

الخصائص البايولوجية و المصلية لفايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة Tomato Yellow Leaf (TYLCV) Curl Virus

فضل عبد الحسين الفضل

كلية الزراعة / جامعة الكوفة

المستخلص

اجريت هذه الدراسة بهدف تحديد الخصائص البايولوجية والمصلية لفايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة في البيوت البلاستيكية. جمعت عينات تظهر عليها اعراض تجعد و النفاف الاوراق و تقزم النباتات و تشوهاها مع ظهور اصفرار على حواف الاوراق و بين العروق. درست اعراض الفايروس على نباتات الاختبار التي لقحت بالفايروس بواسطة الذبابة البيضاء *Bemisia tabaci*. اظهرت النتائج ان المدى العائلي للفايروس محدود جدا اقتصر على عدد قليل من العوائل النباتية. استجابت نباتات الداتورة *Datura stramonium* و عناب الذيب *Solanum nigrum* للعدوى بظهور النفاف الاوراق و شفافية العروق و تشوة الاوراق الحديثة بعد 20 يوما من العدوى. استجابت نباتات الزربيج *Chenopodium amaranticolor* و الفاصوليا *Phaseolus vulgaris* و نباتات التبغ البري *Nicotiana glutinosa* للاصابة بدون ظهور اعراض مرئية على النباتات و استدلت على وجود الفايروس فيها بواسطة اختبار اليزا ELISA المصلي و قد تمثلت هذه العوائل مصدرا للفايروس ينقل منها الى نباتات الطماطة بواسطة الذبابة البيضاء. اشارت نتائج الدراسة الى ان الفايروس ينقل بكفاءة من النباتات المصابة الى السليمة بواسطة الذبابة البيضاء و ان حشرة واحدة كانت كافية لنقل الفايروس بنسبة 25% و ازادت النسبة بزيادة اعداد الحشرات على النبات حيث بلغت 100% عند استعمال 10 حشرات/نبات. بلغت اقل مدة لازمة لتغذية حشرة الذبابة البيضاء على النبات المصاب لاكتساب الفايروس 30 دقيقة و نفس المدة للحشرة الحاملة للفايروس على النبات السليم لاحداث العدوى. و بلغت مدة الحضانة للفايروس في جسم الحشرة 24 ساعة. و بزيادة مدة التغذية للحشرة على النبات المصاب و السليم تزيد من كفاءتها على نقل الفايروس.

المقدمة

يعد فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV) من اكثر الفايروسات انتشارا و اهمية في البيوت البلاستيكية و الزجاجية و الحقول المكشوفة في العديد من المناطق المعتدلة في العالم (Markham و اخرون 1994. Czosnek و Laterrot 1997) يعود الفايروس الى الجنس Begomovirus و النوع Geminivirus (Bridson و Markham 1995, Brunt و اخرون 1997). تظهر الاعراض على النباتات المصابة بشكل تقزم شديد للنباتات، النفاف حواف الاوراق نحو الاعلى و الاسفل، اصفرار حواف الاوراق و بين العروق و صغر حجم الاوراق. و يسبب الفايروس خسائر كبيرة في محصول الطماطة قد تصل الى 100% اذا حصلت الاصابة مبكرا (Navas-Castillo و Mariones , 2000, Idris , وأخرون , 2001, Valverde , وأخرون , 2001).

ينقل فايروس تجعد و اصفرار الاوراق الطماطة بكفاءة عالية بواسطة الذبابة البيضاء *Bemisia tabaci* , وان حشرة واحدة تستطيع اكتساب الفايروس و نقله الى نباتات طماطة بطريقة باقية. و وجد ان المدة اللازمة للحشرة على النبات المصاب لاكتساب الفايروس والمدة اللازمة للحشرة الحاملة للفايروس على النبات السليم لاحداث العدوى تتراوح بين 20-30 دقيقة. و تزداد كفاءة الحشرة على النقل بزيادة مدة الاكتساب و العدوى (Bird و Brown , 1992, Ghanem , وأخرون 2001 , Lapidot , وأخرون , 2001, Salati , وأخرون , 2002) و أن مدة حضانة الفايروس في جسم الحشرة تتراوح بين 21-24 ساعة (Mehta , وأخرون 1994).

