الكشف عن فايروس تجعد واصفرار اوراق الطماطة TYLCV وسلالاته في نباتات الطماطة وتحديد المدى العائلي له باستخدام تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي PCR

[1] عفاف اركان الجبوري [2] فضل عبد الحسين الفضل

[3] حيدر محمود سماكة

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

[3] كلية الطب البيطري - جامعة الكوفة - العراق

المستخلص

أجريت هذه الدراسة بهدف تشخيص و تحديد المدى العائلي ومصدر الاصابة الاولية لفايروس تجعد واصفرار اوراق الطماطة Tomato yellow leaf curl virus من النباتات الاقتصادية ونباتات الادغال المتواجدة في مزارع الطماطة بالمنطقة الصحراوية في محافظة النجف الاشرف باستخدام تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي (Polymerase chain reaction , PCR) فضلا عن كشف سلالات الفايروس التي تصيب نباتات الطماطة في المنطقة ذاتها جمعت عينات من اوراق نباتات الطماطة التي تظهر عليها اعراض تجعد والتفاف الاوراق وتقزم النباتات وتشوهها مع ظهور اصفرار على حواف الاوراق وبين العروق ، من الهجن المتداول زراعتها محليا في المنطقة وهي علا واسيل وشرين وابوالكف . اظهرت نتائج اختبارتفاعل البلمرة التسلسلي PCR للكشف عن الفايروس TYLCV في نباتات الطماطة وجود سلالتين للفايروس هما سلالة الارض المحتلة TYLCV-IS والسلالة العادية TYLCV-mld في الهجين المحلي شرين والذي اعطى اختبار PCR له حزمتين هي (634bp) TYLCV-IS و (316bp) TYLCV-mld على التوالي ، واعطت بقية الهجن المختبرة حزمة واحدة بحدود (634bp) التي تمثل سلالة الارض المحتلة TYLCV-IS .

اظهر اختبار PCR للنباتات الاقتصادية المستخدمة في الدراسة وهي الباذنجان والبطيخ والخيار والسمسم والفلفل واللوبيا وجود سلالة الارض المحتلة فيها حيث اعطت حزمة قدرها (634bp) بينما اظهر اختبار نباتات الادغال التي تم استخدامها في الدراسة وجود سلالة الارض المحتلة في كل من الخباز والرغيلة النوع Chenopodium murale و Chenopodium quinoa حيث اعطت حزمة قدرها (634bp) .اما نباتي ام الحليب والاتربلكس فلم يعطي اختبارهما اي حزمة للحامض النووي الفايروسي DNA .

الكلمات المفتاحية :- فايروس TYLCV ، تقنية PCR، المدى العائلي .

* البحث جزء من رسالة ماجستير للباحث الأول

Detection of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) and its strains on Tomato plants and host rang determine by Polymerase Chain Reaction

[1]Al- Jubouri A.A. [2] Al- Fadhal F. A. [3] Samaka H. M.

1,2 Department of plant protection - Faculty of Agriculture University of Kufa - Iraq

3 Faculty of Veterinary Medicine University of Kufa - Iraq

Abstract

This study was conducted to identify , determine the host rang, detection of virus strains and find out the source of initial infection of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) on tomato Solanum lycopersicom L. ,weeds and other economic crops planted closed to tomato fields in the desert region of Najaf province by polymerase chain reaction (PCR) technique. Samples of tomato leaves showed curling , rolling, stunting and yellowing symptoms were collected from the hybrids Aula,Aseel ,Shreen and Abu- alkaf . PCR results showed that tomato plants have two strains of TYLCV which were occupied area strain (Palestine) TYLCV-IS and normal strain TYLCV-mld in Sheen hybrid, by amplifying two DNA bands with sizes of 634bp and 316bp respectively , where the other TYLCV -infected hybrids were given a 634bp DNA band , in addition PCR results showed that the economic plants used in this study Eggplant (Solanum melongen L.) , Melon (Cucumis melo L.) , Cucumber (Cucumis sativus L.) , Sesame (Sesamum indicum L.) and Cowpea (Vigna sinensis L.) and Weeds plants Small flowered mallow (Malva parviflora L.) , Wall goosefoot (Chenopodium murale L.),and Kinoa (Chenopodium quinoa Willd.) , gave positive results with TYLCV-IS strain by amplifying a 634bp – DNA band representing the occupied area strain. While Common sow thistle (Sonchus oleraceus L.) and Pop saltbush (Atriplex holocarpa F- muell.), gave negative result by PCR test.

Keywords : TYLCV virus , PCR technique , Host Range

*Part of M.Sc thesis of first author

المقدمة

يعد مرض تجعد واصفرار أوراق الطماطة واحدا من الإمراض النباتية الأكثر ضررا في العالم . يتسبب المرض بواسطة فايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطة TYLCV التابع للجنس Begomoviruses والعائلة Geminiviridae ، تتميز فايروسات هذه العائلة بامتلاكها تركيباً وراثياً يتكون من حامض نووي DNA دائري مفرد الشريط مغلف بجزيئات ثنائية Geminate متعددة الأوجه Icosahedral partical ومنها اشتق اسمها (16) .

أن الفايروس TYLCV يظهر في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية مسببا أمراضاً شديدةً في المحاصيل المهمة اقتصاديا بضمنها الطماطة وبخسائر تصل إلى 100% في الإنتاج تنقل هذه الفايروسات بوساطة الذبابة البيضاء Bemisia tabaci التابعة للعائلة Alyrodidae (16) . يعد الجنس Begomovirus هو المجموعة الأكبر من العائلة Geminiviridae ، وقد دونت سنة 2008 قائمة بأنواع الفايروسات التوأمية Geminiviruses شملت 672 عزلة موصوفة من Begomoviruses ، منها 200 سجلت كمسببات مرضية للطماطة (14) .

