تقنية الـ PCR إلى أن نبات السمسم الظاهر عليه اعراض تورق الازهار تحتوي على الحامض النووي لفايتوبلازما تورق الازهار وجميع الأدغال المرافقة لهذا المحصول بإستثناء دغل الشيح Wormwood (*Artemisia camperstis* L.) وذلك بعد ظهور حزم DNA الواضحة بحجم (558 bp) في الترحيل الكهربائي للهلام الحاوي على الحامض النووي المضخم بواسطة تقنية PCR لعينات السمسم والنباتات الأخرى المأخوذة من حقل التجربة لعام 2015 (15، 4، 2).

حيث كانت النتائج كالآتي:

1- نبات السمسم

Sesamum indicum)

Sesame(L.

اثبتت تجربة الكشف عن الحامض النووي DNA لفايتوبلازما تورق الازهار باستخدام تقنية الـ PCR إلى أن نبات السمسم الظاهر عليه اعراض تورق الازهار تحتوي على الحامض النووي لفايتوبلازما تورق الازهار (شكل 3) وذلك بعد ظهور الحزم الواضحة بحجم (558 bp) في الترحيل الكهربائي للهلام الحاوي على الحامض النووي المضخم بواسطة تقنية PCR لعينة السمسم المأخوذة من حقل التجربة 2015(2،5). الشويل[1،2] Alkali (*Cressa cretica* L.) weed[1,2]

أعطى إختبار PCR لهذا النبات حزمة بحدود (558 bp)، حيث تؤكد هذه النتيجة وجود المسبب المرضي (الفايتوبلازما) في نبات الشويل رغم عدم ظهور اعراض الإصابة عليها(شكل 3). وتعتبر هذه النتيجة اول تسجيل في المنطقة لتواجد الفايتوبلازما في هذا الدغل لعدم وجود دراسات سابقة أو مصادر تؤكد أو تنفي ذلك من خلال مراجعتنا لها.

2- زمزوم

Dichanthium annulatum)

Marvel grass((Forks) Stapf

أظهر إختبار PCR وجود فايتوبلازما تورق الأزهار (558 bp) على نبات الزمزوم مع عدم ظهور الأعراض على النبات(شكل 3) (20).

3- البرسيم

Alfalfa(*Medicago sativa*)

أعطى إختبار PCR لهذا النبات حزمة بحدود (558 bp)، حيث تؤكد هذه النتيجة وجود المسبب المرضي (الفايتوبلازما) في نبات البرسيم رغم عدم ظهور اعراض الإصابة عليها(شكل 3) (10، 21).

4- القصب

Phragmites)

Common read(*communis*T.

أظهر إختبار PCR وجود فايتوبلازما تورق الأزهار (558 bp) على نبات القصب مع عدم ظهور الأعراض على النبات(شكل 3).

وتعتبـر هـذه النتيجـة اول تسـجيل فـي المنطقـة لتواجـد الفايتوبلازمـا فـي هـذا الـدغل لعـدم وجـود دراسـات سـابقة أو مصـادر تؤكـد أو تنفـي ذلـك من خلال مراجعتنا لها.

5- الشيح (*Artemisia* Wormwood(*camperstis* L.)

أظهـر إختبـار PCR عـدم وجـود فايتوبلازمـا تـورق الأزهـار علـى نبـات الشـيح، حيـث أن الإختبـار لـم يظهـر حـزم DNA علـى هـلام الأكـاروز وأن النبـات خـال مـن المسـبب المرضـي (شـكل 3) وتعتبـر هـذه النتيجـة اول تسـجيل فـي المنطقـة لتواجـد الفايتوبلازمـا فـي هـذا الـدغل لعـدم وجـود دراسـات سـابقة أو مصـادر تؤكـد أو تنفـي ذلـك مـن خـلال مراجعتنـا لها.

