

التشخيص الجزيئي لفايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (*Tomato yellow leafcurl virus*) واختبار استجابة بعض التراكيب الوراثية لنبات الطماطة (*Solanum lycopersicom* L.) ضد الفايروس المعزول

عقيل نزال العابدي¹ مالك حسن كريم² كريم عبدالحسين الشجيري³ علاء طالب سالم¹

¹ قسم وقاية النبات- كلية الزراعة-جامعة كربلاء

² قسم وقاية النبات- كلية الزراعة-جامعة المثنى

³ قسم الانتاج النباتي-المعهد التقني المسيب-جامعة الفرات الاوسط

البريد الالكتروني: aqlabedy@yahoo.co.uk

المستخلص:

نفذت هذه الدراسة خلال الموسم الزراعي 2015-2016 في البيت البلاستيكي و مختبر فايروسات النبات في كلية الزراعة- جامعة كربلاء بهدف عزل و تشخيص فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (*Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV*) و مقاومة بأستعمال بعض التراكيب الوراثية لنبات الطماطة (*Nicker Son* و *Ginan* و *Mugestem* و *Hybrid Early Lady F1* و *Alaziza* و *Flat kimia T6m* و *Wardeh* و *Ghazalah* و *Faten* و *Selmoren*).

شخص الفايروس بأستعمال بعض النباتات الكاشفة {الطماطة (*Solanum lycopersicom* L.)، الفلفل (*Capsicum annum* L.)، الزربخ (*Chenopodium amaranticolor* (Coste and Reyn)، الباميا (*Abelmoschus esculentus* L. (Moench))، الفاصوليا (*Phaseolus vulgaris* L.)، المنطاد (*Physalis floridana* L.) و القطن (*Gossypium hirsutum* L.)}، كما شخص الفايروس باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase chain reaction, PCR) و تحديد تتابع القواعد النيتروجينية (Nucleotide sequence).

اظهرت النتائج استجابة نباتات الطماطة (صنف سوبر ماريموند) للإصابة الفايروسية و بأعراض ظهرت في البداية بشكل تجعد و اصفرار للاوراق الحديثة النمو و التي تطورت فيما بعد الى اعراض تجعد شديد و اصفرار شملت بقية اوراق النبات مع ملاحظة تقزم شديد في النباتات المصابة. كما اظهرت نباتات الفلفل اعراض مرضية بهيئة تجعد واضح في الاوراق القمية و مع استطالتها و بفارق ملحوظ عن النباتات غير المصابة بنفس الفايروس.

بينت النتائج ايضا حساسية نباتات الفاصوليا و الباميا للإصابة بفايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV) دون ظهور اي اعراض مرضية مؤكدين وجود الفايروس بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR). كما وجد ان نباتات القطن و المنطاد و الزربخ غير حساسة للفايروس مع اثبات غياب الفايروس بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR).

اثبت تحليل التتابع النيوكليوتيدي لحزمة الحامض النووي الفايروسي (634bp) المضاعفة بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) و باستخدام برنامج (Basic Local Alignment Search Tool) و مقارنة مع البيانات المتوفرة في قاعدة المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (National Center for Biotechnology Information) تشابة السلالة المعزولة و بنسبة 100% مع السلالتين A2MA (GenBank accession numbers: KT961706.1 and A1MA و KT961705.1) المشخصة مسبقا و بنسبة 99% مع السلالة A3MA (GenBank accession numbers: KT961704.1) في حين كانت اكثرها تباعدا (93%) عن العزلات الايرانية.

(JQ928345.1 و EU834059.1 و EU834064.1) (GenBank accession numbers). كما بينت النتائج حساسية جميع التراكيب الوراثية لنبات الطماطة المختبرة ضد فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV).

Molecular identification of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) and testing the response of some tomato (*Solanum lycopersicom* L.) genotypes against the isolated virus

**Aqeel N. AL-Abedy¹ Malik H. Kareem² Kareem A. Al-Shujayri³
Alaa T. Salim¹**

¹**Plant Protection Department-Agriculture Faculty-Karbala University**

²**Plant Protection Department-Agriculture Faculty-AL-Muthanna University**

³**Department of Plant Production-Technical Institute-Musayyib-AL-Furat Al-Awsat University**

Corresponding author: aqlabedy@yahoo.co.uk

Abstract:

This study was conducted during the agricultural season 2015-2016 in the green house and the Plant Virology laboratory belonging to the College of Agriculture at Karbala University with the aim of isolation and characterization of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) and its resistance using some tomato genotypes (Nicker Son, Ginan, Nicker Son, Flat kimia T6m, Wardeh, Ghazalah, Faten, Alaziza, Selmoren, Hybrid Early Lady F1 and Mugestem).

The virus was identified using some indicator plants such as tomato plants (*Solanum lycopersicom* L.), pepper (*Capsicum annuum* L.), goosefoot (*Chenopodium amaranticolor* (Coste and Reyn)), okra (*Abelmoschus esculentus* L. (Moench)), beans (*Phaseolus vulgaris*), airship (*Physalis floridana* L.) and cotton (*Gossypium hirsutum* L.). TYLCV was also identified using the polymerase chain reaction technique (PCR) and sequencing the PCR-amplicons.

The results, of inoculating the above mentioned indicators plants, showed that tomato plants (super marimond) infected with TYLCV exhibited typical symptoms of crinkling and yellowing of newly growth leaves which later developed into symptoms of severe wrinkling and yellowing to encompass the rest of the plant leaves with severe stunting in infected plants. Moreover, the results also showed the sensitivity of beans and okra plants to TYLCV without inducing any kind of symptoms. However, the presence of the virus was detected by PCR. It was also found that cotton and airship plants were found to

be susceptible to the virus that was detected by PCR in all TYLCV-inoculated plants.

