

تقويم استجابة بعض هجن البندورة/الطماطم المستوردة وبعض الطرز الوراثية المحلية للإصابة بفيروس موزايك البندورة/الطماطم والكشف الجزيئي عنه

فايز إسماعيل¹، أمين عامر حاج قاسم² وصلاح الشعبي¹

(1) الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، إدارة بحوث وقاية النبات، دوما، ص.ب. 113، دمشق، سورية،
البريد الإلكتروني: faizismail@mail.sy؛ (2) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة بجامعة حلب، حلب، سورية

المخلص

إسماعيل، فايز، أمين عامر حاج قاسم وصلاح الشعبي. 2012. تقويم استجابة بعض هجن البندورة/الطماطم المستوردة وبعض الطرز الوراثية المحلية للإصابة بفيروس موزايك البندورة/الطماطم والكشف الجزيئي عنه. مجلة وقاية النبات العربية، 30: 223-230.

تم تقويم استجابة 20 هجيناً مستورداً من البندورة/الطماطم تحت ظروف الإعداء الاصطناعي في الحقل إزاء الإصابة بفيروس موزايك البندورة/الطماطم *Tomato mosaic virus* (ToMV) خلال عام 2009، كما تم تقويم استجابة 15 طرازاً وراثياً محلياً من البندورة/الطماطم إزاء الفيروس نفسه ضمن غرفة النمو تحت ظروف الإعداء الاصطناعي. زُرعت بذور الهجن في محطة بحوث أوتايا التابعة للهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية بدمشق، سورية ضمن أربعة مكررات، وأعدت النباتات في طور ما قبل الإزهار بالطريقة الميكانيكية بالعزلة المحلية SY-250-07 من فيروس ToMV. اختبرت النباتات المعدة وغير المعدة (الشاهد) بالنسبة لكل هجين بعد شهر واحد من إجراء الإعداء الاصطناعي لتقصي وجود الفيروس بواسطة اختبار الادمصاص المناعي بالاختواء المزدوج للفيروس بواسطة الأجسام المضادة - إلبزا، وتم تقدير إنتاجية الهجن المزروعة المعدة وغير المعدة ونوعية الثمار المنتجة منها. بينت نتائج الاختبار المصلي عدم إصابة سبعة هجن مستوردة من البندورة/الطماطم بفيروس ToMV (لوريت، إلغرو، TH 01308، T-30، غلا، TY-QUEEN وبامبلا) وامتلاكها لصفة المقاومة، ولم تُشاهد عليها أية أعراض مميزة للإصابة. كما لم تتأثر إنتاجية الهجن المقاومة نتيجة لعدوى الفيروس مقارنة بنباتات الشاهد غير المعدة بالنسبة لكل هجين. أصيبت نباتات الهجن الأخرى المختبرة بالفيروس وظهرت أعراض متباعدة عليها، تمثلت بموزايك وتجعد الأوراق وتشوهاها، وتقزم النباتات، وتكوين الورقة السرخسية. وكانت ثمار الهجن المصابة صغيرة الحجم، تكسوها بقعات صفراء اللون، وهي غير قابلة للتسويق. وقد تراوحت نسب الفقد في غلة الهجن المصابة ما بين 32 و55%. أصيبت جميع الطرز الوراثية للبندورة/الطماطم المحلية المختبرة بفيروس موزايك البندورة/الطماطم تحت ظروف الإعداء الاصطناعي في غرفة النمو، وظهرت عليها أعراض الاصفرار، وتشوه الأوراق، واكتسابها لشكل الورقة السرخسية. تم الكشف عن عزلتين من فيروس ToMV بساطة اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل بعد النسخ العكسي (RT-PCR) باستخدام زوجين من البادئات المتخصصة بالفيروس، وتم تضخيم قطعة من مورثة الغلاف البروتيني للفيروس بطول 419 زوج نيكلوتيدي.

كلمات مفتاحية: إلبزا، بندورة/طماطم، تفاعل البوليميراز المتسلسل بعد النسخ العكسي، فيروس موزايك البندورة/الطماطم، سورية.

المقدمة

والمصلية/السيرولوجية (23) في الكشف عن فيروس ToMV، ثم اعتمدت طرائق جزيئية مختلفة في الكشف عنه منذ ثمانينات القرن الماضي كاختبار التهجين الجزيئي Molecular Hybridization (15)، وتفاعل البوليميراز المتسلسل بعد النسخ العكسي Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) (19). سُجل فيروس ToMV في سورية للمرة الأولى على محصولي البندورة/الطماطم والفليفلة/الفلفل في محافظات سورية مختلفة عام 2007، وبلغ معدل حدوثه في عينات البندورة/الطماطم المختبرة 18.5% و8.8% في عينات الفليفلة/الفلفل المختبرة (1).

هدف هذا البحث إلى تقويم استجابة 20 هجيناً مستورداً و15 طرازاً وراثياً محلياً من البندورة/الطماطم تحت ظروف الإعداء الاصطناعي في الحقل والمختبر، على التوالي، إزاء الإصابة بفيروس موزايك البندورة/الطماطم والكشف عن الفيروس بواسطة تفاعل

يُعد إنتاج واستخدام الأصناف النباتية المقاومة للفيروسات بصورة عامة من أهم طرائق مكافحة المتباعدة للحد من انتشارها ولخفض أضرارها. وقد حُدد وجود ثلاثة أنواع من مورثات المقاومة (*Tm1* و *Tm2* و *Tm2*) في نباتات البندورة/الطماطم مسؤولة عن المقاومة لفيروس موزايك البندورة/الطماطم *Tomato mosaic virus* (ToMV)، جنس *Tobamovirus*، وتقوم هذه المورثات بكبح تضاعف الفيروس وتحركه داخل نبات البندورة (9). وقد استخدمت هذه المورثات في برامج التربية لإنتاج أصناف بندورة/طماطم مقاومة للإصابة بهذا الفيروس (9، 17). وتم في جمهورية مصر العربية انتخاب بعض هجن البندورة/الطماطم المحلية (دقي 2 وعين شمس 2) المقاومين للإصابة بفيروس ToMV تحت ظروف البيت الزجاجي (14). واستخدمت الطرائق الحيوية (10)

البوليميراز المتسلسل بعد النسخ العكسي (RT-PCR) إلى جانب الاختبار المصلي.

