

**التشخيص الجزيئي لفايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (*Tomato yellow leaf curl virus*)
(*Bemisia tabaci*) والحشرة الناقلة له**

زينب مسلم عباس

طالبة ماجستير

عقيل نزال العابدي

استاذ مساعد

قسم وقاية النبات /كلية الزراعة /جامعة كربلاء

البريد الالكتروني : aqlabedy@yahoo.co.uk

المستخلص:

هدفت هذه الدراسة الى عزل و تشخيص عزلتين مختلفتين من فايروس تجعد و اصفرار أوراق الطماطة (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) و كذلك التحري عن الطراز الوراثي (Biotype) لحشرة الذباب الابيض (*Bemisia tabaci*) باستخدام تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase chain reaction, PCR) و تحديد تسلسل القواعد النيتروجينية لنواتج الحوامض النووية المضاعفة (PCR-amplified products) لمعرفة فيما اذا كانت عزليتي الفايروس و الطراز الوراثي لحشرات الذباب الابيض (*B. tabaci*) المنتشرة في مناطق اخذ العينات من بعض محافظات العراق (النجف، كربلاء، بابل و القادسية) متشابهة او مختلفة وراثيا و معرفة أي منهما اكثر انتشارا.

اظهرت نتائج اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) و باستخدام البوادي (TY1 و TY2) امكانية مضاعفة حزمة من الحامض النووي (PCR product) بحجم 580 زوج قاعدة نيتروجينية (Base pairs, bp) ان ما تم عزله و تشخيصه من محافظتي النجف و بابل هي سلالات تابعة لفايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV). وجد ايضا من خلال نتائج تحليل تسلسلات القواعد النيتروجينية لجين Mitochondrial cytochrome oxidize I (mtCOI) لنواتج الحوامض النووية (PCR-amplified products) من عينات حشرات الذباب الابيض (*B. tabaci*) التي جمعت من مناطق مختلفة بأن النمط الوراثي B (Biotype B) هو النمط الوحيد الذي تم تشخيصه في هذه الدراسة، مما يجعل وجود وسيادة هذا النمط الوراثي اكثر خطورة في انتشار فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV) لكونه احد النمطين الوراثيين المسؤولين عن نقل فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV).

الكلمات المفتاحية: *Tomato yellow leaf curl virus* و *Bemisia tabaci* و PCR.

Molecular characterization of *Tomato yellow leaf curl* (TYLCV) and its vector (*Bemisia tabaci*)

Aqeel N. AL-Abedy
Assistant Professor

Zianab M. Abbas
MSc student

Department of Plant Protection / College of Agriculture / University of
Kerbala.

E-mail address: aqlabedy@yahoo.co.uk

Abstract:

The aim of this study was to isolate and diagnose two different isolates of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) and to investigate the biotype of whiteflies insects (*Bemisia tabaci*) using the polymerase chain reaction technique to determine the sequences of the nitrogen bases of the PCR-amplified products to identify the genetic similarity and differences between the virus isolates as well as among the biotypes of whiteflies (*B. tabaci*) spread in the sampling areas in some of the provinces of Iraq (Najaf, Karbala, Babylon and Dewanyia) in addition to know which of them are more prevalent in those areas.

Results of the polymerase chain reaction (PCR) test using the TY1 and TY2 primers showed the possibility of amplifying a PCR product of 580 base pairs (bp) from the TYLCV isolates obtained from some areas in the provinces of Najaf, Babylon. It was also found from the results of the analysis of the mitochondrial cytochrome oxidize I (mtCOI) sequences generated from the PCR-amplified products amplified from *B. tabaci* samples collected from different regions in Najaf, Karbala, Babylon and Diwaniya governorates, that the biotype B is the only biotype identified in this study, which makes the presence and dominance of this biotype more dangerous in the spread of TYLCV in nature for being one of the two biotypes of this insect that is responsible for the transmission of TYLCV.

Key words: *Tomato yellow leaf curl virus*, *Bemisia tabaci*, PCR.

المقدمة:

يعد محصول الطماطة (*Solanum lycopersicom* L.) واحدا من المحاصيل المهمة الذي يحتل المرتبة الاولى من حيث الاهمية من بين محاصيل الخضر في كثير من بلدان العالم و منها العراق بسبب احتواء ثماره على بعض الفيتامينات مثل فيتامين A و C و كذلك العناصر المعدنية و منها الحديد و الفسفور، كما انها تستهلك طازجة فضلا عن دخولها في كثير من الصناعات الغذائية (24)(20). من ناحية اخرى يدر هذا المحصول مردود مادي للمزارع اذ قدر اجمالي قيمة الانتاج للمحافظات العراقية بحوالي 403004. 972 مليون دينار (18). نظرا لتلك الاهمية انتشرت زراعته المحصول في عموم القطر مع تميز مناطق متخصصة في إنتاجيته مثل البصرة و ذي قار و النجف و كربلاء و ديالى و صلاح الدين و نينوى و كركوك (6). في السنوات الماضية زاد الاهتمام في انتاج هذا المحصول في غير موسمه باستخدام اساليب الزراعة المحمية و التي تفاوتت من البسيطة في الزراعة تحت الانفاق الى المعقدة منها بالزراعة في البيوت الزجاجية و البلاستيكية المجهزة بمنظومات السيطرة الحديثة (4). ان التوسع في زراعة محصول الطماطة في الحقول المكشوفة و كذلك

البيوت الزجاجية و البلاستيكية في السنوات الماضية ادى الى ظهور كثير من الامراض المحددة لإنتاج هذا المحصول نتيجة لتوفر الظروف الملائمة لظهور و أنتشار العديد من الامراض ومنها مرض تجعد و اصفرار اوراق الطماطة المتسبب عن الفايروس (*Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV*) (7)(21).

يعتبر فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV) من اكثر الفايروسات انتشارا على محصول الطماطة في العراق مسيياً خسائر قد تصل الى 100% في الزراعة المكشوفة و المحمية و خصوصا عند حدوث الاصابة في المراحل المبكرة لنمو النبات (29). ينتقل فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة بكفاءة عالية بواسطة حشرة الذبابة البيضاء (*Bemisia tabaci*) بطريقة دورانية باقية غير تكاثرية (Persistent, non-propagative Circulative manner) (28)(26)(19). لفايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة مدى عائلي واسع يصل الى 32 نوع عائدة الى 13 عائلة نباتية (2).