Sequencing of the PCR-amplified fragments and employing the BLAST program (Basic Local Alignment Search Tool) revealed that the TYLCV isolate characterized in this study gave a similar percentage of 100% with the virus strains A1MA and A2MA (GenBank accession numbers: KT961706.1 and KT961705.1) and 99% with the viral strain A3MA (GenBank accession numbers: KT961704.1), while the most divergence (93%) was noticed with the Iranian isolates (JQ928345.1 and EU834059.1 and GenBank accession numbers: EU834064.1). The results also showed the susceptibility of all tomato genotypes tested against TYLCV.

المقدمة (Introduction)

تعد الطماطة (*Solanum lycopersicom*) واحدة من أهم محاصيل الخضار لما تمتلكه

ثمارها من قيمة غذائية عالية فهي غنية بالفيتامينات مثل فيتامين A و C والعناصر المعدنية مثل الحديد والفسفور، كما أنها تستهلك طازجة فضلا عن دخولها في كثير من الصناعات الغذائية (12 و 14). صاحب انتشار زراعة الطماطة بغير مواسمها و بأستخدام مختلف الطرق الحديثة و التقليدية ظهور الكثير من مسببات المرضية و منها فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV) قياسا بالاختبارات الجزيئية (Molecular tests) منها تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase chain reaction, PCR) (16).

كما استخدمت أيضا وسائل أخرى لمنع أو تقليل الأضرار الناجمة عن الإصابة بفايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV) و من بين تلك الطرق هي استخدام المبيدات الكيميائية التي تكمن فائدتها في تقليل انتشار الفايروس في حقول الطماطة عن طريق تقليل الكثافة العددية لحشرة الذباب الأبيض إلا أنها لا تعد الطريقة الأكفأ في مقاومة الفايروس نظرا لأثارها السلبية للبيئة و صحة الإنسان و النبات و الحيوان فضلا عن دورها في ظهور صفة المقاومة لدى الافة (16). أصبحت الحاجة ملحة الى إيجاد مصادر وراثية لمقاومة الفايروسات النباتية و ادخالها في برامج تربية النبات الحديثة لإنتاج صنف يحمل صفة واحدة أو أكثر لمقاومة فايروس أو عدد من فايروسات النبات (15 و 20). قام Camara و آخرون (11) بتنفيذ برنامج تربية لبعض اصناف الطماطة (40 صنف) ذات اصول وراثية

غير تكاثرية (19 و 21). استخدمت طرائق عدة لتشخيص الفايروسات النباتية كاستخدام الاختبارات المصلية (Serological tests) في تشخيص الفايروس التي اثبتت قلة حساسيتها وعدم مقدرتها على التفريق بين السلالات المختلفة لفايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV) قياسا بالاختبارات الجزيئية (Molecular tests) منها تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase chain reaction, PCR) (16).

كما استخدمت أيضا وسائل أخرى لمنع أو تقليل الأضرار الناجمة عن الإصابة بفايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV) و من بين تلك الطرق هي استخدام المبيدات الكيميائية التي تكمن فائدتها في تقليل انتشار الفايروس في حقول الطماطة عن طريق تقليل الكثافة العددية لحشرة الذباب الأبيض إلا أنها لا تعد الطريقة الأكفأ في مقاومة الفايروس نظرا لأثارها السلبية للبيئة و صحة الإنسان و النبات و الحيوان فضلا عن دورها في ظهور صفة المقاومة لدى الافة (16). أصبحت الحاجة ملحة الى إيجاد مصادر وراثية لمقاومة الفايروسات النباتية و ادخالها في برامج تربية النبات الحديثة لإنتاج صنف يحمل صفة واحدة أو أكثر لمقاومة فايروس أو عدد من فايروسات النبات (15 و 20). قام Camara و آخرون (11) بتنفيذ برنامج تربية لبعض اصناف الطماطة (40 صنف) ذات اصول وراثية

عزل و تشخيص فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV) جزيئيا باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) و تحديد التتابع النيوكليوتيدي (Nucleotide sequence) لسلسلة الفايروس المعزولة. اختبار استجابة بعض التراكيب الوراثية لنبات الطماطة للفايروس المعزول (TYLCV) لتحديد حساسيتها و مقاومتها.

(viruliferous whiteflies, المنماة سابقا على نباتات الباذنجان, الى نباتات طماطة (صنف سوبر ماريموند) مصاب بالفايروس المراد تشخيصه و موضوع في صندوق خشبي ابعاده 50×40×40 سم مغطى بقماش المللم. اعطيت الحشرات فترة تغذية لمدة 24 ساعة, بعدها تم تلقيح نباتات طماطة بعمر اربعة اوراق حقيقية و بمعدل 15 حشرة /نبات موضوعة في ثلاثة صناديق خشبية (ابعادها 50×40×40 سم) كل منها يحتوي على اربعة نباتات. تركت الحشرات الحاملة للفايروس لمدة 48 ساعة لغرض اتمام عملية التلقيح. بعدها تم رش جميع النباتات بالمبيد الكيميائي اميجارد (Imidacloprid) و نقلها بعد حوالي ساعتين الى بيت ابعاده (5×4×2.5 م) مصنوع من طبقتين من قماش المللم و موجود داخل البيت البلاستيكي. تم متابعة النباتات بشكل يومي لتسجيل بداية ظهور و تطور الاعراض المرضية الناتجة من الإصابة الفايروسية. اختبرت جميع نباتات التجربة بواسطة اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) و باتباع طريقة العمل الموصوفة لاحقا.

تشخيص الفايروس باستعمال النباتات الكاشفة زرعت بذور بعض النباتات الكاشفة (جدول 1) التي حصل عليها من معهد البحوث جيمز هاتن (James Hutton Institute)- مدينة دندي- المملكة المتحدة في سنادين بلاستيكية ابعادها 8*30 سم و الحاوية على تربه مزيجية معقمة و يتموس (1:1). بعد بلوغ النباتات 3-4 اوراق حقيقية, تم تفريد النباتات و نقلها الى سنادين اكبر حجما لأستخدامها في تجربة تشخيص الفايروس.