مواد البحث وطرائقه

التقويم الحقلّي لاستجابة 20 هجيناً مستورداً من البندورة/الطماطم

للإصابة بفيروس ToMV تحت ظروف الإعداء الاصطناعي

أجريت تجربة تقويم الهجن المستوردة من البندورة/الطماطم إزاء فيروس ToMV في محطة بحوث أوتايا في غوطة دمشق التابعة للهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية خلال عام 2009. واستخدمت العزلة الفيروسية SY-250-07 المأخوذة من نبات بندورة/طماطم صنف دورا كان مزروعاً في محافظة درعا عام 2007 بدت عليه أعراض المرض، وأثبت الاختبار المصلي إليزا لاحقاً إصابته بفيروس ToMV فقط، وعدم إصابته بفيروس الذبول المتبع للبندورة/الطماطم *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)، جنس *Tospovirus*، عائلة *Bunyaviridae* وفيروس تجعد واصفرار أوراق البندورة/الطماطم (TYLCV)، جنس *Begomovirus*، عائلة *Geminiviridae* في إحداث العدوى الاصطناعية بالطريقة الميكانيكية لكافة نباتات الهجن المستخدمة في التجربة وعددها 20 هجيناً مستورداً من البندورة/الطماطم المدخلة إلى القطر خلال أعوام 2005، 2006 و 2007 بهدف اعتمادها للزراعة في الحقل. تم الحصول على بذور معظم هذه الهجن من قسم الخضراوات في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية وبعضها الآخر من الشركات الزراعية الخاصة المستوردة لبذور البندورة.

زُرعت بذور جميع هجن البندورة/الطماطم المستوردة في بداية شهر نيسان/أبريل عام 2009 ضمن صفائح من الستيريوبور المخصصة لإنبات بذور البندورة/الطماطم داخل غرفة النمو عند حرارة تراوحت ما بين 24-26 °س ورطوبة نسبية 65%. نُقلت الشتول إلى الحقل عندما وصل طولها إلى 20-30 سم في النصف الثاني من شهر أيار/مايو عام 2009، وزُرعت في أربعة مكررات على خطوط بمعدل 10 شتول من كل هجين/مكرر، أُعديت لاحقاً بالعزلة الفيروسية SY-250-07، وثُركت 10 شتول أخرى من كل هجين/مكرر دون عدوى كشاهد. كانت المسافة ما بين النباتات 50 سم وما بين الخطوط 1.5 م. أُعديت النباتات العشر الأولى من كل هجين/مكرر بالطريقة الميكانيكية بالعزلة الفيروسية بعد مرور 45 يوماً على التشتيل في مرحلة ما قبل الإزهار باستخدام رأس هاون السحق ومحلول منظم فوسفاتي ($KH_2PO_4 + Na_2PO_4$) عياريته 0.1 M ودرجة حموضته (pH) = 7.0. تم سحق أجزاء من النبات المصاب بنسبة 1:10 (أجزاء ورقية/ محلول منظم فوسفاتي) بوساطة جفنة وهاون من اليورسلان

معاملين سابقاً بمادة هيبوكلوريت الصوديوم تركيز 5%، ثم أُضيفت مادة السيليت (Celite) بمعدل 1 غ/10 مل من المحلول لتخريش سطح أوراق نباتات البندورة/الطماطم عند الإعداء. غُسلت الأوراق المعدة بالماء المقطر بعد مرور دقيقة واحدة للتخلص من بقايا اللقاح. تم مراقبة نباتات التجربة أسبوعياً وسُجلت الأعراض المتسببة عن فيروس ToMV التي ظهرت على جميع النباتات المعدة عند كل هجين على حدة وفي المكررات الأربعة، وتم تقييم شدة المرض مقارنة بنباتات الشواهد غير المعدة بعد مرور أسبوعين، وثلاثة أسابيع وأربعة أسابيع من إجراء الإعداء الاصطناعي اعتماداً على سُلّم تقييم خماسي (0-4): 0 = لا توجد أعراض مرئية على النباتات المعدة، وكان نموها مماثلاً لنمو نباتات الشاهد غير المعدة (السليمة)؛ 1 = اصفرار وموزايك خفيف على الأوراق الحديثة؛ 2 = موزايك متوسط الشدة مع تبرقش الأوراق الحديثة والقديمة؛ 3 = موزايك شديد جداً مترافق مع تقزم النباتات وبداية تشوه الأوراق الحديثة؛ 4 = تشوه شديد للأوراق الحديثة والقديمة وتحولها إلى الشكل الخيطي بما يشبه ورقة نبات السرخس/الخنشار Fern-leaf.

جُمعت عينات ورقية مركبة من كافة النباتات المعدة والشواهد غير المعدة من كل مكرر/هجين على حدة، ومن المكررات الأربعة بعد شهر واحد من إجراء الإعداء الاصطناعي. واختبرت جميع العينات المركبة بوساطة اختبار الادمصاص المناعي المرتبط بالأنزيم بالاحتواء المزدوج للفيروس بالأجسام المضادة (DAS-ELISA) (7) باستخدام أجسام مضادة متخصصة متعددة الكلون من إنتاج شركة Bioreba السويسرية للكشف عن فيروس موزايك البندورة/الطماطم. سُجلت قيم قراءات تفاعل الفيروس في عينات الهجن المختبرة (الكثافة الضوئية Optical density) باستخدام قارئ إليزا عند موجة طولها 405 نانوميترات. واعتبرت العينة مصابة بالفيروس إذا تساوى أو تجاوز متوسط قيم امتصاصها للضوء ثلاثة أضعاف متوسط قيم الشواهد السليمة الخاصة بكل طبق إليزا على حدة وفقاً لتعليمات الشركة الصانعة. جرى قطاف الثمار في طور النضج بمعدل ثلاث قطفات لكل مكرر، وصنف ومعاملة على حدة، بما فيها نباتات الشاهد بفارق أسبوعين بين القطفة والأخرى، بهدف تحديد تأثير الإصابة بالفيروس في كمية الإنتاج ونوعيته، وسُجلت أوزان الثمار لكافة مكررات المعاملات. واستخدمت المعادلة التالية في تقدير الفقد في الإنتاج:

$$\frac{100 \times (a - A)}{A} = \% \text{ الفقد في الإنتاج}$$

حيث: A = الإنتاج في معاملة الشاهد غير المعدى (كغ)،
a = الإنتاج في المعاملة المعدة (كغ)

