

التشخيص البايولوجي والسيروولوجي و الجزيئي لفايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (*Tomato yellow leaf curl virus*)مالك حسن كريم/ كلية الزراعة- جامعة المثنى  
عقيل نزال بربر /كلية الزراعة- جامعة كربلاء  
فلاح حسن عيسى/ كلية الزراعة- جامعة المثنى

## المستخلص

Article  
Information

Received

Date

12/4/2016

Accepted

Date

25/9/2016

## Keywords

Virus

Curl

Tomato

Leaves

Yellowing

تُدصّ فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (*Tomato yellow leaf curl virus*) المعزول باستعمال بعض النباتات الكاشفة {الطماطة *Solanum lycopersicon*، الداتورا *Datura stramonium*، التبغ *Nicotiana benthamiam*، التبغ صنف *N. tabacum cv. White Burley*، التبغ صنف *N. tabacum cv. Samsun*، التبغ *N. glutinosa*، الفاصوليا *Phaseolus vulgaris*، الباميا *Abelmoschus esculentus*، القطن *Gossypium hirsutum*، المنطاد *Physalis floridana*، الزربيج *Chenopodium amaranticolor*، القرع *Cucurbita pepo*، الخيار *Cucumis sativus*، البطيخ *Cucumis melo*، الباذنجان *Solanum melongena*}. اظهرت نباتات الطماطة المصابة اعراض مرضية بهيئة تجعد و اصفرار الاوراق مع تقزم النبات و تساقط الازهار، كما اعطت نباتات الداتورا هي الاخرى اعراض مرضية مرتبطة بفايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة الذي تم التأكد من وجوده بواسطة اختباري الاليزا و تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR). اوضحت النتائج ايضا عدم ظهور اي نوع من الاعراض المرضية عند تلقح نباتات التبغ نوع *N. glutinosa* و التبغ نوع *N. tabacum var. Samsun* و التبغ نوع *N. benthamiam* و الفاصوليا و الباميا الملقة بفايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة رغم التأكد من وجود فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة بواسطة اختباري الاليزا (ELISA) و تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR). كما اثبت اختباري الاليزا و تفاعل البلمرة المتسلسل بأن نباتات التبغ نوع *N. tabacum var. While Burley* و القطن و المنطاد و الزربيج و القرع و الباذنجان و الخيار و البطيخ غير قابلة للإصابة بهذا الفايروس. بينت دراسة تحليل تسلسل التتابع النيوكليوتيدي (Nucleotide sequence analysis) لعزلة فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV) المعزولة من محافظة المثنى ظهور سلالة جديدة لم تسجل مسبقا في قاعد بيانات المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI). اظهرت العزلة MA4A المعزولة من محافظة المثنى بنفس المجموعة مع عزلة الفايروس TYLCV (JQ354991.1) العراقية و بنسبة تشابه بلغت 99% لكن بتفرع مختلف.

البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الاول

## Biological, Serological and Molecular Characterization of Tomato yellow leaf curl virus

Malik H. Kareem<sup>1</sup>, Agric. College, AlMuthanna Univ.

Aqeel N. Barbar Agric.College, Karbala Univ.

Falah H. Issa<sup>1</sup>, Agric. College, AlMuthanna Univ.

## Abstract

Experiments were carried out during the **growing season of 2014-2015** in the laboratory of Plant Virology and greenhouses, Plant Protection, Faculty of Agriculture, Karbala Univ. Whitefly-mediated inoculation of some indicator plants (*Solanum lycopersicon*, *Datura stramonium*, *Nicotiana benthamiam*, *N. tabacum cv. White Burley*, *N. tabacum cv. Samsun*, *N. glutinosa*, *Phaseolus vulgaris*, *Abelmoschus esculentus*, *Gossypium hirsutu*, *Physalis floridana*, *Chenopodium amaranticolor*, *Cucurbita pepo*, *Cucumis sativus*, *Cucumis melo*, *Solanum melongena*) have been employed to identify the virus under study. Tomato plants infected with virus have shown symptoms of leaf wrinkling and yellowing with the stunting of plants and dropping of flowers. Datura plants have exhibited symptoms associated with the TYLCV that its presence has been confirmed by ELISA and PCR. Inoculation of *N. glutinosa*, *N. tabacum var. Samsun* and *N. benthamiam*, Beans and Okra have not produced any kind of symptoms and the presence of the virus has been detected by ELISA test and PCR. ELISA and PCR-based results have proven that plants of *N. tabacum var. While Burly*, Cotton, Ground cherry, Goosefoots, Squash, Cucumbers, Eggplant and Watermelon are immune to TYLCV. From the Nucleotide sequence analysis of different isolates of TYLCV collected from some provinces Muthanna, new strains of TYLCV have been recorded in the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The isolate A4MA obtained from the desert region farms in Muthanna province have shown 99% similarity to the nearest neighbor TYLCV (JQ354991.1).

Al- Muthanna University All rights reserved

(2015). كذلك استخدمت الاختبارات المصلية (Serological tests) للكشف عن الفيروسات النباتية (Fang و Ramasamy، 2015). تعد هذه الطريقة اقل حساسية و لا تستطيع التفريق بين السلالات المختلفة للفايروس الواحد قياسا بالاختبارات الجزيئية (Molecular tests) و منها تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase chain reaction, PCR) (Henson و French، 1993). اصبح تفاعل البلمرة المتسلسل التقنية الالهة 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 قليلة جدا و لمنطقة محددة من جينوم الكائن الحي الى الملايين من النسخ التي تحمل نفس مواصفات النسخة الاصلية (Cai و آخرون، 2014). هدفت هذه الدراسة الى عزل و تشخيص الفايروس المسبب لتجدد و اصفرار اوراق الطماطة باستخدام بعض النباتات الكاشفة و تحديد طريقة نقل الفايروس اضافة الى استخدام اختباري الاليزا (ELISA) و تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) و كذلك معرفة تسلسل النتابع النيوكليوتيدي (Nucleotide sequence) للفايروس المسبب للمرض.

#### المواد وطرائق العمل Materials and methods

##### مصدر الفايروس (Virus source)

جمعت نباتات طماطة ظهرت عليها اعراض اصابة فايروسيه متمثلة بتجدد و التفاف الاوراق مع تقزم شديد من بعض المزارع الصحراوية الواقعة في محافظة كربلاء المقدسة خلال الموسم الزراعي 2014-2015. زرعت جميع النباتات (التي جمعت من المزارع) في سنادين بلاستيكية ابعادها 21×21 سم و نقلت الى البيت البلاستيكي التابع لكلية الزراعة- جامعة كربلاء بعد وضعها في صناديق خشبية ابعادها 40×40×60 مغطاة بقماش الململ لغرض تنميتها و اجراء بعض التجارب اللاحقة عليها.