يمثل فايروس تجعد و اصفرار الاوراق على الطماطة مشكلة كبيرة في البيوت المحمية و في الحقول المكشوفة و يعتبر محدا لزراعة هذا المحصول في العراق. لذا اجريت الدراسة بهدف تحديد المدى العائلي للفايروس و العوائل التي يمكن ان تمثل مصدرا لاصابة الطماطة و تحديد الناقل و طريقة النقل كاحد النقاط الاساسية لتحديد طريقة ملائمة و كفوءة لمقاومته.

المواد و طرائق العمل

- مصدر الفايروس: نقلت نباتات طمطة تظهر عليها اعراض التفاف الاوراق و اصفرار حوافها مع اصفرار بين العروق و صغر حجم الاوراق و تقزم شديد من البيوت البلاستيكية من المنطقة الصحراوية لمحافظة كربلاء الى اصص فخارية تحوي تربة مزيجية. حفظت النباتات في اقفاص خشبية مغطاة بقماش الململ في بيت زجاجي بدرجة حرارة 25-30 م واستعملت مصدرا للفايروس.

- نباتات الاختبار: زرعت بذور طمطة *Lycopersicon esculentum* ، و ورد الدكمة *Gomphrena globosa* ، و الزريبيج *Chenopodium amaranticolor* و الخيار *Cucumis sativus* ، و فول الصويا *Glycin max* ، و الفاصوليا *Phaseolus vulgaris* ، و اللوبيا *Vigna unguiculata* ، و المنطاد *Physalis floridana* ، و الفلفل *Capsicum annum* ، و الداتورة *Datura stramonium* ، و عناب الذيب *Solanum nigrum* ، و الباذنجان *Solanum melongena* ، و التبغ البري *Nicotiana glutinosa* ، في اصص فخارية قطر 30سم . اعدت النباتات في مرحلة 3-4 اوراق بواسطة الذبابة البيضاء *B. tabaci*.

- نقل الفايروس: جمعت اعداد من الذبابة لبيضاء من نباتات باذنجان بواسطة شافطة، نقلت الحشرات الى نباتات قطن في اقفاص خشبية 1×1×1م محاطة بقماش ململ لتربيتها. نقلت اعداد من الذبابة البيضاء الخالية من الفايروس الى نباتات مصابة و تركت تتغذى مدة 24 ساعة لاكتساب الفايروس. نقلت الحشرات الحاملة للفايروس الى نباتات طمطة سليمة بواسطة اقفاص ورقية (leaf cages) . تركت الحشرات تتغذى على النبات السليم مدة 24 ساعة (10 حشرة/ نبات) ثم رشت بمبيد حشري لابادتها.

- تقدير اقل مدة لازمة للحشرة على النبات المصاب لاكتساب الفايروس:

وضعت اعداد من الذبابة البيضاء غير حاملة للفايروس على نباتات طمطة مصابة و تركت تتغذى للمدد 15، 20، 30، 35، 40 دقيقة. نقلت الحشرات بعد كل فترة الى نباتات سليمة و تركت تتغذى مدة 48 ساعة ثم رشت بمبيد حشري لابادتها. وضعت النباتات في اقفاص خشبية محمية من الحشرات في البيت الزجاجي.

تقدير اقل مدة لازمة للحشرة الحاملة للفايروس على النبات السليم لاحداث العدوى :

وضعت اعداد من الذبابة البيضاء غير حاملة للفايروس على نباتات طمطة مصابة و تركت تتغذى مدة 24 ساعة . نقلت الحشرات الحاملة للفايروس الى نباتات طمطة سليمة و تركت تتغذى للمدد 15 ، 20 ، 25 ، 30 ، 35 ، 40 دقيقة . رشت النباتات بعد كل فترة بمبيد حشري لابادة الحشرات . وضعت النباتات في صناديق خشبية محمية من الحشرات في البيت الزجاجي .