مختلفة و تقييم استجابتها للإصابة بفايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة, كاشفا ان من بينها 12 صنف ذات مقاومة عالية, و 16 صنفا كان ذات حساسية عالية اما بقية الاصناف فكانت متوسطة المقاومة للفايروس. نظرا لأهمية محصول الطماطة و الاضرار الاقتصادية المتسببة عن فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV), فقد هدفت هذه الدراسة الى:

المواد و طرائق العمل

مصدر الفايروس و نقلة بواسطة حشرات الذباب الابيض (*B. tabaci*)

جمعت نباتات طماطة ظهرت عليها اعراض اصابة فايروسيه متمثلة بتجعد و التقاف الاوراق مع تقزم شديد من احد المزارع الصحراوية الواقعة في محافظة كربلاء خلال الموسم الزراعي 2015-2016. زرعت جميع النباتات في سنادين بلاستيكية ابعادها 21 × 21 سم و نقلت الى البيت البلاستيكي التابع لكلية الزراعة- جامعة كربلاء بعد وضعها في صناديق خشبية ابعادها 60×40×40 مغطاة بقماش المللم لغرض تنميتها و اجراء بعض التجارب اللاحقة عليها.

لغرض نقل الفايروس لنباتات سليمة حساسة للفايروس, جمعت عدد من بالغات حشرات الذبابة البيضاء من حقول الباذنجان التابعة لكلية الزراعة-جامعة كربلاء بواسطة شافطة يدويه (Hand Aspirator) و تم تنميتها على نباتات باذنجان (صنف برشلونه) سليمة موضوعة في قفص خشبي ابعاده 50×50×120 سم و ذات قاعدة خشبية و جوانبه الخمسة الاخرى مغطاة بطبقتين من قماش المللم لمنع دخول او خروج الحشرات من الصندوق. اخذت عينة من حشرات الذبابة البيضاء (*B. tabaci*,

Biotype: B) بعد حفظها في الايثانول (70%) الى مختبر علم الحشرات في كلية العلوم-جامعة نيوكاسل- المملكة المتحدة لغرض تشخيصها على اساس الحامض النووي.

تم نقل حوالي 300 حشرة بالغة من حشرات الذباب الابيض غير الحاملة للفايروس (Non-

جدول 1: النباتات الكاشفة المستعملة في تشخيص الفايروس المعزول من نباتات الطماطة النامية في بعض مناطق المنطقة الصحراوية في محافظة كربلاء.

Table 1: Indicator plants used in identification of the virus isolated from tomato plants growing in some areas of the desert region in Karbala province.

النبات الكاشف	العائلة	الاسم العلمي
الطماطة	Solanaceae	<i>Solanum lycopersicom</i>
الفلفل	Solanaceae	<i>Capsicum annuum</i>
الزرببخ	Solanaceae	<i>Chenopodium amaranticolor</i>
الباميا	Malavceae	<i>Abelmoschus esculentus</i>
الفاصوليا	Fabaceae	<i>Phaseolus vulgaris</i>
المنطاد	Solanaceae	<i>Physalis floridana</i>
القطن	Malavceae	<i>Gossypium hirsutum</i>

ظهور و تطور اي اعراض مرضية. بعد مرور 35 يوما من التلقيح, تم جمع عينات ورقية من كل نبات و فحصها بواسطة اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل للتأكد من وجود الفايروس. تشخيص الفايروس باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)

استخلص الحامض النووي باستخدام العدة (Cat. No: FAPGK001) المجهزة من قبل شركة فافورجين (Favorgen) تايوان- الصين, و باتباع الخطوات الموصوفة من قبل الشركة المصنعة. تم تقدير تركيز و نقاوة الحامض النووي DNA باستخدام جهاز قياس الطيف الضوئي (Spectrophotometer) تحت الطول الموجين 260 و 280 نانوميتر لمعرفة تركيز الحامض النووي DNA من خلال المعادلة الآتية:

TTGACCAAGATTTTT
ACACTTATCC (10 pmol) و 1 مايكروليتر من الحامض النووي. بعد وضع جميع المكونات المطلوبة للتفاعل في الانبوبة المجهزة من قبل الشركة المصنعة و اكمال الحجم بالماء (Nuclease free water) إلى 20 مايكروليتر تم مضاعفة الحامض النووي الفايروسي باستخدام ظروف تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) المبينة في جدول 2.

تم اطلاق حوالي 300 حشرة من الذباب الابيض غير الحاملة للفايروس على نبات طماطة مصاب بالفايروس تحت التشخيص و تركت للتغذية لمدة 48 ساعة ثم نقل عدد من الحشرات بواسطة شافطة يدوية الى ثلاثة صناديق خشبية كل منها يحتوي ثلاثة نباتات الطماطة (صنف سوير ماريموند) و بمعدل 15 حشرة/ نبات. نفذت معاملة مقارنة باتباع نفس الخطوات السابقة باستثناء تغذية الحشرات على نبات طماطة سليمة. نقلت جميع الصناديق الى البيت البلاستيكي و تركت للتغذية لمدة 48 ساعة, ثم رش جميع النباتات بالمبيد اميجارد (Imidacloprid) لقتل جميع الحشرات, و بعد حوالي ثلاث ساعات تم نقل جميع النباتات الى بيت مصنوع من قماش المللم (حاوي في احد جوانبه على باب مزود بسحاب للتحكم بفتحه و غلقه). تم مراقبة النباتات بشكل يومي لتسجيل

اجراء تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) اجري اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) باستخدام العدة (PCR PreMix, Cat. No. Bioneer K-2012) المجهزة من قبل شركة الكورية المنشأ. نفذ تفاعل البلمرة المتسلسل بحجم 20 مايكروليتر و الحاوية على 1 مايكروليتر من كل البادئ الامامي (F- TTTATTTG و TAGTTGAAG (R- و الخلفي

جدول 2: خطوات و ظروف تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) المستخدمة لمضاعفة الحامض النووي لفايروس تجعد و اصفرار اوراق الطمطة (TYLCV).

Table 2: Steps and conditions of polymerase chain reaction (PCR) used for amplifying DNA of TYLCVi isolated.