WI، USA) وباستخدام زوج من البادئات المتخصصة بمورثة أنزيم تضاعف الـ RNA الخاص بالفيروس (RNA Polymerase Gene) لفيروس ToMV، هما: البادئ 1F، وتسلسل نيكليوتيداته: 5'-TGC AGC AAA GGT AAT AGT AG-3'، والبادئ 1R، وتسلسل نيكليوتيداته: 3'-CCG AAC TTT TAG CGA GTT TC-5'، وهما البادئ اللذان تم استخدامهما في اسبانيا (5) اعتماداً على تسلسل نيكليوتيدات العزلة AJ 417701 من فيروس ToMV المدرجة في موقع المركز الوطني لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI) في الولايات المتحدة الأمريكية. وأُتبعَت لائحة التدوير الحراري التالية: 45 °س لمدة 45 دقيقة بهدف إجراء عملية النسخ العكسي وتركيب السلسلة الكاملة (cDNA) بدءاً من الحمض النووي الريبسي الكلي بواسطة أنزيم النسخ العكسي، بعدها دقيقتين عند حرارة 94 °س بهدف تعطيل النسخ العكسي بتخريب الأنزيم المتبقي وفصل السلسلتين المتشكلتين RNA/cDNA وتنشيط أنزيم البوليميراز، أُتبعَت بـ 35 دورة مكونة من 1 دقيقة عند حرارة 94 °س، و 45 ثانية عند حرارة 56 °س، و 1 دقيقة عند حرارة 72 °س. وانتهت العملية بدورة واحدة نهائية عند حرارة 72 °س لمدة 5 دقائق. أُجري الرحلان الكهربائي على هلامه أغاروز بتريز 1% بعد صبغها بواسطة مادة بروميد الميثيل، واستخدم معلّمان جزيئيان، الأول Marker 100 bp، الفرق ما بين عُصباته 100 زوج نيكليوتيدي، والثاني Marker 50 bp، الفرق ما بين عُصباته 50 زوج نيكليوتيدي. وتمت عملية تظهير عُصبات الـ cDNA في هلامه الأغاروز باستخدام جهاز توثيق الهلام ويوجد الأشعة فوق البنفسجية وصُورت بكاميرا وحُفظت نسخة عن الصورة في الحاسوب.

النتائج

التقويم الحقلّي لاستجابة 20 هجيناً مستورداً من البندورة/الطماطم

للإصابة بفيروس ToMV تحت ظروف الإعداء الاصطناعي

تباينت هجن البندورة/الطماطم المستوردة في استجابتها للإصابة بفيروس ToMV تحت ظروف العدوى الاصطناعية بالإعداء الميكانيكي في الحقل، ولم تُصَب سبعة أصناف بالفيروس، هي: لوريت، إليغرو، TH 01308، T-30، غلا، TY-QUEEN وبامبلا، التي يمكن أن تُعدّ أصنافاً غير قابلة للإصابة أو مقاومة للفيروس. وقد توافقت النتيجة المتحصل عليها مع ما ورد في النشرات الفنية المرفقة بهذه الأصناف من حيث امتلاكها لصفة مقاومة إزاء فيروس موزاييك البندورة/الطماطم، باستثناء الصنف T-30 الذي لم يُذكر في نشرته الفنية أية إشارة لقدرته على مقاومة هذا الفيروس، وكذلك الصنف بامبلا الذي أشارت نشرته الفنية إلى قدرته على مقاومة فيروس موزاييك التبغ

حُللت نتائج التجربة إحصائياً باستخدام برنامج التحليل الإحصائي (GENSTAT 7) بواسطة الحاسوب، وتم حساب قيمة أقل فرق معنوي ما بين متوسط كمية الإنتاج للنباتات المعدة وغير المعدة (الشاهد) لكل صنف على حدة عند مستوى احتمال 0.05. أُعيد زراعة بذور الهجن التي لم تُسجل عليها إصابات أثناء نموها في الحقل بعد الإعداء الاصطناعي في المختبر ضمن أصص بلاستيكية تحتوي على تربة زراعية مكونة من خليط الرمل والتورب الزراعي، وأُعدت النباتات لاحقاً بالعزلة الفيروسية المستخدمة سابقاً، ثم اختبرت البادرات في طور الإزهار بواسطة الاختبار المصلي إليزا للتأكد من عدم قدرة الفيروس على إصابتها مجدداً.

تقويم استجابة 15 طرازاً وراثياً محلياً من البندورة/الطماطم للإصابة بفيروس ToMV تحت ظروف الإعداء الاصطناعي في المختبر

أُجريت تجربة تقويم استجابة 15 طرازاً وراثياً محلياً من البندورة/الطماطم إزاء الإصابة بفيروس ToMV تحت ظروف الإعداء الاصطناعي خلال عام 2009 ضمن ظروف غرفة النمو عند حرارة تراوحت ما بين 24-26 °س ورطوبة نسبية 65%. زُرعت الشتول ضمن أصص تحتوي على خلطة مكونة من تربة زراعية ورمل وتورب زراعي بنسبة 3/1 في أربعة مكررات، بمعدل خمسة نباتات/مكرر، وتركت خمسة نباتات أخرى دون عدوى كشاهد. استخدمت العزلة SY-250-07 الخاصة بفيروس ToMV في عملية الإعداء الاصطناعي بالطريقة الميكانيكية في طور ما قبل الإزهار ولمرة واحدة فقط. تم الحصول على بذور الطرز الوراثية المحلية من البندورة/الطماطم من قسم الأصول الوراثية في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، واعتمد سُلّم التقييس الخماسي نفسه (0-4) المستخدم في التجربة السابقة لتقويم شدة الإصابة بفيروس ToMV على النباتات المعدة مقارنة بنباتات الشواهد غير المعدة من الطرز الوراثية نفسها.

