ظهور مواد شبيهة بالإنترفيرون في نباتات الطماطم/البندورة المنيعة للإصابة بفيروس البطاطا/البطاطس اس (PVS) عند إلقاحها به

رائد رؤوف العاني
مركز بحوث التقنيات الأحيائية، جامعة النهرين، العراق، البريد الالكتروني: raed_r1961@yahoo.com

الملخص

العاني، رائد رؤوف. 2011. ظهور مواد شبيهة بالإنترفيرون في نباتات الطماطم/البندورة المنيعة للإصابة بفيروس البطاطا/البطاطس اس (PVS) عند إلقاحها به. مجلة وقاية النبات العربية 29: 253–257.

أجريت هذه الدراسة لغرض معرفة سبب مناعة الطماطم/البندورة للإصابة بفيروس البطاطا/البطاس اس (*Potato virus S*، PVS، جنس *Carlavirus*، عائلة *Flexiviridae*). حسبت الأوزان الجزيئية لبروتينات نباتات طماطم/بندورة سليمة بطريقة الرحلان الكهربائي على هلام متعدد الأكريلامايد، فأظهرت النتائج ظهور ست حزم بروتينية ذات أوزان جزيئية 14.2، 20.1، 24.0، 29.0، 36.0 و 45.0 كيلو دالتون. وعند تلقيحها ميكانيكياً بمستخلص عصير نبات بطاطا/بطاطس مصاب بفيروس البطاطا/البطاس اس اظهرت نتائج اختبار اليزا ELISA عدم اصابة الطماطم/البندورة بالفيروس بعد إلقاحها ثلاث مرات كل 48 ساعة. استخلصت بروتينات نباتات الطماطم/البندورة الملقحة بالفيروس ورحلت على هلام متعدد الاكريلامايد فأظهرت النتائج ظهور ثلاث حزم بروتينية جديدة كانت أوزانها الجزيئية 26.0، 30.0 و 32.0 كيلو دالتون والتي قد يعزى لها سبب مناعة الطماطم/البندورة من الإصابة بفيروس البطاطا اس. استخلصت بروتينات الطماطم/البندورة الملقحة بالفيروس وتم معاملتها بحامض البيرفورميك واخضع المحلول لعملية طرد مركزي ورحل الراسب على هلام متعدد الأكريلامايد واظهرت النتائج ظهور ثلاث حزم بروتينية ذات أوزان جزيئية 26.0، 30.0 و32.0، كيلو دالتون. رشت البروتينات المستخلصة من نباتات الطماطم على نباتات البطاطا بثلاثة تراكيز هي 20، 40 و 60 ميكروغرام/مل بمعدل ثلاثة نباتات من كل تركيز ومن ثم لقحت نباتات بطاطا بمستخلص أوراق نبات بطاطا مصاب بفيروس البطاطا واي ثلاث مرات كل 48 ساعة. أظهرت النتائج أن التركيز الأول قد اضفى حماية لنبات البطاطا ضد الفيروس وصلت الى 12 يوماً، أما التركيزين الثاني والثالث فقد اضفيا حماية للنباتات ضد الفيروس وصلت إلى 18 يوماً، وهذا دليل على عدم تخصصية البروتينات المنتجة في نبات الطماطم نتيجة تلقيحها بفيروس البطاطا اس والتي تعتبر صفة مهمة مشابهة لصفات الانترفيرون الحيواني.

كلمات مفتاحية: مواد شبيهة بالانترفيرون، فيروس البطاطا اس، طماطم، بطاطس.

