

## تشخيص ثلاث سلالات جديدة تابعة لفيروس تجعد واصفرار أوراق الطماطم/البندورة (*Tomato yellow leaf curl virus*) في العراق

عقيل نزال العابدي<sup>1</sup> مالك حسن كريم<sup>2</sup> و كرار عبد الزهرة الاسدي<sup>1</sup>

(1) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة كربلاء، العراق، البريد الإلكتروني: alabedyaqeel0@gmail.com

(2) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة المثنى، العراق.

### الملخص

العابدي، عقيل نزال، مالك حسن كريم و كرار عبد الزهرة الأسدي. 2019. عزل وتشخيص ثلاث سلالات جديدة تابعة لفيروس تجعد واصفرار أوراق الطماطم/البندورة (*Tomato yellow leaf curl virus*). مجلة وقاية النبات العربية، 37(3): 223-231.

هدفت هذه الدراسة إلى تشخيص بعض عزلات فيروس اصفرار وتجعد أوراق الطماطم/البندورة (*Tomato yellow leaf curl virus*، TYLCV)، جنس *Begomovirus*، عائلة (*Geminiviridae*) التي جمعت من بعض المحافظات العراقية (النجف، بابل والمثنى) من خلال استخدام تفاعل المتسلسل للبوليمراز وتحديد تسلسل التتابع النيوكليوتيدي لحزم الحمض النووي المضاعف. أثبت من خلال مقارنة التتابع النيوكليوتيدي للسلالات الفيروسية وباستخدام برنامج BLAST بأن العزلات الفيروسية في هذه الدراسة هي سلالات جديدة غير مسجلة سابقاً في قاعدة بيانات المركز الأمريكي لمعلومات التقنية الحيوية، حيث سجلت السلالات الفيروسية الثلاثة تحت الأسماء A3MA، A5MA و A6MA وتحت أرقام الإدخال KT961704، KT961705 و KT961706. تبين أن هذه السلالات تتشابه بنسبة بلغت 99% مع عزلة فيروس اصفرار وتجعد أوراق الطماطم/البندورة (TYLCV) العراقية (GenBank Accession Number: 354991.1). كما أظهرت هذه السلالات نسبة تشابه فيما بينها بلغت 99%.

كلمات مفتاحية: TYLCV، PCR، تشخيص، العراق.

### المقدمة

الأمراض طول السنة. ومن هذه الأمراض مرض اصفرار وتجعد أوراق الطماطم/البندورة المتسبب عن فيروس اصفرار وتجعد أوراق الطماطم/البندورة (*Tomato yellow leaf curl virus*، TYLCV)، جنس *Begomovirus*، عائلة (*Geminiviridae*) (Cai et al., 2014)؛ Hosseinzadeh & Garivani, 2014). يعد فيروس اصفرار وتجعد أوراق الطماطم/البندورة من الفيروسات الأكثر انتشاراً في دول العالم ومنها العراق مسببا خسائر اقتصادية قد تصل إلى 100% في كثير من المحاصيل الاستراتيجية ومنها محصول الطماطم/البندورة الذي يعد العائل الرئيس للفيروس (غالي وآخرون، 1997). كما يصيب الفيروس عوائل نباتية أخرى مثل الباذنجان، البطاطا/البطاطس، التبغ والفاصولياء فضلاً عن إصابته لكثير من نباتات الأدغال/الأعشاب ونباتات الزينة (الهيبي والعاني، 1998؛ السامرائي، 1998).

ينتقل فيروس اصفرار وتجعد أوراق الطماطم/البندورة بكفاءة عالية بوساطة حشرة الذبابة البيضاء (*Bemisia tabaci*) بطريقة باقية دورانية غير تكاثرية (Al-Abedy et al., 2018؛ Giovanni et al., 2004؛ Segbefia et al., 2015). لفيروس اصفرار وتجعد أوراق الطماطم/البندورة مدى عوائل واسع يصل إلى 32 نوع نباتي عائدة إلى 13 عائلة نباتية (Barone et al., 2007). تظهر أعراض المرض بهيئة

يعد محصول الطماطم/البندورة (*Solanum lycopersicom L.*) واحداً من محاصيل الخضار المهمة الذي يحتل المرتبة الأولى من بين محاصيل الخضار في كثير من بلدان العالم ومنها العراق لأهميته الاقتصادية والغذائية. نظراً لتلك الأهمية انتشرت زراعته في عموم القطر مع تميز مناطق متخصصة في إنتاجه مثل البصرة وذي قار والنجف وكربلاء وديالى وصلاح الدين ونيوى وكركوك (غالي وآخرون، 1997). وقد زاد الاهتمام في إنتاج محصول الطماطم في غير موسم باستخدام تقانات الزراعة المحمية في القطر والتي تتفاوت من البسيطة منها في الزراعة تحت الانفاق والمعقدة منها بالزراعة في الدفيئات البلاستيكية والزجاجية المجهزة بمنظومات السيطرة الحديثة منذ سبعينيات القرن الماضي (الهيبي والعاني، 1998).

إن التوسع في زراعة المحصول في الدفيئات الزجاجية والبلاستيكية أدى إلى ظهور كثير من الأمراض المهددة لإنتاج هذا المحصول نتيجة لتوافر الظروف المناسبة لانتشار وتطور تلك

البلاستيكية التابعة لكلية الزراعة، جامعة كربلاء. بعدها وضعت تلك النباتات بشكل منفصل وحسب منطقة الجمع في صناديق خشبية أبعادها 60×50×50 سم مغطاة بقماش الململ لغرض تمييزها دون حصول خلط بين عزلات الفيروس.