الكشف الجزيئي عن عزلتين سوربيتين من فيروس ToMV

تم استخلاص كلي للحمض النووي الريبسي (RNA) من أوراق وثمار مجفدة لنباتي بندورة/طماطم، جُمع الأول من محافظة القنيطرة عام 2008 والثاني من محافظة ريف دمشق عام 2007، كل على حدة، ودلّت نتيجة اختبار إليزا أنهما مصابان بفيروس ToMV. استخدمت مادة الترايزول (TRIzol reagent) من إنتاج شركة Invitrogen في استخلاص الـ RNA وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة مع بعض التعديلات الطفيفة. أُجري اختبار التفاعل المتسلسل لأنزيم البوليميراز بعد النسخ العكسي بمرحلة واحدة (One step RT-PCR) باستخدام مجموعة اختبار جاهزة (Access RT-PCR System) وفقاً للتعليمات الواردة من الشركة الصانعة (Madison، Promega Corporation)،

واتخذت شكلاً خيطياً متطاولاً وملتقاً باتجاه الوجه العلوي للورقة وكانت مصفرة قليلاً، بينما اكتسبت أوراق بعض الهجن، مثل: شانيل وإيبيا ومايسترو وروكي وروج وأدورا وريد بريبت شكل ورقة نبات السرخس/الخنشار (Fern-leaf)، وتراوحت قيم شدة أعراض المرض الناتجة عن الإصابة بالفيروس ما بين 3 و4.

كانت متوسطات قيم قراءات اختبار إليزا في الهجن السبعة المقاومة أقل من العتبة الحدية (0.19) عندما أخذت القراءة بعد ساعة واحدة من إضافة مادة التفاعل إلى طبق إليزا، بينما تراوحت متوسطات قيم قراءات اختبار إليزا في الهجن التي أصيبت بالفيروس ما بين 0.29-0.37، وكانت قريبة من متوسط قراءة الشاهد الموجب (0.47). وقد توافقت قيم قراءات إليزا مع شدة الأعراض الظاهرية التي تم تسجيلها ورصدها على الهجن القابلة للإصابة، فبلغت 0.29 في الهجين صن رايز، و0.30 في الهجينين سمارة وصفاء، و0.32 في الهجين مايسترو، و0.33 في الهجينين دياموند سويتى ومروى، و0.34 في الهجينين إيبيا وأدورا، و0.35 في الهجين ريد بريبت، و0.36 في الهجن شانيل ودياموند ويسبر وروكي و0.37 في الهجين روج (جدول 1).

Tobacco mosaic virus (TMV، جنس *Tobamovirus*) فقط (جدول 1). وكانت النشرة الفنية المرافقة للصنف مايسترو قد أشارت إلى مقاومته للإصابة بفيروس ToMV ولكنه أصيب به من خلال هذه التجربة، وقد عُزي ذلك إلى اختلاف الظروف البيئية أو اختلاف سلالة الفيروس المستخدمة في الإعداء الميكانيكي التي قد تتباين قدرتها الإراضية من منطقة جغرافية إلى أخرى (20). لم تُبدِ الهجن التي لم تصب بالفيروس أية أعراض مميزة في كافة أطوار نمو نباتاتها، وقد شوهد على الأوراق القمية لبعضها أعراض الاصفرار الذي عُزي إلى نقص الحديد، بينما أصيبت نباتات الهجن الأخرى بدرجات متفاوتة، وبدأت أعراض الإصابة بالظهور بعد مرور أسبوعين على عملية الإعداء الميكانيكي، وكانت على هيئة اصفرار للأوراق وموزاييك وتبرقش خفيف على معظمها. ولوحظت أعراض موزاييك شديدة مترافقة مع تقزم نباتات بعض الهجن، مثل: صن رايز وسمارة وصفا مع تقدم العملية المرضية لاحقاً، وتراوحت قيم شدة أعراض المرض الناتجة عن الإصابة بالفيروس وفقاً لسلم التقييس ما بين 2 و3. وظهرت تشوهات على أوراق نباتات بعض الهجن، مثل: مروى ودياموند ويسبر ودياموند سويتى بعد مرور أكثر من شهر واحد على إجراء الإعداء الاصطناعي

جدول 1. استجابة بعض هجن البندورة/الطماطم للإعداء الميكانيكي بالعدوى SY-250-07 لفيروس موزاييك البندورة/الطماطم (ToMV).

Table 1. Response of some tomato hybrids to mechanical inoculation with an isolate of ToMV (SY-250-07).

