تمنيع نبات التبغ *Nicotiana tabacum* ضد فايروس موزائيك الطماطة Tomato mosaic virus ToMV

رائد رؤوف العاني* رقيب عاكف حمد**

الملخص

أجريت هذه الدراسة في محاولة لتمنيع نباتات التبغ ضد الإصابة الفايروسية بأستحثاث مقاومة مكتسبة جهازية Systemic Acquired Resistance (SAR) بواسطة حامض الساليسلك Salicylic acid في نبات التبغ *Nicotiana tabaccum* صنف samsun التي تستجيب لفايروس موزائيك الطماطة بتكوين بقع موضعية. رشت 10 نباتات تبغ بحامض الساليسلك بتركيز 1 مايكرومول/مل ولمدة ثلاث أيام متتالية ولقحت بالفايروس بعد 24 ساعة من الرش بالحامض في حين تركت عشرة أخرى من نباتات التبغ غير معاملة بحامض الساليسلك ولقحت فقط بمستخلص نبات طماطة مصابة بالفايروس للمقارنة. أظهرت النتائج انخفاض معنوي كبير في عدد البقع المتنخرة Necrotic local lesion فقد بلغ معدل عدد البقع 7.05 بقعة/ورقة للنباتات المعاملة بالحامض وبنسبة تثبيط بلغت 61.68 % في حين كان معدل عدد البقع 18.4 بقعة/ورقة في معاملة المقارنة وعند اجراء عملية عدوى ميكانيكية لنبات التبغ بالفايروس كل 24 ساعة فلم تظهر اية اصابة بالفايروس ولغاية 12 يوم واعتمد إختبار اليزا ELISA في الكشف عن الإصابة. ان النتائج التي تم الحصول عليها تشير الى أن حامض الساليسلك هو السبب الرئيس في اضفاء حماية للنبات ضد الفايروس طيلة هذه الفترة.استخلصت بروتينات النباتات المستخدمة في الدراسة وحللت على هلام متعدد الأكريل أمايد 15% (Polyacrylamide gel electrophoresis 15%) بتقنية الترحيل الكهربائي وقد أظهرت النتائج ظهور حزمتين من البروتين في نباتات التبغ حددت أوزانها الجزيئية 35,20.4 كيلودالتون في حين لم تظهر مثل هذه الحزم البروتينية لعينات بروتينات تبغ غير مرشوشة بحامض الساليسلك. من النتائج التي تم الحصول عليها يلاحظ ان هذه البروتينات المستحثة مسؤولة بشكل رئسي عن مقاومة النبات للفايروس والتي يطلق عليها بالبروتينات ذات العلاقة بالامراضية.

المقدمة

جرت محاولات عديدة لمكافحة الفايروسات والحد من إنتشارها في الحقل عن طريق إبادة مصادر العدوى ومقاومة النواقل واستخدام بعض المبيدات الكيميائية للحصول على نباتات خالية من الفايروسات الا أن جميع هذه المحاولات لم تستهدف الفايروس وتضاعفه مباشرة لذا اتجه التفكير في العقود الأخيرة الى استهداف الفايروس مباشرة، وقد أعتمدت في ذلك طرق فيزيائية كالمعاملات الحرارية لتخليص الأجزاء النباتية من الفايروس وأخرى كيميائية لنفس الغرض (7). وقد وجد أن مادة Saporin الموجودة في نباتات عائلة Araliaceae ذات تأثير مثبط للحامض النووي لفايروس موزائيك التبغ كما ودلّت نتائج بعض الدراسات أن القلويدات Alkaloids ومركبات Antohcyanin، *Coumarin* المستخلصة من البكتريا والفطريات والأشنات ذات تأثير تثبيطي للفايروسات النباتية (5). كما وجد أن مادة Scopolerin وهي من مشتقات مادة Coumarin المستخلصة من بعض النباتات ذات تأثير مثبط لفعالية فايروس موزائيك التبغ (8). ولوحظ أن رش نبات التبغ البري *Nicotiana glutinosa* بمادة Kinetin وهو أحد مشتقات Purin يؤدي الى ايقاف تطور البقع الموضعية لفايروس موزائيك التبغ على الأوراق المعداة فضلاً عن البقع الموضعية لفايروس البطاطا X (PVX) على نبات الداتورة *D. stramonium* (9).