إن المدى العائلي للفايروس يبلغ 10 أنواع نباتية تعود لـ 3 عوائل نباتية مختلفة يمكن أن تصاب بالفايروس بعد إجراء عدوى صناعية بالفايروس لـ 40 نوع تعود إلى 9 عوائل بضمنها أنواع من الطماطة التابع للجنس Lycopersicon وهي (L. esculentum) ، (L. hirsutum) ، (L. peruvianum) و (L. pimpinellifolium) إضافة إلى نبات الداتورة (Datura stramonium) والتبغ البري (Nicotiana glutinosa) و (N. tabacum cv. Samsun) و الفاصوليا (Phaseolus vulgaris) (11) .

سبب الفايروس TYLCV ضرراً شديداً على الفاصوليا Phaseolus vulgaris و الفلفل Capsicum annuum والتبغ N. benthamiana و الطماطة Solanum lycopersicum L. (22).

أما الأدغال مثل الداتورة و الحلبلاب Cynanchum acutum فتظهر أعراض واضحة بينما نباتات الخباز Malva Parviflora هي حاملات للفايروس بدون ظهور الإعراض (16) . وظهرت أعراض التجعد والتشوه على الأوراق يرافقها تقزم شديد واصفرار عند العدوى بالفايروس لنباتات D. Stramouium , N. tabacum cv. Samsun و N. glutinosa و Phaseolus vulgaris var. Battle، كذلك سبب تحزم العروق Vein clearing على أوراق نبات عنيب الذيب solanum nigrum (7) . وأوضحت دراسة أخرى أن عزلة الفايروس TYLCV- Eg تصيب أنواعاً نباتية مختلفة تابعة للعائلات Cucurbitaceae و Fabaceae و Chenopodiaceae من جانب أخر لا تظهر أعراض على العوائل Compositae و Graminaceae (10).

أصبح تحليل تسلسل الحامض النووي (Nucleic acid sequence analysis) هو الاختيار الأفضل في التشخيص الأكثر دقة للفايروس، فضلاً عن تقدير علاقته مع عزلات الفايروس TYLCV الأخرى ، كما استعملت مقارنات التسلسل Comparisons of the Sequence للمواد الوراثية genomes Geminiviral والجينات ونواتج ألجين Gene products لرسم الأشجار الوراثية Phylogenetic trees ، أظهرت هذه الاختبارات أن الفايروسات

التوأمية Geminiviruses المنقولة بالذباب الأبيض للعالم القديم والعالم الحديث تتكون من مجموعتين مميزة من بينها فايروسات TYLCVS التي وضعت في مجاميع طبقا للتوزيع الجغرافي شاملة عزلات لحوض البحر المتوسط والشرق الأوسط وجنوب شرق آسيا ، وافترضت مقارنات التسلسل أيضا أن اسم TYLCV ربما يغطي أنواعا من الفايروسات المختلفة مثل TYLCV-ITA وTYLCV - THA وغيرها (13). لذا هدفت الدراسة الى تحديد سلالات الفايروس TYLCV المنتشرة في مزارع الطماطة بالمنطقة الصحراوية في محافظة النجف الاشرف، باستخدام تقنية (PCR). وتحديد العوائل الثانوية للفايروس TYLCV في حقول الطماطة سواء كانت نباتات اقتصادية أم ادغال منتشرة في نفس الحقول اوالحقول المجاورة وتحديد اهميتها كمصدر للاصابة الفايروسية.

المواد وطرائق العمل

- مصدر الفايروس:-

جمعت عينات من أوراق طماطة ظهرت عليها أعراض الاصابة بفايروس TYLCV من تجعد الاوراق واصفرارها بصورة واضحة كما في الشكل (1) خلال زيارات ميدانية لمزارع الطماطة في المنطقة الصحراوية لمحافظة النجف الاشرف في الموسم الخريفي لسنة 2013 - 2014بالاضافة الى نباتات اقتصادية اخرى مزروعة مع الطماطة ونباتات الادغال المتواجدة في تلك الحقول .

وضعت النماذج في أكياس نايلون مسجل عليها منطقة وتاريخ الجمع واسم الصنف . نقلت النماذج لمختبر الدراسات العليا في كلية الطب البيطري – جامعة الكوفة و حفظت النماذج في المجمدة على درجة حرارة –20 م^0 لحين أجراء الاختبارات اللاحقة عليها . لغرض دراسة المدى العائلي للفايروس TYLCV استخدم عدد من النباتات وكما مثبت في الجدول التالي :

النباتات المستخدمة في تشخيص فايروس TYLCV باستخدام تقنية PCR

الاسم العربي	الاسم الانكليزي	الاسم العلمي	العائلة
الطماطة	Tomato	Solanum lycopersicom L.	Solanaceae
الباذنجان	Egg plant	Solanum melongen L.	Solanaceae
الفلفل	Pepper	Capsicum annuum L.	Solanaceae
الرغيلة	Wall goosefoot	Chenopodium murale L.	Chenopodiaceae
الرغيلة	Kinoa	Chenopodium quinoa Willd.	Chenopodiaceae
الخيار	Cucumber	Cucumis sativus L.	Cucurbitaceae
البطيخ	Melon	Cucumis melo L.	Cucurbitaceae
ام الحليب	Common sow thistle	Sonchus oleraceus L.	Compositae
اللوبيا	Cowpea	Vigna sinensis L.	Fabaceae

الخباز	Small flowered mallow	Malva parviflora L.	Malavceae
السمسم	Sesame	Sesamum indicum L.	Pedaliceae
اتربلكس	Pop saltbush	Atriplex holocarpa F-muell.	Chenopodiaceae

و استخدم عدد من هجن الطماطة والتي تزرع باستمرار من قبل الفلاحين والمزارعين في محافظة النجف الاشرف في الدراسة للكشف عن الفايروس TYLCV كما في الجدول الاتي .