**جدول 1.** مناطق الجمع لعزلات فيروس اصفرار وتجعد أوراق الطماطم/البندورة (TYLCV).

**Table 1.** Locations where *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) isolates were collected from.

اسم العزلة	مكان الجمع	Isolate code
A3MA	بساتين السماوة الغربية، السماوة، محافظة المثنى. Western Samawah orchards, Samawah, Al-Muthanna province	
A5MA	مزارع منطقة علي بن الحسين، ناحية جبلة، محافظة بابل. Ali bin Al Hussein farms, Agbalah district, Babylon province	
A6MA	مزارع المنطقة الصحراوية، الحيدرية، محافظة النجف. Farms of the desert region, Al-Haidariyah, Najaf Governorate	

#### تهيئة النباتات وإحداث الإصابة

تم اختبار صنفين Super Marmande و Moneymaker من نبات الطماطم/البندورة للإصابة بفيروس اصفرار وتجعد أوراق الطماطم بهدف تحديد الأعراض المرضية الناتجة عن الإصابة بسلاسل الفيروس المعزولة في هذه الدراسة. زرعت بذور الطماطم لكل صنف وبشكل منفصل في أطباق فلين حاوية على بتموس وبعد مرور 15 يوماً من الانبات فردت النباتات وزرع كل منها بشكل منفرد في أصص بلاستيكية أبعادها 11×13 سم. أجريت عملية التلقيح بالفيروس لنباتات الطماطم/البندورة (بعمر 2-3 أوراق حقيقية) بواسطة حشرات الذباب الأبيض وفق طريقة العمل الموصوفة لاحقاً.

#### نقل الفيروس بواسطة حشرة الذبابة البيضاء (*B. tabaci*)

جمع عدد من بالغات حشرات الذبابة البيضاء من حقول البانجان التابعة لكلية الزراعة، جامعة كربلاء بواسطة شافطة يدوية وتم تمييزها على نباتات بانجان (صنف برشلونة) سليمة موضوعة في قفص خشبي أبعاده 50×50×120 سم وذات قاعدة خشبية وجوانبه الخمسة الأخرى مغطاة بطبقتين من قماش الململ لمنع دخول أو خروج الحشرات من الصندوق. تم التأكد من خلو حشرات الذباب الأبيض بين فترة وأخرى من الفيروس عن طريق وضع نباتات طماطم سليمة (صنف Super Marmande) في الصناديق الحاوية على نباتات

اصفرار حواف الأوراق والتفافها نحو الداخل مع تجعد وتقرم شديد إضافة إلى انخفاض نسبة عقد الأزهار وتساقطها مؤدياً ذلك إلى خفض الإنتاجية.

هناك العديد من التقنيات التي تستخدم في تشخيص فيروسات النبات ومنها تقنية تفاعل البوليمراز المتسلسل (PCR) وذلك بمضاعفة الحمض النووي (DNA) من تراكيز منخفضة جداً ولمنطقة محددة من مجين/جينوم الكائن الحي إلى الملايين من النسخ التي تحمل مواصفات النسخة الأصلية نفسها (Christopher *et al.*, 2010). استغلّت هذه التقنية في تشخيص العديد من الكائنات الحية، منها فيروسات النبات.

هدفت هذه الدراسة إلى عزل وتشخيص فيروس اصفرار وتجعد أوراق الطماطم/البندورة من بعض المحافظات العراقية (النجف، بابل والمثنى) ومعرفة وجود سلالات من هذا الفيروس وذلك بتحديد التتابع النيوكليوتيدي للعزلات المأخوذة وبالتالي معرفة نسب التشابه والاختلاف الوراثي فيما بين السلالات المعزولة والسلالات المعروفة عالمياً.

#### مواد البحث وطرائقه

##### مصدر الفيروس

جمعت بعض نباتات الطماطم/البندورة التي ظهرت عليها أعراض مرضية متمثلة بتجعد والتفاف الأوراق مع اصفرار حوافها إضافة إلى اختزال في حجم النبات، من بعض مزارع الطماطم/البندورة الواقعة في محافظات النجف، بابل والمثنى (جدول 1). لوحظ أن نباتات الطماطم/البندورة المصابة بعزلة الفيروس A5MA والمزروعة في إحدى مزارع ناحية جبلة في محافظة بابل تميزت بأعراض مرضية تمثلت بتجعد والتفاف شديد في الأوراق مع تقرم واضح للنبات إضافة إلى قلة عدد الأزهار وانخفاض كبير في نسبة عقدها مع اختزال واضح في حجم الثمار الناتجة. كما أظهرت نباتات الطماطم/البندورة المصابة بعزلة الفيروس A3MA والمزروعة في بعض مزارع بساتين السماوة الغربية في محافظة السماوة أعراض مرضية بهيئة تقرم والتفاف الأوراق مع قلة عدد الأزهار والثمار المتكونة. كما لوحظ أن أعراض نباتات الطماطم المصابة بعزلة الفيروس A6MA والتي كانت مزروعة في إحدى مزارع المنطقة الصحراوية الواقعة في محافظة النجف كانت أقل شدة من الأعراض المرضية المتسببة عن العزلات الفيروسية A3MA وA5MA. ظهرت الأعراض بشكل تقرم بسيط واصفرار والتفاف الأوراق العلوية مع ملاحظة الحجم الطبيعي للثمار المتكونة إلا أنها قليلة العدد.

نقل عدد من تلك النباتات (4-5) وزرعت بشكل منفرد في صناديق بلاستيكية أبعادها 50×25 سم، ثم نقلت إلى الدفيئة

البانجان نفسها وحشرات الذبابة البيضاء. كما تم استبدال نباتات البانجان القديمة بنباتات أخرى حديثة النمو كل 2-3 أسابيع.

نقل حوالي 300 حشرة بالغه من حشرات الذباب الأبيض غير الحاملة للفيروس المرية سابقاً على نباتات البانجان، إلى نباتات الطماطم/البندورة المأخوذة من مناطق جمع العينات (المثى وبابل والنجف) (جدول 1) والمصابة بالفيروس والموضوع كل منها بشكل منفصل في صندوق خشبي مغطى بقماش الململ. أعطيت الحشرات فترة تغذية لمدة 48 ساعة، بعدها تم تلقيح نباتات طماطم بعمر 2-3 أوراق حقيقية وبمعدل 15 حشرة/نبات والموضوعة في صناديق خشبية كل منها يحتوي على ستة نباتات. تركت الحشرات الحاملة للفيروس على نباتات الإختبار لمدة 48 ساعة لغرض إتمام عملية إلقاح الفيروس. بعدها رشت جميع النباتات بالمبيد الكيماوي غاوشو/اميجارد (Imidacloprid) وتم نقلها بعد حوالي ساعتين إلى بيت ابعاده 5×4×2.5 م مصنوع من طبقتين من قماش الململ وموجود داخل الدفيئة البلاستيكية. نفذت معاملة مقارنة باتباع الخطوات السابقة نفس باستثناء تغذية الحشرات على نبات طماطم/البندورة سليمة. تم متابعة النباتات بشكل يومي لتسجيل بداية ظهور وتطور الأعراض المرضية الناتجة من الإصابة بالفيروس.