##### تشخيص الفايروس (Virus identification)

##### تحديد طريقة نقل الفايروس (Virus transmission)

##### النقل الميكانيكي (Mechanical inoculation)

غطيت نباتات طماطة صنف سوبرماريموند بعمر 3-4 اوراق حقيقة بواسطة جرائد مرطبة بالماء و تركت لمدة 24 ساعة في المختبر بهدف جعل النباتات اكثر حساسية للإصابة الفايروسية (Barbar، 2013). حضر المستخلص النباتي بأخذ 5 غم من

يعد محصول الطماطة (*Solanum lycopersicom* L.) واحدا من محاصيل الخضر المهمة الذي يحتل المرتبة الثانية من حيث الالهية من بين محاصيل الخضر في كثير من بلدان العالم و منها العراق، و تعود تلك الالهية الى احتواء الثمار على العديد من الفيتامينات مثل فيتامين A و C و العناصر المعدنية مثل الحديد و الفسفور، كما انها تستهلك طازجة فضلا عن دخولها في كثير من الصناعات الغذائية (مطلوب و آخرون، 1989؛ Giovanni و آخرون، 2004؛ Christopher و آخرون، 2010). نظرا لتلك الالهية انتشرت زراعته في عموم القطر مع تميز مناطق متخصصة في انتاجيته مثل البصرة و ذي قار و النجف و كربلاء و ديالى و صلاح الدين و نينوى و كركوك (السامرائي، 1998). ان التوسع في زراعة المحصول في البيوت الزجاجية و البلاستيكية في السنوات الماضية ادى الى ظهور كثير من الامراض المحددة لإنتاج هذا المحصول نتيجة لتوفر الظروف المناسبة لانتشار و تطور المرض و من هذه الامراض مرض تجدد و اصفرار اوراق الطماطة المتسبب عن الفايروس *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (Barone و Frusciante، 2007؛ Girhepuje و Shinde، 2011). يعد فايروس تجدد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV) من اكثر الفايروسات انتشارا على محصول الطماطة في العراق مسببا خسائر قد تصل الى 100% و خصوصا عند حدوث الاصابة في المراحل المبكرة لنمو النبات (شفيق، 1983). ينتقل فايروس تجدد و اصفرار اوراق الطماطة بكفاءة عالية بواسطة حشرة الذبابة البيضاء (*Bemisia tabaci*) بطريقة دورانية باقية غير تكاثرية (Persistent, non-propagative circulative manner) (Ghanem و آخرون، 2001؛ Salati و آخرون، 2002؛ Pakkianathan و آخرون، 2015). استخدمت طرائق عديدة لتشخيص الفايروسات النباتية كاستخدام النباتات الكاشفة (Indicator plants) التي تظهر عند تلقحها بفايروس ما اعراض مرضية معينة مثل تجدد الاوراق، موزائيك و تنخر و تشوه الاوراق و التي غالبا لا يعول عليها في تشخيص الفايروسات بسبب تداخلها مع العديد من العوامل البيئية و كذلك مسببات مرضية اخرى قد تعطي نفس الاعراض المرضية، كما ان هناك العديد من الفايروسات النباتية لا تظهر اي اعراض مرضية عند الاصابة (Lin و آخرون، 2009؛ Alemu،

اوراق النباتات المصاب و سحقها في 15 مل من المحلول الفوسفاتي الدارئ (Sörenson phosphate buffer).

اعطيت جميع النباتات المراد تلقحها رشة خفيفة من مادة الكورندم (Corundum) ثم لحت بواسطة قطعة من القطن المغطسة بالمستخلص المحضر سابقا. كما تم تنفيذ معاملة مقارنة بتلقيح عدد من لنباتات بالمحلول الفوسفاتي الدارئ فقط. غسلت جميع النباتات الملقحة بالماء بعد مرور 30 دقيقة ثم وضعت في قفص مصنوع من قماش الململ (ابعاده 5×4×2.5 م) و تحت ظروف البيت البلاستيكي. تم متابعة جميع النباتات بشكل دوري لظهور و تطور اي اعراض مرضية و لمدة 35 يوما. عند نهاية التجربة، تم جمع عينات ورقية من كل نبات لاستخلاص الحامض النووي و اختباره بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل و الاليزا. اعيدت التجربة لمرة و بشكل منفصل.

**النقل بواسطة الحقن (Syringe injection transmission)**  
باعتماد الطريقة الموصوفة من قبل Allam و اخرون (1994)، تم حقن 10 نباتات بعمر 3-4 اوراق حقيقة بالعصير النباتي المصاب المحضر سابقا بسحق 5 غم من الاوراق المصابة بالفايروس المراد تشخيصه في 15 مل من المحلول الفوسفاتي الدارئ (Sörenson phosphate buffer). كما تم حقن نباتات اخرى باستخدام نفس المحلول الدارئ فقط لاتخاذها كمعاملة مقارنة. نميت جميع النباتات في البيت المصنوع من قماش الململ و متابعتها بشكل دوري لظهور اي اعراض مرضية. بعد مرور 35 يوما من تنفيذ التجربة، استخلص الحامض النووي (DNA) من النباتات الملقحة و اختبر بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) و الاليزا (ELISA). اعيدت هذه التجربة لمرة و بشكل منفصل.

**النقل بواسطة البذور (Seed transmission)**  
لمعرفة فيما اذا كان الفايروس المسبب للمرض القابلية على الانتقال بواسطة البذور، نفذت هذه تجربة بجمع ثمار طماطة ناضجة من نباتات مصابة بالفايروس تحت التشخيص لغرض استخلاص البذور منها. وضعت الثمار في اربعة احجام من الماء المقطر المعقم و الموضوع في خلاط كهربائي لغرض استخلاص البذور. تم تنظيف البذور من متبقيات الثمار و وضعها في محلول هايبيكلوريت الصوديوم (5%) لمدة 20 دقيقة ثم غسلت بالماء المقطر المعقم (Himabindu و اخرون ، 2012). كما تم اعادة نفس الخطوات السابقة باستثناء استعمال ثمار طماطة مأخوذة من

نبات طماطة غير مصاب بالفايروس. زرعت البذور في اصص بلاستيكية معقمة (13×15 سم) مملوءة بترابه مزيجيه- بتموس (1:1) معقمة موضوعة في البيت المصنوع من قماش الململ و تحت ظروف البيت البلاستيكي. تم مراقبة النباتات الناتجة لمدة ثمانية اسابيع لظهور اي اعراض مرضية. فحصت جميع النباتات بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل بعد جمع عينات ورقية و استخلاص الحامض النووي منها.