شدة المرض/متوسط قيم قراءة إليزا بعد الإعداء الميكانيكي بفيروس ToMV Disease severity/mean ELISA reading after mechanical inoculation with ToMV			المقاومة للفيروسات وفقاً لنشرة الهجين Resistance to viruses according to hybrid label	الشركة المنتجة Seed company	الهجين The hybrid	تسلسل الهجن وفقاً لدرجة مقاومتها لفيروس ToMV Series of hybrids according to ToMV resistance
أسبوعان 2 weeks	ثلاثة أسابيع 3 weeks	أربعة أسابيع 4 weeks				
1	3	0.37/4	مقاوم TYLCV	Namdhari Seeds	Hybrid ROUGE F1	1
1	3	0.36/4	-	Service Plus	Hybrid ROCKY F1	2
1	3	0.36/4	-	Clause Tezier	Hybrid SHANEL F1	2
1	3	0.36/4	مقاوم TMV	Diamond Seeds	Hybrid DIAMOND WHISPER F1	2
1	3	0.35/4	-	Golden Land Seeds	Hybrid RED BRIGHT F1	3
1	3	0.34/4	مقاوم TYLCV	Sakata	Hybrid ADORA F1	4
1	3	0.34/4	-	Syngenta	Hybrid EBIA F1	4
1	3	0.33/4	مقاوم TMV	Diamond Seeds	Hybrid DIAMOND SWEETY F1	5
1	3	0.33/4	مقاوم TMV	May Seed	Hybrid MARWA F1	5
1	3	0.32/4	مقاوم ToMV	Nunhems	Hybrid MAYSTRO F1	6
1	2	0.30/3	مقاوم TMV	May Seed	Hybrid SAFA F1	7
1	2	0.30/3	مقاوم TMV	Marto Seeds	Hybrid SAMAR F1	7
1	2	0.29/3	-	Asgrow	Hybrid SUNRISE	8
0	0	0.14/0	مقاوم ToMV	Europe United Seed	Hybrid OULA F1	9
0	0	0.14/0	مقاوم ToMV	Green Seeds	Hybrid TY-QUEEN F1(R)	9
0	0	0.13/0	-	Green Seeds	Hybrid T-30 F1	10
0	0	0.13/0	مقاوم TMV	VHS	Hybrid PAMELA F1	10
0	0	0.10/0	مقاوم ToMV و TYLCV	Petoseed	Hybrid LORITE	11
0	0	0.09/0	مقاوم ToMV	Syngenta	Hybrid TH 01308 F1	12
0	0	0.08/0	مقاوم ToMV	Asgrow	Hybrid ELEGRO	13

عن صفة المقاومة لفيروس ToMV في نبات البندورة/الطماطم
(9). (Tm2², Tm2, Tm1).

**تقويم استجابة 15 طرازاً وراثياً محلياً من البندورة/الطماطم للإصابة
بفيروس ToMV تحت ظروف الإعداء الاصطناعي في المختبر**
أصيب جميع الطرز الوراثية المحلية من البندورة/الطماطم المختبرة في
هذه التجربة بفيروس ToMV تحت ظروف الإعداء الاصطناعي في
غرفة النمو، وبدأت الأعراض بالتكشف على النباتات المعدة اعتباراً
من اليوم العاشر لإحداث العدوى الاصطناعية بالطريقة الميكانيكية،
وتمثلت هذه الأعراض بالاصفرار العام على النباتات، وظهور تبرقش
وموزايك على أوراقها، وتشوه بعض الأوراق في بعض الطرز الوراثية
فاكتسبت شكل ورقة نبات السرخس/الخنثار (شكل 1). وتراوحت قيم
قراءات اختبار إليزا لهذه الطرز الوراثية المحلية ما بين 0.23 و0.37
مقارنة مع قراءة الشاهد الموجب (0.53). بينما كان متوسط قراءة إليزا
في نباتات الشاهد غير المعدى للمدخلات نفسها 0.056.

لم تتأثر إنتاجية الهجن السبعة المقاومة بالإصابة بفيروس
ToMV، وكانت الفروقات ظاهرية غير موثوقة ما بين متوسطات قيم
الإنتاج للنباتات المعدة ونباتات الشاهد غير المعدة لكل هجين على
حدة، وبلغت متوسطات إنتاج الهجن لوريت، إليغرو، TH 01308،
T-30، علا، TY-QUEEN، ويامبلا المعدة، 4.1، 4.7، 6.6، 5.1،
6.1، 5.4 و 5.1 كغ، بينما كانت في الشواهد غير المعدة لهذه الهجن،
4.4، 5.1، 7.1، 5.6، 5.5، 5.7 و 5.4 كغ، على التوالي. وسُجلت
فروقات موثوقة عند مستوى احتمال 0.05 ما بين متوسطات قيم
الإنتاج عند بعض الهجن القابلة للإصابة بالمعدى وغير المعدة، وكانت
الثمار الناتجة من بعض هذه الهجن، مثل: دياموند ويسبر وإيبيا وصفا
صغيرة الحجم مشوهة تكسوها بقع صفراء اللون غير قابلة للتسويق.
وقد تراوحت نسب الفقد في الغلة في الهجن القابلة للإصابة ما بين 32
و55% (جدول 2). وقد أكدت نتائج اختبار إليزا للهجن السبعة مجدداً
المقاومة لفيروس ToMV عند زراعتها مرة أخرى في المختبر وإعداؤها
بعزلة الفيروس نفسها عدم إصابتها بالفيروس، الأمر الذي أكد مقاومتها
له، وعُزي ذلك إلى وجود مورثة واحدة أو أكثر من المورثات المسؤولة

جدول 2. تأثير الإصابة بفيروس موزايك البندورة (ToMV) في إنتاج 20 هجيناً من البندورة/الطماطم المستوردة بالعدوى الاصطناعية تحت
الظروف الحقلية، 2009

Table 2. Effect of ToMV infection on 20 imported tomato hybrids by mechanical inoculation under field conditions, 2009.

النسبة المئوية للفقد (%) % Yield loss	متوسط إنتاج الهجين (كغ) Average yield (Kg)		الهجين The hybrid
	الشاهد Control	المعدى Infected	
7.9	4.425 a	4.075a	Hybrid LORITE F1
38.6	5.825	3.575	Hybrid SUNRISE F1
8.8	5.100 b	4.650 b	Hybrid ELEGRO F1
6.4	7.050 c	6.600 c	Hybrid TH 01308 F1
42.0	7.200	4.175	Hybrid SHANEL F1
43.5	5.225	2.950	Hybrid DIAMOND WHISPER F1
50.3	7.150	3.550	Hybrid DIAMOND SWEETY F1
9.9	5.575 d	5.025 d	Hybrid T-30 F1
5.0	6.450e	6.125 e	Hybrid OULA F1
49.2	6.100	3.100	Hybrid EBIA F1
36.6	5.675	3.600	Hybrid MAYSTRO F1
39.9	7.325	4.400	Hybrid ROCKY F1
41.5	6.150	3.600	Hybrid ROUGE F1
38.9	6.300	3.850	Hybrid SAMAR F1
31.9	7.600	5.175	Hybrid ADORA F1
40.1	7.550	4.525	Hybrid RED BRIGHT F1
6.6	5.725 f	5.350 f	Hybrid TY-QUEEN F1
5.6	5.350 g	5.050 g	Hybrid PAMELA F1
54.7	7.400	3.350	Hybrid SAFA F1
43.1	7.200	4.100	Hybrid MARWA F1
		0.98	قيمة أقل فرق معنوي عند مستوى احتمال 0.05 (LSD at P=0.05)
		13.1	معامل الاختلاف (C.V %)