6- السيسبان Sesbania(*Sesbania sesban*)

أعطـى إختبـار PCR لهـذا النبـات حزمـة بحـدود (558 bp)، حيـث تؤكـد هـذه النتيجـة وجـود المسـبب المرضـي (الفايتوبلازمـا) فـي نبـات السيسـبان رغـم عـدم ظهـور اعـراض الإصـابة عليها(شـكل 3)، وتعتبـر هـذه النتيجـة اول تسـجيل فـي المنطقـة لتواجـد الفايتوبلازمـا فـي هـذا الـدغل لعـدم وجـود دراسـات سـابقة أو مصـادر تؤكـد أو تنفـي ذلـك مـن خـلال مراجعتنـا لها.

الخيار (*Cucumis sativus* Cucumber)

أثبتـت التجربـة الكشـف عـن الحـامض النـووي DNA لفايتوبلازمـا تـورق الأزهـار فـي عينـة نبـات الخيـار Cucumber (*Cucumis sativus*)إلـى أن هـذا النبـات يحمـل المسـبب المرضـي بعـد ظهـور حزمـة بحجـم (558 bp) في إختبار PCR (شكل 3) (8، 22).

وتعتبـر هـذه النتيجـة إشـارة لأول مـرة عـن إحتـواء محصـول الخيـار Cucumber للفايتوبلازمـا رغـم عـدم ظهـور اعـراض الإصـابة عليـه فـي المنطقـة وهـذا يشـكل مصـدراً مهمـاً لنقـل الفايتوبلازمـا إلـى محصـول السمسـم وإصـابته عـن طريـق حشـرات القفـازات الناقلـة للمسـبب المرضـي وتكمـن أهميـة محصـول الخيـار فـي نقـل المسـبب المرضـي فـي عـدم ظهـور الأعـراض علـى محصـول الخيـار وهـذا يزيـد مـن تنـوع مصـادر الإصـابة واهميتهـا بالنسبة لمحصول السمسم.

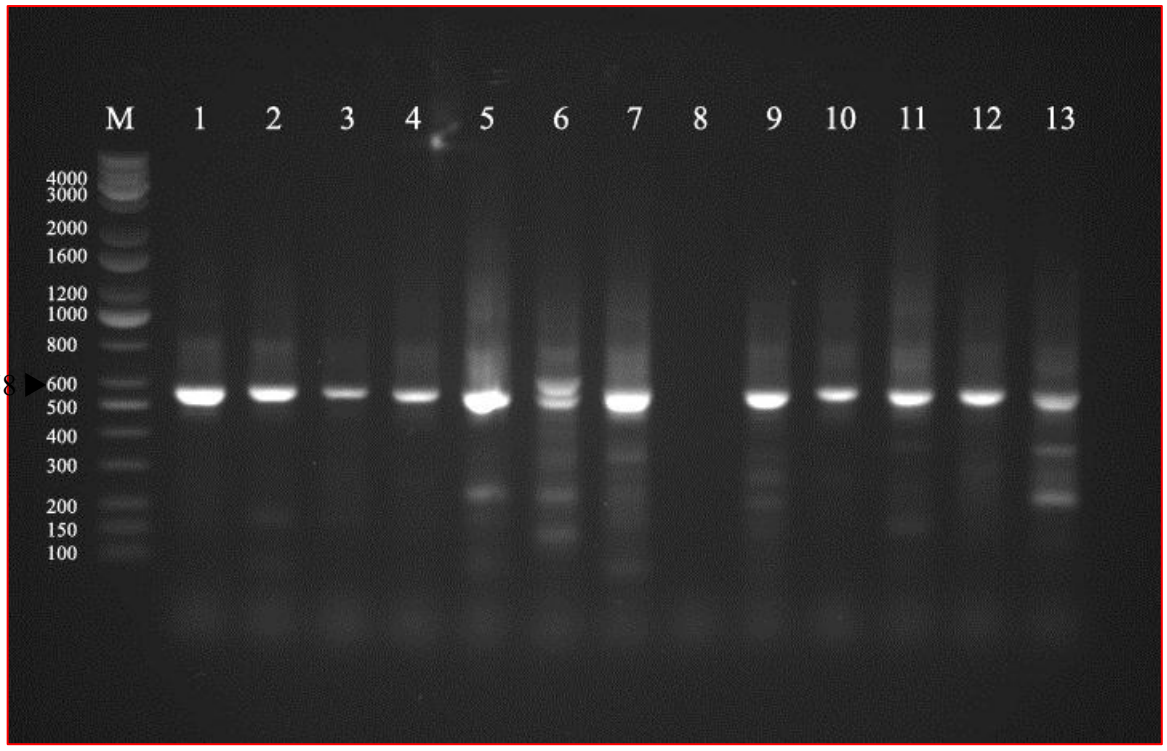
7- البربين (*Portulaca oleracea* Purslane)