### النقل بواسطة حشرة الذبابة البيضاء (*B. tabaci*)

#### جمع و تربيته حشرة الذبابة البيضاء

جمعت عدد من بالغات حشرة الذبابة البيضاء من حقول الباذنجان التابعة لكلية الزراعة-جامعة كربلاء بواسطة شفاطة يديه (Hand Aspirator) و تم تنميتها على نباتات باذنجان (صنف برشلونه) سليمة موضوعة في قفص خشبي ابعاده 50×50×120 سم و ذات قاعدة خشبية و جوانبه الخمسة الاخرى مغطاة بطبقتين من قماش الململ لمنع دخول او خروج الحشرات من الصندوق. اخذت عينة من حشرات الذبابة البيضاء بعد حفظها في الايثانول (70%) الى مختبر علم الحشرات في قسم علوم الحياة-كلية العلوم-جامعة نيوكاسل- المملكة المتحدة لغرض تشخيصها على اساس الحامض النووي. شخضت الحشرة بأنها حشرة الذبابة البيضاء (*B. tabaci*, Biotype: B). تم التأكد من خلو حشرة الذبابة البيضاء بين فترة و اخرى من الفايروس المراد تشخيصه عن طريق وضع نباتات طماطة سليمة (صنف سوبر ماريموند) في نفس الصناديق الحاوية على نباتات الباذنجان و حشرات الذبابة البيضاء. كما و تم استبدال نباتات الباذنجان القديمة بنباتات اخرى حديثة النمو كل 3-2 اسبوع.

#### النقل بواسطة حشرة الذبابة البيضاء

لدراسة طرق نقل الفايروس و انتشاره بين نباتات الطماطة، تم نقل حوالي 300 حشرة بالغة من حشرات الذبابة البيضاء غير الحاملة للفايروس (Non-viruliferous whiteflies)، المنماة سابقا على نباتات الباذنجان، الى نباتات طماطة (الصنف سوبر ماريموند) مصاب بالفايروس المراد تشخيصه و موضوع في صندوق خشبي ابعاده 40×40×50 سم مغطى بقماش الململ. اعطيت الحشرات فترة تغذية لمدة 48 ساعة، بعدها تم تلقيح نباتات طماطة بعمر اربعة اوراق حقيقية و بمعدل 15 حشرة /نبات موضوعة في ثلاثة صناديق خشبية (ابعادها 40×40×50 سم) كل منها يحتوي على

تشخيص الفايروس باستعمال النباتات الكاشفة

### تحضير النباتات الكاشفة

زرعت بذور بعض النباتات الكاشفة (جدول 1) التي حصل عليها من معهد جيمز هاتن (James Hutton Institute) - مدينة دندي - المملكة المتحدة في سنادين بلاستيكية ابعادها 30×8 سم و الحاوية على تربه مزيجية معقمة و بتموس (1:1). بعد بلوغ النباتات 3-4 اوراق حقيقية، تم تفريد النباتات و نقلها الى سنادين اكبر حجما لاستخدامها في تجربة تشخيص الفايروس.

اربعة نباتات. بعد ترك الحشرات الحاملة للفايروس لمدة 48 ساعة لغرض اتمام عملية التلقيح. بعدها تم رش جميع النباتات بالمبيد الكيماوي اميجارد (Imidacloprid) و نقلها بعد حوالي ساعتين الى بيت ابعاده (2.5×4×5 م) مصنوع من طبقتين من الململ و موجود داخل البيت البلاستيكي. نفذت معاملة مقارنة بأتباع نفس الخطوات السابقة باستثناء تغذية الحشرات على نبات طماطة سليمة. تم متابعة النباتات بشكل يومي لتسجيل بداية ظهور و تطور الاعراض المرضية الناتجة من الاصابة الفايروسية. اختبرت جميع نباتات التجربة بواسطة اختباري تفاعل البلمرة المتسلسل و الاليزا.

جدول (1). النباتات الكاشفة المستعملة في تشخيص الفايروس المعزول من نباتات الطماطة النامية في بعض مناطق المنطقة

الاسم العلمي	العائلة	النبات الكاشف
<i>Solanum lycopersicom</i>	Solanaceae	الطماطة
<i>Solanum melongen</i>	Solanaceae	الباذنجان
<i>Datura stramonium</i>	Solanaceae	الداتورا
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Solanaceae	الزربيح
<i>Cucumis sativus</i>	Cucurbitaceae	الخيار
<i>Cucumis melo</i>	Cucurbitaceae	البطيخ
<i>Cucurbita pepo</i>	Cucurbitaceae	القرع
<i>Abelmoschus esculentus</i>	Malvaceae	الباميا
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	الفاصوليا
<i>Physalis floridana</i>	Solanaceae	المنطاد
<i>Nicotiana benthiam</i>	Solanaceae	التبغ
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. White Burley	Solanaceae	التبغ
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Samsun	Solanaceae	التبغ
<i>Nicotiana glutinosa</i>	Solanaceae	التبغ
<i>Gossypium hirsutum</i>	Malvaceae	القطن

### اصابة النباتات الكاشفة

اعراض مرضية. بعد مرور 35 يوما من التلقيح، تم جمع عينات ورقية من كل نبات و فحصها بواسطة اختباري تفاعل البلمرة المتسلسل والاليزا، للتأكد من وجود الفايروس.

### التشخيص السيرولوجي للفايروس

اجري اختبار الاليزا (TAS-ELISA) باستخدام العدة المجزة من قبل شركة (AC Diagnostics, Inc. الأمريكية: Cat. No: V257-K1) و حسب الخطوات الموصوفة من قبل الشركة المصنعة. اعتبرت العينات النباتية مصابة بالفايروس عندما يكون معدل قيم الامتصاص الضوئي عند الطول الموجي 405 نانوميتر اكبر من ضعف معدل قيم الامتصاص الضوئي للعينات النباتية غير المصابة.

### تشخيص الفايروس باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)

تم اطلاق حوالي 300 حشرة من الذباب الابيض غير الحاملة للفايروس على نبات طماطة مصاب بالفايروس تحت التشخيص و تركت للتغذية لمدة 48 ساعة. بعدها نقل عدد من الحشرات بواسطة شافطة يدوية الى ثلاثة صناديق خشبية كل منها يحتوي ثلاثة نباتات الطماطة (صنف Super Maremonde) و بمعدل 15 حشرة /نبات. نقلت جميع الصناديق الى البيت البلاستيكي و تركت للتغذية لمدة 48 ساعة، ثم رشت جميع النباتات بالمبيد اميجارد (Imidacloprid) لقتل حشرة الذبابة البيضاء، و بعد حوالي ثلاث ساعات تم نقل جميع النباتات الى بيت مصنوع من قماش الململ (حاوي في احد جوانبه على باب مزود بسحاب للتحكم بفتحه و غلقه) و مراقبتها بشكل يومي لظهور و تطور اي

على طول موجي 280 نانومتر اجري اختبار تفاعل البلمرة التسلسلي باستخدام العدة (K- PCR PreMix, Cat. No. (2012) المجهزة من قبل شركة Bioneer الكورية المنشأ. نفذ تفاعل البلمرة المتسلسل بحجم 20 مايكروليتر و الحاوية على 1 مايكروليتر من كل من البادئ الامامي (-5') (3'-ACGTAGGTCTTGACATCTGTTGAGCTC و الـخـفـي (-5') (3'-AAGTGGGTCCCACATATTGCAAGAC) (10 pomol) و 1 مايكروليتر من الحامض النووي (30 µg/ng). بعد وضع جميع المكونات المطلوبة للتفاعل في الانبوبة المجهزة من (Nuclease free water) إلى 20 مايكروليتر، تم مضاعفة الحامض النووي الفايروسي باستخدام ظروف تفاعل البلمرة المتسلسل المبينة في جدول 2.