المقدمة

تحتوي الكثير من النباتات على مواد كيمياوية لها القدرة على تثبيط الفيروس عند خلط مستخلصاتها معه واختبارها على كاشف نباتي له ووجد أن النباتات التابعة للعوائل Solanaceae، Phytollaceae، Leguminsae، Amaranthaceae، Caryophyllaceae، Chenopodaceae تحوي على الكثير من مثبطات الفيروسات (19). وأشير الى وجود نباتات مختلفة مثل *Pelargonium hortorum*، *Chenopodium album*، *C. amaranticolor*، *Capsicum frutescens* تحوي على مواد مضادة للفيروسات الحيوانية والنباتية (16). قسمت المركبات المضادة للفيروسات الى مجاميع هي Furocoumarins، alkaloids، terpenoids، lignins (4). شخصت بعض المركبات المثبطة للفيروسات ووجد بأنها ذات طبيعة بروتينية انزيمية تتراوح أوزانها الجزيئية بين 1000–38000 دالتون وقد أبدى قسم منها تشابهاً مع الأنترفيرون الحيواني إذ أنها تمتلك مدى واسعاً ضد الفيروسات، بالإضافة إلى أنها ثابتة حرارياً، تترسب بالتراكيز العالية من كبريتات الأمونيوم لكنها تختلف عن الانترفيرون الحيواني من حيث عدم حساسيتها لحامض البيرفورمك (15). ولقد وجد أن بعض النباتات تمتلك أكثر من مركب بروتيني واحد مضاد للفيروس (2، 6). أشار العاني 2006 (1) بأن رش نباتات الطماطم/البندورة السليمة بمستخلص أوراق نباتات تبغ نوع *samsun*^{NN} معداة بفيروس موزاييك الطماطم/البندورة (ToMV) قد ثبط تضاعف الفيروس لمدة ثمانية أيام. كما أن هناك الكثير من المستخلصات النباتية التي تمتلك القدرة على استحثاث المقاومة ضد الفيروسات في النبات المعامل به قبل العدوى بالفيروس فضلاً عن فعاليتها التثبيطية عند خلطها بالفيروس (3). كما وقد استخدمت عوامل كيميائية لاستحثاث المقاومة في النبات ضد الفيروسات مثل بعض المواد الكيميائية الطبيعية وغير الطبيعية (5، 14). وأوضحت بعض الدراسات أن مادة Saporin الموجودة في نباتات عائلة Araliaceae ذات تأثير مثبط للحامض النووي لفيروس موزاييك التبغ ودلت بعض الدراسات أن أشباه القلويات Alkaloids ومركبات Anthocyanin، Coumarin المستخلصة من بعض أجناس البكتريا والفطور والأشنات ذات تأثير تثبيطي للفيروسات النباتية (10، 21). كما وجد أن مادة Scopolerin وهي من مشتقات

مادة الـCoumarin المستخلصة من بعض النباتات ذات تأثير مثبط لفعالية فيروس موزاييك التبغ (TMV) (13). وقد تمكن Wei و Beer (20) من عزل بروتين من البكتريا *Erwinia amylovora* القادر على تحفيز مقاومة جهازية ضد الكثير من المسببات المرضية على نبات البطاطا. وأشير إلى أن حامض الساليسيليك قادر على جعل نباتات التبغ مقاومة لفيروس موزاييك الخيار (CMV) ويعيق حركته من خلية الى أخرى عن طريق تحفيزه لمورث المقاومة في النبات المسؤول عن الاستجابة الموضعية Hypersensitive Response (HR) (11). وقد أشارت دراسات عدة بأنه عند اصابة نبات التبغ بفيروس موزاييك التبغ يحدث تصنيع لبروتينات لم تكن موجودة قبل الإصابة أطلق عليها بالبروتينات ذات العلاقة بالامراضية Pathogenesis Related Proteins (PR-proteins) (12). كما ويمكن تحفيز ما لايقل عن تسعة مورثات بطرائق مختلفة أطلق عليها مورثات المقاومة الجهازية (SAR-genes) وأن النواتج البروتينية إما أن تكون انزيمات مثل B-1.3-gluconase أو Chitinase أوتكون البروتينات ذات طبيعة أنزيمية (12). وتختلف مورثات المقاومة الجهازية المكتسبة التي يجري تحفيزها حسب الأنواع النباتية فقد وجد أن المجموعة III من الـChitinase هي السائدة في نبات الخيار بينما لوحظ أن المورثاات NPR1 و PR1 هي السائدة في نبات التبغ (18، 21). ونظراً لكون نبات الطماطم/البندورة منيع للإصابة بفيروس البطاطا اس (*Potato virus S*، PVS، جنس *Carlavirus*، عائلة *Flexiviridae*)، فقد أجريت هذه الدراسة لتشخيص العوامل المسؤولة عن مناعتها لهذا الفيروس.

مواد البحث وطرائقه

استخلاص البروتينات الداخلية لنباتات طماطم/بندورة سليمة

اتبعت طريقة Da Rocha وآخرون (7) في استخلاص بروتينات نباتات طماطة مزروعة في أصص بلاستيكية داخل بيوت محمية.