تظهر الاعراض بشكل عام على النباتات المصابة بهيئة اصفرار حواف الاوراق و التفافها نحو الداخل مع تجعد و تقزم شديد اضافة الى انخفاض نسبة عقد الازهار و تساقطها مؤدياً ذلك الى خفض الانتاجية كما و نوعاً (16). قدرت منظمة وقاية النبات الاوربية المساحة الموبوءة عالمياً بفايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV) بحوالي 7 مليون هكتار موزعة في 40 دولة (17). اما في العراق فإن الفايروس يعد الاكثر انتشاراً على محصول الطماطة و يسبب خسائر اقتصادية تتراوح بين 50-100% خاصة عند حدوث الاصابة في وقت مبكر من عمر النبات (29). ان استخدام بعض الطرائق مثل الاختبارات الجزيئية (Molecular tests) مثل تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase chain reaction, PCR) و كذلك الاختبارات المصلية (Serological tests) في تشخيص فايروسات النبات يعتبر من الامور الملحة لإعطائها نتائج دقيقة يمكن الاعتماد عليها في تشخيص فايروسات النبات و الوصول الى الهدف المنشود و هو ايجاد طريقة كفوة في مقاومة الفايروس و حماية المصادر الطبيعية الاخرى (13)(23)(3). اصبح تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) التقنية الأهم و التي تحتل مساحة واسعة في كافة المختبرات العلمية التي تتعامل مع دراسة الحامض النووي (DNA و RNA) و التي تهدف الى مضاعفة الحامض النووي (DNA) من تراكيز واطئة جداً و لمنطقة معينة من جينوم الكائن الحي الى الملايين من النسخ التي تحمل مواصفات النسخة الاصلية نفسها (12).

نظراً للأهمية الاقتصادية لمحصول الطماطة و الاضرار المتسببة عن فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV) في خفض انتاجية المحصول كما و نوعاً، فقد هدفت هذه الدراسة الى عزل و تشخيص فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV) من محافظتي النجف و بابل و كذلك تشخيص الطرز الوراثية (Biotypes) لعينات مختلفة من حشرات الذباب الابيض (*B. tabaci*) باستخدام تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) و تحديد تسلسل القواعد النيتروجينية للنواتج المضاعفة (PCR-amplified products) بهدف معرفة اوجه التشابه و الاختلاف الوراثي فيما بين العزلات الفيروسية (TYLCV) و كذلك فيما بين الطرز

الوراثية لحشرات الذباب الابيض المعزولة في هذه الدراسة و لمقارنتها ايضا مع ما موجود من البيانات المتوفرة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (National Center for Biotechnology Information, NCBI).

المواد وطرائق العمل:

مصدر الفايروس

جمعت نباتات طماطة ظهرت عليها اعراض اصابة فايروسيه متمثلة بتجدد و التفاف الاوراق مع تقزم شديد من بعض المناطق زراعة الطماطة في محافظات النجف و بابل خلال الموسم الزراعي 2016-2017. زرعت جميع النباتات بشكل منفصل و حسب منطقة الجمع في سنادين بلاستيكية ابعادها 21×21 سم و نميت في البيت البلاستيكي التابع لكلية الزراعة- جامعة كربلاء بعد وضعها في صناديق خشبية ابعادها 60×40×40 مغطاة بطبقتين من قماش الململ.

تشخيص الفايروس باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR).

استخلاص الحامض النووي منقوص الاوكسجين (DNA) من النبات.

استخلص الحامض النووي منقوص الاوكسجين (DNA) للفايروس من النباتات المصابة باستخدام العدة (Cat. No: GP100) و المجهزة من قبل شركة Geneaid و باتباع الخطوات الموصوفة من قبل الشركة المصنعة.

استخدام تقنية تفاعل البلمرة لمتسلسل (PCR amplification) لتضخيم الغلاف البروتيني (Coat protein) لفايروس تجعد اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV)

اجري اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) باستخدام العدة {Maxime PCR PreMix (i-Taq); Cat. No. 25026} المجهزة من قبل شركة iNtRoN الكورية. نفذ تفاعل البلمرة المتسلسل بحجم اجمالي 20 مايكروليتر حاوية على 1 مايكروليتر من كل البادئ الامامي {TY1 : GCCCATGTA (T/C) CG (A/G) AAGCC (A/G) و البادئ الخلفي {TY2 : GG (A/G) TTAGA (A/G) GCATG (A/C) GTAC} تركيز كل منهما 10 pomol (1) و 1 مايكروليتر من الحامض النووي (30 نانوكرام. مايكروليتر⁻¹). بعد وضع جميع المكونات المطلوبة للتفاعل في الانبوبة المجهزة من قبل الشركة المصنعة، اكمل الحجم بالماء (Nuclease-free water) إلى 20 مايكروليتر.

تم مضاعفة الحامض النووي لعزلات الفايروس المختلفة و المراد تشخيصها باستخدام خطوات و ظروف تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) الاتية: عملية مسخ اولي (Initial denaturation) للحامض النووي (DNA) لمدة خمسة دقائق في درجة حرارة 94 م، متبوعة بـ 35 دورة كل منها مؤلفة من عملية مسخ نهائي (Final denaturation) لمدة 30 ثانية في درجة حرارة 94 م، ارتباط البوادئ (Primer annealing) لمدة 30 ثانية في درجة حرارة 58 م و من ثم استطالة اولية (Initial extension) لنتائج الحامض النووي المضاعف (PCR)

(product) لمدة 1 دقيقة في درجة حرارة 72 م مع انتهاء خطوات تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) بدورة واحدة من عملية الاستطالة النهائية (Final extension) في درجة حرارة 72 م لمدة خمسة دقائق.

تشخيص الطرز الوراثية (Biotypes) لحشرات الذباب الابيض (*B. tabaci*)

جمع عدد من بالغات حشرة الذبابة البيضاء (*B. tabaci*) بواسطة شافطة يدوية (Hand Aspirator) من مناطق مختلفة في محافظات النجف و كربلاء و بابل و القادسية (جدول 1) و وضعت كل منها مباشرة و حسب منطقة الجمع في انبوية مزودة بغطاء محكم و حاوية على كحول ايثلي (95%) و جلبت الى مختبر فايروسات النبات في كلية الزراعة/ جامعة كربلاء لغرض استخلاص الحامض النووي (DNA) و تشخيصها جزيئياً.

جدول 1: مناطق جمع حشرات الذباب الابيض (*B. tabaci*) لغرض تحديد الطرز الوراثية (Biotypes).