استخلص الحامض النووي (DNA) باستخدام العدة (Cat. No: FAPGK001) المجهزة من قبل شركة فافورجين (Favorgen) تايوان، و بآتياع الخطوات الموصوفة من قبل الشركة المصنعة. تم قياس تركيز الحامض النووي DNA باستخدام جهاز قياس الطيف الضوئي (Spectrophotometer) تحت طول موجي 260 نانوميتر بآتياع المعادلة الآتية:  
تركيز الحامض النووي (µg/ml) = قيمة الامتصاص الضوئي على طول موجي 260 نانومتر × 50  
× عامل التخفيف (Dilution factor).

كما تم تحديد نقاوة الحامض النووي DNA من خلال تطبيق المعادلة الاقضية للشركة المصنعة و اكمال الحجم بالماء (Nuclease free water) إلى 20 مايكروليتر، تم مضاعفة الحامض النووي الموصوفة من قبل William و اخرون (1997):

نقاوة الحامض النووي DNA (DNA purity) = مقدار الامتصاص على طول موجي 260 نانومتر / مقدار الامتصاص

جدول (2) خطوات و ظروف تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) المستخدمة لمضاعفة الحامض النووي لفايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV).

عدد الدورات	الوقت	درجة الحرارة (°م)	خطوات تفاعل البلمرة المتسلسل
1	10 دقائق	94	Initial denaturation
35	30 ثانيه	94	Final denaturation]
	20 ثانيه	62	Annealing
	30 ثانيه	72	Initial extension
	30 ثانيه	72	Final extension
		4	Hold

اضيف 10 مايكروليتر من الـ DNA المضاعف بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل الى كل حفرة من حفر طبقة هلام الاكاروز. كما تم اضافة 5 مايكروليتر من معلم الحامض النووي (1 Kbp DNA ladder marker) الى الحفرة الموجودة في الجانب الايسر من العينات المضافة لغرض تحديد احجام الحامض النووي المضاعف. أوصلت أقطاب الجهاز بالتيار الكهربائي و شغل مجهز الطاقة (Power supply) على 100 فولت. بعد اكمال عملية ترحيل العينات، فحصت طبقة هلام الجل الحاوية على حزم الحامض النووي تحت الاشعة فوق البنفسجية (UV trans illuminator) و اخذت صور لها.

تحليل تسلسل قواعد الحامض النووي (DNA) لفايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV).

جمعت عينات ورقية من نباتات طماطة، ظهرت عليها نفس الاعراض المرضية المذكورة سابقا و الناتجة عن الاصابة بفايروس

حضرت طبقة هلام الاكاروز (agarose gel) بعد اخذ وزن 1 غم من الاكاروز و اذابته في 100 مل من المحلول الدائري 1×TBE (Tris boric acid EDTA buffer) و لحين تحول الخليط الى محلول رائق. اضيف 5 مايكروليتر من صبغة الـ Ethidium bromide بعد انخفاض درجة المحلول (40-45 م°). جهز القالب الخاص بصبب الاكاروز و الحاوي على المشط في إحدى نهاياته لعمل حفر داخل طبقة الجل، ثم صبب الاكاروز المذاب و الحاوي على صبغة الـ Ethidium bromide و ترك ليتصلب في درجة حرارة الغرفة. عند اكتمال تصلب طبقة الاكاروز، رفع المشط بحذر و أعيد القالب الى مكانه في جهاز الترحيل، ثم أضيف محلول 1× TBE إلى حوض الترحيل (Electrophoresis tank) مغطيا طبقة الاكاروز بارتفاع 1 سم تقريباً .

لم تظهر جميع النباتات الملقحة اي اعراض مرضية حتى بعد مرور 35 يوما من اجراء عملية الحقن بالعصير النباتي الحامل للفايروس. كما ان عدم وجود الفايروس الممرض تم اثباته بواسطة اختباري تفاعل البلمرة المتسلسل و الاليزا. بلغ معدل الامتصاص الضوئي عند اجراء اختبار الاليزا للنباتات المحقونة بالعصير النباتي المصاب 0.0831 مقارنة بمعدل الامتصاص الضوئي للنباتات المحقونة بالمحلول الفوسفاتي و البالغ 0.073. كما لم يلاحظ ظهور اي حزمة مضاعفة من الفايروس عند استخلاص الحامض النووي و اختباره بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (شكل 1). اثبتت هذه النتائج هذه الدراسة عدم امكانية انتقال الفايروس الممرض بواسطة حقن النبات بالعصير النباتي المصاب بالفايروس و هذه النتائج جاءت متفقة مع ما ذكره زايد و اخرون (2007).

#### **النقل بواسطة البذور (Seed transmission)**

لم تظهر النباتات الناتجة من بذور استخلصت من نبات طماعة مصابة بالفايروس الممرض اي اعراض مرضية، اذ كانت تلك النباتات مشابهة في مظهرها للنباتات السليمة الناتجة عن البذور المأخوذة من نباتات غير مصابة بنفس الفايروس. كما لم يعطي اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) اي امكانية لتضاعف حزمة الحامض النووي الفايروسي بحجم (634bp) (شكل 1). اتفقت هذه النتائج مع ما اشار اليه العديد من الباحثين حول عدم امكانية فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماعة بالانتقال بواسطة البذور (شفيق، 1983؛ زايد و اخرون، 2007؛ Kashina و اخرون، 2007؛ حسن و اخرون، 2011).