إعداء نباتات الطماطم/البندورة بفيروس البطاطا اس

اتبعت طريقة Noordam (17) في إعداء نباتات الطماطم/البندورة بمستخلص أوراق نباتات بطاطا مصابة بفيروس البطاطا اس تم الحصول عليها من حقول البطاطا من المناطق الزراعية المحاذية لمدينة بغداد وعزلت من الأوراق المصابة إصابة مفردة بفيروس البطاطا اس، وقد اعتمد إختبار إليزا DAS-ELISA في التشخيص. استخلصت بروتينات الطماطم الملقحة بالفيروس حسب الطريقة المذكورة آنفاً لغرض حساب تركيز البروتينات في النباتات السليمة والمعداة بالفيروس. أتبعت طريقة Givan و Leech (9) في تقدير تركيز البروتينات النباتية المستخلصة من النباتات السليمة والمعداة بالفيروس وفق المعادلة التالية:

$$\text{تركيز البروتين (ميكروغرام/مل)} = \frac{\text{الإمتصاص عند الموجة 280} - \text{الإمتصاص عند الموجة 253}}{2.51}$$

تقدير الوزن الجزيئي لبروتينات نباتات الطماطم/البندورة السليمة والمعداة بالفيروس

قدر الوزن الجزيئي للبروتينات الفعالة بطريقة الرحلان الكهربائي SDS-polyacrlylamide gel electrophoresis في هلام متعدد الأكريلامايد 15% لهلام الفصل (Resolution gel) و4% لهلام الرص (stalking gel) في أنابيب عمودية (8)، حيث سخنت النماذج الى 100 °س في محلول منظم مولار 0.21 Tris-HCl يحوي 2% SDS و2% بيتا–مركابتو إيثانول و15% جليسيرول و0.05 صبغة البروموفينول الزرقاء. وضعت النماذج على سطح الهلام وأجريت عملية الترحيل على جهد 100 فولت لمدة 5 ساعات. غطس الهلام في صبغة الكوماسي الزرقاء تركيز 0.25% في مزيج من 5 أحجام ميثانول، 5 أحجام ماء مقطر، حجم واحد حامض الخليك و5% ميثانول عند 37 °س مع الرج الخفيف للإسراع في عملية إزالة الصبغة.

معاملة البروتينات النباتية المستخلصة مع حامض البيرفورميك

عوملت البروتينات النباتية المستخلصة من نبات الطماطم مع 10 مل من حامض البيرفورميك في جهاز هزاز كهربائي لمدة 60 دقيقة عند 4 °س ثم أخضع المحلول لعملية طرد مركزي بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 30 دقيقة وأجريت للراسب عملية ترحيل كهربائي في هلام متعدد الأكريل أمايد كما سبق ذكره آنفاً.

رش نباتات البطاطا بالمستخلص البروتيني لنباتات طماطم ملقحة بالفيروس

حضرت التراكيز 20 و40 و60 ميكروغرام/مل من مستخلص بروتينات الطماطم الملقحة بفيروس البطاطا اس ممزوجة مع مادة (Tween 20) تركيز 0.1% ورش كل تخفيف على خمسة نباتات بطاطا، وبعد 48 ساعة من الرش لقحت بفيروس البطاطا واي وكررت العملية ثلاث مرات.

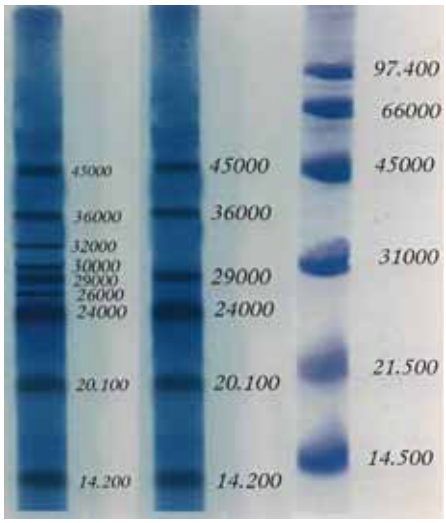
اعتمد اختبار اليزا DAS-ELISA في الكشف عن الفيروسات باستخدام مصول منتجة من شركة Bioreba، سويسرا.