a, b, c, d, e, f, g = No significance different at P= 0.05 (resistant varieties).
قيمة أقل فرق معنوي عند مستوى احتمال 0.05 (الأصناف المقاومة)
معامل الاختلاف (C.V %)



شكل 1. أعراض الورقة السرخسية والتقرم على نباتات بعض الطرز الوراثية المحلية من البندورة/الطماطم نتيجة للإعطاء الاصطناعي بفيروس موزايك البندورة (ToMV).

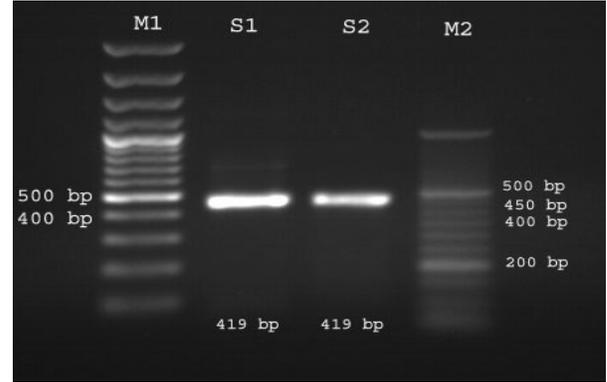
Figure 1. Fern-leaf and dwarfing symptoms on some local tomato genotypes as a result of artificial inoculation with ToMV.

المناقشة

أظهرت نتائج هذا البحث التأثير السلبي للإصابة بفيروس ToMV في نمو وإنتاج هجن البندورة/الطماطم المدخلة إلى القطر القابلة للإصابة بهذا الفيروس، وتراوحت نسب الفقد في الغلة في الهجن القابلة للإصابة ما بين 32 و 55%. وأكدت دراسات مرجعية سابقة خطورة هذا الفيروس على زراعة البندورة عالمياً، ووصلت نسبة الفاقد في إنتاج البندورة/الطماطم المزروعة في البيوت البلاستيكية على المستوى العالمي حوالي 20% (6)، بينما تراوحت نسب انخفاض غلة محصول الفليفلة/الفلفل في مصر نتيجة لإصابته بفيروس ToMV ما بين 27-54% تبعاً لموعد الإصابة (3). ويُعدّ فيروس موزايك البندورة/الطماطم من أكثر الفيروسات انتشاراً على محصولي البندورة/الطماطم والفليفلة/الفلفل في السودان، وقد تسبب في حدوث أضرار فادحة في كمية الإنتاج ونوعيته (8). وأكدت دراسات مرجعية سابقة التأثير السلبي لفيروس موزايك البندورة في عقد الثمار، الأمر الذي يؤدي إلى تساقط الأزهار وفشل العقد وبالتالي قلة الإنتاج (2). يُعدّ إنتاج واستخدام أصناف متحملة أو مقاومة من البندورة/الطماطم الأسلوب الأنجع على المدى الطويل في مكافحة هذا الفيروس، حيث تبقى المقاومة المكتسبة وراثياً فاعلة لفترة طويلة من الزمن وذلك وفقاً لنتائج دراسات مرجعية سابقة (18). كما تُعدّ غريلة أصناف وهجن وطرز وراثية برية من البندورة/الطماطم من أهم الطرائق المهمة في مكافحة هذا الفيروس والحد من أضراره على محصولي البندورة/الطماطم والفليفلة/الفلفل. وقد أظهرت نتائج دراسة أجريت في جمهورية مصر العربية لغريلة هجن من البندورة/الطماطم المحلية

الكشف الجزيئي عن عزلتين سوريتين من فيروس ToMV

أدى اختبار الكشف عن عزلتين سوريتين من فيروس ToMV مصدرهما محافظتي القنيطرة وريف دمشق بواسطة اختبار RT-PCR وباستخدام زوجين من البادئات المتخصصة بالفيروس إلى تضخيم قطعة من مورثة الغلاف البروتيني لهذا الفيروس بطول 419 زوج نيكليوتيدي (شكل 2).



شكل 2. تضخيم قطعة بطول 419 زوج نيكليوتيدي من مورثة الغلاف البروتيني لعزلتين سوريتين من فيروس ToMV بواسطة اختبار RT-PCR، M1: معلم 100 زوج نيكليوتيدي، M2: معلم 50 زوج نيكليوتيدي S1: عزلة سورية من فيروس ToMV مصدرها القنيطرة، S2: عزلة سورية من فيروس ToMV مصدرها ريف دمشق

Figure 2. Amplification of 419 bp fragment from the capsid protein gene of two Syrian ToMV isolates by RT-PCR test, M1: 100 bp markers ladder, M2: 50 bp markers ladder, S1: Syrian ToMV isolate from AI-Qunaitara; S2: Syrian ToMV isolate from Damascus Countryside

مقاومة للإصابة بفيروس ToMV (9، 17). وتعدّ المورثة $Tm2^2$ من أكثر المورثات الثلاثة ثباتاً وتحملًا، حيث يدل وجودها في الصنف أو النوع التابع للجنس *Lycopersicon* على المقاومة المرتفعة له (12)، ويتطلب التغلب على مقاومة هذه المورثة حدوث طفرات مختلفة متعددة في الفيروس نفسه (24). وقد تم الكشف لاحقاً عن وجود مورثات خاصة بالمقاومة تجاه فيروس موزاييك البندورة (ToMV) في نباتات الفليفلة أيضاً (16).