أعطـى إختبـار PCR لهـذا النبـات حزمـة بحـدود (558 bp)، حيـث تؤكـد هـذه النتيجـة وجـود المسـبب المرضـي (الفايتوبلازمـا) فـي نبـات البـربين رغـم عـدم ظهـور اعـراض الإصـابة عليها(شكل 3) (7).

8- المديد (*Cynanchum acutum* L. Cynanchum)

أظهـر إختبـار PCR وجـود فايتوبلازمـا تـورق الأزهـار (558 bp) علـى نبـات المديـد مـع عـدم ظهـور الأعـراض علـى النبات(شـكل 3).

وتعتبـر هـذه النتيجـة اول تسـجيل فـي المنطقـة لتواجـد الفايتوبلازمـا فـي هـذا الـدغل لعـدم وجـود



شــكل (3): يوضــح الترحيــل الكهربــائي علــى هــلام الاكــاروز لنــاتج تضــخيم قطعــة مســتقيمة مــن جينــات فايتوبلازمــا تــورق الأزهــار فــي عينــات نبــات السمســم (Lane 1)، البــذور المأخــذوة مــن حقــل المعاملــة (البرنــامج الوقــائي) (Lane 2)، البــذور المــأخوذة مــن حقــل المقارنــة(Lane 3)، ونباتــات الأدغــال المرافقــة لمحصــول السمســم فــي حقــل التجربــة فــي كليــة الزراعــة 2015 (الشــويل$_1$ (Lane 4)، زمــزوم (Lane 5)، البرســيم (Lane 6)، القصــب (Lane 7)، الشــيح (Lane 8)،السيســبان (Lane 9)، الشــويل$_2$ (Lane 10)، بــربين (Lane 12)، المديــد (Lane 13)) ونبــات الخيــار (Lane 11). ترتيــب منتجــات PCR لتضــخيم جزء من جينات فايتوبلازما تورق الأزهار لستة عينات بحجم (bp558):

M: Ladder 1000 bp

Lane 1: Sesame (*Sesamumindicum* L.)السمسم

Lane 2: بذور نبات السمسم مأخوذة من حقل المعاملة

Lane 3: بذور نبات السمسم مأخوذة من حقل المقارنة

Lane 4: Alkali weed$_1$ (*Cressacretica* L.)$_1$ الشويل

Lane 5: Marvel grass (*Dichanthiumannulatum* (Forks) Stapf)الزمزوم

Lane 6: Alfalfa (*Medicago sativa*)البرسيم

Lane 7: Common read (*Phragmitescommunis*T.)القصب

Lane 8: Wormwood (*Artemisia camperstis* L.)الشيح

Lane 9: Sesbania (*Sesbaniasesban*)السيسبان

Lane 10: Alkali weed$_2$ (*Cressacretica* L.)$_2$ الشويل

Lane 11: Cucumber (*Cucumissativus*)الخيار

Lane 12: Purslane (*Portulacaoleracea*)البربين

Lane 13: Cynanchum (*Cynanchumacutum* L.)المديد

دراسات سابقة أو مصادر تؤكد أو تنفي ذلك من خلال مراجعتنا لها.