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج تقدير تركيز بروتينات نباتات طماطم سليمة بأنها 182.2 ميكروغرام/مل في حين كان تركيز البروتينات المستخلصة من نباتات الطماطم الملقحة بفيروس البطاطا اس 191.3 ميكروغرام/مل وهذا يدل على استحثاث بروتينات جديدة في نبات الطماطم بعد إعدائها بالفيروس. وقد أظهر تحليل مستخلص بروتينات نباتات طماطم سليمة في هلام متعدد الأكريلامايد ظهور ست حزم بروتينية قدرت أوزانها الجزيئية بـ 14.2، 20.0، 24.0، 29.0، 36.0، 45.0 كيلو دالتون والتي قدرت أوزانها الجزيئية باستخدام منحنى المعايرة القياسي للبروتينات القياسية (Rabbit muscle phosphorylase، Bovine serum albumin، Hen egg white ovalbumin، Bovine carbonic anhydrase، Soybean trypsin inhibitor، Hen egg lysozyme) ذات الأوزان الجزيئية (97400، 66000، 45000، 31000، 21500، 14500 دالتون، على التوالي) وبعد الإعداء بفيروس البطاطا اس لوحظ ظهور ثلاثة بروتينات جديدة والتي حسبت أوزانها الجزيئية بالطريقة أعلاه نفسها وكانت 26000، 30000، 32000 دالتون (شكل 1).

وعند مزج بروتينات الطماطم المعداة بالفيروس مع حامض البيرفورميك وترحيلها على هلام متعدد الأكريلامايد أظهرت النتائج وجود البروتينات المستحثة فقط، حيث أنها لم تذب بالحامض والتي هي أحد صفات الانترفيرون النباتي ومن الممكن أن يعزى لها سبب مناعة الطماطم من الإصابة بفيروس البطاطا اس، حيث أنها استحثت حال تلقيح الطماطم بالفيروس ومنعت تضاعفه حال دخوله ولكن لم يتم فصل هذه البروتينات المستحثة بشكل منفرد واختبار كل واحد منها في منع اصابة الطماطم بالفيروس، ومن الممكن أن تكون هذه البروتينات قد عملت مجتمعة على تثبيط تضاعف الفيروس ومن الأرجح أن تكون آلية عمل هذه البروتينات هو تثبيط بداية الإصابة بالفيروس والتي تفسر استحثاث هذه البروتينات نتيجة الإصابة بالفيروس حال دخوله، وربما قد تكون لهذه البروتينات المستحثة صفات انزيمية محطمة للبروتين (Protease) اذ تقوم بتحطيم الغلاف البروتيني للفيروس حال دخوله أو تقوم بتحطيم المستقبلات الفيروسية الخلوية أو تخريبها (denaturation)، الأمر الذي يؤدي إلى عدم قدرة الفيروس على الإلتصاق بجدار الخلية والدخول اليها وبذلك تصبح الخلية مقاومة للإصابة.

وفي الحالة الثانية، عند رش نباتات البطاطا بمستخلص بروتين طماطم معداة بفيروس البطاطا اس وبالتراكيز 20، 40 و 60 ميكروغرام/مل وإلقاح نباتات البطاطا بمستخلص أوراق نبات بطاطا مصابة بفيروس البطاطا واي كل 48 ساعة أظهرت النتائج أن التركيز الأول أضفى حماية لنبات البطاطا إزاء فيروس البطاطا واي وصلت إلى حد 12 يوماً في حين أضفى التركيزين الأخيرين حماية لنبات البطاطا ضد الفيروس وصلت الى 18 يوماً، بينما أظهرت النتائج أن إجراء عدوى ميكانيكية لنباتات بطاطا سليمة بفيروس البطاطا واي أظهر أعراض إصابة بالفيروس خلال 48 ساعة وهذا يوضح أن البروتينات المستحثة في نباتات الطماطم نتيجة إلقاحها بالفيروس ورشها على نباتات البطاطا قبل دخول فيروس البطاطا واي اليها أدى الى حدوث تثبيط كامل للفيروس ومنع حدوث الإصابة وفي هذه الحالة قد تعزى آلية عمل هذه البروتينات الى منافسة الفيروس على المستقبلات الخلوية (Cell receptors) وهي قد تكون ذات طبيعة أنزيمية حيث أنه عند ارتباطها بالمستقبلات الخلوية قد تؤدي إلى تحويرها (denaturation) وبالتالي تحول من قدرة الفيروس على التعرف عليها، ولايستبعد أن يكون دورها تحفيزياً إذ تعمل على تحفيز الخلية لتصنيع عامل مقاومة جديد ضد الفيروس في نبات البطاطا.