- تقدير مدة حضانة الفايروس في جسم حشرة الذبابة البيضاء:

وضعت اعداد من حشرة الذبابة البيضاء على نباتات طمطة مصابة مدة ساعة لاكتساب الفايروس. نقلت الحشرات الحاملة للفايروس الى نباتات طمطة سليمة للمدد 16، 18، 20، 22 و 24 ساعة ثم رشت النباتات بعد كل مدة تغذية بمبيد حشري. وضعت النباتات في اقفاص محمية من الحشرات في البيت الزجاجي. جرت متابعة وجود الفايروس في النباتات عن طريق متابعة الاعراض ومن ثم تأكيد ذلك بواسطة الاختبار المصلي المسمى :

Double Antibody Sandwiche –Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Das - ELISA)

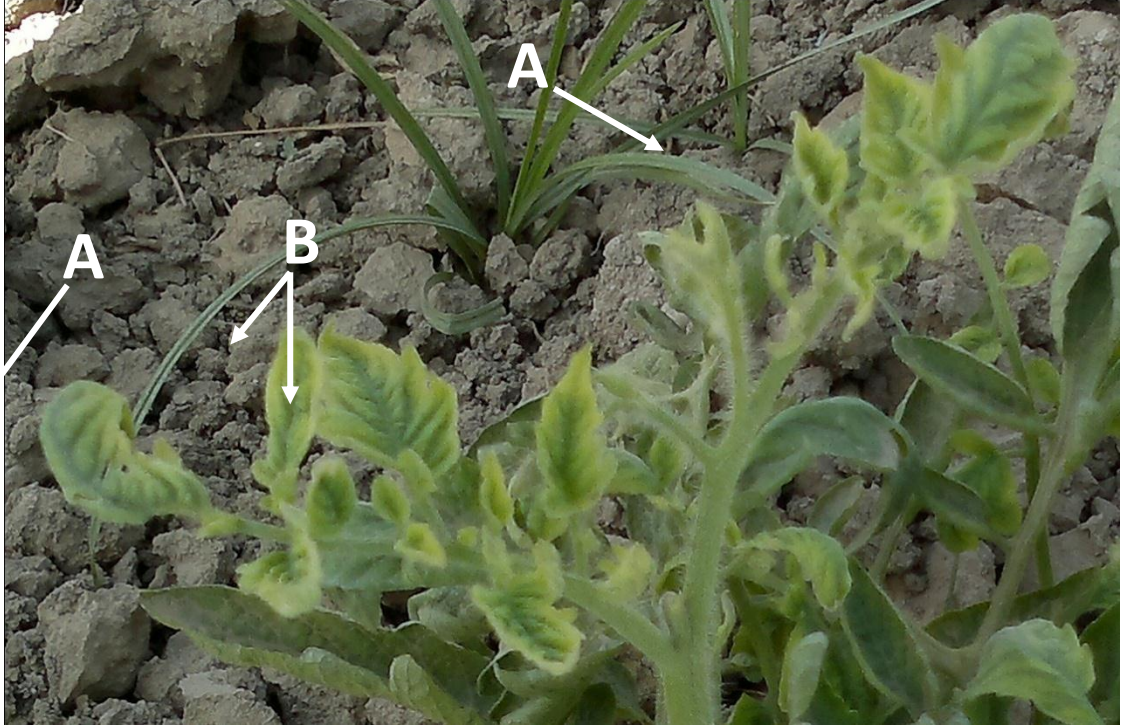
اخذت اوراق حديثة من النباتات المعدة و سحقت في محلول داريء فوسفاتي ملحي(10 ملي مولاري Na₂HPO₄ ، 140 ملي مولاري NaCl (PH7) ، مضافا اليه 0.05 % (Tween - 20) (PBST)(بنسبة 1 غم اوراق : 10 مل داريء). مرر المستخلص من خلال طبقتين من قماش الململ و استعمل الراشح في الاختبار. اضيف 200 مايكرو لتر من الراشح الى كل حفرة من حفر طبق المعايرة الدقيقة المعاملة مسبقا بالاجسام الضادة للفايروس (TYLCV). و ترك الطبق بدرجة حرارة 4 م ليلة كاملة. غسلت حفر الطبق جيدا بمحلول PBST و اضيف لكل حفرة 200 مايكرو لتر من معقد الاجسام المضادة-انزيم (الفوسفاتيز القاعدي alkaline-phosphatase) و ترك التفاعل بدرجة 37 م مدة 4 ساعات. غسلت حفر الطبق جيدا كالمسابق و اضيف لكل حفرة مادة (substrate) (PVP) (P.nitrophenyl phosphate في محلول الداريء diethanolamine و حضنت الاطباق بدرجة حرارة المختبر مدة ساعتين. قدر أمتصاص تفاعل substrate buffer (0.5 ملغم/مل) (PH 8-9) و حضنت الاطباق بدرجة حرارة المختبر مدة ساعتين. قدر أمتصاص تفاعل