#### **النقل بواسطة حشرة الذبابة البيضاء (B. tabaci)**

اظهرت النتائج امكانية نقل الفايروس بواسطة حشرة الذبابة البيضاء المتغذية سابقا على نبات طماعة مصاب بالفايروس قيد التشخيص، اذ اظهرت النباتات المصابة بعد مرور 2-3 اسابيع من التلقيح اعراض مرضية متمثلة باصفرار بسيط و تجعد خفيف للأوراق بعد مرور 12 يوما من التلقيح متطورا فيما بعد الى تجعد و التقفاف حواف الاوراق الى الداخل مع تقزم واضح و تساقط لأزهار النباتات المصابة. اثبت استخلاص الحامض النووي من النباتات الملقحة و اختباره بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل وجود فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماعة من خلال مضاعفته لحزمة الحامض النووي الفايروسي و بالحجم المتوقع

تجعد و اصفرار اوراق الطماعة، من بعض المزارع الواقعة في محافظة المثني لاستخلاص الحامض النووي. تم مضاعفة حزم الحامض النووي DNA بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل و ارسال نواتج التفاعل (PCR amplicons) مع البودئ الامامية و الخلفية التي استخدمت لمضاعفة حزمة الحامض النووي الفايروسي الى شركة Microgene الكورية لغرض تحديد تسلسل الحامض النووية لعزلة الفايروس المعزولة. لمعرفة نوع السلالة الفايروسية الموجودة في مزارع حقول الطماعة في محافظة المثني و كذلك لمعرفة درجة التشابه و الاختلاف مع سلالات نفس الفايروس المعزولة سابقا، ادخل تسلسل الحامض النووي في قاعدة البيانات المتوفرة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (National Center for Biotechnology Information, NCBI) باستخدام برنامج ال- (Basic Local Alignment BLAST Search Tool)، (Zheng و اخرون، 2000)، و تم رسم شجرة النسب الوراثية (Phylogenetic neighbor-joining tree) لمقارنة عزلة الفايروس باستخدام برنامج MEGA 6 (MEGA (version 6 software) (Tamura و اخرون، 2013).

#### **النتائج و المناقشة Results and discussion**

#### **تشخيص الفايروس (Virus identification)**

#### **تحديد طريقة نقل الفايروس (Virus transmission)**

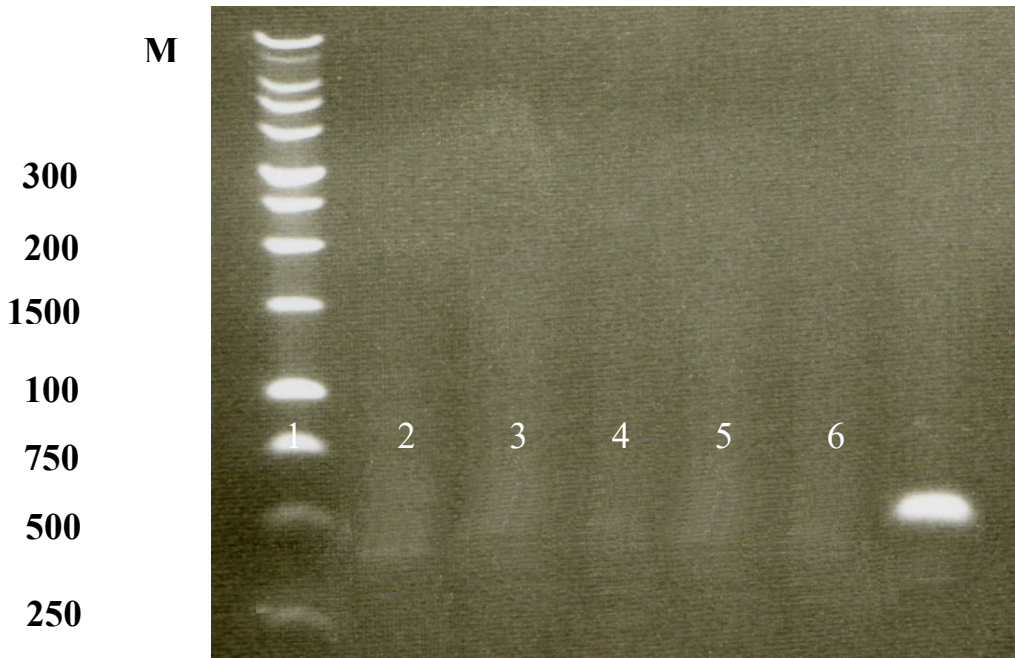
#### **النقل الميكانيكي (Mechanical inoculation)**

اظهرت النتائج ان تلقيح نباتات الطماعة ميكانيكيا بالعصير النباتي المصاب لم يعطي اي اعراض مرضية للإصابة بالفايروس تحت التشخيص حتى بعد 35 يوما من التلقيح. كما اوضحت نتائج اختبار النباتات الملقحة بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل عدم امكانية مضاعفة حزمة من الحامض النووي الفايروسي (شكل 1). كما لم يعطي اختبار الاليزا اختبارا موجبا، حيث بلغ معدل قيم الامتصاص الضوئي عند الطول الموجي 405 نانومتر 0.077 مقارنة بمعدل قيم الامتصاص الضوئي (0.069) للعينات النباتية المأخوذة من نباتات المقارنة الملقحة فقط بالدارئ الفوسفاتي (Sörenson phosphate buffer). اتفقت هذه النتائج مع ما اشار اليه زايد و اخرون (2007) و حسن و اخرون (2011) بعدم امكانية فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماعة (TYLCV) بالانتقال ميكانيكيا.

#### **النقل بواسطة الحقن (Syringe injection transmission)**

الى امكانية انتقال فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة بواسطة حشرة الذباب الابيض.

(شكل 1). اتفقت هذه النتيجة مع ما وجده شفيق، Al-Ani؛ 1983 و اخرون، 2011؛ الفضل، 2012 الذين اشاروا



شكل 1: اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل لبعض نباتات الطماطة المحقونة بالعصير النباتي المصاب بفايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة. M = 1Kbp DNA ladder marker، 1 = نقل بالبذور، 2 = نقل بالحقن، 3 = النقل الميكانيكي، 4 = Negative PCR Control، 5 = Negative PCR Control، 6 = النقل بحشرة الذبابة البيضاء.

الفايروس في النباتات المصابة، اذ تم مضاعفة حزمة من الحامض النووي الفايروسي و بالحجم المتوقع (634bp) و هذا متفق مع حجم التتابع النيوكليوتيدي المحصور بين المواقع التي صممت منها البوادي الامامية و الخلفية في جينوم الفايروس TYLCV (شكل 3).

اتفقت هذه النتائج مع ما اشار اليه Kashina و اخرون (2004)؛ Hanssen و اخرون (2010)؛ المولى (2013)؛ الجبوري (2014) الى ان نباتات الطماطة صنف Super Maremonde المصابة بفايروس TYLCV اظهرت اعراض مرضية مشابهة للأعراض المرضية التي شوهدت على نباتات الطماطة المستعملة في هذه الدراسة. كما وجد العديد من الباحثين ان تلقح نباتات الداتورا بفايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة اعطى اعراض مرضية بهيئة تجعد الاوراق و التقافها و اصفرار بين العروق و التي كانت مماثلة للإعراض المرضية التي لوحظت في هذه الدراسة (الوالي، 2006؛ Ajlan و اخرون، 2007؛ Abd El-Monem و اخرون، 2011؛ الفضل، 2012). كما اثبتت النتائج حساسية انواع التبغ *N. glutinosa*، *N. tabacum* var. Samsun، *N. benthamiam*، الفاصوليا و الباميا للإصابة

بعد مرور ثلاثة اسابيع من اجراء عملية تلقح نباتات الطماطة صنف Super Maremonde بواسطة حشرة الذبابة البيضاء الحاملة للفايروس، ظهرت اعراض مرضية بهيئة تجعد و اصفرار الاوراق القمية التي تطورت فيما بعد الى اعراض تجعد شديد و اصفرار شملت بقية اوراق النبات مع ملاحظة تقزم شديد في النباتات المصابة عند مقارنتها بالنباتات غير المصابة بالفايروس. كما اظهرت نباتات الداتورا بعد مرور 30 يوما من التلقيح اعراض مرضية متمثلة باصفرار خفيف بين عروق اوراق النبات و التي تطورت فيما بعد الى اعراض تجعد و التقاف اوراق النبات (شكل 2).