وعند مقارنة نتيجة المديد Cynanchum في جدول (7) الذي أظهر تفاعلاً سلبياً حسب إختبار PCR مع التفاعل الموجب الذي تم الحصول عليه في جدول (8) فقد يعود ذلك إلى عدة أسباب منها: إختلاف منطقة الجمع بالنسبة للنموذجين وسنة الجمع أيضاً وكذلك مرحلة نمو النبات وتركيز الفايتوبلازما فيه أو قد يرجع السبب إلى عدم إحتواء المديد على الفايتوبلازما في تلك الفترة التي أخذ فيه النموذج للفحص من عام 2014 مقارنة بالنموذج الذي تم إختياره من عام 2015 والذي أخذ من حقل السمسم في كلية الزراعة / القزوينية وعليه فإن إعادة عملية الإختبار على المديد اعطى دليلاً قاطعاً على احتوائه على الفايتوبلازما وهذا يؤكد أهمية مرحلة أخذ النماذج للفحص وتكرارها أيضاً لتجاوز الإشكاليات التي قد تحصل أو الأخطاء.

ثالثاً- عينات البذور الناتجة من حقل التجربة عام 2015

اثبتت تجربة الكشف عن الحامض النووي DNA لفايتوبلازما تورق الازهار باستخدام تقنية الـ PCR للبذور الناتجة من حقل التجربة لكل من المعاملة (حقل تطبيق البرنامج الوقائي) والمقارنة، أن هذه البذور تحمل فايتوبلازما تورق الأزهار بعد ظهور حزم واضحة بحجم (bp 558) في إختبار PCR، (شكل 3). وتؤكد هذه النتيجة أهمية البذور في حمل المسبب المرضي الفايتوبلازما وإعادة دورة المرض من جديد عند زراعة هذه البذور في الموسم القادم، كما وتلعب هذه البذور دوراً مهماً في نشر المرض ومسببه إلى مناطق أخرى وحقول زراعية جديدة مما يؤدي ذلك إلى صعوبة السيطرة على المرض وانتشاره وتعتبر هذه النتيجة إشارة أولى للكشف عن الفايوبلازما في بذور السمسم بإستخدام تقنية PCR في المنطقة.

كما أن النتيجة الإيجابية التي ظهرت بإحتواء بذور معاملتي المقارنة والمعاملة (حقل تطبيق البرنامج الوقائي) على الحامض النووي DNA لفايتوبلازما تورق أزهار السمسم تؤكد بأن إستعمال المضاد الحياتي (Tylosin tartrate) ضد الفايتوبلازما النباتية يوقف نشاطها ولا يؤدي إلى قتلها (23).

وتكمن الخطورة في هذا الموضوع إلى أن المضادات الحياتية لا تنهي وجود الفايتوبلازما في النباتات المصابة إي أن تأثيرها تثبيطي Biostatic أكثر من كونه قاتل لها Biocidal

حيـث أنهـا توقـف نشـاط الفايتوبلازمـا. ولـذلك تلعـب البـذور دوراً مهمـاً وخطيـراً فـي نقـل الفايتوبلازمـا بـين الحقـول الزراعيـة وانتشـارها إلـى منـاطق جديـدة ويؤكـد صـعوبة السـيطرة على المرض.

ويعـد اسـتخدام البـذور المحليـة أحـد أسـباب النسـب العاليـة للإصـابة بهـذا المسـبب المرضـي فـي عمـوم محافظـة الديوانيـة وكـذلك فـي حقـل التجربـة فـي كليـة الزراعـة فـي محافظـة النجـف الأشرف.

شكل (4): أعراض الإصابة بتورق الأزهار (Phyllody) على نبات السمسم Sesame

(A): نبات مصاب، (B): نبات سليم.