شكل 1. نمط الرحلان الكهربائي لمستخلص بروتينات نباتات طماطم/بندورة على هلام الأكريلامايد. (A) البروتينات القياسية؛ (B) البروتينات المستخلصة من نباتات طماطم/بندورة سليمة؛ (C) البروتينات المستخلصة من نباتات معداة بفيروس البطاطا اس.

Figure 1. Gel electrophoresis of tomato plant protein extract. (A) standard marker protein, (B) proteins extracted from healthy tomato plants, (C) proteins extracted from tomato plants inoculated with Potato virus S.

إن البروتينات المستحثة في نباتات الطماطم نتيجة إعدائها بفيروس البطاطا اس والتي أضفت مناعة للطماطم ضد الفيروس ومن ثم اضفاء حماية لنباتات البطاطا ضد الإصابة بفيروس البطاطا واي والتي وصلت الى حد 18 يوماً يدل على عدم تخصص هذه البروتينات

والتي هي صفة من صفات الانترفيرون الحيواني. لذلك فمن الأرجح تسميتها بالمواد الشبيهة بالإنترفيرون والتي تختلف عن البروتينات ذات العلاقة بالامراضية Pathogenesis Related Proteins (PR-proteins) من ناحية أنها لاتعطي مناعة مستديمة للنبات فضلاً عن حساسيتها لحامض البيرفورميك أما البروتينات المستحثة في نبات الطماطة فهي غير متحسسة لحامض البيرفورمك كما أوضحت نتائج الدراسة فضلاً عن تخصصية البروتينات ذات العلاقة بالإمراضية في حين كانت البروتينات المستحثة في نبات الطماطم نتيجة إصابتها بفيروس البطاطا اس غير متخصصة بدليل أنها أضفت حماية لنبات البطاطا من الاصابة بفيروس البطاطا واي، وإنعدام التخصصية هي من صفات الانترفيرون فضلاً عن صفات أخرى لا تتمتع بها جميع البروتينات التي تستحث في النباتات نتيجة إصابتها بالفيروس أو تلك البروتينات التي تستحث بمواد كيميائية أو عضوية أخرى.

Abstract

Al-Ani, R.R. 2011. Production of Interferon-like Substances in Tomato Plants Immune to Infection With *Potato Virus S* Following Inoculation With This Virus. Arab Journal of Plant Protection, 29: 253-257.

This study was carried out to investigate the resistance mechanisim of tomato plants to infection with *Potato virus S* (PVS). The molecular weight of healthy tomato plant proteins was determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The results showed the presence of six protein bands of 14.2, 20.1, 24.9, 29.0, 36.0, 45.0 kDa when mechanically inoculated three times (once every 48 hrs.) by a crude sap of potato plants infected with PVS. The ELISA test showed that inoculated tomato plants were not infected with the virus. The profile of gel electrophoresis showed the presence of three novel protein bands of 26.0, 30.0, 32.0 kDa in size, which could be the reason for tomato plants resistance to the virus. The proteins produced in virus–inoculated tomato plants were mixed with performic acid and centrifuged. The gel electrophoresis profile of the precipitant protein appeared as three protein bands, 26.0, 30.0 and 32.0 kDa in size. The extracted protein from tomato plants were sprayed on potato plants with three concentrations of 20, 40, 60 microgram/ml on three plants for each concentration, followed by inoculation with crude sap of potato plants infected with potato virus Y three times every 48 hrs. Results obtained showed that the first concentration provided a protection for potato plants for 12 days, whereas the second and third concentrations provided potato plants a protection against PVY up to 18 days. This result indicated that the proteins produced in tomato plants in response to infection with *Potato virus S* were not virus-specific, which is an important characteristic of the animal interferon.

Keywords: interferon- like substance, potato virus S, tomato, potato.