ت	منطقة الجمع
1	بساتين منطقة البوحداري/قضاء الكوفة / محافظة النجف
2	مزارع الطمطة في المنطقة الصحراوية/ محافظة النجف
3	مزارع الطمطة في المنطقة الصحراوية/ محافظة كربلاء
4	البيوت البلاستيكية/ كلية الزراعة/ جامعة كربلاء
5	بساتين ناحية الحسينية/ محافظة كربلاء
6	بساتين قضاء الوردية/ محافظة بابل
7	بساتين بني مسلم/ ناحية الكفل/ محافظة بابل
8	البيوت البلاستيكية/ ناحية الشافعية/ محافظة القادسية
9	بساتين ناحية المحاويل/ محافظة بابل
10	بساتين منطقة القزوينية/ قضاء الكوفة/ محافظة النجف

استخلاص الحامض النووي منقوص الاوكسجين (DNA) من حشرات الذبابة البيضاء (*B. tabaci*)

لغرض استخلاص الحامض النووي (DNA) من حشرات الذباب الابيض، استخدمت العدة (Cat . No : FAPGK 001) و المجهزة من قبل شركة فافورجين (Favorgen) التايوانية المنشأ وفق الخطوات الموصوفة من قبل الشركة المصنعة مع اجراء بعض التحوير.

استخدام تقانة تفاعل البلمرة لمتسلسل (PCR amplification) في تشخيص الطراز الوراثي لحشرات الذباب الابيض (*B. tabaci*)

نقد اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) بنفس الخطوات الموصوفة سابقا ما عدا استخدام كلا من البادئ الامامي (CO1-F: TTGATTTTTGGTCATCCAGAAGT) و البادئ الخلفي (CO1-R: Mitochondrial cytochrome التي تستهدف الجين TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA)

1 mtCOI) oxidase). تم مضاعفة الحامض النووي (PCR-amplified product) لحشرة الذباب الابيض باستخدام خطوات و ظروف تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) المبينة في جدول 2.

جدول 2: خطوات و ظروف تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) المستخدمة لمضاعفة الحامض (DNA)

النوعي لحشرة الذبابة البيضاء (*B. tabaci*) (5).

عدد الدورات	الوقت	درجة الحرارة (م)	خطوات تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)
1	دقائق 5	95	Initial denaturation
35×	ثانية 30	94	Final denaturation
	ثانية 45	52	Annealing
	دقيقة 1	72	Initial extension
1	دقائق 5	72	Final extension
		4	Hold

الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز (Agarose gel electrophoresis)

حضرت طبقة هلام الاكاروز (Agarose gel) بأخذ 1 غم من الاكاروز و اذابته في 100 مل من المحلول الدارئ (TBE×1) و لحين تحوله الى محلول رائق بعد انخفاض درجة حرارة المحلول الى 40° م. بعد انخفاض الحرارة (40-50° م) اضيف 5 مايكرو ليتر من صبغة الايثيديم برومايد (Ethidium bromide). جهز القالب الخاص (Agarose gel tray) و وضع المشط في احدى نهايتيه لعمل حفر داخل طبقة هلام الاكاروز ثم صب الاكاروز المذاب في القالب و ترك ليتصلب في درجة حرارة الغرفة. بعد اكمال تصلب طبقة هلام الاكاروز، رفع المشط بحذر دون احداث تشوية او تحطيم للحفر (Wells) و اعيد القالب الى مكانه في جهاز الترحيل الكهربائي. اضيف المحلول الدارئ (1×TBE) الى حوض الترحيل الكهربائي (tank) (Electrophoresis) لحين غمر طبقة الاكاروز بارتفاع حوالي 1 سم. اضيف 5 مايكرو ليتر من الحامض النووي المضاعف بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) من كل عينة الى كل حفرة من حفر طبقة هلام الاكاروز. كما اضيف 5 مايكرو ليتر من سلم الحامض النووي DNA (1kbp DNA ladder marker) الى الحفرة الموجودة في الجانب الايسر من العينات المضافة للمساعدة بتحديد احجام الحامض النووي المضاعف. اوصلت اقطاب الجهاز بالتيار الكهربائي و شغل جهاز الطاقة على (Power supply) على 120 ملي امبير لمدة ساعة و نصف. بعد اكمال عملية ترحيل العينات، فحصت طبقة هلام الاكاروز الحاوية على نواتج الحامض النووي المضاعف (PCR-amplified products) و المصبوغة بصبغة الايثيديم برومايد (Ethidium bromide) تحت الاشعة فوق البنفسجية (Ultraviolet light) و اخذت لها صور.

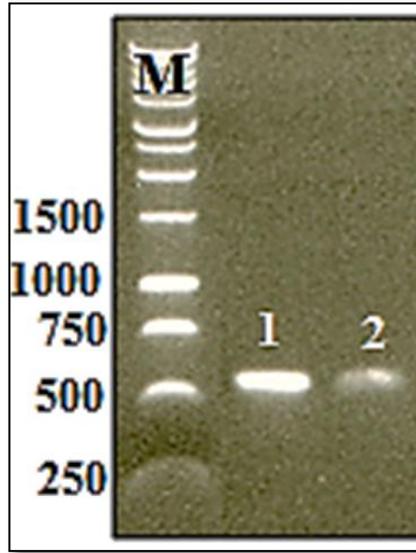
تحليل تسلسل قواعد النيروجينية للحامض النووي (DNA) المضاعفة من عزلات فايروس تجعد واصفرار اوراق الطماطة (TYLCV)

لغرض معرفة تسلسل القواعد النيروجينية لنواتج الحوامض النووية المضاعفة بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) من عزلات فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV) و كذلك المضاعفة من عينات حشرات الذباب الابيض (*B. tabaci*)، تم ارسال نواتج الحامض النووي (PCR product) الى شركة Macrogen الكورية مع كلا من البوادئ الامامية و الخلفية (Forward and reverse primers) التي استخدمت في عملية مضاعفة الحامض النووي. لمعرفة نوع العزلة الفيروسية و كذلك الطراز الوراثي (Biotypes) لحشرات الذباب الابيض المنتشرة في بعض مناطق زراعة الطماطة، و كذلك معرفة درجة التشابه و الاختلاف في تسلسلات القواعد النيروجينية للحوامض النووية المضاعفة من الحامض النووي لسلالة الفايروس، تم ادخال تسلسل القواعد النيروجينية لنواتج الحامض النووي المضاعف في قاعدة البيانات المتوفرة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) باستخدام برنامج (Basic Local BLAST Alignment Search Tool) (30).

النتائج والمناقشة:

تشخيص عزلات فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV)

اظهرت النتائج امكانية مضاعفة نواتج من الحامض النووي (PCR products) بحجم 580 زوج قاعدة نيروجينية (Base pairs, bp) بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) و بوجود البادئات TY1 و TY2 (Degenerate primer pair) بعد استخلاص الحامض النووي (DNA) الفايروسي من عينات نباتية مصابة جمعت من بعض مناطق زراعة الطماطة في محافظتي النجف و كربلاء (شكل 1).