* مركز بحوث التقنيات الأحيائية – جامعة النهرين– بغداد، العراق.

** كلية الزراعة – جامعة بغداد– بغداد، العراق.

وأشير وأن لمادة P. chlorophenol تأثيراً مثبطاً على تطور البقع الموضعية لفايروس موزائيك الخيار CMV على التبغ بنسبة 78% وثبطت الأصابة الجهازية للفايروس على الخيار بنسبة 60% (10). ووجد أن المستخلص المائي ولأستيوني لنبات الزنجبيل Ginger (*Zingiber perforatum*) لها فعالية تثبيطية لفايروس البطاطا X وفايروس موزائيك التبغ TMV حيث بلغت نسبة التثبيط الى 87% حتى التخفيف 10:1 للمستخلص المائي بينما احتفظ المستخلص الأستيوني بفاعليته التثبيطية حتى التخفيف 50:1 حيث وصلت النسبة المئوية لتثبيطه الى 75-100%. أن مستخلصات نبات الفلفل والجيرانيوم والداتورا تمتلك قابلية على استحثاث مقاومة مكتسبة جهازية في نبات البطاطا ضد الاصابة بفايروس البطاطا Y (6). وقد تمكن Beer (1) من عزل البروتين Harpin من البكتريا *Erwinia amylovora* القادر على تحفيز مقاومة جهازية ضد الكثير من المسببات المرضية على نبات البطاطا وبضمنها فايروسي البطاطا X,Y (1)، أن حامض الساليسلك يجعل نبات التبغ مقاوماً لفايروس موزائيك الخيار CMV ويعيق حركته من خلية الى أخرى عن طريق تحفيزه جين المقاومة في النبات المسؤول عن الاستجابة الموضعية نتيجة الإستجابة بفرط الحساسية Hyper sensitive Response (HR). وأشير الى أن معاملة جذور نبات الطماطة بحامض الساليسلك بتر كيز 200 مايكرومول أدت الى استحثاث مقاومة مكتسبة جهازية ضد الفطر *Alternaria solani* وأشار Zehnder (11) وجماعته الى أن البكتريا *Pseudomonas flouresens* حفزت المقاومة الجهازية في نبات الخيار ضد أمراض الذبول عند معاملة جذورها باللقاح البكتيري بعد أربعة أيام من الإنبات. لقد أشارت دراسات عدة بأنه عند إصابة نباتات التبغ بفايروس موزائيك التبغ يحدث تصنيع لبروتينات لم تكن موجودة قبل الإصابة أطلق عليها بالبروتينات ذات العلاقة بالإمراضية Pathogenesis Related Protein (PR-protein) (14) كما ويمكن تحفيز ما لايقل عن تسعة جينات بطرق مختلفة أطلق عليها جينات المقاومة الجهازية (SAR-genes) وأن النواتج البروتينية لهذه الجينات ذات تأثير مباشر على المسببات المرضية وهذه النواتج اما أن تكون أنزيمات مثل B-1,3-gluconase أو Chitinase أو تكون هذه البروتينات ذات طبيعة انزيمية (2). وذكر Vidhyasekaran (12) بأن استحثاث المقاومة الجهازية بالنبات مرتبط بانتاج بروتينات ذات العلاقة بالامراضية (PR-protein) تمتلك القدرة على مقاومة المسببات المرضية، وتختلف جينات المقاومة الجهازية المكتسبة التي يجري تحفيزها حسب الأنواع النباتية فقد وجد أن المجموعة III من Chitinase هي السائدة في نبات الخيار بينما يلاحظ أن الجينات PR1,NPR1 هي السائدة في نبات التبغ (3). أجريت هذه الدراسة في محاولة لإستحثاث مقاومة مكتسبة جهازية في نبات التبغ بواسطة حامض الساليسلك لمقاومة فايروس موزائيك الطماطة والكشف عن البروتينات ذات العلاقة بالإمراضية التي يمكن استحثاثها لهذا الغرض.

المواد وطرائق البحث

جمعت عينات أوراق نباتات طماطة ظهرت عليها أعراض الإصابة بفايروس موزائيك الطماطة من البيوت المحمية في كلية الزراعة –جامعة بغداد وفحصت بإختبار اليزا ELISA لتأكيد الإصابة بإستخدام مصل مستورد من شركة Switzerland-bioreba وتم حفظ المصاب بالفايروس منها في درجة حرارة -20° م لحين الاستخدام.