خطوات تفاعل البلمرة المتسلسل	درجة الحرارة (°م)	الوقت	عدد الدورات
Initial denaturation	94	10 دقائق	1
Final denaturation[	94	30 ثانية	35
Annealing	52	20 ثانية	
Initial extension	72	30 ثانية	
Final extension	72	30 ثانية	1
Hold	4	-	-

جمعت من بعض المزارع الواقعة في محافظة كربلاء) مع البودئ الامامية و الخلفية التي استخدمت لمضاعفة حزمة الحامض النووي الفايروسي الى شركة Macrogen الكورية لغرض تحديد تسلسل الحامض النووي لعزلة الفايروس.

لمعرفة نوع السلالة الفايروسية الموجودة في مزارع حقول الطمطة و كذلك لمعرفة درجة التشابه و الاختلاف في التتابع النيوكليوتيدي للحامض النووي لعزلة فايروس تجعد واصفرار اوراق الطمطة المشخصة في هذه الدراسة و العزلات الاخرى المشخصة عالميا، ادخل تسلسل الحامض النووي في قاعدة البيانات المتوفرة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (National Center for Biotechnology Information, NCBI) باستخدام برنامج الـ (Basic BLAST Local Alignment Search Tool). (23).

اختبار استجابة بعض التراكيب الوراثية لنبات الطمطة ضد فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطمطة (TYLCV) تم اختبار عشرة تراكيب وراثية لنبات الطمطة بهدف تحديد استجابتها لفايروس تجعد و اصفرار اوراق الطمطة (جدول 3). زرعت بذور الطمطة بشكل منفصل في اطباق فلين

حضرت طبقة هلام الاكاروز (Agarose gel) بتركيز 1% في المحلول الداري (Tris-boric acid EDTA 1×TBE buffer). اضيف 5 مايكروليتر من صبغة الـ Ethidium bromide بعد انخفاض درجة المحلول (40-45 °م). تم الكشف عن نواتج الـ PCR بالترحيل الكهربائي على طبقة هلام الاكاروز المصبغة سابقا بمادة الـ Ethidium bromide. كما تم اضافة 5 مايكروليتر من معلم الحامض النووي (DNA 1 Kbp ladder marker) الى الحفرة الموجودة في الجانب الايسر من العينات المضافة لغرض تحديد احجام الحامض النووي المضاعف. أوصلت أقطاب الجهاز بالتيار الكهربائي و شغل مجهز الطاقة (Power supply) على 100 فولت. بعد اكمال عملية ترحيل العينات، فحصت طبقة هلام الجل الحاوية على حزم الحامض النووي تحت الاشعة فوق البنفسجية (UV transillumination) و اخذت صور لها.

تحليل تسلسل قواعد الحامض النووي (DNA) لعزلة فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطمطة (TYLCV)

تم ارسال ناتج التفاعل (PCR-amplified fragments) (المضاعف من الحامض النووي (DNA) المسخلص من عينات نباتات طمطة

حاوية على بتموس و بعد حوالي 15 ايام من الانبات فرقت النباتات و زرع كل منها بشكل منفرد في اصص بلاستيكية ابعادها 11×13سم لأستخدامها في التجارب اللاحقة.

جدول 3: التراكيب الوراثية لنبات الطمطة المختبرة ضد فايروس تجعد واصفرار اوراق الطمطة (TYLCV).

Table 3: Genotypes of tomato plant tested against TYLCV.

ت	التركيب الوراثي لنبات الطمطة	الشركة المنتجة	البلد	ت	اسم الهجين/ الصنف	الشركة المنتجة	البلد
1	Flat kimia T6m	Alh seed	Lebanon	6	Nicker Son	Cal Am seed	USA
2	Alaziza	Western seed	Kenya	7	Wardeh	Cal Am seed	USA
3	Hybrid Early Lady F1	Petoseed	USA	8	Ghazalah	Hi-tech	China
4	Selmoren	Petoseed	USA	9	Ginan	Petoseed	USA
5	Mugestem	Petoseed	USA	10	Faten	Huizer	Netherland

اجراء عملية التسميد باستخدام سماد الـNPK (2 غم/ لتر) اسبوعيا. كما اجريت عملية المكافحة بالمبيد اميجارد (Imidacloprid) كل اسبوع لضمان عدم وجود الحشرات الناقلة للفايروس. تم متابعة النباتات بشكل يومي مع تسجيل اي ظهور و تطور للأعراض المرضية و لحين انتهاء فترة التجربة. بعد مرور ستة اسابيع من التلقيح تم اختبار نباتات التجربة بواسطة اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل.

مقارنتها بالنباتات غير المصابة بالفايروس (شكل 1). كما اظهرت نباتات الفلفل بعد مرور 13 يوما من التلقيح اعراض مرضية بهيئة تجعد واضح في الاوراق القمية و مع استطالتها و بفارق ملحوظ عن النباتات غير المصابة بنفس الفايروس (شكل 1).

اثبت تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) وجود الفايروس TYLCV في النباتات المصابة. اذ تم مضاعفة حزمة من الحامض النووي الفايروسي و بالحجم المتوقع (634bp) و هذا

اجريت عملية التلقيح لنباتات الطمطة (بعمر 2-3 اوراق حقيقية) بواسطة حشرات الذباب الابيض وفق الطريقة الموصوفة سابقا. كما نفذت معاملة مقارنة بتلقيح نباتات التراكيب الوراثية بواسطة حشرات الذباب الابيض غير الحاملة للفايروس. بعد رش النباتات بالمبيد اميجارد (Imidacloprid). نقلت جميع نباتات التجربة الى ظلة مصنوعة من قماش الململ ذات ابعاد 4×5×2.5 م لمنع دخول الحشرات. سقيت جميع النباتات بالماء و حسب الحاجة مع

النتائج و المناقشة

تشخيص الفايروس باستعمال النباتات الكاشفة
بعد مرور 2-3 اسابيع من اجراء عملية تلقيح نباتات الطمطة (صنف Super Maremonde) بواسطة حشرة الذبابة البيضاء الحاملة للفايروس، ظهرت اعراض مرضية بهيئة تجعد و اصفرار الاوراق الحديثة النمو و التي تطورت فيما بعد الى اعراض تجعد شديد و اصفرار شملت بقية اوراق النبات مع ملاحظة تقزم شديد في النباتات المصابة عند

المصابة بفايروس TYLCV اظهرت اعراض مرضية مشابهة للأعراض المرضية التي شوهدت على نباتات الطماطة المستعملة في هذه الدراسة. كما وجد العديد من الباحثين ان تلقيح نباتات الفلفل بفايروس تجعد واصفرار اوراق الطماطة اعطى اعراض مرضية مماثلة لتلك التي شوهدت في هذه الدراسة (4) و 7 و (8).