شكل 1: نواتج الحامض النووي (DNA) المضاعفة باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) من عزلات فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماعة (TYLCV) المعزولة من احدى مزارع الطماعة في المنطقة الصحراوية/ محافظة النجف (1) و بساتين بني مسلم/ ناحية الكفل/ محافظة بابل (2). .1Kbp DNA ladder marker=M.

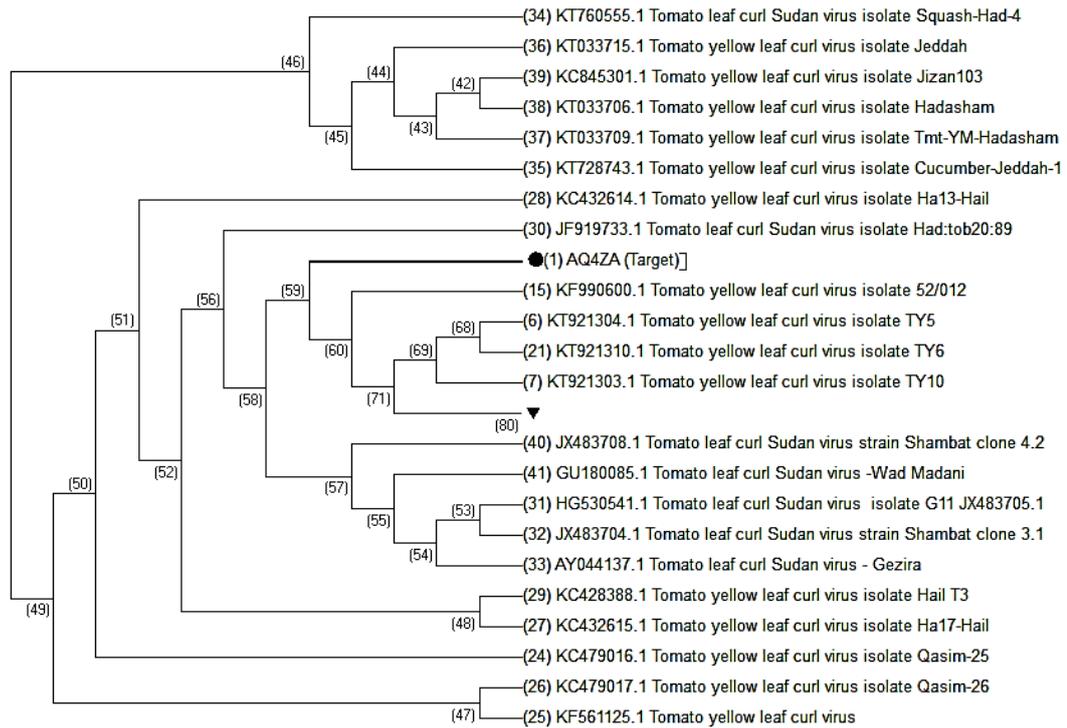
اثبتت نتائج تحليل تسلسل القواعد النيتروجينية لنواتج الحامض النووي المضاعفة (PCR-amplified products) من عزلتي الفايروس المعزولة و باستخدام برنامج BLAST بأن هاتين العزلتين تعود الى فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماعة (TYLCV). اظهر تحليل تسلسل القواعد النيتروجينية لعزلات الفايروس المعزولة و باستخدام برنامج BLAST وجود اختلافات واضحة فيما بينها و كذلك بينها و بين العزلات الاخرى التابعة لنفس الفايروس و المسجلة سابقا في قاعدة البيانات المتوفرة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI). اعطيت كل عزلة اسم خاص بها (Isolate code) للتمييز.

كما لوحظ من خلال مقارنة تسلسل القواعد النيتروجينية للحامض النووي المضاعف من عزلة الفايروس TYLCV (AQ4ZA) المعزولة من احدى مزارع الطماعة في المنطقة الصحراوية في محافظة النجف مع البيانات المتوفرة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) ان اعلى نسبة تشابه بلغت 89% كانت مع عزلات الفايروس المعزولة من الاردن (EU143745) و GenBank Accession No.: (GQ861426). كما وجد ان اقل نسبة تشابه وراثي كانت مع عزلات الفايروس المعزولة من المملكة العربية السعودية و الاردن. اظهرت ايضا نفس العزلة نسبة اختلاف وراثي تراوحت بين 87-88% مع بقية العزلات المسجلة في المركز المذكور اعلاه (جدول 3 و شكل 2).

جدول 3: مقارنة بين نسب تشابه تسلسل القواعد النيتروجينية للغلاف البروتيني (CP) لسلسلة فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (AQ4ZA) المعزولة من منطقة احدى مزارع الطماطة في المنطقة الصحراوية/ محافظة النجف و العزلات الاخرى لنفس الفايروس و المسجلة عالميا في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI).

Virus	Isolate name	Origin	The most similar sequences in GenBank database	
			GenBank Accession Number	Sequence similarity (%)
TYLCV	.*	Iraq	A/N	100
TYLCV	.**	Jordan	EU143745	89
TYLCV	TYLCV-IL[JO:Ju:08]	Jordan	GQ861426	89
TYLCV	Bou[IR:Ge29:06]	Iran	GU076454	88
TYLCV	TY5	Egypt	KT921304	88
TYLCV	TY10	Egypt	KT921303	88
TYLCV	SE:Imp:4:09	Sweden	HF548830	88
TYLCV	SE:Imp:1:08	Sweden	HF548827	88
TYLCV	2	Kuwait	KJ830841	87
TYLCV	Ka-Hajeb 2	Tunisia	KM042092	87
TYLCV	52/012	Tunisia	KF990600	87
TYLCV	51/012	Tunisia	KF990599	87
TYLCV	3/012	Tunisia	KF990598	87
TYLCV	KISR	Kuwait	JF451352	87
TYLCV	IL[IR:Boj:23-	Iran	KC106639	85
TYLCV	-	India	KC846880	85
TYLCV	IL[IR:Ta30:06]	Iran	GU076440	85
TYLCV	TY6	Egypt	KT921310	79
TYLCV	EE:Imp:6:08	Estonia	HF548836	79
TYLCV	Mersin 1	Turkey	AJ812277	79
TYLCV	Qasim-25	Saudi Arabia	KC479016	78
TYLCV	Qasim	Saudi Arabia	KF561125	78
TYLCV	Qasim-26	Saudi Arabia	KC479017	78
TYLCV	Ha17-Hail	Saudi Arabia	KC432615	78
TYLCV	Ha13-Hail	Saudi Arabia	KC432614	78
TYLCV	Hail T3	Saudi Arabia	KC428388	78
TYLCV	Kure	Japan	AB730586	78
TYLCV	Gj	South Korea	JQ013091	78
TYLCV	Gh	South Korea	JQ013090	78

*سلسلة فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV) المعزولة من منطقة احدى مزارع الطماطة في المنطقة الصحراوية في محافظة النجف. ** - عدم توفر اسم السلسلة او العزلة في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI).