#### استخلاص الحامض النووي (DNA) الكلي من النبات

استخلص الحامض النووي باستخدام العدة (FAPGK Cat. No: 001) المجهزة من قبل شركة فافورجين (Favorgen)، تايوان وحسب الخطوات الموصوفة من قبل الشركة المصنعة.

#### استخدام تقنيه تفاعل البوليمراز المتسلسل (PCR)

اجري اختبار تفاعل البوليمراز المتسلسل باستخدام العدة (PCR PreMix, Cat. No. K) (2012) المجهزة من قبل شركة Bioneer الكورية المنشأ. نفذ تفاعل متسلسل للبوليمراز بحجم 20 مايكروليتر حاوية على 1 مايكروليتر من كلٍ من البادئ الأمامي والخلفي (10 pomol) (-ACGTAGGTCCTTGACATCTGTTGAGCTCTYv2337-F و (TYc138-R-AAGTGGGTCCACATATTGCAAGAC) و 1 مايكروليتر من الحمض النووي (30 نانوجرام/ميكروليتر). بعد وضع جميع المكونات المطلوبة للتفاعل في الأنبوبة المجهزة من قبل الشركة المصنعة وإكمال الحجم بالماء الخالي من النيوكلياز إلى 20 مايكروليتر.

تم مضاعفة الحمض النووي لعزلات الفيروس المختلفة باستخدام خطوات وظروف تفاعل البوليمراز المتسلسل (PCR) الآتية: عملية مسخ أولي (Initial denaturation) للحامض النووي (DNA) لمدة 5

دقائق عند حرارة 98 °س متبوعة بـ 35 دورة مؤلفة من عملية مسخ نهائي (Final denaturation) لمدة 40 ثانية عند 94 °س، ارتباط البادئات (Primer annealing) لمدة 30 ثانية في حرارة 58 °س ومن ثم استطالة اولية (Initial elongation) لنتاج الحامض النووي المضاعف لمدة دقيقة عند 72 °س وأخيراً إنهاء التفاعل بخطوة الاستطالة النهائية (Final elongation) عند حرارة 72 °س.

#### الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الأجاروز

حضرت طبقة هلام الأجاروز بعد أخذ وزن 1g من الأجاروز وإذابته في 100 مل من المحلول الدائري Tris-boric acid EDTA (TBE) buffer ولحين تحول الخليط إلى محلول رائق. أضيف 5 مايكروليتر من صبغة بروميد الإثديوم بعد خفض درجة حرارة المحلول إلى 40-45 °س. جهز القالب الخاص بصب الأجاروز والحاوي على مشط خاص في إحدى نهاياته لعمل حفر داخل طبقة الهلام، ثم صب محلول الأجاروز المذاب والحاوي على صبغة بروميد الإثديوم وترك ليتصلب عند درجة حرارة الغرفة. وبعد اكتمال تصلب طبقة هلام الأجار ورفع المشط بحذر أعيد القالب إلى مكانه في جهاز الترحيل، أضيف محلول TBE IX إلى حوض الترحيل (Electrophoresis tank) بعد تصلب هلام الأكاروز مغطياً طبقة الهلام بارتفاع 1 سم تقريباً.

أضيف 10 ميكروليتر من الـ DNA المضاعف بوساطة تفاعل البوليمراز المتسلسل إلى كل حفرة من حفر طبقة هلام الأجاروز. كما تم إضافة 5 مايكروليترات من المعلم الجزيئي للحامض النووي (1 Kbp DNA ladder marker) القياسي إلى الحفرة الموجودة في الجانب الأيسر من القالب لغرض تحديد أحجام الحمض النووي المضاعف. أوصلت أقطاب الجهاز بالتيار الكهربائي وشغل جهاز الطاقة على 100 فولت لمدة 140 دقيقة. بعد اكمال عملية ترحيل العينات، فحصت طبقة هلام الأجاروز الحاوية على حزم الحامض النووي تحت الأشعة فوق البنفسجية وأخذت صور لها (شكل 1).

#### تحديد تسلسل القواعد النيتروجينية للحمض النووي (DNA) لعزلات

##### فيروس اصفرار وتجعد أوراق الطماطم/البندورة

بعد تشخيص الفيروس باستخدام تفاعل البوليمراز المتسلسل (PCR) وملاحظة تضاعف حزم الحمض النووي وبالحجم المتوقع (643 زوج قاعدي)، ارسلت نواتج التفاعل مع البادئات الأمامية والخلفية التي استخدمت لمضاعفة حزمة الحمض النووي الفيروسي إلى شركة Macrogen الكورية لغرض تحديد تسلسل القواعد النيتروجينية لحزم الحمض النووي الفيروسي المضاعفة.

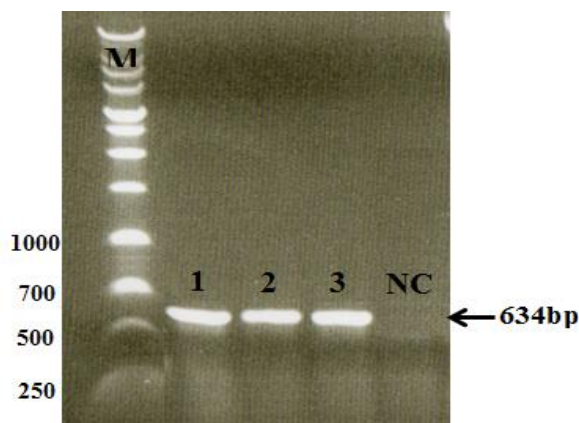
واضحاً فيما بينها وبين السلالات العائدة للفيروس نفسه والمسجلة سابقاً في قاعدة البيانات المتوفرة في المركز الأمريكي لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI). أعطيت كل عزلة فيروسية رمزاً خاص بها للتمييز وكما هو موضح في جدول 1. تم تسجيل جميع التتابعات تحت أرقام ادخال (GenBank Accession numbers) والمبينة في جدول 2.