هجن الطماطة المختبرة بتقنية الـ PCR

ت	الهجين	منطقة الجمع	تأريخ الجمع
1	شرين	مزارع الطماطة في المنطقة الصحراوية في النجف الاشرف	2013-9-16
2	علا		2013-9-27
3	اسيل		2013 -9-27
4	ابو الكف		2013 -9-27

(أ)

(ب)

شكل (1)

أ- يوضح اعراض فايروس تجعد واصفرار اوراق الطماطة على نبات الطماطة

ب- نبات طماطة سليم

-اســتخلاص الحــامض النــووي DNA:-
اجريــت عمليــة اســتخلاص الحــامض النــووي الفايروسـي لاسـتخدامه فـي الدراسـة وفـق طريقـة Potter (23) مع بعض التغييرات البسيطة والتـي تتلخص بالآتي:-

1- اخذ 5 ملغم من نسيج ورقة النبات .

2- اضــيف اليهــا 1 مــل مــن محلــول الاستخلاص المكون من [50 ملـي مـول EDTA و 100ملـي مـول HCL - Tris و 500 ملـي مــول NaCl و 10 ملــي مــول ß- mercaptoethanol]

3- سـحقت جيـدا بوسـاطة الجفنـة الخزفيـة وبعد سحقها وضعت في انبوب زجاجي سعة (10) مل وحضنت بالحمام المائي بدرجة حرارة 65 م^0 لمدة 10 دقائق .

4- اخرجت الانابيب من الحمام المائي و اضيف لمحلول العينة حجم مساو لها من محلول (فينول /كلوروفورم/ايزواميل الكحول) .

5- وضعت الانابيب على الثلج لمدة 10 دقائق ثم اجري لها طرد مركزي بسرعة 6000 دورة / دقيقة لمدة 30 دقيقة .

6- اخذ الجزء الطافي واضيف لـه محلول خـلات البوتاسـيوم (5 مـولاري) بنسـبة 5/1 مـن حجم العينة ثم اضيف حجم مساو من ايزوبروبانول وحضنت الانابيب في درجة حرارة - 20 لمدة 10 دقائق .

7- بعد عشر دقائق اجريت عملية طرد مركزي للعينات بسرعة 10000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق ومن ثم اهمل الطافي .

8- اخذ الراسب واضيف اليه 1 مل من الايثانول لكل انبوبة واجريت لـه عملية انتباذ مرة بـنفس السـرعة والفتـرة الزمنيـة المـذكورة اعـلاه للتخلص من الايثانول .

9- اضيف لكل عينة 0.7 من TE Buffer.

10- رجـت الانابيـب جيـدا لاذابـة DNA وحفظت في الثلاجة لمدة 24 ساعة لضمان ذوبان الـ DNA كاملا قبل نقله للمجمدة وتجميده لحين الاستعمال .

- تشخيص الفايروس TYLCV بتقنية الـ PCR :-

اسـتخدم اختبـار PCR للكشـف عـن وجـود الحـامض النـووي DNA للفـايروس TYLCVفي النباتات المصابة ، باستخدام بادءات محـددة (specific primer) الفـايروس قيـد الدراســة ، اســتعملت مستخلصــات DNA كقالب Template للتضخيم وتم الحصول على البادئات تجارياً من شركة Biocont الكندية .

- استخدام بادئ الحامض النووي DNA لسلالات الفايروس TYLCV:- استخدم في الدراسة عدد من البوادئ (Primers) لاتمام التفاعل وكانت حسب ما مشار لها في الجدول الاتي :-

Primer	Sequence (5'-3')	المصدر
T Y Al m v 2516	TTTTATTTGTTGGTGTTTGTAGTTGAAG	9
TYAlmc115	ATATTGATGGTTTTTTCAAAACTTAGAAG	
TYv2337	ACGTAGGTCTTGACATCTGTTGAGCTC	
TYc138	AAGTGGGTCCCACATATTGCAAGAC	
TYv2664	ATTGACCAAGATTTTTACACTTATCCC	

تم التشخيص باستخدام (KAPA3G Plant PCR Kit) انتاج شركة (KAPA) من جنوب افريقيا والتي استخدمت باتباع تعليمات الشركة المصنعة والمبين ة في الجدول الاتي :-

Plant PCR buffer –contains MgCl2 and dNTPs	µ25
Primers	1.5 µ x 5
Plant PCR Polymerase	µ2
Tamplet (purified DNA)	µ5
Plant PCR Enhancer	µ0.5
MgCl2	µ 5
PCR grade water	µ5

تضخيم الحامض النووي :-اجري برنامج لتضخيم الحامض النووي DNA وذلك حسب الطريقة المذكورة من قبل الشركة KAPA والمعتمدة من قبلها وحسب ما مذكور في الجدول الاتي:-

المراحل	درجة الحرارة م^0	الفترة الزمنية	عدد الدورات
Initial denaturation	95	10 دقائق	1
Denaturation	95	30 ثانية	49
Annealing	63	20 ثانية	
Extension	72	30 ثانية	
Final extension	72	30 ثانية	
Hold	4	5 دقيقة	

-الترحيل الكهربائي Electrophoresis :-اجريت عملية ترحيل الحامض النووي الفايروسي المضاعف بوساطة الـ PCR بعد تحضير طبقة الجل (agarose gel) وتحميل عينات الـ DNA المضاعفة وكما هو موصوف ادناه :-

1- تحضير الاكاروز جل (Agarose gel) :-

أ. وزن0.7 غم من الاكاروز وأضيف إلى 50 مل من دارئ 1XTBE .