استحثاث المقاومة الجهازية

زرعت نباتات تبغ *Nicotiana tabaccum* var *samsun* في أصص بلاستيكية بثلاث معاملات وخمسة مكررات وعند وصول النباتات الى إرتفاع 15 سم رشت المعاملة الأولى بحامض الساليسلك تركيز 1 مايكرومول/مل ولمدة ثلاث أيام متتالية أما المعاملة الثانية فقد رشت بحامض الساليسلك وبنفس الطريقة أعلاه ولقُحت

بمستخلص نبات طماطة مصاب بالفايروس كل 48 ساعة وفحصت بإختبار اليزا كل 48 ساعة أيضاً والمعاملة الثالثة لقحت بمستخلص نبات طماطة مصاب بالفايروس وتم مراقبة النباتات يومياً لملاحظة الأعراض.

استخلاص البروتينات من الأنسجة النباتية

أتبعت طريقة daRocha وجماعته (4) في استخلاص البروتينات من الأنسجة النباتية لنباتات التبغ المرشوشة بحامض الساليسلك ونباتات المقارنة وكمايلي :

1- هرس 50 غم من الأوراق في 100 مل محلول داريء فوسفاتي KH_2PO_4 تركيز 0.01 مولاري يحوي 0.2 % SDS و 0.1 % من Mercaptoethanol في خلاط كهربائي لحين تجانس المستخلص.

2- رشحت المحتويات عبر ورق ترشيح واتمان (Whatman 1) وأضيف للراشح 51.6 غم سلفات الأمونيوم Ammonium sulfate مع التحريك حتى الذوبان ثم ترك المحلول لمدة ساعتين بدرجة 4 م للترسيب.

3- جمع الراسب بعملية طرد مركزي بسرعة 9000 د/د لمدة نصف ساعة، وأذيب في محلول داريْ فوسفاتي ذو تركيز 0.01 مولاري بأس هيدروجيني pH =7.5.

4- أضيف للمحلول حجم مساو من الأسيتون البارد وترك لمدة ساعة واحدة ثم أخضع لعملية طرد مركزي بسرعة 9000 د/د نصف ساعة.

5- أذيب الراسب في محلول داريء فوسفاتي تركيز 0.01 مولاري ذو أس هيدروجيني 7.5.

تقدير تركيز البروتين

أعتمدت طريقة Whitaker وجماعته (13) في تقدير تركيز البروتينات المستخلصة من النباتات بموجب المعادلة الآتية:

$$\text{Conc. of protein (mg/ml)} = \frac{OD_{280} - OD_{235}}{2.51}$$

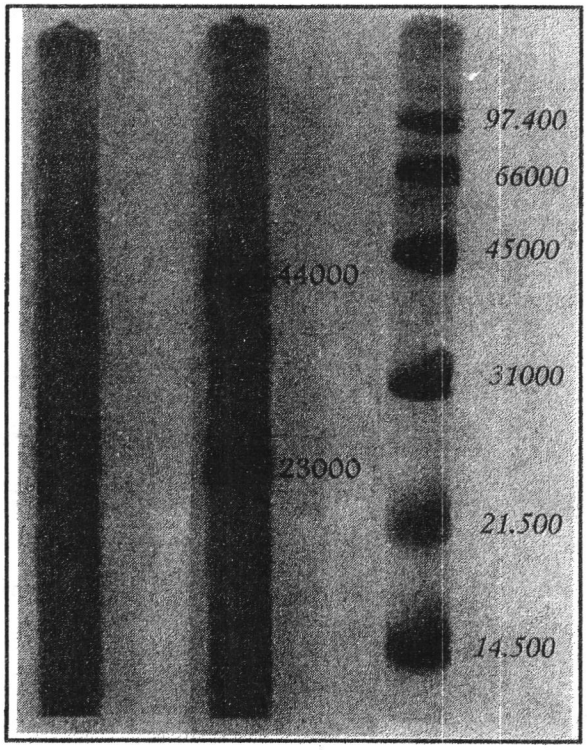
تقدير الوزن الجزيئي للبروتينات القياسية

قدر الوزن الجزيئي للبروتينات القياسية بطريقة الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الأكريل أمايد SDS -Polyacrylamide gel electrophoresis 15% لهلام الفصل Resolution gel و4% لهلام الرص stacking gel. سخنت النماذج عند درجة حرارة 100 م في محلول منظم 0.125 Tris-HCl مولاري يحوي 2% SDS و2%B-mercaptoethanol، 15% Glycerol، 0.05% صبغة Bromophenol. وضعت النماذج على سطح الهلام وأجريت عملية الترحيل عند القوة 100V لمدة 5 ساعات. غطس الهلام في محلول صبغة الكوماسي الزرقاء 0.25% في مزيج من 5 أحجام ميثانول، 5 أحجام ماء مقطر وحجم واحد حامض الخليك لمدة 10 دقائق. أزيلت الصبغة بتغطيس الهلام في محلول يتكون من 10% حامض الخليك و5% ميثانول عند درجة حرارة 37 م مع الرج الخفيف للإسراع من عملية إزالة الصبغة.

النتائج والمناقشة

أظهرت النتائج بأن تركيز البروتينات في معاملة المقارنة بلغ 186.3 مايكروغرام/مل في حين أظهرت نتائج تركيز البروتينات المستخلصة من نباتات الطماطة المرشوشة بحامض السالسلك بلغ 197.8 مايكروغرام/مل وهذا يدل على ظهور بروتينات جديدة لم تكن موجودة في معاملة المقارنة وللتأكد من هذا الإفتراض أظهر تحليل مستخلص بروتينات نباتات طماطة سليمة في هلام متعدد الاكريل امايد SDS-Pplyacrylamide gel electrophoresis 15% ظهور حزمتان بروتينيان جديدتان غير موجودة في مستخلص بروتينات نباتات تبغ سليمة وغير معاملة و قدرت

أوزانها الجزيئية 35,20.4 كيلو دالتون باستخدام منحنى المعايرة القياسي للبروتينات (Rabbit phosphorylase, Bovine serum albumine, Hen egg white ovalbumine, Bovine carbonic anhydrase, Soybean trypsin inhibitor, Hen egg white lysozyme) ذات الأوزان الجزيئية 97400، 66000، 5400، 31000، 21.500 و14500 دالتون (شكل 1) والتي يعزى لهذه البروتينات المستحدثة انخفاض عدد البقع الموضعية وبصورة معنوية حيث بلغ معدل عدد البقع 7.05 بقعة/ورقة في النباتات المرشوشة في حامض الساليسلك والملقحة بالفيروس وبنسبة تثبيط 61.68% مقارنة مع عدد البقع التنخرية في نباتات التبغ الملقحة بالفايروس وغير المرشوشة بحامض الساليسلك والبالغة 18.4 بقعة/ورقة. أن هذه البروتينات اما أن تكون انزيمات أو بروتينات ذات طبيعة أنزيمية والتي يطلق عليها بالبروتينات ذات العلاقة بالامراضية Pathogenesis Related Protein ويرمز لها (PR-protein). وربما تكون ميكانيكية عمل حامض الساليسلك هو تحفيز جين المقاومة بالنبات (R-gene) التي تعمل على انتاج البروتينات ذات العلاقة بالامراضية التي ذكرت انفاً والتي من الممكن أن تقوم بغلق الفتحات بين الخلايا (Plasmodesmata) واعاقة حركة الفايروسات من خلية الى أخرى وتحديده في منطقة الدخول. ولايُستبعد أن يكون التأثير هو الارتباط بالمستلمات الخلوية على الغشاء البلازمي واعاقة دخول الفايروس للخلية وانعكس ذلك في انخفاض عدد البقع على الاوراق في النباتات الملقحة بالفايروس.



شكل 1: المعايرة القياسي للبروتينات (Rabbit phosphorylase, Bovine serum albumine, Hen egg white ovalbumine, Bovine carbonic anhydrase, Soybean trypsin inhibitor, Hen egg white lysozyme) ذات الأوزان الجزيئية 97400، 66000، 5400، 31000، 21.500 و14500 دالتون.

المصادر

1- Beer, M. (1991). Induced resistance in cucumber plants against pathogens. Plant Disease, 76(10).

2- Buszn, G.H. Kessemeyer and V. Marten (1997). Differntial expression of chitinase in *Vitis vinifera* L. Responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. Plant Physiol, 115:1029-1038.

3- Coa, H.; X. Li and X.N. Dong (1998). Concentrationof broad-spectrum disease resistance by over expression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. Proc. Nat..Acad. Sci-USA., 95:6531-6536.