أثبتت نتائج التحليل أن نسب التشابه لكل من السلالات الفيروسية A3MA، A5MA و A6MA بلغت 99% مع عزلة فيروس اصفرار وتجعد أوراق الطماطم/البندورة العراقية (354991.1) المعزولة سابقاً من إحدى مزارع محافظة بغداد والمشخصة عام 2013 في جامعة ريديغ، المملكة المتحدة. كما أظهرت السلالات المعزولة في هذه الدراسة نسب تشابه فيما بينها بلغت 99% (جدول 2).

تبين نسب التشابه أن السلالات الفيروسية A3MA، A5MA و A6MA هي سلالات جديدة غير مسجلة سابقاً في المركز الأمريكي لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI)، إذ بينت شجرة التحليل الوراثي ظهور السلالات الثلاث في المجموعة نفسها (Clade) التي ظهرت بها عزلة فيروس TYLCV العراقية (354991.1) ولكن بتفرع منفصل عنها (الأشكال 2، 3، 4). يتضح مما تقدم وجود تغير وراثي واضح بين عزلات الفيروس TYLCV باختلاف مناطق العزل وهذا يتفق مع ما ذكره Hosseinzadeh & Garivani (2014) بوجود تماثل في التتابع النيوكليوتيدي تراوح ما بين 97.3 و 99.9% لخمسة سلالات تابعة لفيروس TYLCV والمعزولة من مدينته بجنود في محافظة خراسان، شمال إيران.

#### الأعراض المرضية الناتجة عن الإصابة بالسلالات الفيروسية المعزولة في هذه الدراسة

أظهرت نتائج إلقاء صنفين مختلفين من نباتات الطماطم/البندورة بوساطة حشرات الذباب الأبيض الحاملة لسلالات فيروس TYLCV وبشكل منفرد، إن لتلك السلالات تأثيرات مختلفة بالنسبة إلى وقت ظهور الأعراض المرضية وكذلك عند إلقاء نوع سوبر مارموند (Super Marmande) بسلالة الفيروس A5MA، ظهور أعراض مرضية بعد مرور 13 يوماً من الإلقاء مثل اصفرار والتفاف حواف الأوراق العلوية للنبات والتي تطور فيما بعد لتشمل جميع وريقات النبات مع ملاحظة تلون اصفر واضح ما بين عروق الوريقات، إضافة إلى قصر السلايميات وتقزم النبات واختزال في حجم وعدد وريقات النبات. يرافق كل ذلك تأثير سلبي في تزهير وتساقط أهار النبات المصاب مقارنة بالنباتات غير المصابة. كما لوحظ أن الأعراض المرضية الناتجة عن الإصابة بهذه السلالة الفيروسية (A5MA) كانت أكثر شدة من تلك الناتجة عن الإصابة بالسلالتين A3MA و A6MA (شكل 5). كما أظهرت نباتات الطماطم/البندورة الملقحة بسلالة الفيروس A3MA وبعد



**شكل 1.** نواتج الحامض النووي (DNA) المضاعفة بوساطة تفاعل البوليمراز المتسلسل (PCR) من عزلات فيروس اصفرار وتجعد أوراق الطماطم/البندورة (TYLCV) المعزولة من محافظات النجف (1)، بابل (2) والمثنى (3). M = سلم الوزن الجزيئي؛ NC = شاهد سلبي (بدون إضافة DNA).

**Figure 1.** PCR amplified products from *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) isolates obtained from Najaf (1), Babylon (2), and Muthanna (3) provinces. M= 1k bp molecular ladder, NC= Negative control (no DNA template added).

لمعرفة درجة التشابه والاختلاف في التتابعات النيوكليوتيدية للأحماض النووية للسلالات الفيروسية، أدخل تسلسل الحمض النووي لكل عزلة مأخوذة من المحافظات المختلفة (نجف، بابل والمثنى) في قاعدة البيانات المتوفرة في المركز الأمريكي لمعلومات التقنية الحيوية (National Center for Biotechnology Information, NCBI) باستخدام برنامج BLAST (Zheng *et al.*, 2000).

تم رسم شجرة تحليل النسب الوراثي (Phylogenetic neighbor-joining tree) باستخدام برنامج MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013) لمقارنة التتابع النيوكليوتيدي للسلالات الفيروسية المعزولة في هذه الدراسة مع ما هو متوفر من السلالات الأخرى العائدة للفيروس نفسه والمشخصة عالمياً في قاعدة البيانات المتوفرة.

#### النتائج والمناقشة

**مضاعفة نواتج الحامض النووي (DNA) بوساطة تفاعل البوليمراز المتسلسل (PCR) وتحديد تسلسل القواعد النيوكليوتيدية**  
بينت نتائج تفاعل البوليمراز المتسلسل مع استخدام البادئات TYc138 و TYv2337 مضاعفة الحمض النووي الفيروسي وبالجم المتوقع (634 زوج قاعدي) المطابق لفيروس اصفرار وتجعد أوراق الطماطم/البندورة (شكل 1). كما بينت نتائج تحليل تسلسل القواعد النيوكليوتيدية لحزم الحامض النووي (DNA) المضاعفة من عزلات اصفرار وتجعد أوراق الطماطم باستعمال برنامج BLAST اختلافاً