تطابقت نتائج الكشف الجزيئي عن عزلتين سوريتين من فيروس ToMV المتحصل عليها في هذا البحث بواسطة اختبار RT-PCR وباستخدام زوجين من البادئات المتخصصة بالفيروس (IR و IF) مع النتيجة التي حصل عليها Aramburu and Galipienso في إسبانيا باختبار عزلة إسبانية من الفيروس أصابت صنف البندورة/الطماطم Marmande، وتم الحصول على منتجات PCR (cDNA) بنفس الحجم (419 bp) (5). وقد استخدم اختبار RT-PCR بنجاح في جمهورية مصر العربية للكشف عن عزلات محلية من فيروس ToMV (19). وتم تطوير اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل بعد النسخ العكسي وبواسطة الالتقاط المناعي [RT-IC Immunocapture (IC) PCR] للكشف عن عزلات من فيروس ToMV معزولة من عوائل نباتية مختلفة وفي عينات من الماء ومن التربة، وتم الكشف عن الفيروس بتركيز 10^{-1} - 10^{-1} pg/ml مقارنة مع اختبار إليزا الذي كشف تركيز 1 ng/ml⁻¹ (11). واستخدم اختبار RT-PCR بواسطة أزواج من البادئات المتخصصة أيضاً للكشف والتفريق ما بين خمسة فيروسات ترتبط فيما بينها بعلاقة مصلية وتابعة للجنس *Tobamovirus* منها فيروس ToMV (13).

والمدخلة إزاء فيروس ToMV تحت ظروف البيت الزجاجي خلال عام 1996 القابلية الشديدة للهجين المدخل H289 للإصابة بهذا الفيروس، بينما كان الهجينان المحليان دوقي 2 وعين شمس 2 مقاومان للإصابة بالفيروس، وكانت بقية الهجن، وهي: كارميللو ودوقي 1 وعين شمس 1 ووادي 577 متوسطة المقاومة للفيروس (14). وبينت نتائج اختبار 12 صنفاً تجارياً من البندورة/الطماطم في باكستان إزاء أربعة فيروسات، هي: فيروس موزاييك الخيار *Cucumber mosaic virus* (CMV، جنس *Cucumovirus*، وعائلة *Bromoviridae*)، فيروس البطاطا اكس *Potato virus X* (PVX، جنس *Potexvirus*، وعائلة *Flexiviridae*)، فيروس البطاطا واي *Potato virus Y* (PVY، جنس *Potyvirus*، وعائلة *Potyviridae*) و ToMV تحت ظروف الإعداء الميكانيكي، أن الصنفين فلوريسست وفوريسيت كانا مقاومين للفيروسات الأربعة المختبرة معاً (4). وبينت نتائج أداء 33 نوعاً وتحت نوعاً تابعة للجنس *Lycopersicon* في هنغاريا تجاه الإصابة بستة فيروسات أحدها كان فيروس ToMV، أن معظم الأنواع المدروسة كانت قابلة للإصابة بشدة بالفيروسات المختبرة، بينما كانت تحت الأنواع المصنفة ضمن الجنس *Lycopersicon* تحتوي على مقاومة جيدة لهذه الفيروسات، ويمكن أن تُعدّ مصدراً للمقاومة في برامج التربية المختصة لإنتاج أصناف البندورة/الطماطم الجديدة (21). وقد عزيت مقاومة نباتات البندورة/الطماطم للإصابة بفيروس موزاييك البندورة/الطماطم إلى وجود ثلاثة أنواع من مورثات المقاومة، وهي: $Tm1$ و $Tm2$ و $Tm2^2$ ، حيث تقوم هذه المورثات بكبح تكاثر الفيروس وتحركه داخل نبات البندورة (9). وقد استخدمت هذه المورثات منذ اكتشافها بصورة واسعة في برامج التربية لإنتاج أصناف بندورة/طماطم

Abstract

Ismaeil, F., A. A. Haj Kasem and S. Al-Chaabi. 2012. Evaluation the Response of Some Tomato Imported Hybrids and Local Genotypes to Infection with *Tomato mosaic virus* and its Molecular Detection. Arab Journal of Plant Protection, 30: 223-230.

Twenty imported tomato hybrids were evaluated for their reaction to infection with *tomato mosaic virus* (ToMV) under artificial infection conditions in the open field during 2009 growing season. Fifteen local tomato genotypes were also evaluated against the same virus in a growth chamber under artificial inoculation conditions. Hybrid seeds were planted in Otaya research station, GCSAR, Damascus, Syria in four replicates. Tomato seedlings were inoculated mechanically with SY-250-07, a local isolate of ToMV. One month after artificial inoculation, inoculated and non inoculated (check) plants for each hybrid were tested by DAS-ELISA to detect the virus level present. Yield and quality of produced fruits from inoculated and non-inoculated hybrids were assessed. Results of serological test showed that seven imported tomato hybrids (LORIT, ELIGRO, TH 01308, T-30, TY-QUEEN and Pamela) were not infected with ToMV, and no viral symptoms were observed on their foliage. The productivity of resistant hybrids was not influenced by virus infection in comparison with non-inoculated check plants. Plants of other tested hybrids were infected with ToMV, and different symptoms were observed such as mosaic, leaf curl, deformation, stunting of plants in addition to the formation of fern-leaf symptoms. The fruits of infected plants were small in size, their surfaces were covered by yellow spots and sometimes were unmarketable. The yield loss of infected hybrids ranged between 32 and 55%. All local tomato genotypes were susceptible to infection with ToMV under artificial inoculation in growth chamber conditions, and yellowing, leaf deformation and fern-leaf symptoms were observed. Two isolates of ToMV were tested by RT-PCR using a specific primer pairs of the virus, and a 419 bp fragment of the capsid protein gene was amplified.

Keywords: ELISA, RT-PCR, Syria, Tomato, ToMV.