اثبت تفاعل الاليزا وجود فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة في نباتات الطماطة و الداتورا الملقحة بالفايروس تحت التشخيص، اذ بلغ معدل الامتصاص الضوئي، عند الطول الموجي 405 نانوميتر، لعينات الطماطة و الداتورا المختبرة 3.089 و 2.876، على التوالي قياسا بمعدلات الامتصاص الضوئي لعينات الطماطة و الداتورا في معاملة المقارنة و البالغة 0.057 و 0.082، على التوالي. كما أكد تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) وجود نفس

النتائج مع ما وجدته شفيق (1983)؛ Al-Musa و Mansour، (1992)؛ Fegla و اخرون، (1997)؛ حمد (2000)؛ الوائلي (2006)؛ Ajlan و اخرون، (2007)؛ حسن و اخرون، (2011)؛ Al-Ani و اخرون (2011)؛ الفضل (2012) الذين بينوا عدم ظهور اي اعراض مرضية في نفس النباتات الملقحة المستعملة في هذه الدراسة رغم اصابتها جهازيا.

بفايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة دون ظهور اي نوع من الاعراض المرضية حتى بعد مرور 35 يوما من التلقيح. اثبت استخلاص الحامض النووي من اوراق النباتات المصابة و تعريضه الى اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) امكانية مضاعفة حزمة من الحامض النووي الفايروسي بحجم (634bp) (شكل 3). كما اكد اختبار الاليزا وجود الفايروس في النباتات الملقحة عند اختبارها بعد مرور 35 يوما من التلقيح. اتفقت هذه

نبات غير مصاب بالفايروس  
(Non-infected plant)



نبات مصاب بالفايروس  
(TYLCV-infected plant)



النبات الكاشف

طماطة (صنف سوبر ماريموند)



داتورا (*D. stramonium*)

شكل 2: نباتات طماطة (صنف سوبر ماريموند) و داتورا (*D. stramonium*) المصابة و غير المصابة بفايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV).

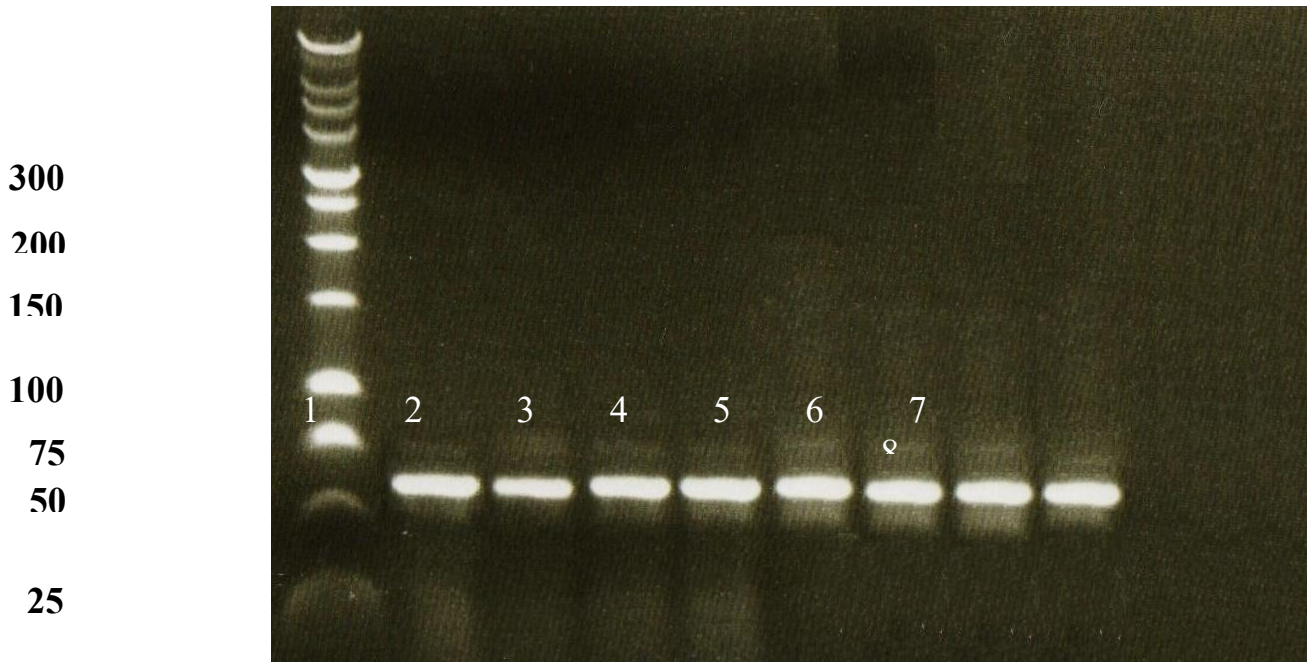
بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) لم يضاعف اي حزمة من الحامض النووي لفايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (شكل 4). كما اكد اختبار الاليزا عدم وجود الفايروس في جميع النباتات المذكورة اعلاه.

كما اظهرت النتائج عدم استجابة نباتات القطن، التبغ ( *N. tabacum* var. White Burley)، المنطاد، القرع، الزربيح، الباذنجان، الخيار و البطيخ للإصابة بالفايروس، اذ لم يلاحظ ظهور اي اعراض مرضية حتى بعد مرور 35 يوم من التلقيح بفايروس. وجد ان استخلاص الحامض النووي و اختباره



و اخرون، 2007؛ Al-Ani و اخرون، 2011؛ Abd Monem و اخرون، 2012؛ المولى، 2013؛ EI- Doughoug و اخرون، 2014).

لاحظ العديد من الباحثين عدم استجابة هذه النباتات عند تلقيحها بفايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة مؤكدا ذلك النتائج التي توصلت اليها هذه الدراسة (شفيق، 1983؛ حمد، 2000؛ Ajlan



شكل 3: اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل للنباتات الكاشفة المستعملة في تشخيص فايروس تجعد واصفرار اوراق الطماطة. 1Kp = M. DNA ladder marker، 1= طماطة، 2= تنغ *N. glutinosa*، 3= تنغ *N. tabacum* var. Samsun، 4= تنغ *N. benthamiana*، 5= فاصوليا، 6= باميا، 7= داتورا، 8= Positive PCR control.