متفق مع حجم التتابع النيوكليوتيدي المحصور بين المواقع التي صممت منها البوادي الامامية و الخلفية (Forward and reverse primers) في جينوم الفايروس TYLCV (شكل 16).

اتفقت هذه النتائج مع ما اشار اليه Kashina و اخرون (17)؛ Hanssen و اخرون (15)؛ المولى (3)؛ الجبوري (1) الى ان نباتات الطماطة صنف Super Maremonde

نبات غير مصاب بالفايروس (Non-infected plant)	نبات مصاب بالفايروس (TYLCV-infected plant)	النبات الكاشف
		طماطة (صنف سوبر ماريموند)
		فلفل

شكل 1: نباتات طماطة (صنف سوبر ماريموند) و فلفل مصابة و غير مصابة بفايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV).

Figure 1: Tomato plants (Super Marine variety) and pepper infected and non-infected with TYLCV.

الطماطة دون ظهور اي نوع من الاعراض المرضية حتى بعد مرور 35 يوما من التلقيح

كما اثبتت النتائج حساسية الفاصوليا و الباميا للإصابة بفايروس تجعد و اصفرار اوراق

مع ما وجده حسن و آخرون, (5)؛ Al-Ani و آخرون (9)؛ الفضل (2) الذين بينوا عدم ظهور اي اعراض مرضية عند استعمال نفس الانواع النباتية المستعملة في هذه الدراسة رغم اصابتها جهازيا.

(شكل 2). اثبت استخلاص الحامض النووي من اوراق النباتات المصابة و تعريضه الى اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) امكانية مضاعفة حزمة من الحامض النووي الفايروسي بحجم (634bp) (شكل 4). اتفقت هذه النتائج

نبات غير مصاب بالفايروس (Non-infected plant)	نبات مصاب بالفايروس (TYLCV-infected plant)	الفاصوليا
		فاصوليا
		عقرب

شكل 2 : نباتات فاصوليا و باميا مصابة بفايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV) بدون ظهور اعراض مرضية (Symptomless infection).

Figure 2: Beans and okra plants show symptomless infection with TYLCV.

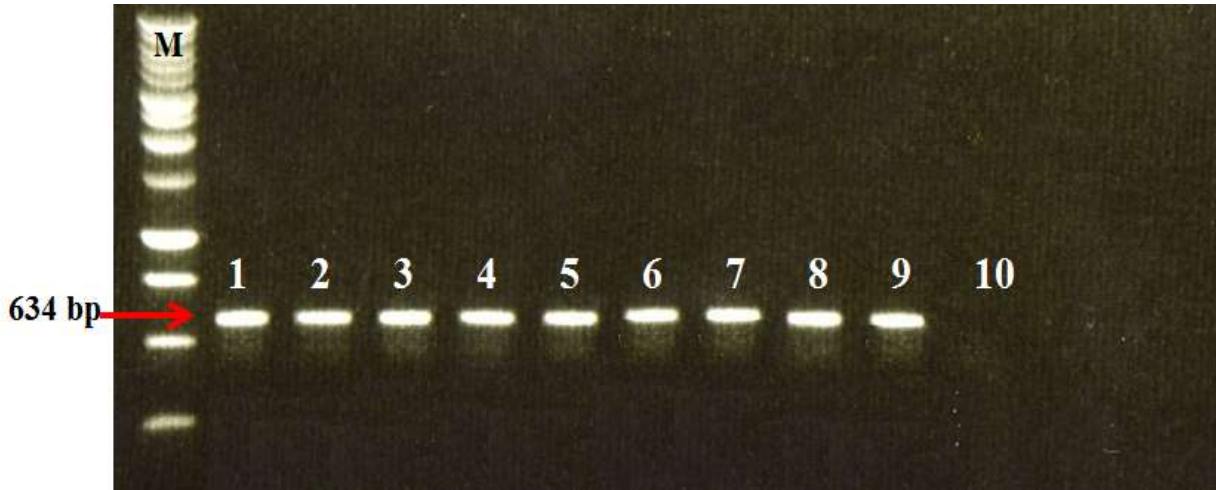
اصفرار اوراق الطماطة (شكل 5). لاحظ العديد من الباحثين عدم استجابة نباتات القطن, المنطاد, الزرباخ و الباذنجان عند تلقيحها بفايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة معززين النتائج التي توصلت اليها هذه الدراسة (2 و 4 و 13).

كما اظهرت النتائج عدم استجابة نباتات القطن, المنطاد, الزرباخ و الباذنجان للإصابة بفايروس, اذ لم يلاحظ ظهور اي اعراض مرضية حتى بعد مرور 35 يوما من التلقيح بفايروس (شكل 3). كما وجد ان اختبار النباتات الملقحة بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) لم يعطي اي حزمة مضاعفة من الحامض النووي لفايروس تجعد و

نبات غير مصاب بالفايروس (Non-infected plant)	نبات مصاب بالفايروس (TYLCV-infected plant)	النبات الكاشف
		قطن
		منطاد
		زربخ

شكل 3: نباتات قطن و منطاد و زربخ و بادنجان لم تستجيب للإصابة بفايروس تجعد و اصفرار اوراق الطمطة (TYLCV).