ب. سخن المحلول في فرن كهربائي لحين ذوبان الاكاروز.

ت . ترك المحلول يبرد بدرجة حرارة الغرفة إلى (40 – 50) م°.

ث . بعد انخفاض درجة حرارة المحلول الى (40-50 م^0) أضيف إلى المحلول 5 مايكروليتر من صبغة Ethidium bromide .

2- مرحلة صب الاكاروز Casting of agarose gel :

أ. جهز القالب الخاص بتحضير طبقة الجل ووضع المشط (comb) في إحدى نهايته لعمل حفر داخل الاكاروز .

ب. صب محلول الاكاروز والمحضر في الخطوة (1) وترك ليتصلب بدرجة حرارة الغرفة .

ت . بعد أكمال تصلب الاكاروز ، رفع المشط بحذر وغطيت طبقة الجل بمحلول TBE 1X (300مل) .

3- مرحلة الإضافات والترحيل Loading and running DNA in agarose gel

أ- أضيف 5 مايكروليتر من الـ DNA إلى حفر الاكاروز

ب- أوصلت أقطاب الجهاز بالتيار الكهربائي بحيث يكون الـ DNA قريباً من القطب السالب وشغل مجهز الطاقة على 75 فولت لمدة 75 دقيقة إلى أن تم ملاحظة تحرك الصبغة إلى نهاية الاكاروز .

ت-أخيراً فحص الجل تحت الأشعة فوق البنفسجية لملاحظة وجود حزم الحامض النووي الـ DNA المضاعف وبعدها اخذت الصور .

النتائج والمناقشة

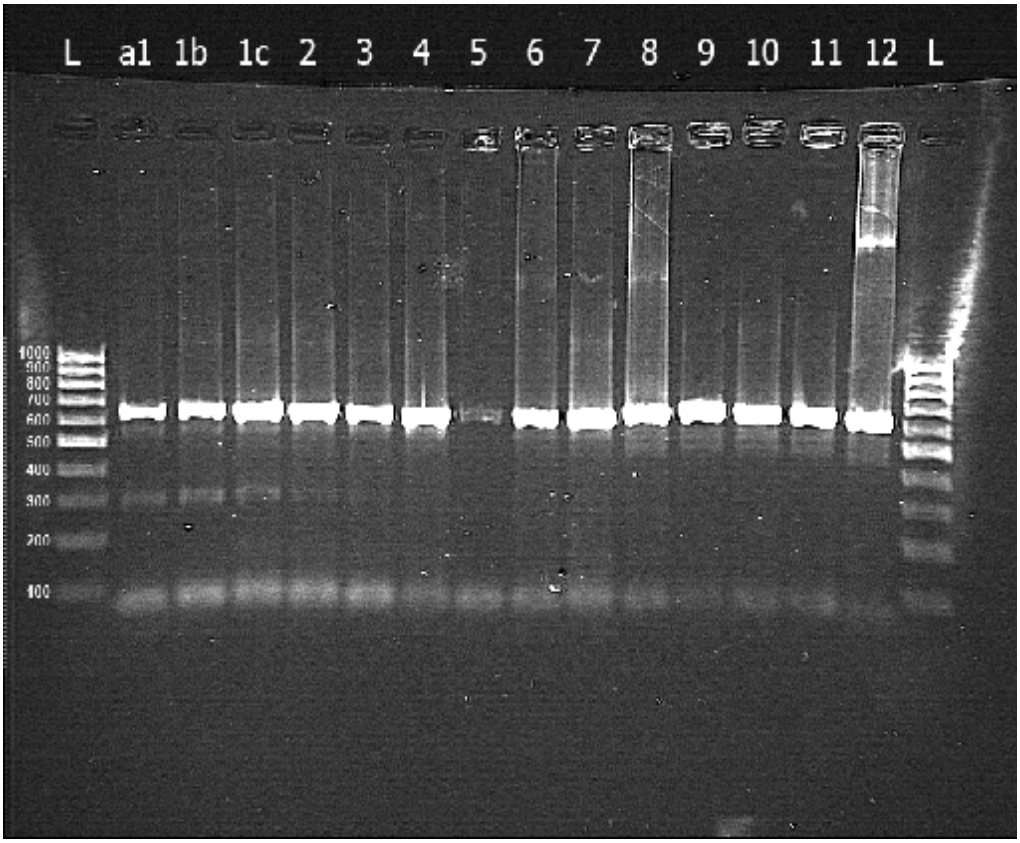
-استخلاص الحامض النووي DNA :-

اظهرت تجربة الاستخلاص للحامض النووي DNA والذي تم ترحيله باستعمال تقنية الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز ظهور حزم واضحة Bands بعد تعريض الهلام للاشعة فوق البنفسجية وهذا يؤكد وجود الحامض النووي DNA في العينات المفحوصة.