شكل 4: اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل للنباتات الكاشفة المستعملة في تشخيص فايروس تجعد واصفرار اوراق الطماطة. 1Kp = M. DNA ladder marker، 1= قطن، 2= بادنجان، 3= تنغ *N. tabacum* cv. White Burley، 4= خيار، 5= قرع، 6= بطيخ، 7= الزريخ، 8= المنطاد، 9= Positive PCR control.

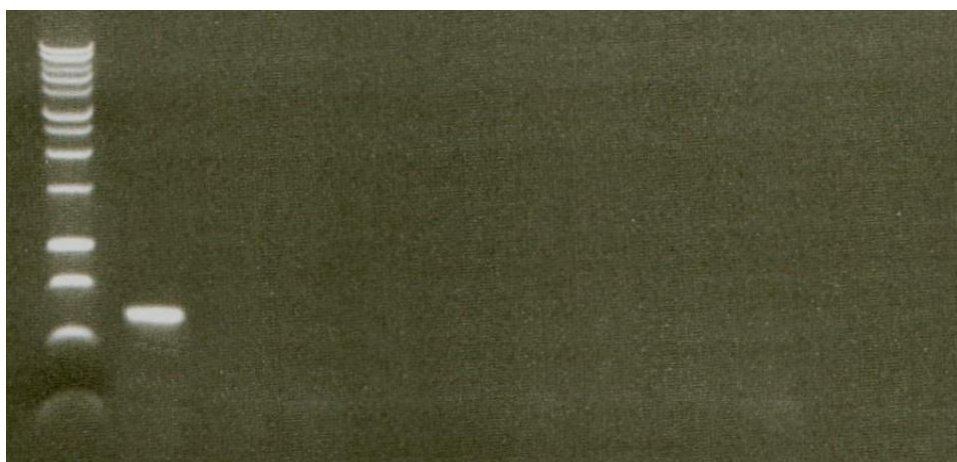
## التشخيص السيولوجي للفايروس

اثبت استخلاص الحامض النووي و اختباره بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) مضاعفة حزمة من الحامض النووي الفايروسي و بالحجم المتوقع (634bp) (شكل 5). اتفقت هذه النتائج مع ما وجدته Anfoka و اخرون (2005) الذين استخدموا نفس البادئات المذكورة في هذه الدراسة في تشخيص الفايروس و امكانيتها في مضاعفة حزمة من الحامض النووي لفايروس تجعد و اصفرار اوراق الطمطة و بحجم 634bp.

اعطت جميع عينات الطمطة المأخوذة من بعض مزارع المنطقة الصحراوية في محافظة كربلاء تفاعلا موجبا عند اختبارها بواسطة اختبار الاليزا، اذ بلغ معدل قيم الامتصاص الضوئي عند الطول الموجي 405 نانوميتر بلغ 3.056 للعينات المصابة المأخوذة من نباتات مصابة مقارنة بمعدل قيم الامتصاص و البالغة 0.086 للعينات النباتية المأخوذة من نباتات غير مصابة بالفايروس.

تشخيص الفايروس باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)

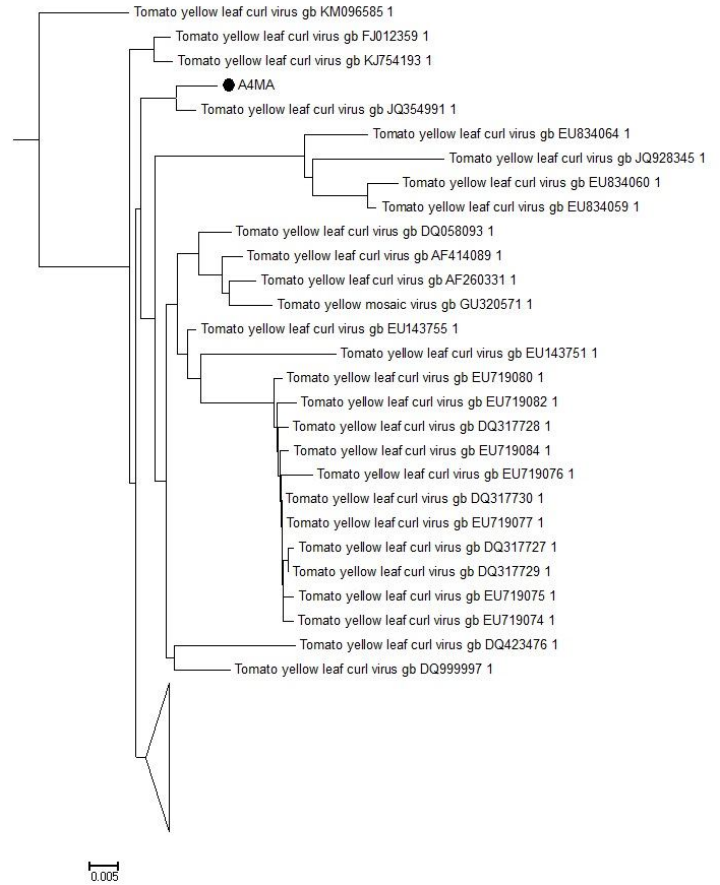
300  
200  
150  
100  
750  
500  
250



شكل 5: حزمة الحامض النووي (DNA) المضاعفة بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) من فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطمطة (TYLCV) من عينات طمطة مأخوذة من بعض المزارع الصحراوية في محافظة كربلاء باستخدام زوج البادئات TYv2337 و TYc138.

تحليل تسلسل قواعد الحامض النووي (DNA) الفايروسي (Nucleotide sequence analysis) لعزلة فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطمطة (TYLCV) في محافظة المثنى. اثبت تحليل شجرة النسب الوراثية ان فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطمطة المعزول من محافظة المثنى هي سلالة جديدة غير مسجلة سابقا في قاعدة البيانات للمركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) و التي كانت اقرب وراثيا الى العزلة العراقية .accession No. KT961704

تحليل تسلسل قواعد الحامض النووي (DNA) الفايروسي (Nucleotide sequence analysis) لعزلة فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطمطة (TYLCV) في محافظة المثنى. اثبت تحليل شجرة النسب الوراثية ان فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطمطة المعزول من محافظة المثنى هي سلالة جديدة غير مسجلة سابقا في قاعدة البيانات للمركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) و التي كانت اقرب وراثيا الى العزلة العراقية



شكل 6: شجرة التحليل الوراثي (Neighbor-joining tree) تبين علاقة عزلة فايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV) (ذات علامة •) المعزولة من مزارع الطماطة في ناحية المجد/ محافظة المثنى مع عزلات نفس الفايروس المسجلة عالميا.