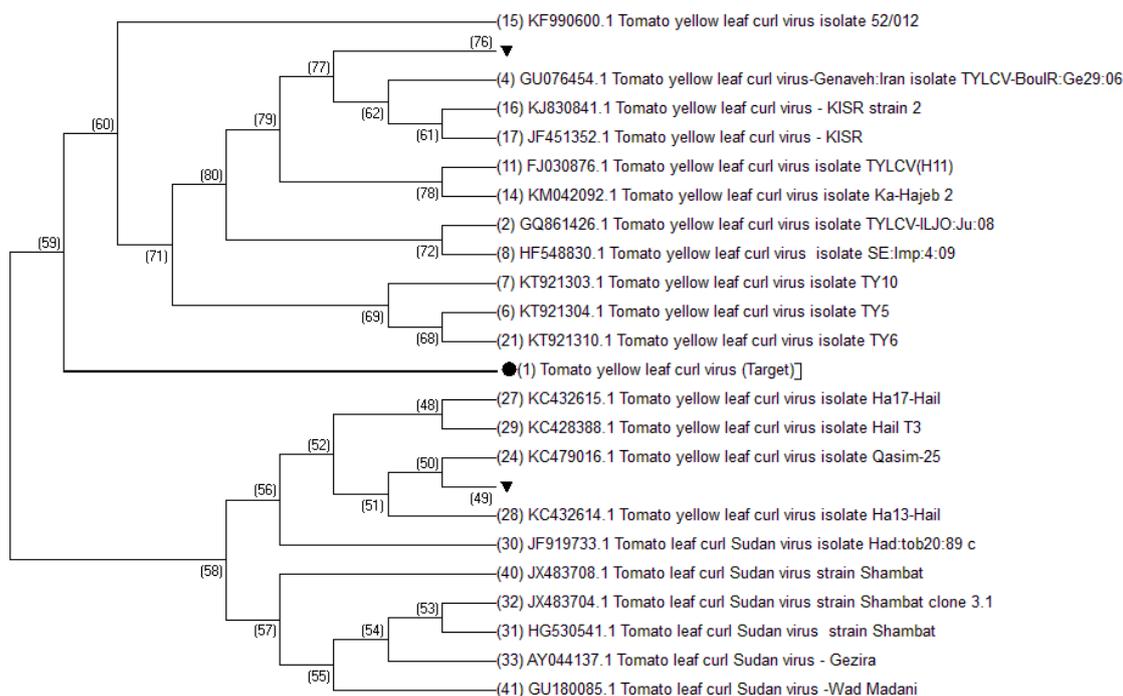


شكل 2: شجرة التحليل الوراثي (Neighbor-Joining tree) تبين علاقة عزلة فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV, AQ4ZA) ، المعزولة في هذه الدراسة من نباتات الطماطة المصابة في احدى مزارع الطماطة في المنطقة الصحراوية في محافظة النجف، مع عزلات نفس الفايروس المسجلة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI). كما اثبتت النتائج ان عزلة الفايروس المعزولة في هذه الدراسة من بساتين بني مسلم/ ناحية الكفل/ في محافظة بابل كانت الاقرب وراثيا لعزلة الفايروس TYLCV (Accession No. JQ354991) العراقية و بنسبة تشابه بلغت 99%، في حين كانت اكثرها تباعدا وراثيا عن عزلات الفايروس المعزولة من كوريا الجنوبية و بنسبة تشابه بلغت 97% (جدول 4 وشكل 3).

جدول 4: مقارنة بين نسب تشابه تسلسل القواعد النيتروجينية للغلاف البروتيني (CP) لسلسلة فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (AQ3ZA) المعزولة من منطقة بساتين بني مسلم/ ناحية الكفل/ محافظة بابل و العزلات الاخرى لنفس الفايروس و المسجلة عالميا في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI).

Virus	Isolate name	Origin	The most similar sequences in GenBank	
			GenBank Accession Number	Sequence (%) similarity
TYLCV	-*	Iraq	N/A	100
TYLCV	TYLCV IRQ	Iraq	JQ354991	99
TYLCV	MU5-NC5_2009	Mauritius	KX347171	98
TYLCV	MU3-NC6_2009	Mauritius	KX347169	98
TYLCV	MU2-NC10_2009	Mauritius	KX347168	98
TYLCV	IL	Morocco	LN846615	98
TYLCV	Mauritius	Mauritius	HM448447	98
TYLCV	3181291	Netherlands	FJ439569	98
TYLCV	Berkane	Morocco	DQ503437	98
TYLCV	Almeria	Spain	AJ489258	98
TYLCV	4724	Spain	DQ058098	98
TYLCV	EE:Imp:14:08	Estonia	HF548844	98
TYLCV	Jangheung 44	South Korea	HM856917	97
TYLCV	Gwangyang 6	South Korea	HM856914	97
TYLCV	Gwangju 30	South Korea	HM856913	97
TYLCV	Gunwi 19	South Korea	HM856912	97
TYLCV	Samcheonpo 1	South Korea	HM856873	97
TYLCV	TYLCV-CW	South Korea	HQ260984	97
TYLCV	Goseong 21	South Korea	HM856911	97
TYLCV	Damyang 43	South Korea	JN183872	97