Figure 3: Cotton, airship, goosefoot, and eggplant plants did not respond for TYLCV infection.



شكل 4: اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) للنباتات الكاشفة المستعملة في تشخيص فايروس تجعد واصفرار اوراق الطماطة. M = 1Kbp DNA ladder marker, 1 و 2 = طماطة, 3 و 4 = فلفل, 5 = باميا, 6 و 7 = فاصوليا, 8 = فلفل, 9 = Positive PCR control و 10 = Negative PCR control.

Figure 4: Testing indicator plants used for identifying TYLCV by polymerase chain reaction (PCR). M = 1Kbp DNA ladder marker, 1 and 2 = tomato, 3 and 4 = pepper, 5 6 = okra, 7 and 8 = beans, 9 = positive PCR control and 10 = Negative PCR control.

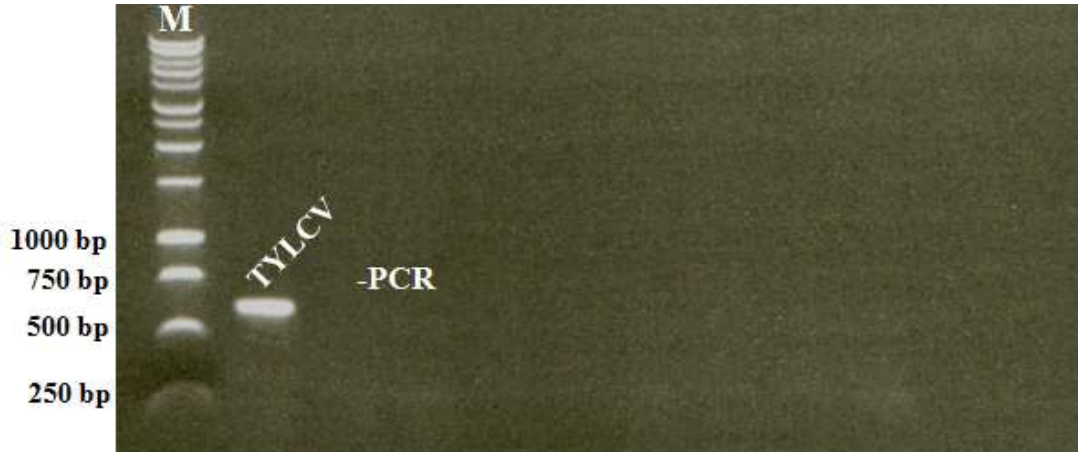


شكل 5: اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) للنباتات الكاشفة المستعملة في تشخيص فايروس تجعد واصفرار اوراق الطماطة. M = 1Kbp DNA ladder marker, 1 = قطن, 2 = باذنجان, 3 = زرببخ, 4 = منطاط, 5 = Negative PCR control و 6 = Positive PCR control.

Figure 5: Testing indicator plants used for identifying TYLCV by polymerase chain reaction (PCR). M = 1Kbp DNA ladder marker, 1 = cotton, 2 = eggplant, 3 = gosefoot, 4 = airship, 5 = Negative PCR control and 6 = Position PCR control.

المتسلسل (PCR) امكانية مضاعفة حزمة من الحامض النووي الفايروسي بالحجم المتوقع (634bp) و بأستخدام زوج البادئات الموصوف في المواد و طرائق العمل (شكل 6).

تشخيص الفايروس بأستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) اثبتت النتائج بعد استخلاص الحامض النووي (DNA) من عينات جمعت من نباتات طماعة مصابة و اختبارة بواسطة تفاعل البلمرة



شكل 6: ناتج الحامض النووي (DNA) المضاعف بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) من فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماعة (TYLCV) من عينة طماعة مأخوذة من احدى المزارع الصحراوية في محافظة كربلاء. M = 1Kbp DNA ladder marker ; -PCR = Negative control (بدون عينة DNA مضافة).

Figure 6: PCR product amplified by PCR from TYLCV from a tomato sample collected from a farm in the desert area of Karbala governorate. M = 1Kp DNA ladder marker; -PCR = Negative PCR control (no DNA sample added).

البلمرة المتسلسل (PCR) الى شركة Macrogen الكورية لمعرفة التسلسل النيوكليوتيدي (شكل 7). اظهرت نتائج تحليل التسلسل النيوكليوتيدي بأستخدام برنامج BLAST بأن الفايروس المعزول في هذه الدراسة هو فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماعة (TYLCV).

تحليل التسلسل النيوكليوتيدي للحامض النووي (Nucleotide sequence analysis) لعزلة فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماعة (TYLCV) تم ارسال حزمة الحامض النووي (Amplicon) المضاعفة بواسطة تفاعل

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
10      20      30      40      50
TYLCV-IRAQ TACTTTTACA AAATTACCTA AATGCCATTG
GGTGTCCAGG TATAAGTAAG
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
60      70      80      90     100

```