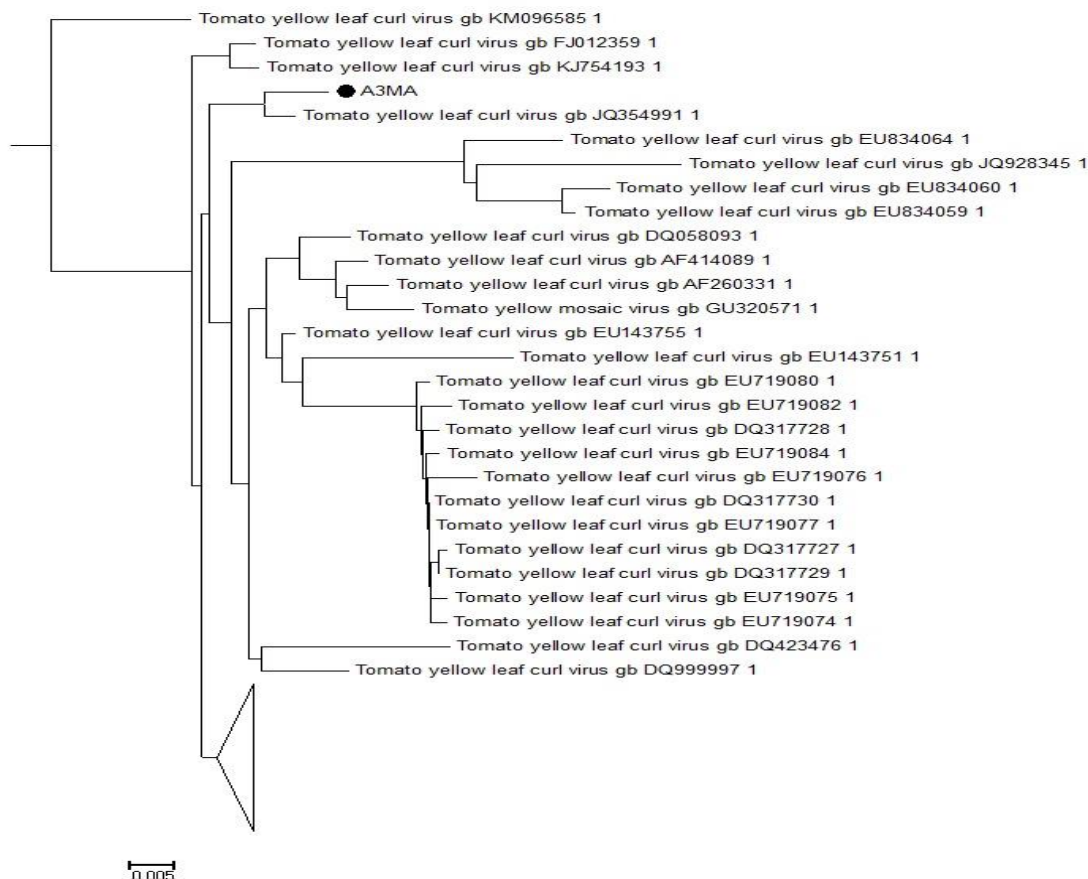
أدى إلى ظهور أعراض مرضية بعد مرور 22 يوماً من الإلحاق مثل اصفرار واضح بين عروق الأوراق العلوية للنبات مع ظهور الأعراض نفسها وبشدة أقل في الأوراق الوسطية والسفلية للنبات نفسه مع ملاحظة صغر حجم الوريقات وقصر السلاميات وتقرم النبات (شكل 5).

مرور 18 يوماً من الإلحاق أعراض مرضية مثل التقاف حواف الأوراق القمية والتي تتقدم مع الوقت لتشمل جميع أوراق النبات، مع تقرم النباتات المصابة وقلة عدد الأزهار الناتجة مع تساقطها قبل مرحلة العقد مقارنة بالنباتات غير المصابة. بينت النتائج أيضاً أن إلحاق نباتات الطماطم/البندورة صنف سوبر مارموند بسلالة الفيروس A6MA

**جدول 2.** ملخص تحليل التتابعات النيوكليوتيدية لسلاسلات فيروس اصفرار وتجعد أوراق الطماطم/البندورة (TYLCV) المعزولة من محافظات النجف وبابل والموثني.

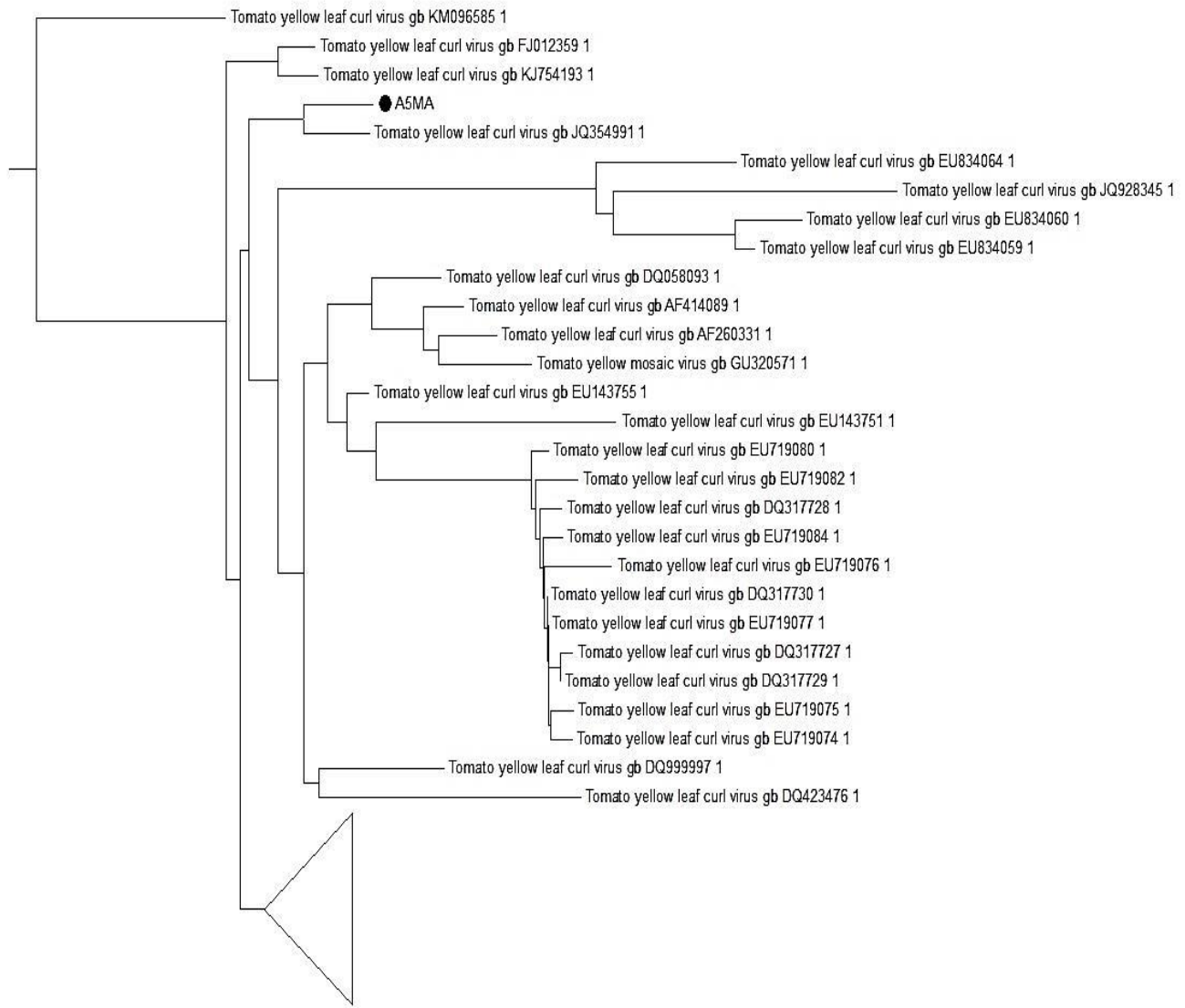
**Table 2.** Summary of nucleotide sequences analysis of TYLCV isolates from Najaf, Babylon, and Muthanna provinces.