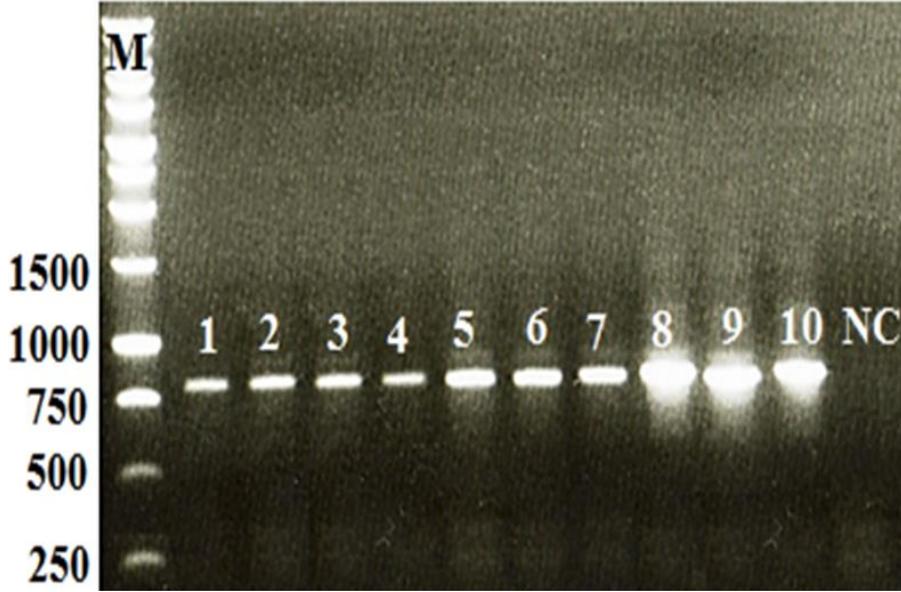
*سلسلة فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV) المعزولة من منطقة بساتين بني مسلم/ ناحية الكفل/ محافظة بابل.



شكل 3: شجرة التحليل الوراثي (Neighbor-Joining tree) تبين علاقة عزلة فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV, AQ3ZA) ، المعزولة في هذه الدراسة من نباتات الطماطة المصابة في منطقة بساتين بني مسلم/ ناحية الكفل/ محافظة بابل، مع عزلات نفس الفايروس المسجلة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI).

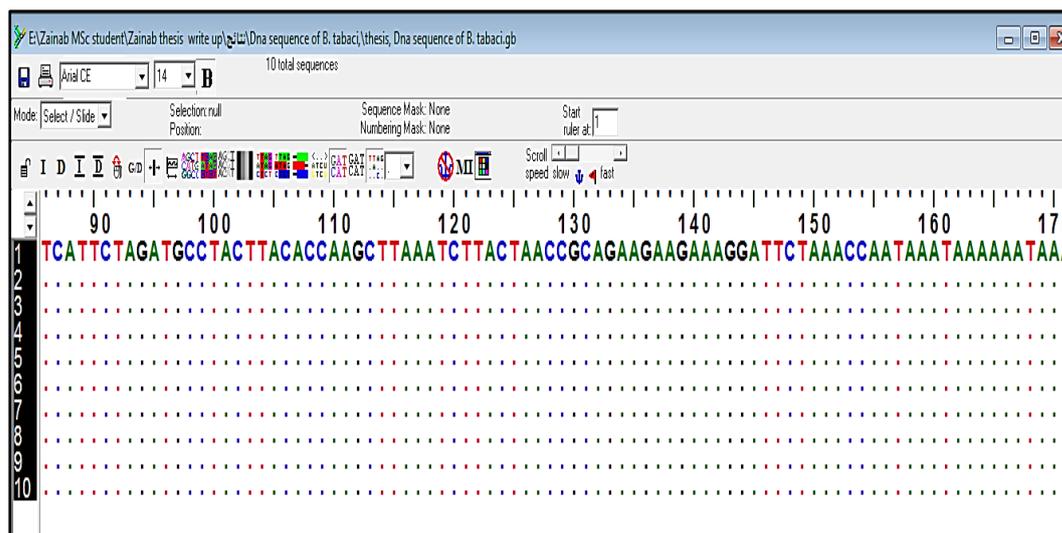
التشخيص الجزيئي للنمط الوراثي (Biotypes) لحشرات الذباب الابيض (*B. tabaci*)

اظهرت نتائج استخلاص الحامض النووي (DNA) من عينات حشرات الذباب الابيض (*B. tabaci*) جمعت من مناطق مختلفة و تعريضه الى تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) و بوجود البادئات CO1-F و CO1-R امكانية مضاعفة نواتج من الحامض النووي (PCR products) حجم كل منها 880 زوج قاعدة نيتروجينية (bp) (شكل 4).



شكل 4: نواتج الحامض النووي (PCR-amplified products) المضاعفة بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) من عينات حشرات الذباب الابيض (*B. tabaci*) المأخوذة من بساتين منطقة البوحداري كوفة / محافظة النجف (1)؛ مزارع الطماسة في المنطقة الصحراوية/محافظة النجف (2)؛ مزارع الطماسة في المنطقة الصحراوية/ محافظة كربلاء (3)؛ البيوت البلاستيكية/كلية الزراعة/ جامعة كربلاء (4)؛ بساتين منطقة الحسينية/ محافظة كربلاء (5)؛ بساتين قضاء الوردية/ محافظة الحلة (6)؛ بساتين بني مسلم ناحية الكفل/ محافظة الحلة (7)؛ البيوت البلاستيكية/ ناحية الشافعية/ محافظة القادسية (8)؛ بساتين ناحية المحاويل/ محافظة الحلة (9)؛ بساتين منطقة الفزوينية/ قضاء الكوفة/ محافظة النجف (10) 1Kbp =M; (NC) :معاملة مقارنة (Negative control).

اثبت تحليل تسلسلات القواعد النيتروجينية لنواتج الحوامض النووية (PCR products) المضاعفة من حشرات الذباب الابيض (*B. tabaci*) و باستخدام برنامج BLAST ان جميع العينات التي جمعت من مناطق مختلفة تعود الى الطراز الوراثي نوع B (Biotype B) عند المقارنة فيما بينها و كذلك المقارنة مع البيانات المتوفرة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI)، اذ اعطت جميع تسلسلات القواعد النيتروجينية نسبة تشابه بلغت 100% (شكل 5).



شكل 5: اصطفاف تسلسلات القواعد النايتير وجينية (Sequence alignments) الناشئة من نواتج الحامض النووي (PCR product) المضاعفة من مناطق مختلفة. القواعد النيروجينية (Identical bases) المتشابهة ممثلة بنقاط. الارقام المثبتة على الجانب الايسر من الشكل تمثل تسلسل القواعد النيروجينية لعينات حشرات ذباب ابيض (*B. tabaci*) المأخوذة من بساتين منطقة البوحداري كوفة / محافظة النجف (1); مزارع الطماعة في المنطقة الصحراوية/محافظة النجف (2); مزارع الطماعة في المنطقة الصحراوية/محافظة كربلاء (3); البيوت البلاستيكية/كلية الزراعة/ جامعة كربلاء (4); بساتين منطقة الحسينية/ محافظة كربلاء (5); بساتين قضاء الوردية/ محافظة الحلة (6); بساتين بني مسلم ناحية الكفل/ محافظة الحلة (7); البيوت البلاستيكية/ ناحية الشافعية/ محافظة القادسية (8); بساتين ناحية المحاويل/ محافظة الحلة (9); بساتين منطقة القزوينية/ قضاء الكوفة/ محافظة النجف (10).