Corresponding author: Faiz Ismaeil, General Commission for Agricultural Scientific Research, Damascus, Douma, P.O. Box 113, Syria, Email: faizismail@mail.sy

References

- resistance gene *Tm-22* from *Lycopersicon esculentum*. Plant Molecular Biology, 52: 39–51.
14. **Letschert, B., G. Adama, D.E. Lesemann, P. Willingmann and C. Heinze.** 2002. Detection and differentiation of serologically cross-reacting tobamoviruses of economical importance by RT-PCR and RT-PCR-RFLP. Journal of Virological Methods, 106: 1-10.
 15. **Maklad, F.M., A.M. Abd-Alla, and A.F. Abou-Hadid.** 1996. Evaluation of tomato hybrid fruit production and reaction to tomato mosaic virus infection. Acta Horticulturae, 434: 185-190.
 16. **Palukaitis, P. and R.H. Symons,** 1980. Nucleotide sequence homology of thirteen *tobamovirus* RNAs as determined by hybridization analysis with complementary DNA. Virology, 107: 354-361.
 17. **Patagas K.G., A.S. Schuerger and C. Wetter.** 1989. Management of *Tomato mosaic virus* in hydroponically grown pepper (*Capsicum annuum*). Plant Disease, 73:570-573.
 18. **Pelham, J.** 1966. Resistance in tomato to *Tobacco mosaic virus*. Euphytica, 15: 58–67.
 19. **Pelham, J.** 1972. Strain-genotype interaction of *Tobacco mosaic virus* in tomato. Annals of Applied Biology, 72: 219-228.
 21. **Shoman, S.A. and B.A. Othman.** 2004. Reverse transcription-polymerase chain reaction mediated detection and identification of *Tobacco mosaic virus*, Egyptian strain. Egyptian Journal of Virology, 1: 139-147.
 22. **Sutic, D.D., R.E. Ford and M.T. Tosic.** 1999. Handbook of Plant Virus Diseases. Boca Raton, Florida: CRC Press, 553 pp.
 23. **Takács, A.P., G. Kazinczi, J. Horváth, R. Gáborjányi.** 2006. Tomato Plants as Resistant Sources: Species and Intra-specific Taxa of *Lycopersicon* as Sources of Resistance to Viruses. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica, 41: 223-228.
 24. **Tchymakov, A.E.** 1974. Utchet bolezni plodovoeagodnekh kultur, Osnovnee metode fitopatologicheskii issledovani v Naytchnee Trudei, Izd-vo "kolos", 6-32. Osnovnee methods of phytopathological researchs, Kolos, Moscow: 6-8.
 25. **Van Regenmortel, M.H.V. and J. Burckard.** 1980. Detection of a wide spectrum of tobacco mosaic virus strains by indirect enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). Virology, 106: 327-334.
 26. **Weber, H., S. Schultze and A.J. Pfitzner.** 1993. Two amino acid substitutions in the *Tomato mosaic virus* 30-kilodalton movement protein confer the ability to overcome the *Tm-2(2)* resistance gene in the tomato. Journal of Virology, 67: 32–38.
 1. **إسماعيل، فايز، أمين عامر حاج قاسم وصلاح الشعبي.** 2011. انتشار وتوزع فيروس موزاييك البندورة/الطماطم على محصولي البندورة/الطماطم والفليفلة/الفلفل في سورية ودراسة انتقاله بواسطة البذور. مجلة وقاية النبات العربية، 29: 21-28.
 3. **منصور، عقل، جابر إبراهيم فجلة، أمين عامر حاج قاسم، عايدة نسور، طلال الزدجالي وحسني يونس.** 2008. فيروس موزاييك البندورة/الطماطم. الفصل الثامن: الفيروسات التي تصيب محصول البندورة/الطماطم. الصفحات: 252-255. كتاب الأمراض الفيروسية للمحاصيل الزراعية المهمة في المنطقة العربية. خالد محي الدين مكوك، جابر إبراهيم فجلة وصفاء قمري (المؤلفون)، إصدار الجمعية العربية لوقاية النبات، دار النهضة العربية، بيروت – لبنان.
 4. **Abu Foul, K.S.I.** 1989. Studies on some viruses affecting pepper plants in northern Egypt. Ph.D Thesis. Faculty of Agriculture, Alexandria University, Egypt, 184 pp.
 5. **Ali, A. and S. Hassan.** 2002. Viruses infecting winter tomato crops in the North West Frontier Province of Pakistan. Australian Journal of Agricultural Research, 53: 333-338.
 6. **Aramburu, J. and L. Galipienso.** 2005. First report in Spain of a variant of *Tomato mosaic virus* (ToMV) overcoming the *Tm-22* resistance gene in tomato (*Lycopersicon esculentum*). Plant Pathology, 54: 566.
 7. **Broadbent, L.** 1976. Epidemiology and control of *Tomato mosaic virus*. Annual Review of Phytopathology, 14: 75-96.
 8. **Clark, M.F. and A.N. Adams.** 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology 34: 475-483.
 9. **Elshafie, E., G. Daffalla, K. Gebre and G. Marchoux.** 2005. Mosaic-inducing viruses and virus like agents infecting tomato and pepper in Sudan. International Journal of Virology, 1: 28.
 10. **Hall, J.** 1980. Resistance at the *Tm-2* locus in the tomato to *Tomato mosaic virus*. Euphytica, 29: 89–97.
 11. **Hollings, M. and H. Huttinga.** 1976. Tomato mosaic virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, 156. Wellesbourne, UK: Association of Applied Biologists, 6 pp.
 12. **Jacobi, V., G.D. Bachand, R.C. Hamelin and J.D. Castello.** 1998. Development of a multiplex immunocapture RT-PCR assay for detection and differentiation of *Tomato and Tobacco mosaic tobamoviruses*. Journal of Virological Methods, 74: 167-178.
 13. **Lanfermeijer, F.C., J. Dijkhuis, M.J.G. Sturre, P. Haan and J. Hille.** 2003. Cloning and characterization of the durable *Tomato mosaic virus*