-كشف الحامض النووي الفايروسي في عينات الطماطة المختبرة :-

بينت نتائج الكشف عن الحامض النووي الفايروسي DNA في عينات الطماطة المختبرة ظهور الحزم Bands المتوقعة وبحدود (634bp)والتي تمثل سلالة الارض المحتلة TYLCV-IS و(316bp) وهي السلالة العادية TYLCV-mld

وكانت هذه النتائج لعدة اصناف من الطماطة حيث اختبرت اربعة اصناف متداول زراعتها في محافظة النجف الاشرف من حيث حساسيتها للاصابة بفايروس TYLCV وقد اعطت الاصناف المتداول زراعتها محليا من الهجن علا وابو الكف واسيل الحزمة (634bp) و اعطى الصنف شرين حزمتين (634bp) و(316bp) وهذه النتائج تتفق مع ما وجده Anfoka واخران (9).الذي ذكر ان السلالة العادية عند تشخيصها باستخدام تقنية الـ PCR اعطت حزمة بحدود (316bp) وسلالة الارض المحتلة اعطت حزمة بحدود (634bp) وتتفق هذه النتيجة مع ما وجده المولى (2) من وجود الحزم في الاصناف علا واسيل وهذا يدل على حساسية هذين الصنفين للاصابة ووجود فايروس TYLCV فيها ولكن تختلف في حدود الحزمة اذ كانت الحزمة بحدود (400bp) وذلك لكونه عمل على عزلة جديدة من هذا الفايروس وحدد حزمتها بـ (400bp) والتي اختلفت عن باقي سلالات الفايروس وسميت TYLCV- Bas البصرة .



شكل (2) يوضح ظهور حزم الحامض النووي للفايروس TYLCV في هجن الطماطة عند الكشف عن الفايروس TYLCV باستخدام اختبار PCR

L: DNA Ladder 1000bp.

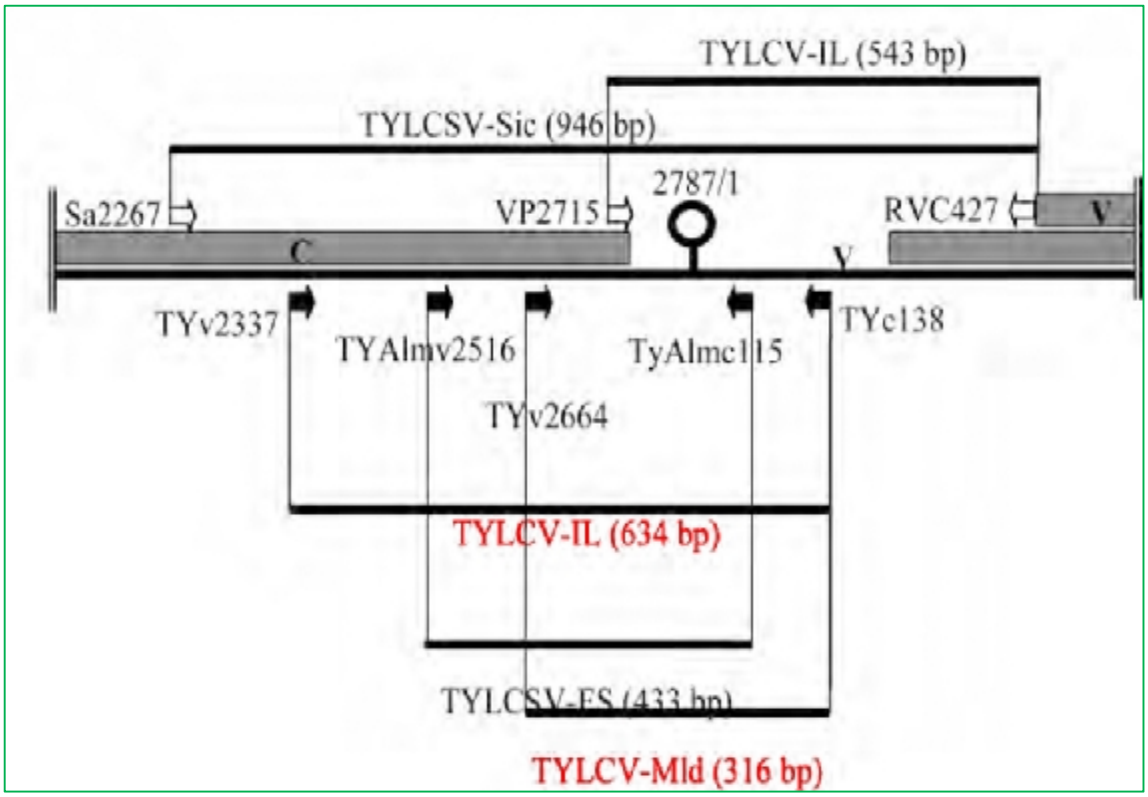
Lanes 1a, 1b, 1c, 2, 3:- Shreen.

Lanes 4, 5, 6:- Aseel.

Lanes 7, 8, 9:- Abu alkaf.

Lanes 10, 11, 12:- Aula .

وهذه النتائج تدل على وجود الفايروس TYLCV على محصول الطماطة في محافظة النجف الاشرف وفي معظم مناطق زراعته وان الإصابة به شديدة الى متوسطة ، إذ ظهر من خلال المشاهدات الميدانية تقزم النبات الشديد وصغر حجم الأوراق وتبرقشها وانحناء حافاتها وصغر حجم الثمار إن وجدت ويتفق هذا مع ما ذكره Glick وآخرون (16) .



شكل (3) الشجرة الوراثية لفايروس تجعد واصفرار اوراق الطماطة حسب ماذكرها Anfoka وآخرون(8)

كشف الحامض النووي الفايروسي في النباتات الاقتصادية وبعض الادغال النامية في مزارع الطماطة

1. نبات ام الحليب (Sonchus oleraceus L.)

لـم يظهـر اختبـار PCR اي حزمـة للحـامض النووي الفايروسي DNA وهذا يتفق مع ما ذكره شفيق (6) Lapidot وPolston (18)

و الوائلي (3) و المولى (2) الذين اجمعوا على عدم استجابة هذا النبات للعدوى بالفايروس اذا لم تكن هناك اصابة فهذا يعني عدم وجود اعراض مرضية

2. نبات الباذنجان (Solanum melongena L.)