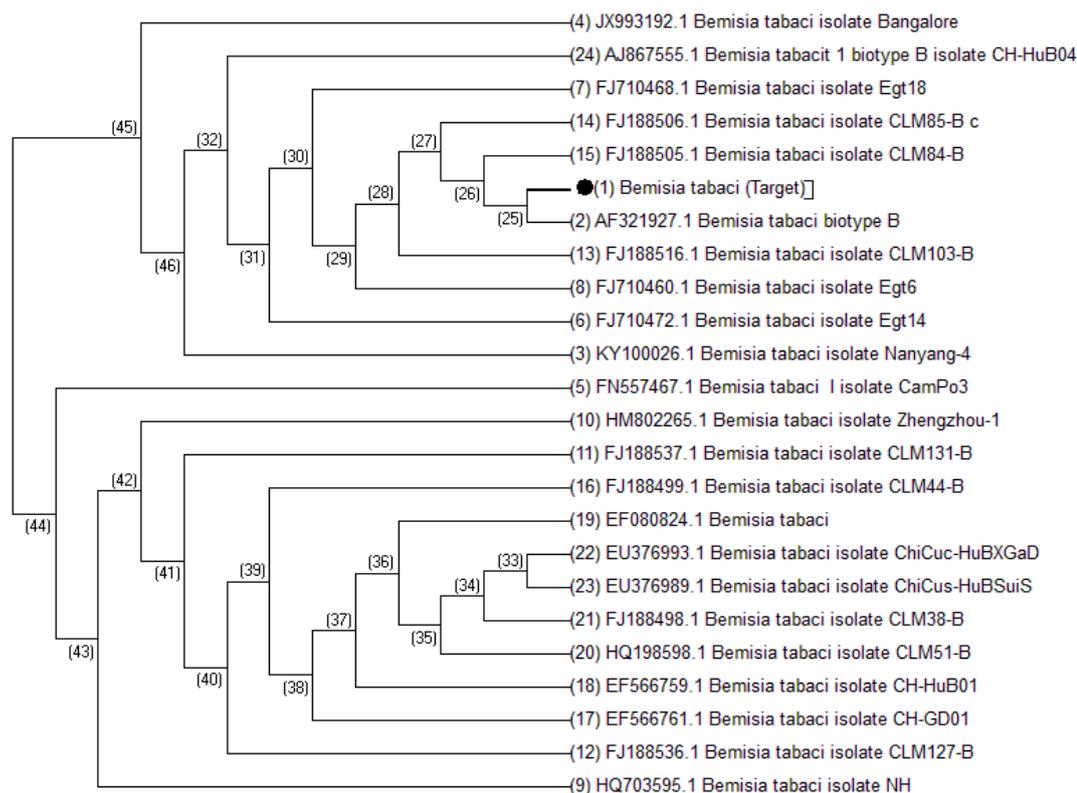
اعطت جميع تسلسلات نواتج الحوامض النووي (PCR products) المضاعفة من عينات حشرات ذباب الابيض المجموعة في هذه الدراسة تشابهاً وراثياً" بلغ 100% مع حشرات الذباب الابيض المشخصة في الهند (Accession No. AF321927). كما اعطت تسلسلات القواعد النيروجينية الناتجة من تضاعف الحامض النووي المستخلص من عينات حشرات الابيض (*B. tabaci*) قيد الدراسة نسب تشابه وصلت 99% مع حشرات الذباب الابيض (Biotypes B) المشخصة في بعض دول العالم مثل الهند و امريكا وايطاليا و مصر و الصين (جدول 5 وشكل 6).

جدول 5: مقارنة بين نسب تشابه تسلسل القواعد النيتروجينية لجين Mitochondrial cytochrome oxidase (mtCOI) المضاعف بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR amplification) من حشرات الذباب الابيض (*B. tabaci*) المشخصة في الدراسة العزلات الاخرى لنفس الحشرة والمسجلة عالميا في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI).

<i>Bemisia tabaci</i>	Isolate name	Origin	The most similar sequences in GenBank	
			GenBank Accession Number	Sequence (%) similarity
Biotype B	_*	Iraq	-	100
Biotype B	**	India	AF321927	100
Biotype B	Nanyang-4	China	KY100026	99
Biotype B	Bangalore II	India	JX993192	99
Biotype B	CamPo3	Italy	FN557467	99
Biotype B	Egt14	Egypt	FJ710472	99
Biotype B	Egt18	Egypt	FJ710468	99
Biotype B	Egt6	Egypt	FJ710460	99
Biotype B	NH	Vietnam	HQ703595	99
Biotype B	Zhengzhou-1	China	HM802265	99
Biotype B	CLM131-B	USA	FJ188537	99
Biotype B	CLM127-B	USA	FJ188536	99
Biotype B	CLM126-B	USA	FJ188535	99
Biotype B	CLM121-B	USA	FJ188530	99
Biotype B	CLM44-B	USA	FJ188499	99
Biotype B	CH-GD01	China	EF566761	99
Biotype B	CH-HuB01	China	EF566759	99
Biotype B	-	USA	EF080824	99
Biotype B	ChiCuc- HuBXGaD	China	EU376993	99
Biotype B	-	China	AJ867555	99
Biotype B	ChiCus-HuBSuiS	China	EU376989	99
Biotype B	CLM38-B	USA	FJ188498	99
Biotype B	wuhan08-1	China	HM597872	99
Biotype B	CLM51-B	USA	HQ198598	99

* عينة حشرات الذباب الابيض المشخصة في هذه الدراسة.

** - تعني اسم العزلة غير مذكور في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI).



شكل 6: شجرة التحليل الوراثي (Neighbor –Joining tree) تبين علاقة عزلة حشرات الذباب الابيض (*B. tabaci*, Biotype B) المشخصة في هذه الدراسة و العزلات الاخرى لنفس الحشرة و المسجلة سابقا في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI).