علاقة القرابة بين فايتوبلازما السمسم مع فايتوبلازما الأدغال المرافقة لمحصول السمسم

أثبتت نتائج دراسة علاقة القرابة بين فايتوبلازما السمسم وتلك التي تصيب الأدغال المرافقة لمحصول السمسم في الحقول الزراعية التي يزرع فيها هذا المحصول بأنها قريبة الصلة مع بعضها وذلك من خلال الوزن الجزيئي للحامض النووي DNA لمحصول السمسم ولهذه الأدغال موضع الدراسة حيث كان bp 558 وتعتبر هذه النتيجة مهمة جداً في معرفة العوائل الثانوية التي تتواجد فيها الفايتوبلازما بعد إنتهاء دورة حياة هذا المحصول في الحقل. حيث توفر هذه الأدغال مصدراً مهماً لحشرات القفازات لنقل الفايتوبلازما إلى محصول السمسم في الموسم القادم لزراعته علاوة على أن البذور والتي تعتبر مصدراً أخر مهماً لهذه الأحياء (الفايتوبلازما) (16، 23، 26، 2، 1، 11، 5).

علاقة القرابة بين فايتوبلازما السمسم مع فايتوبلازما المحاصيل الإقتصادية الأخرى

أثبتت نتائج الدراسة ومن خلال الوزن الجزيئي للحامض النووي DNA المتحصل عليه باستخدام تقنية PCR لعينات محصول الخيار وفرشة البطل احتوائها على الفايتوبلازما حيث أن هذا الوزن الجزيئي هو نفس الوزن الجزيئي للحامض النووي لفايتوبلازما تورق الأزهار على السمسم مما يشير إلى إصابة هذه النباتات بالفايتوبلازما رغم عدم ظهور الأعراض على محصول الخيار وهذا يشكل نقطة مهمة جداً من خلال توفير مصدر جيد للإصابة بالفايتوبلازما لمحصول السمسم.

كما ويعتبر نبات الزينة (فرشة البطل Red bottle brush) المعمر أحد أهم مصادر الإصابة لمحصول السمسم كونه يمثل مصدراً دائماً لنقل المسبب المرضي بواسطة حشرات القفازات ويعد ذلك إشارة لأول مرة في هذه الدراسة. كما أن محصول الخيار Cucumber يشكل مصدراً مهماً أخر لتوفير المسبب المرضي لإعادة الإصابة في المواسم القادمة لمحصول السمسم ويعد ذلك ايضاً أول إشارة لتسجيل إحتواء هذا المحصول على الفايتوبلازما رغم عدم ظهور أعراض المرض عليه.

وهذا ما حصل في حقل التجربة لعام 2015 في كلية الزراعة – جامعة الكوفة (16، 24، 18، 19، 22).

المصادر:

1. الحديثي، عدي نجم، 2002. المكافحة المتكاملة لمرض تورق ازهار السمسم المتسبب عن الفايتوبلازما. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة بغداد، العراق.
2. صكب، أنور محسن، 2003، دراسة اقتصادية لواقع إنتاج وتكاليف محصول السمسم في العراق – محافظة واسط نموذج تطبيقي. كلية الإدارة والاقتصاد، جامعة واسط، العراق.
3. الفضل، فضل عبدالحسين، 1997. الكشف عن الفايتوبلازما في بعض الادغال وعلاقتها مع فايتوبلازما بعض المحاصيل الاقتصادية. اطروحة

دكتــوراه، كليــة الزراعــة، جامعــة بغــداد، العراق.