اوراق الطماطة وامكانية مكافحة الناقل احيائيا. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة البصرة.  
 حسن زياد محمود و عماد داود اسماعيل و صلاح الشعبي 2011.  
 التحري عن العوائل البرية المخزنة لفايروس تجعد واصفرار اوراق البندورة في الساحل السوري. مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية- سلسلة العلوم البيولوجية. 33 (5): 189-200.  
 حمد سمير عبد الرزاق حسن 2000. تأثير بعض المستخلصات النباتية ومنظمات النمو في فايروس تجعد واصفرار اوراق الطماطة. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة بغداد.  
 زايد محمد علي و جبر عبد الله و محمد شقرون 2007. حصر وتعريف فايروس تجعد واصفرار اوراق الطماطة في المنطقة العربية، مجلة وقاية النبات العربية 25: 65.  
 شفيق حسين لطيف 1983. دراسات على تشخيص ومقاومة فايروس تجعد واصفرار اوراق الطماطة في البيوت البلاستيكية. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة بغداد.  
 مطلوب عدنان ناصر و عز الدين سلطان محمد و كريم صالح عبدول 1989. انتاج الخضروات. الجزء الثاني، مديرية دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل.

Abd El-mone, A. F., KhA. El-Dougd, K. H. A., Ibtisam, A., Ahme, H. E. A., and HS. Abd El-Kader 2011. Identification and molecular characterization of *Tomato yellow leaf curl*

#### المصادر

الجبوري عفاف اركان عليوي 2014. تشخيص جزيئي لفايروس تجعد واصفرار اوراق الطماطة (TYLCV) باستخدام تقنية تفاعل لبلمرة المتسلسل (PCR) مع برنامج وقائي من الاصابة بالفايروس. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة الكوفة.  
 السامرائي اسماعيل خليل 1998. ظاهرة الاصفرار الحديدي و اثرها في انخفاض الانتاجية في المحاصيل الزراعية. مجلة الزراعة العراقية. (1): 14-16.  
 الفضل فضل عبد الحسين 2012. الخصائص الجزيئية والمصلية لفايروس تجعد واصفرار اوراق الطماطة. مجلة جامعة الكوفة لعلوم الحياة. (2)4: 139-145.  
 المولى عبد الكريم قاسم جبر 2013. استخدام الطرائق الحيوية والجزيئية وتحليل التتابع الجيني في دراسة فايروس تجعد واصفرار اوراق الطماطة (TYLCV) في العراق وسبل مكافحته. اطروحة دكتوراه، كلية التربية، جامعة البصرة.  
 الوائلي مهند عبد الرضا خلف 2006. دراسة تشخيصية باستخدام طرق سيرولوجية وحيوية لفايروس تجعد واصفرار

*virus-EG*. Emir. *Journal of Food Agriculture* 23(4), Pp. 355-367.

Ajlan, A. M., Ghanem, 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), Pp.179-192.
- Al-ani, R. A., Abhab, A. M., Hamad, S. A. H., 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. 5155-515.
- Alemu, K. 2015. Detection of diseases, identification and diversity of viruses: A Review. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare* 5(1), Pp. 204- 213.
- Allam, E. K., Abo-Elnasr, M. A., Othman, B. A., and Thabet, S. D., 1994. A new method for mechanical transmission of *Tomato yellow leaf curl virus* VII<sup>th</sup>. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, Pp.77-91.
- Anfoka, G. H., Abhary, M. 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), Pp. 61-66.
- Barbar, A. N., 2013. Genetic and Molecular analysis of resistance to *Potato virus Y* and *Potato virus S* in Potato (*Solanum tuberosum*). Ph. D. Thesis, College of Life Sciences and Medicine. Aberdeen University. P. 254.
- 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.
- 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), Pp. 341–350.
- Christopher, D. J., Raj, T. S., Rani, S. U., and Udhayakumar, R., 2010. Role of defense enzymes activity in tomato as induced by *Trichoderma virens* against *Fusarium wilt* caused by *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. *Journal of Biopesticides* 3(1), Pp. 158- 162.
- El-Doughoug, N. K., Mahfouze, S. A., Ahmed, S., Othman, B. A., and Hazaa, A. A., 2014. Characterization, nucleotide sequencing of *Tomato yellow leaf curl virus* Egyptian isolae. *Science of Agriculture* 7(2), Pp. 58-69.
- Fang Y. and RP. Ramasamy 2015. Current and prospective methods for plant disease detection. *Biosensors* 4: 537- 561.
- Fegla, G. I., IA. El-Samra, I. A., Norman, K. A., and Younes H. A., 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 Agriculture Sciences, Faculty of Agriculture, Assiut University, Assiut (1), Pp. 549- 568.
- 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), Pp. 188-196.
- Giovanni, C. D., Orco, P. D., Bruno, A., Ciccarese, F., Lotti C. and Ricciard, L., 2004. Identification of PCR-based markers (RAPD, AFLP) linked to a novel powdery mildew resistance gene (*ol-2*) in tomato. *Plant Science* (166), Pp. 41-48.
- 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), Pp. 243–251.
- Hanssen, I. M., Lapidot, M. and Thomma, B. P. H. J., 2010. Emerging viral diseases of tomato crops. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23(5), Pp. 539– 548.
- Henson, J. M. and Fesnch, R., 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual Review of phytopathology* (31), Pp. 81-109.
- Himabindu, K. B., Priya, M. S., Reddy, D. M. P. Sudhakar, Srinivasul, Y., Reddissekhar, M., Latha, P., and Reddy, B. R. K., 2012. Studies on the effect of various sterilants and culture conditions on in-vitro seed germination in tomato (*Solanum lycopersicum*). *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* 3(4), Pp. 476-480.
- Kashina, B. D., Mabagala, B. R., and Mpunami, A. A., 2004. Analysis of the variability of *Tomato yellow leaf curl* disease isolates from Tanzania using RFLPs and sequence data. In: 4th *International Geminivirus Symposium*, Cape Town, RSA: 16/12 W11b-16.

- Kashina, B. D., Mabagal, R. B., and Mpunami, A. A., 2007. Serological detection and variability of *Tomato yellow leaf curl virus* isolates from Tanzania. *Journal of Plant Protection Research* 47(4), Pp. 367-373.
- 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), Pp. 1861- 1863.
- Mansour A. and Al-Musa, A., 1992. *Tomato yellow leaf curl virus*: host range and virus-vector relationships. *Plant Pathology* (41), Pp.122-125.
- 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), Pp. 1- 12.
- Salati R., Nahkla, M., Rojas, M., Guzman P., Maxwell D. and Gilbertso, 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), Pp. 487- 496.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, A., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biological Evolution* 30(12), Pp. 2725– 2729.
- William, W. W., Mackey, K., and Chomczynski, A., 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*, (22), Pp. 474-481.
- Zheng, L., Campbell, M., Murray, J., Lam, S., and Xu, G. R., 2000. The *BMP1* gene is essential for pathogenicity in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular of Plant-Microbe Interact*, (13), Pp. 724–732.