يُعتبر التشخيص الدقيق للحشرات و التي منها الناقلة للفايروسات النباتية كحشرة الذباب الابيض (*B. tabaci*) من الحاجات الملحة من اجل الوصول الى طريقة كفوة في ادارة الآفة و بالتالي تقليل او منع الضرر الاقتصادي (11). اسهم تحليل جين Mitochondrial cytochrome oxidase I (mtCOI) في مجاميع عالمية مختلفة من حشرة الذباب الابيض (*B. tabaci*) الى فهم كبير للتباين الوراثي بين الانواع المعقدة لحشرات الذباب الابيض (*B. tabaci*) (8)(5)(15). في دراسة اجريت من قبل Rocha , وآخرون (27) وجدوا بأن النمط الوراثي B (Biotype B) لحشرات الذباب الابيض (*B. tabaci*) كان النمط الوراثي الوحيد في مزارع الطماطة و الفلفل و الخيار و القرع و الهانة و الباذنجان. يتميز هذا النمط الوراثي بقابليته العالية في التكاث و الانتشار مقارنة بالأنماط الوراثية الاخرى (10). بالإضافة الى التأثيرات السلبية لحشرات الذباب الابيض (Biotype B) الناتجة عن التغذية المباشرة للحشرة على النبات فأنها تلعب دورا في نقل العديد من الفايروسات المنتمية الى مجموعة Geminiviruses و منها فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV) (9)(14) (22). وجد من خلال دراسات سابقة بأن النمط الوراثي B (Biotype B) لحشرة الذباب الابيض (*B. tabaci*) هو النمط الاكثر سيادة و كفاءة في نقل فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV) (25).

References:

1. Accotto, G.P.; Navas-Castillo, J.; Noris, E.; and Moriones, E. L. D. (2000) Typing of tomato yellow leaf curl viruses in Europe. *European Journal Plant Pathology*, 106:179-186.
2. Ajlan, A. M.; Ghanim, G. M. and Abdul Salam, K. S. (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.
3. Alemu, K. (2015) Detection of diseases, identification and diversity of viruses: A Review. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 5 (1): 204-213.
4. Al-Hiti, I. A.; and Abdullah, N. A. (1998) Protected plant pests and the feasibility of dyeing integration in their resistance. *Iraqi Agriculture Series*, (1): 26-30
5. Alhudaib, K.A.; Adel, A .R.; Babiker, M.A. and Ahmed M.S.(2014) Molecular Identification of the biotype of whitefly (*Bemisia tabaci*) inhabiting the eastern region of Saudi Arabia. *Journal of Biological Sciences*, 14(8). 494-500.
6. Al-Samarrai, I. K .(1998) Phenomenon of yellowing iron and its impact on the decline in productivity in agricultural crops. *Iraqi Agriculture Journal*, (1): 14-16.
7. Barone, A. and Frusciante, L. (2007) Molecular marker-assisted selection for resistance to pathogens in tomato, Marker-Assisted Selection, Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish:153-164.
8. Bosco, D.; Loria, A.; Sartor, C.; Cenis, J.L. (2006) PCR-RFLP identification of *Bemisia tabaci* biotypes in the Mediterranean basin. *Phytoparasitica* 34:243–251.
9. Brown, J.K.; Bird, J. (1992) Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basis. *Plant Dis*, 76:220–225.
10. Brown, J.K. (1994) The status of *Bemisia tabaci* (Genn.) as a pest and vector in world agroecosystems *FAO Plant Prot. Bull.* 42:3–32.
11. Brown, J.K. (2000) Molecular markers for the identification and global tracking of whitefly vector *Begomovirus* complexes. *Virus Res*, 71:233–260.
12. Cai, H.; Caswell, J. and Prescott, J. (2014) Non culture molecular techniques for diagnosis of bacterial disease in animals a diagnostic laboratory perspective. *Journal of Veterinary Pathology*, 51: 341–350.11111111
13. Chika-Ali, M.; Maoka, T. and Natsuaki, K. T. (2008) The occurrence of potato viruses in Syria and the molecular detection and characterization of Syrian *Potato virus S* isolates. *Potato Research*, 51: 151- 161.

14. **Czosnek, H.; Brown, J.(2010)** The whitefly genome-white paper: proposal to sequence multiple genomes of *Bemisia tabaci*. In: Stansly PA, Naranjo SE (eds.) *Bemisia: bionomics and management of a global pest*. 540 ages. *Springer, Dordrecht, The Netherlands*, pp 503–532.
15. **Dinsdale, A.; Cook, L.; Riginos, C.; Buckley, Y.M.; De Barro, P. (2010)** Refined global analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) mitochondrial cytochrome oxidase 1 to identify species level genetic boundaries. *Ann Entomol Soc Am*, 103:196– 208. [doi:10.1603/AN09061](https://doi.org/10.1603/AN09061).
16. **El-DougDoug, K.h. A.; Gomaa, H.H.A. and El-Maaty, S.A. (2006)** The impact of interference between tomato yellow plants. *Journal of Applied Sciences Research*, 2(12):1151-1155.
17. **EPPO.(2005)** Tomato yellow leaf curl and Tomato mottle *Begomovirus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 35: 319-325.
18. **FAOSTAT Database. (2017)** Tomato world production statistics http://www.growtomatoes.com/world_production_statistic_s.htm. [accessed on 2 August 2017].
19. **Ghanim, M.; Morin, S. and Czosnek, H. (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.
20. **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.
21. **Girhepuje, P.V. and Shinde, G. B. (2011)** Transgenic tomato plants expressing a wheat endochitinase gene demonstrate enhanced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 105: 243–251.
22. **Idris, A.M. and J.K. Brown.(2005)** Evidence for interspecific-recombination for three monopartite begomoviral genomes associated with the tomato leaf curl disease from central Sudan. *Archives of Virology*, 150: 1003–1012.
23. **Lin Y.; Druffel, K. L.; Whitworth, J.; Pavek, M. J. and Pappu, H. R. (2009)** Molecular characterization of two *Potato virus S* isolates from late-blight resistant genotypes of potato (*Solanum tyberosum*). *Archives of Virology*, 154: 1861- 1863.
24. **Matlub, A.N.; Ezzedine, S. M. and Karim, S. A. (1989)** Vegetable production, Part II, Directorate of the House of Books for Printing and Publishing, University of Mosul.
25. **Morris, J.; Steel, E.; Smith, P.; Boonham, N.; Spence, N.; Barker, I. (2006)** Host range studies for tomato chlorosis virus and cucumber vein

yellowing virus transmitted by *Bemisia tabaci* (Gennadius). *European Journal Plant Pathology*, 114: 265-273.

26. 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.
27. Rocha,K.C.G.;Julio,M.M.;Jesús,N.C.;Valdir,A.Y.;Carlos,F.W.;Marcelo, A.P.; and Renate,K.S. (2011) Only the B biotype of *Bemisia tabaci* is present on vegetables in São Paulo State, Brazil. *Science Agriculture (Piracicaba, Braz.)*, v.68, n.1, p.120-123.
28. 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.
29. Shafiq, H. L. (1983) Studies on the diagnosis and resistance of the virus wrinkling and yellowing of tomato leaves in green houses. Master Thesis, Faculty of Agriculture, University of Baghdad.
30. 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.