```

TYLCV-IRAQ  ACACCGATAC ACCGATTGCC ATAGAGCTTT
              GAGAGACACC GATTCATTTTC
              ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
              110    120    130    140    150
TYLCV-IRAQ  ACCATGCCTC GTCTATTAA AATATATGCC
              AAAAATTATT TCCTGACTTA
              ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
              160    170    180    190    200
TYLCV-IRAQ  TCCCAATTGT TCTCTCTCTA AAGAGGAAGC
              ACTTTCCCAA TTAAAAAACC
              ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
              210    220    230    240    250
TYLCV-IRAQ  TAGAAACCCC AACAAATAAA AAATACATCA
              AAGTTTGCAG AGAATTCCAC
              ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
              260    270    280    290    300
TYLCV-IRAQ  GAGAATGGGG AACCACATCT CCATGTGCTT
              ATCCAATTTCG AAGGAAAATA
              ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
              310    320    330    340    350
TYLCV-IRAQ  CCAATGTAAG AACCAACGGT TCTTCGACCT
              GGTATCCCCA AACAGATCAG
              ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
              360    370    380    390    TYLCV-IRAQ
CACATTTCCA TCCGAACATT CAGGCAGCTA AGAGCTCAAC A

```

شكل 7: تتابع القواعد النايكروجينية (Nucleotide sequence) لسلالة فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV) المعزولة في هذه الدراسة من احد المزارع الصحراوية في محافظة كربلاء.

Figure 7: Nucleotide sequencing of the TYLCV strain isolated in this study from a farm in the desert area of Karbala governorate

KT961705.1), اذ بلغت نسبة التطابق 100% (جدول 4), في حين بلغت نسبة التشابه 99% مع السلالة A3MA (GenBank accession numbers: KT961704.1) وكانت اكثرها تباعدا وراثيا (93%) عن العزلات الايرانية (JQ928345.1) و EU834059.1 (GenBank accession numbers: EU834064.1

كما وجد من خلال مقارنة التتابع النيوكليوتيدي لهذه السلالة مع التتابعات النيوكليوتيدية لسلالات نفس الفايروس الموجودة في قاعدة البيانات المتوفرة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) ان نسبة التشابه مع السلالات الاخرى العائدة لنفس الفايروس تراوحت بين 93-100% و كان اكثرها تشابها مع سلالاتي الفايروس العراقية (GenBank accession numbers: KT961706.1 and

جدول 4: مقارنة بين نسب التشابه النيوكليوتيدي للجينات C1 و C4 من فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة المعزول في هذه الدراسة و العزلات الاخرى لنفس الفايرس المسجلة عالمياً.

Table 4: Comparison between the nucleotide similarity percentages of the genes C1 and C4 of TYLCV, isolated in this study, with the other TYLCV isolates globally registered in NCBI.

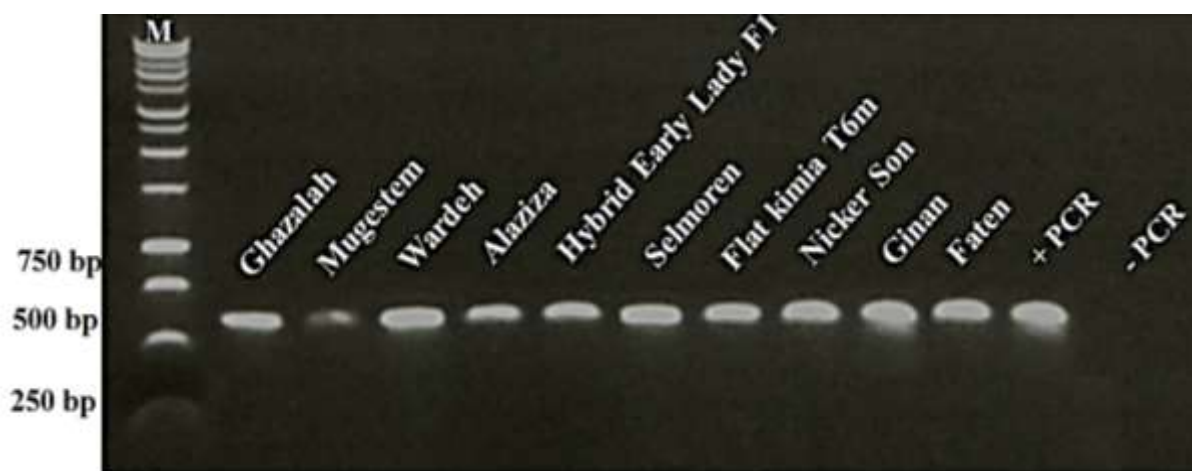
Virus	Isolate name	Origin	The most similar sequences in GenBank database	
			GenBank Accession Number	Sequence similarity (%)
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	A1MA	Iraq	KT961706.1	100
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	A5MA	Iraq	KT961705.1	100
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	A3MA	Iraq	KT961704.1	99
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	-	Jordan	EU143755.1	98
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	Sinaloa	Mexico	FJ012359.1	98
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	3256-1	Spain	DQ058082.1	98
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	ES:T188:03	Spain	DQ317771.1	98
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	ES:T341:03	Spain	DQ317749.1	98
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	186-Kermanshah	Iran	JQ928340.1	97
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	-	USA	AF260331.1	97
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	AN152	Sanderson	GU320571.1	97
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	2	Lebanon	DQ999997.1	97
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	-	Jordan	EU143751.1	96
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	-	USA:	AF260331.1	96
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	AN152	Antigua and Barbud	GU320571.1	96
<i>Tomato yellow leaf curl</i>	-	Jordan	EU143751.1	95

<i>virus</i>				
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	-	Egypt	DQ423476.1	95
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	-	Iran	JQ928345.1	93
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	BA	Iran	EU834059.1	93
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	Sh	Iran	EU834064.1	93

استجابة بعض التراكيب الوراثية لنبات الطماطة ضد فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV)

الطماطة (TYLCV), اذ اعطت جميع النباتات الملقحة اعراض مرضية واضحة (شكل 9) و مرتبطة بوجود فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة الذي تم اثبات وجوده بواسطة اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) (شكل 8).

اظهرت النتائج حساسية جميع التراكيب الوراثية (Nicker Son و Ginan و Hybrid Early Lady F1 و Mugestem و Flat kimia T6m و Alaziza و Wardeh و Ghazalah و Faten و Selmoren) لفايروس تجعد و اصفرار اوراق



شكل 8: نواتج الحامض النووي (DNA) الفايروسي المضاعفة بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) من جميع التراكيب الوراثية لنبات الطماطة المختبرة ضد فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV). +PCR: Positive PCR control; -PCR: Negative PCR control. M: 1kb DNA ladder marker.

Figure 8: PCR products amplified by polymerase chain reaction (PCR) from all tomato genotypes tested against TYLCV. + PCR: Positive PCR control; - PCR: Negative PCR control. M: 1kbp DNA ladder marker