4- DaRocha, A.; S.T. Ohki and C. Hurruki (1986). Detection of viruses and Mycoplasma like organisms in situ by indirect immunoflorescence microscopy. Phytopathology, 76:864-868.

5- Karlov, Bogulsow; Clownia; K.; Kazimierz, Majewska, Anisska petkowlez, Jozfefa; Szaiawska-Dekundy, Danuta, (1976). Search for coumarin compound fruits and seeds, I-Fruits of the family umbelliferae. Apiaceae. Farm Pol., 34,25-28.

6- Kessman, H.; Staub, E. Hoffman; T. Maetzke; J. Herzog; E. Ward; S. Uknes and J. Ryals. (1994). Induction of systemic acquired resistance in plant by chemicals. Ann. Rev. Phytopathology, 32:439-45.

7- Leeman, M.; F.M. Denouden; J.A. Vaupelt; F.P.M. Dirks and H. Steijl (1996). Iron availability affects induction of systemic resistance to fusarium wilt of radish by *Pseudomonus flourescens*. Phytopathology, 86: 149-155.

8- Mikukka, H. Possingham and V. John (1979). Factor effecting the extraction of intact ribonucleic acid from plant containing interfering phenolic compound. Pant Physiology, 60:543-547.

9- Reunov, A.V.; G.D. Reunova and T.T. Zhilia (1977). Inhibition by kinetin of the multiplication of tobacco mosaic virus in locally infected leaves cof host plant.Iv$_3$. Akad. Nauk. SSSR, Ser. Biol., 4:621-623.

10- Rwyals, J.A.; U.H. Neuenschawander; M.G. Willits; A. Molina; H.Y. Steiner; U.H. M.G. Willits; A. Molina; H.Y. Steiner and M.D. Hunt (1996). Systemic Acquired Rwsistance. Pant cell., 8:1809-1819.

11- Spletzer, M.E. and A.J. Enyedi (1999). Salicylic acid induces resistance to *Alternaria solani* in hydrophonically grown tomato. Phytopathology, 63: 1493-1496.

12- Vidhyasekaran, P. (1997). Fungal pathogenesis in plant and crops molecular biology and host defense mechanisms. Marcel Dekker. USA., 552PP.

13- Whittaker, P.; C.V. Givan and R.M. Leech (1987). Biochemical anatomy of higher plant chloroplast and their synthesis of small molecul. Biol. Rev., 49:409-428.

14- Zehnder, W.G.; J.F. Murphy; E.J. and J.W. Klopper (2001). Application of *Rhizobacteria* for induced resistance. European Journal of Plant pathology, 107:39-50.

IMMUNIZATION TOBACCO PLANTS *Nicotiana tabaccum* AGAINST TOMATO MOSAIC MOSAIC VIRUS (ToMV)

R. R. Al-Ani* R.A. Hammad**

ABSTRACT

This study was carried out for immunization tobacco plants against viral infection by induction a Systemic Acquired Resistance (SAR) by salicylic acid in *Nicotiana tabaccum* var samsun which respond to tomato mosaic virus with local lesion. Ten of tobacco plants were sprayed with salicylic acid at conc. 1 micromole/ml for three days respectively then inoculated by virus after 24 hrs. while other ten tobacco plants were inoculated by virus without spraying by salicylic acid as control treatment. The results have been shown high significant decreasing in average of local lesion it reached to 7.05%L/L while it were 18.4% in control treatment at inhibition percent 61.68%. When mechanical inoculated every 24 hrs. it have not be shown any infected by virus up to 12 days ELISA test were depended in detected the infection. The results which were obtained refer that the salicylic acid is the main reason for provide a protection for the plants against virus all that periods. The proteins of all tobacco plants were extracted the profile of poly acrylamide gel electrophresis 15% have been shown appearance two protein bands in tobacco plants at M.W. 20.4 , 35 KDa in protein extract of tobacco plants sprayed by salicylic acid while this bands have not be shown in unsprayed tobacco plants by salicylic acid. From obtained results it has been shown that these inductive proteins were mainly responsible for plant resistance against virus which called a Pathogenesis Related Protein (PR-protein).

* Biotech. Rese. Center- Al-Nahrain Univ.- Baghdad, Iraq.
** College of Agric.- Baghdad Univ.-Baghdad, Iraq.