Corresponding author: Raed Raouf Al-Ani, Biotechnology Research Center, Al-Nahrain University, Iraq, Email: raed_r1961@yahoo.com

References

1. **Al-Ani, R.** 2006. Induction of Systemic Acquired Resistance in Tobacco and Tomato Plants against TOMV. PhD thesis, College of Agriculture, Baghdad University, Iraq.
2. **Al-Ani, R.A., U.N. Al-Essawi, and S.A. Al-Mashaikhy.** 2002. Isolation of proteins from *Datura stramonium* have ability to inhibit the multiplication of *Potato virus Y* (PVY). Jerash Journal for Research & Studies, 7: 9-21
3. **Busan, G.H., K. Kessemeyer and V. Marten.** 1997**.** Differential expression of chitinase in *Vitis vinifera* L. Responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. Plant Physiology, 115: 1092-1038.
4. **Chessin, M., D. DeBorde and A. Zipf (eds.).** 1994. Antiviral proteins in higher plants. CRC Press, Boca Raton, Fl.
5. **Chui, E.W., R.A.J. Carson and J.P Carr.** 2002. Chemically induced virus resistance in *Arabidopsis thalina* is independent of pathogenesis related protein expression and the NPR1 Gene. Molecular Plant-Microbe Interactions, 15: 75-81.
6. **Coa, H., X. Li and X. Dong.** 1998. Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. Proceeding of the National Academy of Sciences USA, 95: 6531-6536.

المراجع

7. **Da Rocha, A., S.T. Ohki and C. Hiruki.** 1986. Detection of mycoplasma-like organisms *in situ* by indirect immunoflorescence microscopy. Phytopathology, 76: 864-868.
8. **Garfin, D.E.** 1990. One-dimensional gel electrophoresis. In: Methods in Enzymology. M.P. Deutscher (ed.). Academic Press, San Diego. 182: 425-441.
9. **Givan, C.V. and R.M. Leech.** 1971. Biochemical autonomy of higher plant chloroplasts and their synthesis of small molecule. Biology Reviews, 46: 409-428.
10. **Grasso, S. and R.J. Shephered.** 1987**.** Isolation and partial characterization of virus inhibitors from plant species taxonomically related to *Phytolacca*. Phytopathology, 68:199-205.
11. **Hammerschmidt, R., J.P. Metraux and L.C. van Loon.** 2001. Inducing resistance: A summary of papers presented at the first the first international symposium on induced resistance to plant diseases, Corfu, May 2000. European Journal of Plant Pathology, 107:1-6.
12. **Horvath, D.M. and N.H. Chua.** 1996. Identification of an Immediate-early salicylic acid-inducible tobacco gene and characterization of induction by other compounds. Plant Molecular Biology, 31: 1061-1072.

13. **Karlov Bogulsow, K. Clownia, Kaisimierz Majewska, Anisska Petkwlez, Jozfefa, Szaiawska-Dekundy, Danuta.** 1976. Search for coumarin compound fruits and seeds, I Fruits of the families umbelliferae and Apiaceae, Farm Pol. 34: 25-28.
14. **Leeman, M., F.M. Den Ouden, J.A. Van Pelt, F.P.M. Dirkx, H. Steijl, P.A.H.M. Bakker and B. Schippers.** 1996. Iron availability affects induction of systemic resistance to Fusarium wilt of radish by *Pseudomonas flourescens.* Phytopathology, 86:149-155.
15. **Meyer, C.** 1983. Is there a plant interferon? The Botanical Review, 49: 1-28.
16. **Newbury, H.J. and J.V. Possingham.** 1977. Factor affecting the extraction of intact ribonucleic acid from plant tissues containing interfering phenolic compound. Plant Physiology, 60: 543-547.
17. **Noordam, D.** 1973. Identification of plant viruses: methods and experiments. Center for Agriculture Publishing and Documentation, Wageningen, the Netherlands. 207 pp.
18. **Spletzer, M.E. and A.J. Enyedi.** 1999**.** Salicylic acid induces resistance to *Alternaria solani* in hydroponically grown tomato. Phytopathology, 89: 722-727.
19. **Vivanco, M.J., M. Querci and F. Ssalazar.** 1999. Antiviral and Antiviroid Activity of MAP-containing extract from *Mirabilis jalapa* roots. Plant Disease, 83: 1116-1121.
20. **Wei, Z.M. and S.V. Beer.** 1996. Harpin from *Erwinia amylovora* induces plant resistance. Acta Horticulturae, 411: 223-225.
21. **Zehnder, G.W., J.F. Murphy, E.J. Sikora and J.W. Kloepper.** 2001**.** Application of rhizobacteria for induced resistance. European Journal of Plant Pathology, 107: 39-50.

Received: October 9, 2010; Accepted: January 24, 2011

تاريخ الاستلام: 2010/10/9؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2011/1/24