رقم الإدخال المخصص من الـ NCBI Accession No. assigned by NCBI	تشابه القواعد Sequence base similarity	العزلة الأقرب (رقم الإدخال) Nearest isolate [Accession No.]	التشابه (%) Similarity (%)	رقم العزلة Isolate code
KT961704	455/460	TYLCV [JQ354991.1]	99	A3MA
KT961705	444/449	TYLCV [JQ354991.1]	99	A5MA
KT961706	444/449	TYLCV [JQ354991.1]	99	A6MA



**شكل 2.** شجرة التحليل الوراثي (Neighbor-joining tree) تبين علاقة سلالة فيروس اصفرار وتجعد أوراق الطماطم/البندورة (TYLCV) (ذات علامة •) المعزولة من بعض مزارع الطماطم في بساتين السماوة الغربية، محافظة المثنى، مع عزلات الفيروس نفسه المسجلة سابقاً في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI).

**Figure 2.** Phylogenetic analysis (Neighborhood-joining tree) showing the relationship of TYLCV (indicated as •) isolated from some tomato farms in the western Samawah orchards, Muthanna province, with the other TYLCV isolates previously registered in NCBI.

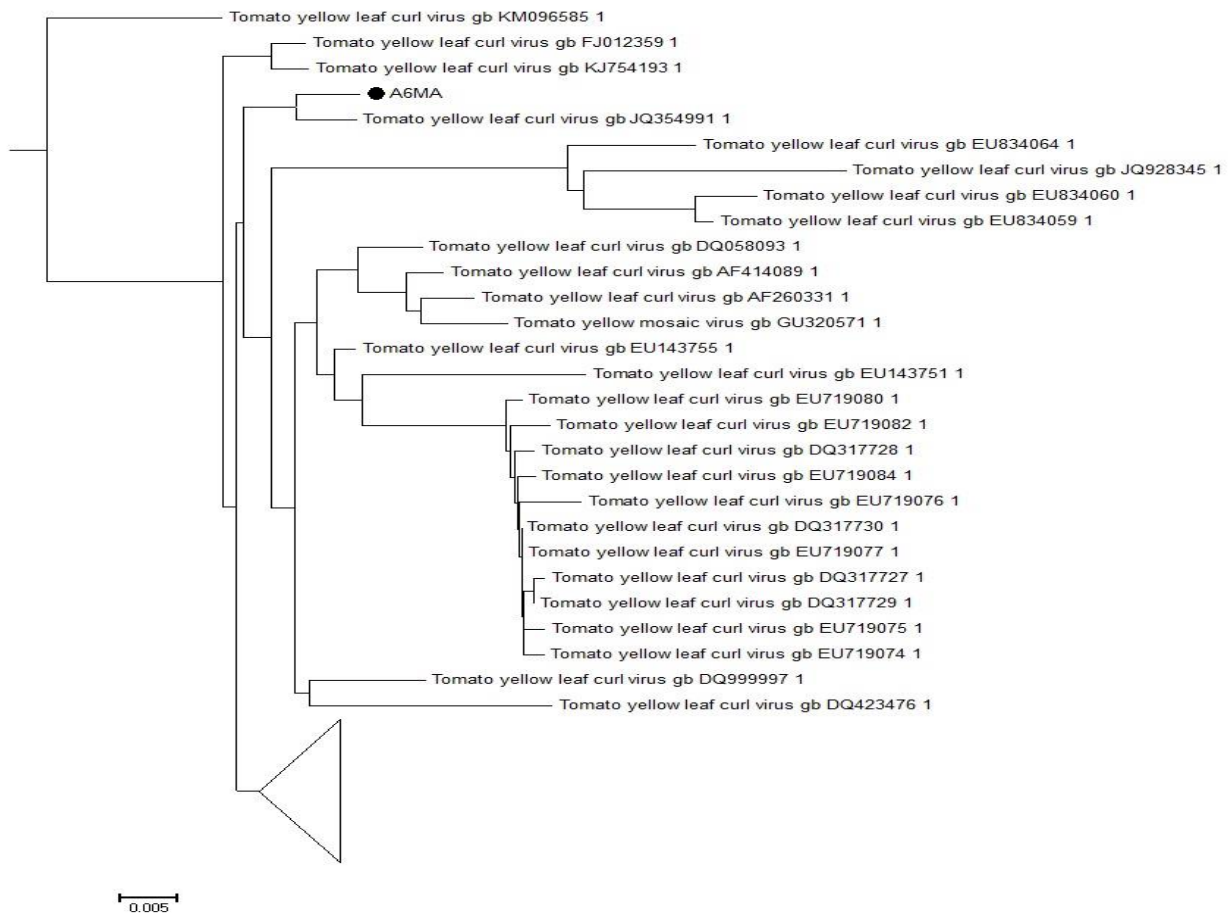


شكل 3. شجرة التحليل الوراثي تبين علاقة سلالة فيروس اصفرار وتجعد أوراق الطماطم/البندورة (TYLCV) (ذات علامة •) المعزولة من بعض مزارع منطقة علي بن الحسين، ناحية جبلة، محافظة بابل، مع عزلات الفيروس نفسه المسجلة سابقا في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI).