اعطى اختبار PCR لهذا النبات حزمة بحدود (634bp) ولكلا العينتين لنبات الباذنجان حيث تؤكد هذه النتيجة وجود سلالة الارض المحتلة TYLCV-IS في العينتين المختبرتين وهذه النتيجة لا تتفق مع ما وجده كل من

crespi واخرون (12) و Lapidot وPolston(18) وخلف واخرون (5) و المولى (2) الذين اثبتوا عدم استجابة نبات الباذنجان للاصابة بالفايروس، ان الاختلاف بين النتيجتين اعلاه قد يعود الى ان النبات كان حاملا للفايروس بدون ظهور اعراض مرضية واضحة وعند

استخدام اختبار PCR امكن من الكشف عن وجود سلالة الارض المحتلة للفايروس فيه ضمن هذه التجربة .مع عدم استجابته بظهور اعراض في تجارب الباحثين الاخرين عند اجراء العدوى وهذا يعلل سبب الاختلاف في النتيجتين لدقة وحساسية اختبار PCR .

3. نبات البطيخ (Cucumis melo L.)

اظهر اختبار PCR وجود سلالة الارض المحتلة (634bp) على نبات البطيخ وهذا يؤكد ان النبات حامل للفايروس مع وجود اعراض الاصفرار عليه وهذا يتفق مع ما وجده Zaher (24) الذي اشار الى ظهور اعراض اصفرار واضحة على نبات البطيخ بسبب الاصابة بفايروس TYLCV و لا تتفق هذه النتيجة مع crespi واخرون (12) حيث اشاروا الى عدم ظهور اعراض على نبات البطيخ عند اجراء اختبار النقل بالفايروس له .قد يعود السبب الى اصناف نبات البطيخ واختلاف درجة تحملها للفايروس بحيث تم الكشف عن وجوده فيها وظهور اعراض الاصفرار في الصنف الحساس مع عدم ظهور هذه الاعراض في الصنف الاخر المتحمل للاصابة .

4. نبات الخيار (Cucumis sativus L.)

اظهر الاختبار وجود حزمة بحدود 634bp مضاعفة من سلالة الارض المحتلة في هذا النبات وهذا يدل على ان النبات حامل للفايروس مع عدم وجود اعراض ظاهرة على النبات الذي اخذت منه العينة وهذا يتفق مع ما وجده الفضل (1) حيث اشار الى عدم ظهور اعراض واضحة على نبات الخيار على الرغم من حصوله على اختبار موجب في فحص اليزا وتتفق هذه النتيجة ايضا مع crespi واخرون (12) Lapidot وPolston (18) حمد (4) والمولى (2).الذين لاحظوا عدم ظهور اعراض مرضية على نباتات الخيار الملقحة صناعيا بالفايروس الا انهم لم يستخدموا اختبارات اخرى للكشف عن كون النبات حامل للفايروس ام لا.

5. نبات الخباز .(Malva parviflora L)

بينت النتائج وجود سلالة الارض المحتلة للفايروس وذلك بظهور حزمة من DNA بحجم 634bp وهذا يتفق مع

French و Henson (16) حيث اشار الى ان النبات حامل للفايروس دون ظهور اعراض وكذلك مع (21) و(15) حيث اشاروا الى ان الفايروس يصيب نبات الخباز تجريبيا عند عمل عدوى رجعية منه .

6. نبـــــــــــــات الرغيلـــــــــــــة

Chenopodium quinoa Willd

Chenopodium murale L.

اوضح اختبار PCR ان هذا الجنس بنوعيه (C. murale، C. quinoa) كان حاملا للفايروس حيث اعطى حزمة قدرها (634bp) التي تمثل سلالة الارض المحتلة مع عدم ظهور اعراض واضحة على هذين النباتين وهذا يتفق مع ما وجده Moghal (20) حمد (4) والمولى (2) من عدم وجود اعراض على نبات الرغيلة المعدى

صناعيا .الا ان استخدام هذا الاختبار كشف ان النبات يحمل جسيمات الفايروس لكن دون ظهور اعراض .

7. نبات السمسم (Sesamum indicum L.)

اظهر الاختبار ان هذا النبات يحمل فايروس TYLCV سلالة الارض المحتلة عن طريق الحصول على حزمة من الحامض النووي المضاعف بحجم 634bp مع عدم وجود اعراض مميزة مرافقة للاصابة بالفايروس ويعتبر هذا الكشف اول تسجيل للفايروس على نبات السمسم حيث اثبتنا ان هذا النبات يحمل جسيمات الفايروس .

8. نبات الفلفل (Capsicum annuum L.)

اثبت الاختبار وجود جسيمات الفايروس في نبات الفلفل اذ اعطى حزمة بحدود (634bp)مع عدم وجود اعراض واضحة على النبات و هذه النتيجة تتفق مع Potter و اخرون (22) حيث اشار الى ان الفايروس يسبب ضرر شديد على الفلفل . كما عزل الفايروس طبيعيا من نبات الفلفل في مصر والسودان (25).