اليزا في الحفر على الطول الموجي 405 نانومتر و عد التفاعل موجبا اذا كانت قيمة الامتصاص للعينات تعادل ثلاثة اضعاف التفاعل لسمتخلص نبات سليم اخضع لنفس الخطوات اعلاه للمقارنة.

النتائج و المناقشة

الاعراض والمدى العائلي:

تشير النتائج في جدول (1) الى أن المدى العائلي للفايروس ضيق جدا حيث أقتصر على عدد محدود من العوائل النباتية و هي : الطماطة *L. esculentum* حيث ظهرت عليها اعراض التقزم ، التفاف الاوراق نحو الاعلى و الاسفل. اصفرار حواف الاوراق و بين العروق كما يتضح في الشكل رقم (1). مقارنة بالنباتات السليمة في الشكل رقم (2) .



شكل رقم (1): تشير الاسهم الى أعراض : (A) التفاف الاوراق المصابة نحو الاعلى و الاسفل. (B): اصفرار حواف الاوراق و بين العروق.



شكل رقم (2) : يوضح لنا الاوراق السليمة لنباتات الطماطة والخالية من الاصابة بالفايروس TYLCV.

وظهرت على نبات الداتورة *D. stramonium* اعراض تقزم، شفافية العروق، اختزال الورقة و تشوهها بعد 20 يوما من العدوى. وعلى عناب الذيب *S. nigrum* ظهرت اعراض شفافية العروق خصوصا على الاوراق الحديثة، و تشوة الاوراق السفلية بعد 20 يوما من العدوى. و يلاحظ في الجدول ان عوائل اخرى لم تظهر عليها اعراض اصابة الا ان الفحص المصلي بتقنية ELISA أثبت احتواءها على الفايروس و هي : الزربيح *Ch. amaranticolor* ، الفاصوليا *Ph. vulgaris* ، التبغ البري *N. glutinosa* و قد تعمل هذه العوائل و التي ينمو بعضها طبيعيا في البيوت البلاستيكية و حولها، دورا مهما في وبائية الفايروس بوجود حشرة الذبابة البيضاء. و قد اشارت دراسات عدة الى نتائج مماثلة حول المدى العائلي للفايروس و الاعراض التي يسببها على هذه العوائل (Abdel-Salam ، 1990 ، Brunt ، 1990 و آخرون Jorda ، 1997 و آخرون، 2000 ، Aveglis و آخرون، 2001 ، Salti و آخرون، 2002 ، Czosnek و Laterrot ، 1997 ، Mariones و Navas-Castillo ، 2000).

نقل الفايروس بواسطة الذبابة البيضاء:

تشير النتائج في جدول (2) الى الكفاءة العالية لحشرة الذبابة البيضاء في نقل الفايروس. و ان حشرة واحدة كانت قادرة على نقل الفايروس من النبات المصاب الى السليم بنسبة 25%. و ان هذه النسبة تزداد بزيادة عدد الحشرات على النبات لتصل 100% عند وجود 10 حشرات/نبات. وقد اشار (Ghanem و آخرون ، 2001). الى نتائج مماثلة بهذا الخصوص.

وجد ان اقل فترة لازمة لحشرة الذبابة البيضاء على النبات المصاب لاكتساب الفايروس 30 دقيقة و مثلها على النبات السليم للحشرة الحاملة للفايروس لاحداث العدوى. و ان مدة حضانة الفايروس في الحشرة تراوحت بين 22 – 24 ساعة. وقد اشير الى نتائج مماثلة في هذا الخصوص (Metho و آخرون 1994 ، Salati و آخرون، 2002 ، Ajlan و آخرون 2006) .