**Figure 3.** Phylogenetic analysis (Neighborhood-joining tree) showing the relationship of TYLCV (marked with •) isolated from some farms in the Ali bin Al Hussein region, Jablah district, Babylon province, with the other TYLCV isolates previously registered in NCBI.

20 يوماً من الإلقاح مثل التفاف حواف الأوراق العلوية والذي تطور فيما بعد ليصبح بشكل أعراض تجعد والتفاف شديد ليشمل كافة وريقات النبات مع ملاحظة تقزم النبات واختزال واضح في عدد الأزهار الناتجة (شكل 6). كما وجد أن تلقيح نباتات أخرى من الصنف المذكور نفسه (Money maker) بسلاطة الفيروس A6MA أدى إلى ظهور أعراض مرضية بعد مرور 15 يوماً من الإلقاح مثل اصفرار ما بين عروق وريقات النبات مع صغر حجم الوريقات وقصر السلاميات وتقزم النبات المصاب (شكل 6). كما وتم تأكيد وجود الفيروس باستخدام تقنية تفاعل البوليمراز المتسلسل (PCR) (شكل 7).

أثبتت سلالة الفيروس A5MA أيضاً بأنها الأكثر ضراوة من السلالتين الأخرتين في شدة ونوعية الأعراض الناتجة على نباتات الطماطم/البندورة صنف Money maker، إذ ظهرت الأعراض المرضية بعد مرور 12 يوماً من الإلقاح على قمة النبات والتي سرعان ما تطورت لتصل إلى معظم أوراق النبات المصاب. كما أظهرت النباتات المصابة قصر السلاميات وتقزماً واضحاً، إضافة إلى قلة عدد الأزهار الناتجة وتساقطها قبل عملية العقد مقارنة بالنباتات غير المصابة (شكل 6). كما أثبتت النتائج أن نباتات الطماطم/البندورة الملقحة بسلاطة الفيروس A3MA أظهرت أعراضاً مرضية بعد مرور



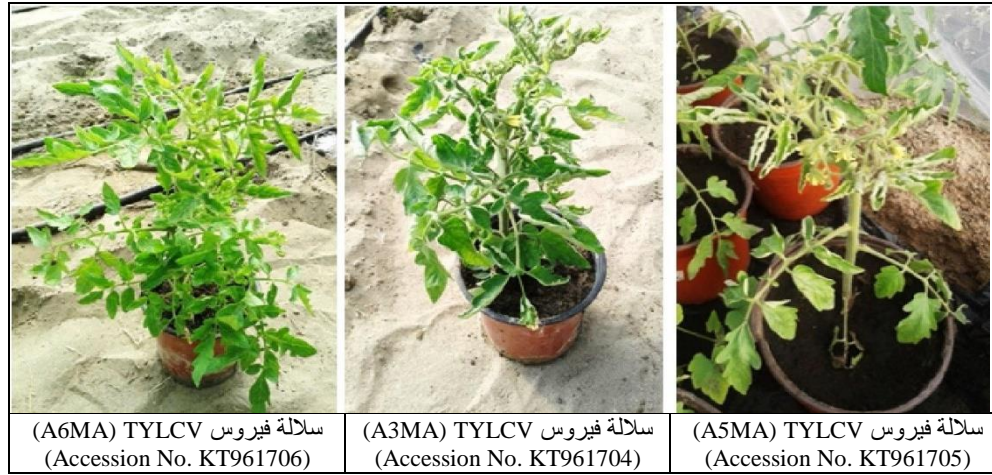
شكل 4. شجرة التحليل الوراثي تبين علاقة سلالة فيروس اصفرار وتجعد أوراق الطماطم/البندورة (TYLCV) (ذات علامة •) المعزولة من بعض مزارع المنطقة الصحراوية، الحيدرية، محافظة النجف، مع عزلات الفيروس نفسه المسجلة سابقاً في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI).

**Figure 4.** Phylogenetic analysis (Neighborhood-joining tree) showing the relationship of TYLCV (marked with •) isolated from some farms in the desert region, AL-Haidariyah, Najaf province, with the other TYLCV isolates previously registered in NCBI.



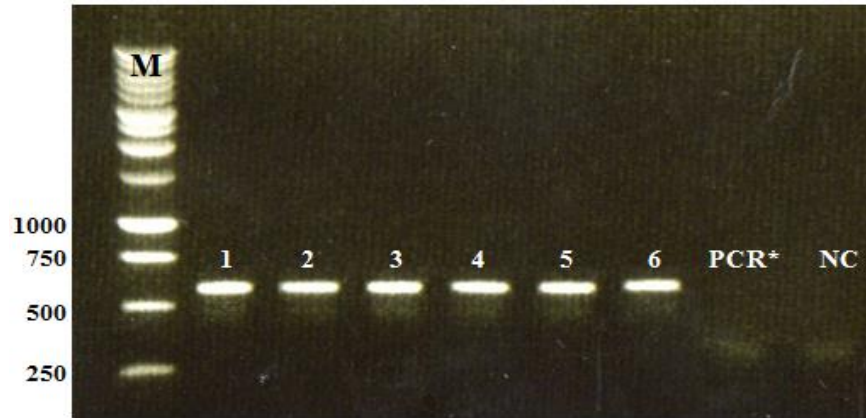
شكل 5. الأعراض المرضية الناتجة عن الإصابة بسلالات فيروس اصفرار وتجعد أوراق الطماطم/البندورة (TYLCV) في صنف الطماطم/البندورة سوبر مارموند بعد 60 يوماً من الإلحاق بالفيروس.