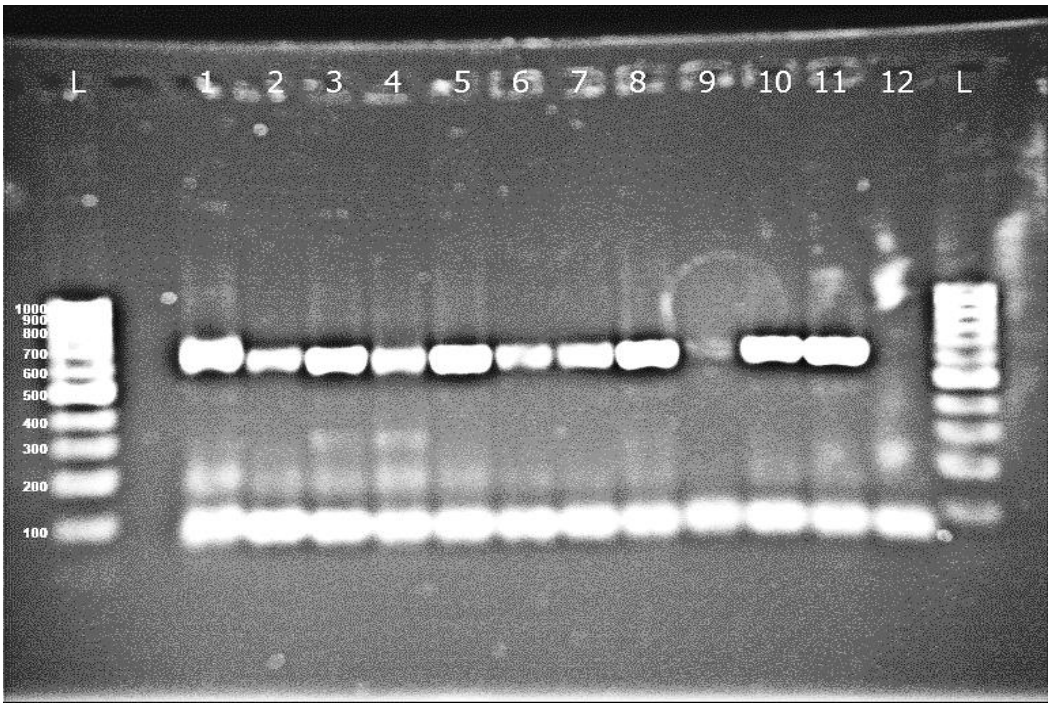
9.نبات اللوبيا Vigna sinensis L.

اظهر اختبار PCR ان نبات اللوبياء كان حامل للفايرس اذ اعطى الاختبار حزمة بحدود (634bp) وهذا لا يتفق مع الفضل (1) حيث اشار الى عدم ظهور اعراض متسببة عن TYLCV على نبات اللوبيا وكذلك كانت نتيجة اختبار اليزا سالبة وقد يرجع هذا الاختلاف في نتيجة الاختبارين PCR و ELISA الى اختلاف الدقة في نتائجهما حيث ان PCRاكثر دقة بسبب تخصصه وموثوقيته1993 (17) .

10. نبات الاتربلكس (Atriplex F-muell holocarpa)

لم تظهر اي حزمة عند فحص العينة المأخوذة من هذا النبات وهذا يدل على انه غير حامل لفايروس TYLCV وتعد هذه النتيجة اول اشارة الى ان هذا النبات غير حامل للفايروس .

اثبتت تجارب الكشف عن الحامض النووي الفايروسي الى احتواء نباتات الطماطة على الفايروس TYLCV ولاكثر من سلالة وان بعض النباتات الاقتصادية كانت حاملة لجسيمات الفايروس بدون ظهور اعراض واضحة عليها كما في نباتات السمسم S. indecum ، الخباز M. parviflora، الفلفل C. annuum ،الرغيلة C. murale، الباذنجان S. melogena ، اللوبياء V. sinensis، الرغيلة C. quinoa ،الخيار C. sativus مع وجود اعراض اصفرار على نبات البطيخ C. melo وهذا يؤشر الى قدرة هذه النباتات لتكون مصدر اصابة اولية لنباتات الطماطة المزروعة قربها مما يؤكد من ضرورة ازالة هذه النباتات او زراعة نباتات الطماطة بمناطق بعيدة عنها ، خوفا من نقل حشرات الذبابة البيضاء للفايروس منها حيث ان نباتات الباذنجان والخيار والبطيخ والسمسم تعتبر عوائل مفضلة غذائيا من قبل حشرة الذبابة البيضاء (19) .



شكل (4) يوضح ظهور حزم الحامض النووي في النباتات الاقتصادية والادغال المختبرة في الكشف عن الفايروس TYLCV باستخدام اختبار PCR

L: DNA Ladder 1000bp.