4. Ahrens, U., and E. Seemüller.1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasmalike organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16 S rRNA gene. Phytopathology, 82(8): 828-832.
5. Akhtar, K. P., M. Dickinson, G. Sarwar, F. F. Jamil, and Haq, M. A. 2008. First report on the association of a 16SrII phytoplasma with sesame phyllody in Pakistan. Plant Pathology, 57(4): 771-771.
6. Bedigian, D. 2010. Characterization of sesame (*Sesamum indicum* L.) germplasm: a critique. Genetic resources and crop evolution, 57(5): 641-647.
7. Chaube, S., S.Mall, P. P. Upadhaya, and Rao, G. P. 2014. Natural occurrence of 16SrI group phytoplasmas on purslane (*Portulaca oleracea* L.), a medicinal weed species in India. Medicinal Plants-International Journal of Phytomedicines and Related Industries, 6(2): 150-153.
8. Dehghani, A., M. O. H. A. M. M. A. D. Salehi, M. Taghizadeh, and Khajezadeh, Y. 2009. Studies on sesame phyllody and effect of sowing date and insecticide spray on disease control in Khuzestan. Applied Entomology and Phytopathology, 77(1):23-36.
9. El Khier, M. K. S., K. E. A. Ishag, and Yagoub, A. E. A. 2008. Chemical composition and oil characteristics of sesame seed cultivars grown in Sudan. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 4(6): 761-766.
10. Esmailzadeh Hosseini, S. A., M. Salehi, and Mirzaie, A. 2011. Alternate hosts of alfalfa witches' broom phytoplasma and winter hosts of its vector Orosiusalbicinctus in Yazd-Iran. Bulletin of Insectology 64: 247-248. Department of Agronomy environmental Sciences and Technologies.

11. Esmailzadeh-Hosseini, S. A., A. Mirzaie, A. Jafari-Nodooshan, and Rahimian, H. 2007. The first report of transmission of a phytoplasma associated with sesame phyllody by Orosiusalbicinctus in Iran. Australasian Plant Disease Notes, *2*(1): 33-34.
12. FAO ،1985. Production year book, Rome.
13. FAOSTAT Database 2004 (http://faostat.fao.org).
14. Favre R., and M. Kyaw. 2009. An analysis of the Myanmar edible oil crops sub-sector. Rural infrastructure and Agro-industries division. Food and Agriculture Organization of the United Nation. Rome. Italy.
15. Hoshi, A., Y. Ishii, S. Kakizawa, K. Oshima, and Namba, S. 2007. Host-parasite interaction of phytoplasmas from a molecular biological perspective. Bulletin of Insectology, 60(2): 105.
16. Kolte, S.J. 1985. Diseases of annual edible oil seed crops. Vol. II. CRS Press, p135.
17. McCoy, R.E., A. Caudwell, C. J. Chang, T. A. Chen, L. N. Chiykowsky, M. T. Cousin, J.L. Dale, G.T.N.de Leuw, D. A. Golino, K. J. Hackett, B. C. Kirkpatrick, R. Marwitz, H. Petzold, R. C. Sinha, M. Sugiura, R. F. Whitcomb, I.L. Yang, B. M. Zhu and Seemüller, H. 1989. Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. In: The Mycoplasmas. Eds. Whitcomb and Tully. Academic Press, New York, USA, 545-640.
18. Montano, H. G., P. S. T. Brioso, J. P.Pimentel, D. V. Figueiredo, and Cunha, J. O. 2006. Cucurbitamoschata, new phytoplasma host in Brazil. Journal of Plant Pathology, 88(2).
19. Montano, H. G., P. S. Brioso, J. O. C.Junior, D. V. Figueiredo, and Pimentel, J. P. 2007. First report of group 16SrIII phytoplasma in loofah (*Luffa cylindrica*). Bulletin of Insectology, 60(2): 277.

of plant-pathogenic mycoplasmalike organisms. Phylogenetic insights may provide the key to culturing phytoplasmas. ASM News (Washington), 60(6): 307-312.