**Figure 5.** Symptoms induced by TYLCV strains on tomato cv. Super Marmande, 60 days after inoculation.



شكل 6. الأعراض المرضية الناتجة عن الإصابة بسلالات فيروس اصفرار وتجعد أوراق الطماطم/البندورة (TYLCV) في صنف الطماطم Moneymaker بعد 60 يوماً من الإلحاق.

Figure 6. Symptoms induced by TYLCV strains on tomato cv. Money maker, 60 days after inoculation.



شكل 7. نواتج الحمض النووي (DNA) لفيروس اصفرار وتجعد أوراق الطماطم/البندورة (TYLCV) المضاعفة بواسطة تفاعل البوليمراز المتسلسل من اصناف الطماطم Super Marmande والمصابة. 1 و 2 و 3 صنف الطماطم Super Marmande المصاب بسلالات الفيروس A3MA و A5MA و A6MA، على التوالي، والعينات 4 و 5 و 6 صنف الطماطم Money maker المصاب بسلالات الفيروس A3MA و A5MA و A6MA، على التوالي. PCR\*= مستخلص من نبات طماطم غير مصاب بفيروس اصفرار وتجعد أوراق الطماطم/البندورة. NC =شاهد مقارنة (بدون اضافة). M =سلم قياسي للوزن الجزيئي للحمض النووي (زوج قاعدي).

Figure 7. DNA products of TYLCV amplified by PCR from the infected Super Marmande and Moneymaker tomato varieties. Lanes 1, 2, and 3 represent samples from Marmande tomato variety infected with TYLCV strains A3MA, A5MA, and A6MA, respectively. PCR\*= DNA extracted from a healthy plant (not infected with TYLCV). NC=Negative control (no DNA template added). M=1Kbp DNA ladder marker.

### Abstract

Al-Abedy, A.N., M.H. Karem and K.A. Al-Asade. 2019. Characterization of three new strains of *Tomato yellow leaf curl virus* in Iraq. *Arab Journal of Plant Protection*, 37(3): 223-231.

This study was conducted to identify and characterize three new strains of *Tomato yellow leaf curl virus* (*Begomovirus*, *Geminiviridae*) from three Iraqi provinces (Najaf, Babylon, and Al-Muthanna) using the polymerase chain reaction (PCR) technique and the nucleotide sequence analysis of amplified DNA. Results showed that the evaluated virus strains were not previously recorded at the USA National Center for Biotechnology Information (NCBI). All three virus strains characterized were registered at NCBI with GenBank accession numbers: KT961704, KT961705 and KT961706. A Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) was applied on all nucleotide sequences obtained from these three virus strains, showed a similarity level of 99% when compared with an Iraqi TYLCV isolate (GenBank accession no.: JQ354991.1). Moreover, it was also found that the similarity level among the three characterized virus strains reached 99%.

**Keywords:** TYLCV, PCR, characterization, Iraq

**Corresponding author:** Aqeel N. Al-Abedy, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Karbala University, Iraq, Email: alabedyaqeel@gmail.com



## References

- Giovanni, C.D., P.D. Orco, A. Bruno, F. Ciccarese, C. Lotti and Ricciardi. 2004. a novel powdery mildew resistance gene (*ol-2*) in tomato. *Plant Science*, 166: 41-48.
- Hosseinzadeh, M. and M. Garivani. 2014. Emerging two distinct groups of the *Tomato yellow leaf curl virus*-severe strain (TYLCV-IL) variants in Iran. *Troika Journal of Sciences*, 2: 149-161.
- Segbefia, M.M., H.M. Amoatey, E.K. Quartey, J.K. Ahiakpa, A.S. Appiah, J. Nunoo and R. Kusi-Adjei. 2015. Detection of TYLCV in ten genotypes of tomato (*Solanum* spp.) using serological and molecular techniques in a coastal savanna zone of Ghana. *Journal of Natural Sciences Research*, 5: 17-24.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biological Evolution*, 30: 2725-2729.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Zheng, L., M. Campbell, J. Murray, S. Lam and J.R. Xu. 2000. The *BMP1* gene is essential for pathogenicity in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13: 724-732.  
<https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.7.724>
- السامرائي، اسماعيل خليل. 1998. ظاهرة الاصفرار الحديدي واثرها في انخفاض الانتاجية في المحاصيل الزراعية. مجلة الزراعة العراقية، 1: 14-16.
- غالي، فائز صاحب وضيء سالم ومحمد سعيد. 1997. تأثير مواعيد زراعة الطماطم إلى اصابتها ببعض الأمراض في البصرة. مجلة البصرة للعلوم الزراعية، 10: 65-76.
- الهييتي، اياد عبد الواحد وعبد الله نجم العاني. 1998. افات المزارع المحمية وجدوى صيغ التكامل في مقاومتها. مجلة الزراعة العراقية، 1: 26-30.
- Al-Abedy, A.N., A.F. Al-Fadhal, W.A. Radi and A.T. Salim. 2018. Molecular identification of *Tomato yellow leaf curl virus* and its whitefly vector (*Bemisia tabaci*). *Journal of Global Pharma Technology*, 10: 924-933.
- Barone, A., L. Frusciantè and J.D. Dargie (eds.). 2007. Molecular marker-assisted selection for resistance to pathogens in tomato. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Cai, H., J.L. Caswell and J.F. Prescott. 2014. Nonculture molecular techniques for diagnosis of bacterial disease in animals: a diagnostic laboratory perspective. *Veterinary Pathology*, 51: 341-350.  
<https://doi.org/10.1177/0300985813511132>.
- Christopher, D.J., T.S. Raj, S.U. Rani and R. Udhayakumar. 2010. Role of defense enzymes activity in tomato as induced by *Trichoderma virens*. *Journal of Biopesticides*, 3: 158-162.

Received: August 25, 2018; Accepted: August 28, 2019

تاريخ الاستلام: 2018/8/25؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2019/8/28