جدول (1) الاعراض و المدى العائلي لفايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة TYLCV

ELISA المصلي الاختبار	الاعراض	نبات الاختبار
+	التفاف، تقزم ، اصفرار	العائلة Solanaceae الطماطة <i>Lycopersicon esculentum</i>
+	التفاف الاوراق ، اصفرار	الداتورة <i>Datura stramonium</i>
-	لم تظهر اعراض	الفلفل <i>Capsicum annum</i>
-	لم تظهر اعراض	المنطاد <i>Physalis floridana</i>
+	التفاف الاوراق ، اصفرار	عناب الذيب <i>Solonum nigrum</i>
+	لم تظهر اعراض	التبغ البري <i>Nicotiana glutinosa</i>
-	لم تظهر اعراض	العائلة Amaranthaceae ورد الدكمة <i>Gomphrena globosa</i>
+	لم تظهر اعراض	العائلة Chenopodaceae الزربيج <i>Chenopodium amaranticolor</i>
+	لم تظهر اعراض	العائلة Cucurbitaceae الخيار <i>Cucumis sativus</i>
-	لم تظهر اعراض	العائلة Leguminosae فول الصويا <i>Glycin max</i>
+	لم تظهر اعراض	الفاصوليا <i>Phaseolus vulgaris</i>
-	لم تظهر اعراض	اللوبياء <i>Vigna unguiculata</i>
نسبة الاصابة %	عدد النباتات المصابة	عدد الحشرات/ نبات
25	20/5	1
25	20/5	2
50	20/10	3
50	20/10	4
65	20/12	5
80	20/16	6

80	20/16	7
100	20/20	10

جدول (2) العلاقة بين عدد حشرات الذبابة البيضاء *B. tabaci* على النبات و نسبة الاصابة بفايروس TYLCV

يستخلص ان فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة ينتشر على نطاق واسع في البيوت المحمية و يسبب خسائر كبيرة في الحاصل في العراق و يعد الان من اكثر العوامل المحددة لزراعة الطماطة في البيوت المحمية خصوصا ان الزراعة في مثل هذه البيوت تتزامن مع انتشار حشرة الذبابة البيضاء حول البيوت و داخلها. و ان حشرة الذبابة البيضاء *B. tabaci* تنقل الفايروس بكفاءة من مصادره الى نباتات الطماطة و من نبات طماطة لآخر بطريقة باقية. كما ان وجود عوائل تصاب بالفايروس دون ظهور اعراض خارجية تدل على اصابتها تضيف مشكلة اخرى حيث تعمل هذه العوائل مصادر للاصابات الثانوية في البيوت البلاستيكية و الحقول المكشوفة معاً. ان تحديد هذه العوائل مع تحديد طريقة النقل و الناقل تعد اساسية لوضع برنامج مكافحة متكاملة لهذا الفايروس للحد من خطورته.

المصادر:

1. Abdel-Salam, A.M., 1990. Mechanical transmissions of two Egyptian isolates of beet curl top and tomato yellow leaf curl. Bull-Fat of Agric. Univ. of Cairo 41: 825-842.
2. Ajlan, A.M., G.A.M. Ghanem and K.A. Abdulsalam. 2006. Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in Saudi Arabia: identification, partial characterization and virus-vector relationship. Arab. J. Biotech. 10(1): 179-192.
3. Avgelis, A. D., N. Roditakis, C. Dovas and N. I. Katis 2001. First report of tomato yellow leaf curl virus on tomato crops in Greece. Plant Dis. 85:678.
4. Briddon, R. W. and P. G. Markham-1995. Family Geminiviridae. Virus Taxonomy: Classification and nomenclature of viruses. In: Sixth Report of the International committee on Taxonomy of viruses. Springer, Verlag, Wien, Austria, 158-165.
5. Brown, J. K., and J. Bird. 1992. Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the American and the caribb tomato Basin. Plant Dis. 76: 220-226.
6. Brunt, A., K. Carbtree, M. Dallwitz, A. Gibbs and L. Watson. 1997. Tomato yellow leaf curl geminivirus. pp. 1319-1321. In: Virus of Plants, Description and lists from the Vide Database. CAB International, London, UK, 1541 pp.
7. Czosnek, H., and H. Laterrot-1997-A Worldwide survey of tomato yellow leaf curl viruses. Archives of virology, 142: 1391 – 1406.
8. Idris, A., S. Smith, and J. K. Brown. 2001. Ingestion, transmission and persistence of chilo del tomato virus (CDTV), a new world biotypes' of the whitefly vector *Bemisia tabaci* (Genn.) Ann. Appl. Biol., 193: 145-154.
9. Ghanem , M. ,S. Morin , and H.Czosnek .2001-Rate of tomato yellow leaf curl virus translocation in the circulative transmission pathway at its vector , the whitefly *Bemisia tabaci* . Phytopathology 91:188 -196 .
10. Clark, M.F. and A. N . adam -1977 . Characteristics of micro plate method of enzyme – linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General virology, 3:475 – 483 .
11. Markham, P.G. , I.D.Bedford , S.Liu , and M.S. pinner _1994.The transmission of geminiviruses by *Bemisia tabaci* . Pesticide Science. 42:123 -128 .
12. Mehta, P. , J.A. Wyman , M.K. Nakhla and D.P. Maxwell -1994 . Transmission of tomato yellow leaf curl virus by *Bemisia tabaci* (Homoptera ,Aelyrodidae).J.Econom . Entomology, 87(5):1291 -1297.

13. Moriones , E. and J.Navas - castillo -2000 - tomato yellow leaf curl virus , an emerging virus complex causing epidemics worldwide . *Virus Res.* 1:123 – 134
14. Lapidot , M. , M. Friedmann , M. Pilowsky , R - Ben - Joseph and S.Cohen - 2001 . Effect of host plant resistance of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) on virus acquisition and Transmission by its whitefly vector. *Phytopathology*, 91:1209-1213.
15. Jorda , C. , I. Font , P.Martinez , M.Juarez and A. Ortega .2000. Current status and new natural hosts of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in Spain. *Plant Dis* . 85: 445.
16. Salati, R., M. Nahkla , M.Rojas , P.Gusman , D.Maxwell and R.Gilbertson . 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.
17. Ververde, R.A., P. Lotrakul , A.P. Landry and J.E. Boudreaux -2001 - First report of tomato yellow leaf curl virus in Louisiana . *Plant Dis* 85:230.

**Biological and Serological Properties of
Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV)**

Fadhal A. Al-Fadhal

College of Agriculture / Kufa Uni.

Abstract

This work was conducted to determine the serological and biological characteristics of Tomato yellow leaf curl virus in plastic houses. Samples from tomato plants showing symptoms of leaf curling and rolling, plant stunting and deformation accompanied with leaf edge and interveinal chlorosis suspected to be of Tomato yellow leaf curl virus were collected. Test plants were inoculated with the virus by whiteflies *Bemisia tabaci*. Results showed that the host range of the virus was restricted to some host plants. The virus caused leaf rolling, vein clearing, and new leaves deformation of *Datura stramonium* and *Solanum nigrum* after 20 days of inoculation. *Chenopodium amaranticolor*, *Phaseolus vulgaris*, and *Nicotiana glutinosa* were responded to virus infection without obvious symptoms on the infected plants. The virus was detected in these plants by serological-ELISA test. These hosts may be representing source of virus transmitted to tomato plants by *Bemisia tabaci*. It has been found that the virus transmitted efficiently from infected to healthy plants by *Bemisia tabaci*. One insect found to transmit the virus by 25%, attained to 100% with 10 insect/plant. The minimum access period on infected plant to acquire the virus was found to be 30 min, and similar period for viruliferous *Bemisia tabaci* on healthy plant for inoculation. The incubation period of the virus in the insect was found to be 24 hrs. The increasing of access period of insect on both infected and healthy plants caused increasing in the efficacy of virus transmission.