24. Seemüller, E., C. Marcone, U. Lauer, A. Ragozzino, and Göschl, M. 1998. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. Journal of Plant Pathology, 80: 3-26.
25. Sinha, R. C., and E. A. Peterson. 1972. Uptake and persistence of oxytetracycline in aster plants and vector leafhoppers in relation to inhibition of clover phyllody agent. Phytopathology, 62(3): 377-383.
26. Srinivasulu, B., and P. Narayanasamy. 1995. Serological detection of phyllody disease in sesamum and leafhopper *Orosiusal bicinctus*. Indian J. Mycol. Plant Pathol, 25: 154-159.
27. Streten, C., M. E. Herrington, D. G.Hutton, D. M. Persley, G. K. Waite and Gibb, K. S. 2005.
20. Rao, G. P., S. Mall, M. Singh, and Marcone, C. 2009. First report of a 'Candidatus Phytoplasmacynodontis'-related strain (group 16SrXIV) associated with white leaf disease of Dichanthiumannulatum in India .Australasian Plant Disease Notes, 4(1): 56-58.
21. Salehi, M., K. Izadpanah, M. Siampour, S. A. Esmailzadeh-Hosseini, A. Bertaccini, and Maini, S. 2011. Polyclonal antibodies for the detection and identification of Fars alfalfa witches' broom phytoplasma. Bulletin of Insectology, 64: 59-60.
22. Salehi, M., M. S. A. E. SiampourHosseini, and Bertaccini, A. 2015. Characterization and vector identification of phytoplasmas associated with cucumber and squash phyllody in Iran. Bulletin of Insectology, 68(2): 311-319.
23. Sears, B. B., andB. C.Kirkpatrick. 1994. Unveiling the evolutionary relationships

Plant hosts of the phytoplasmas and rickettsia-like-organisms associated with strawberry lethal yellows and green petal diseases .Australasian Plant Pathology, 34(2): 165-173.

he relationship between sesame Phytoplasma (phyllody) and others plant Phytoplasma by using polymerase chain reaction (PCR)

[1]Maytham Hussein Mohammed [2]Fadhal Abd Alhussein Alfadhal

[3]Abdullah Obais Alhatami

[1-2] Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kufa, Republic of Iraq

[3] Department of Microbiology, faculty of Veterinary medicine, University of Kufa, Republic of Iraq

Abstract:

This study was aimed to identification of sesame phytoplasma (phyllody) on sesame (*Sesame indicum*L.) and some other important economic crops behind the weeds of agriculture field like Annual beard grass(*Polypogon monspeliensis*), Darnel (*Lolium temulentum* L.), Suaeda$_1$ (*Schanginia baccata* MQ.T), Melilotus (*Melilotus*), Purple panic – grass (*Echinochloa colonum*), Cynanchum (*Cynanchum acutum* L.), Alkali weed (*Cressa cretica* L.), Marvel grass (*Dichanthiumannulatum* (Forks) Stapf), Alfalfa (*Medicago sativa*), Common read (*Phragmites communis*T.), Wormwood (*Artemisia camperstis* L.), Sesbania (*Sesbania sesban*), Purslane (Portulacaoleracea), Cucumber (*Cucumis sativus*) and Red bottle brush (*Melaleuca viminalis*), in Al-Dewania and Al-Najaf Al-Ashraf province field by using polymerase chain reaction (PCR) and find out the relationship between the phytoplasma that infect these plants with sesame phytoplasma. Phytoplasma identification was confirmed by PCR according to amplifying a 558 bp - DNA clearly band representing the samples of sesame(*Sesamumindicum* L.). All the plants gave positive results by giving 558 bp – DNA according to PCR test with the exception of Darnel (*Lolium temulentum* L.), Cynanchum (*Cynan chumacutum* L.) and worm wood weed plant (*Artemisia camperstis* L.) gave negative results. Sesame seeds collected from control and treatment field experiment gave positive result according to PCR test.

Keywords: Phyllody Phytoplasma, Sesame, PCR, Host range

Part of M.Sc. thesis of the first author.