Lane 1:- Sesamum indecum

Lane 2:- Malva parviflora

Lane 3:- Capsicum annuum

Lane 4:- Chenopodium murale

Lane 5 & 7 :-Solanum melogena

Lane 6:- Vigna unguiculata

Lane 8 :- Chenopodium quinoa

Lane 9:- Sonchus oleraceus

Lane 10:- Cucumis melo

Lane 11:- Cucumis sativus

Lane 12:- Atriplex holocarpa

المصادر

1. الفضـــل، فضـــل عبـــد الحســـين .2012 . الخصـائص البايولوجيـة والمصـلية لفـايروس تجعـد واصـفرار اوراق الطماطـة . مجلـة جامعـة الكوفـة لعلـوم الحيـاة ، 4 (2) :139-145 .
2. المولى، عبد الكريم قاسم جبر.2013 . استخدام الطرائق الحيويـة و الجزيئيـة وتحليل التتـابع الجيني فـي دراسـة فـايروس تجعد واصـفرار أوراق الطماطـة TYLCV فـي العـراق وسـبل مكافحتـه. اطروحـة دكتـوراه. كليـة الزراعة . جامعة البصرة . العراق .
3. الوائلي، مهند عبد الرضا خلف .2006 . دراسة تشخيصـية باسـتخدام طـرق سـيريولوجية وحيويـة لفـايروس تجعـد واصـفرار أوراق الطماطـة وإمكانيـة مكافحـة الناقـل إحيائيـا . رسـالة ماجسـتير ، كليـة الزراعـة ، جامعـة البصرة. العراق
4. حمد، سمير عبد الرزاق حسن .2000 . تـأثير بعض المستخلصات النباتيـة ومنظمـات النمو في فايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطـة . رسـالة ماجسـتير ،كليـة الزراعـة ،جامعـة بغداد . العراق .
5. خلـف ، مهنـد عبـد الرضـا و مثنـى عكيـدي المعاضيدي ومحمد عـامر فيـاض .2011 . اسـتخدام تقـانتي الاختبـارين المنـاعيين (ELISA) و(TBIA) فـي اختبـار حساسـية بعـض اصـناف الطماطـة لفـايروس تجعـد واصـفرار اوراق الطماطـة (TYLCV).مجلة ابحاث البصرة (العلميات) ،7 (4) 145-155 .
6. شفيق ، حسين لطيف .1983 . دراسات على تشخيص ومقاومـة فـايروس تجعد واصـفرار أوراق الطماطـة فـي البيـوت البلاسـتيكية .رسـالة ماجسـتير ،كليـة الزراعـة ،جامعـة بغداد .
7. Al-ani,R.A, Adhab,M.A, Hamad,S .A. 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), pp. 5149-5155.
8. Anfoka, G., M.Abhary, F. Haj Ahmad, A.F. Hussein, A. Rezk, F. Akad, Y. Abou-Jawdah, M. Lapidot, F. Vidavski, M.K. Nakhla, H. Sobh, H. Atamian, L. Cohen, I. Sobol, H. Mazyad, D.P. Maxwell and Czosnek, H. . 2008. Survey of Tomato yellow leaf curl disease-associated viruses in the eastern Mediterranean basin. Journal of Plant Pathology, 90: 313-322.
9. Anfoka G.H.; Abhary M.and Nakhla M.K. . 2005 . Molecular identification of species of the

Tomato yellow leaf curl virus complex in Jordan. Journal of Plant Pathology, 87: 61-66.

10. Asmaa, F. El-Monem,A., El-Dougdoug,K.A., Hamad,I.A. Ahmed,E.A. and Abd El-Kader,H.S. 2011. Identification and molecular characterization of Tomato yellow leaf curl virus - EG .Emir. J. Food Agric., 23 (4): 355-367.
11. Cohen, S., and F. E. Nitzany . 1966 . Transmission and host range of the Tomato yellow leaf curl virus. Phytopathology, 56:1127-1131.
12. Crespi, S., Accotto .GP., Caciagli P.and Gronenborn B.(1991). Use of digoxigenin-labelled probes for detection and host-range studies of Tomato yellow leaf curl geminivirus. Res Virol.1 42(4):283-8.
13. Czosnek, H. and H. Laterrot . 1997. A worldwide survey of Tomato yellow leaf curl viruses. Archives of Virology, 142: 1391-1406.
14. Fauquet, C.M., Briddon R.W., Brown J.K., Moriones E., Stanley J., Zerbini M., Zhou X. 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. Archives of Virology, 153: 783–821
15. Fegla, G. I. ; I. El-Samra ; K. Noaman and H. Younes . 1997. Host range, transmission and serology of an isolate of Tomato yellow leaf curl virus from tomato of plastic houses in northern Egypt. Proceeding of the 1st Scientific Conference of Agricultural Sciences. Faculty of Agriculture Assiut Univ. Egypt .1: 549-568. .
Glick, E.; Levy, Y and Gafni, Y. 2009 . The viral etiology of Tomato yellow leaf curl disease – a review. Plant Protect. Sci., 45: 81–97.
16. Henson, J. M. and R. French . 1993. The polymerase chain reactions and plant disease diagnosis. Annu Rev Phytopathol, 31 81–109.
17. Kato,K.,Onuki,M.,Fuji,S. and Hanada,K. 1998. The first occurrence of Tomato yellow leaf curl virus in tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) in japan. Ann.Phytopathol, Soc. Jpn., 64: 552-559.
18. Lapidot M and J. E. Polston . 2007.Resistance to Tomato

yellow leaf curl virus inTomato. In Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease Edited by: Czosnek H. The Netherlands: Springer;:503-520.

19. Mansour, A. and A. Al-Musa .1992. Tomato yellow leaf curl virus : host range and virus-vector relationships. Plant Pathology, 41: 122-125.

20. Moghal, S. ; T. Al-Zadjali and Al- Zadjali .1993 . Effect of insect proof net and transplanting dates on leaf curl virus in tomato. Pages : 248-251. annual Report of Directorate General of Agricultural Research, Rumias, Sultanate of Oman. Document No. OMAN/AGRI./RES/RPT/93.

21. Morilla, G., Janssen, D., García-Andrés, S., Moriones, E., Cuadrado, I .M., and Bejarano, E. R. .2005. Pepper (Capsicum annuum) is adead-end host for Tomato yellow leaf curl virus. Phytopathology, 95:1089-1097 .

22. Potter J.L., Nakhla M.K., Mejía L and Maxwell, D.P., 2003. PCR and DNA hybridization Methods for Specific Detection of bean-infecting begomoviruses in the Americas and Caribbean Plant Disease, 87: 1205-1212.

23. Samretwanich, K. ; P. Chiemsombat ; K. Kittipakorn and M. Ikegami .2000.. Yellow leaf disease of cantaloupe and wax gourd from Thailand caused by Tomato leaf curl virus. Plant Disease ,84: 707-709.

24. Zaher, N.A. ; M. Shafie ; A. Shalaby and M. Nakhla .1997.. Natural occurrence of Tomato yellow leaf curl virus on datura (Datura stramonium L.) ,Plants in Egypt. Egyptian Journal of Applied Sciences, 12: 31-42.