Ginan			Ghazalah
Faten			Nicker Son
Mugestem			Wardeh
Flat kimia T6m			Hybrid Early Lady F1
Alaziza			Selmoren

شكل 9: الاعراض المرضية المتسببة عن فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV) في التراكيب الوراثية لنبات الطماطة المختبرة في هذه الدراسة.

Tomato yellow leaf curl virus-EG.
Emir. *Journal of Food Agriculture*
23(4):355-367.

8- Ajlan A. M., Ghanem G. M. and Abdul Salam K. (2007) *Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in Saudi Arabia: Identification, partial characterization and virus-vector relationship.* [Arab Journal of Biotechnology](#) 10(1):179-192.

9- Al-Ani R. A., Abhab M. A., Hamad S. A. H. and Diwan S. N. H. (2011) *Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) identification, virus vector relationship, strains characterization and a suggestion for its control with plant extracts in Iraq.* *African Journal of Agricultural Research* 6(22): 5155-5155.

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

11- Camara M., Mbaye A. A., Noba K., Samb P. I., Diao S. and Cilas C. (2013) *Field screening of tomato genotypes for resistance to Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) disease in Senegal.* *Crop protection* 44: 59-65.

12- Christopher D. J., Raj T. S., Rani S. U. and Udhayakumar R. (2010) *Role of defense enzymes activity in tomato as induced by Trichoderma virens against Fusarium wilt caused by Fusarium*

المصادر

-الجبوري, عفاف اركان عليوي (2014) 1- تشخيص جزيئي لفايروس تجعد واصفرار (باستخدام تقنية TYLCV اوراق الطمطة) مع برنامج PCRتفاعل لبلمرة المتسلسل (وقائي من الاصابة بالفايروس. رسالة ماجستير, كلية الزراعة, جامعة الكوفة.

-الفضل, فضل عبد الحسين (2012) 2- الخصائص البايولوجية والمصلية لفايروس تجعد واصفرار اوراق الطمطة. مجلة جامعة الكوفة لعلوم الحياة. المجلد 4 العدد 2 : 145-139.

-المولى, عبد الكريم قاسم جبر (2013)- 3 استخدام الطرائق الحيوية والجزيئية وتحليل التتابع الجيني في دراسة فايروس تجعد (في TYLCV واصفرار اوراق الطمطة) العراق وسبل مكافحته. اطروحة دكتوراه, كلية التربية, جامعة البصرة.

-الوانلي, مهند عبد الرضا خلف (2006)- 4 دراسة تشخيصية باستخدام طرق سيربيولوجية وحيوية لفايروس تجعد واصفرار اوراق الطمطة وامكانية مكافحة الناقل احيائيا. رسالة ماجستير, كلية الزراعة, جامعة البصرة.

-حسن, زياد محمود و عماد داود اسماعيل و 5- صلاح الشعبي (2011) التحري عن العوائل البرية المخزنة لفايروس تجعد واصفرار اوراق البندورة في الساحل السوري. مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية- سلسلة العلوم البيولوجية. المجلد 33 العدد 5: 189-200.

-شفيق, حسين لطيف (1983) دراسات على- 6 تشخيص ومقاومة فايروس تجعد واصفرار اوراق الطمطة في البيوت البلاستيكية. رسالة ماجستير, كلية الزراعة, جامعة بغداد.

7- Abd El-monem A. F., El-DougDoug Kh. A., Ibtisam A., Ahmed H. E. A. and Abd El-Kader H. S. (2011) *Identification and molecular characterization of*

- resistance in insect pests or vectors and development of novel strategies to combat its evolution. *International Journal of Bioinformatics and Biomedical Engineering* 1(3): 344-351.
- 19- **Pakkianathan B. C., Kontsedalov S., Lebedev G., Mahadav A., Zeidan M., Czosnek H. and Ghanim M.** (2015) Replication of *Tomato yellow leaf curl virus* in its whitefly vector *Bemisia tabaci*. *Journal of Virology* 15: 1-12.
- 20- Prasanna H. C., Sinha D. P., Rai G. K., Krishna R., Kashyap S. P., Singh N. K., Singh M. and Malathi V. G. (2015) Pyramiding Ty-2 and Ty-3 genes for resistance to monopartite and bipartite *Tomato yellow leaf curl viruses* of India. *Plant Pathology* 64(2): 256– 264.
- 21- Salati, R., Nahkla M., Rojas M., Guzman P., Maxwell D. and Gilbertson R. (2002) *Tomato yellow leaf curl virus* in the Dominican Republic: Characterization of an infection clone, virus monitoring in whiteflies, and identification of reservoir hosts. *Phytopathology* 92: 487- 496.
- 22- Zheng L., Campbell M., Murray J., Lam S. and Xu J. R. (2000) The *BMP1* gene is essential for pathogenicity in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular of Plant-Microbe Interact* 13: 724-732
- oxysporum f sp. lycopersici*. *Journal of Biopesticides* 3(1): 158- 162.
- 13- El-Doughoug N. K., Mahfouze S. A., Ahmed S. A., Othman B. A. and Hazaa M. M. (2014) Characterization, nucleotide sequencing of *Tomato yellow leaf curl virus* egyptian isolates. *Science of Agriculture* 7(2): 58-69.
- 14- Giovanni C.D., Orco P.D., Bruno A., Ciccarese F., Lotti C. and Ricciardi L. (2004) Identification of PCR-based markers (RAPD, AFLP) linked to a novel powdery mildew resistance gene (*ol-2*) in tomato. *Plant Science* 166: 41-48.
- 15- Hanssen I. M., Lapidot M. and Thomma B. P. H. J. (2010) Emerging viral diseases of tomato crops. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23(5): 539-548.
- 16- Henson J. M. and French R. (1993) The Polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology* 31: 81-109.
- <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>. [Accessed on 11 August 2015]
- 17- Kashina B. D., Mabagala R. B. and Mpunani A. A. (2004) Analysis of the variability of *Tomato yellow leaf curl disease* isolates from Tanzania using RFLPs and sequence data. In: 4th International *Geminivirus* Symposium, Cape Town, RSA: 16/12 W11b-16.
- 18- Muhammad S., Keith, D., Muhammad S. (2015) Insecticides

