Mesopotamia J. of Agric. ISSN: 2224 - 9796 (Online) مجلــة زراعــة الـرافديـن
Vol. (45) No. (3) 2017 ISSN: 1815 - 316 X (Print) المجلد (45) العدد (3) 2017

تأثير بعض المستخلصات النباتية ومركبات اخرى في فايروس موزاييك الرقي (WMV) *Watermelon mosaic virus*

بـان علـي أحمـد نبيـل عزيـز قاسـم
قسم وقاية النبات / كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل – العراق
E-mail: ban_alnamy@yahoo.com

الخلاصة

أظهـر اختبـار الاليـزا باستعمال المصـل المضـاد لفـايروس موزائيـك الرقـي WMV تفـاعلاً موجبـاً مـع مستخلص من نبـات القرع تظهر عليـه اعراض الموزائيك والتنفط وتشوه الاوراق، وقد تم تأكيد التشخيص بالاختبارالحيوي وذلك بظهور البقع الموضعية المصفرة على أوراق نبات الزربيح وهو النبات الكاشف الكمي لهذا الفايروس. اظهر كلا من المضاد الحيوي الميتومايسين ومحلول البارا امينو فينول ومستخلصات الثويا الكحولي والمائي والرغيلة المائي والكحولي واليوكالبتوس الكحولي بالتراكيز العالية كفاءة تثبيطية عالية في تثبيط فايروس موزاييك الرقي (WMV) خارج النسيج الحي عند مزج محاليلها مع عصير النبات المصاب فيما كانت اقل نسبة تثبيط للمبيد البافستين بتركيز 0.5 مل/ لتر اذ بلغ متوسط عدد البقع 3.8 بقعة / ورقة من اوراق نبات الزربيح، اظهر المستخلص الكحولي لليوكالبتوس ومحلول البارا امينو فينول قدرة تثبيطية عالية في تثبيط الفايروس داخل النسيج الحي تلتها معاملة الثويا الكحولي ومستخلص الرغيلة المائي فيما ابدى المبيد بافستين بتركيز 0.5 مل / لتر نسبة قليلة في تثبيط الفايروس تلاها المستخلص المائي لليوكالبتوس بتركيز12.5ملغم/ مل، ان نتائج التثبيط العالية لجميع المعاملات وخاصة في التراكيز العالية تتفق مع معدل قراءات اليزا على الطول الموجي405 نانومتر.

الكلمات الدالة: فايروس موزاييك الرقي، المستخلصات النباتية، مركبات مختلفة.

تاريخ تسلم البحث: 2013/2/26 ، وقبوله: 2013/5/27.

المقدمة

يُعد فـايروس موزاييك الرقـي (WMV) *Watermelon mosaic virus* من الفايروسـات الخطـرة والمهمة اقتصادية على انتاجية محاصيل العائلة القرعية Cucurbitaceae اذ يؤدي الى خسائر كبيرة في الانتاج وخفض في نوعية المحصـول (Coutts، 2006)، وهو من الفايروسـات عالميـة الانتشـار وسُجل وجوده في العراق لاول مرة عام 1979 على العديد من محاصيل الخضر (Shawkat و Fegla،1979) وله اهمية اقتصادية كبيرة في القطر اذ ينتشر في معظم حقول المحاصيل القرعية بشكل وبائي مسببا خسائر جسيمة في الحاصل ولذلك اتجهت الدراسات الحديثة حول التـأثير التثبيطي للعديد من مستخلصات الاجزاء النباتية وبعض المضادات الحياتية ومواد اخرى على الفايروسات النباتية اذ ترتبط هذه المواد مع الكابسيد الفايروسي (الغطاء البروتيني) لتعيق حركة الفـايروس عبر الخلايا اوتمنع نزع الكابسيد عند بداية تضـاعف الفـايروس فتفشل الاصابة (Mahy وVan Regenmortel، 2008) وقد اظهرت هذه المواد قدرتها التثبيطية للفايروسات سواء عند استعمالها مخلوطة مع العصير النباتي (خارج النسيج الحي) او رشا على النباتات (داخل النسيج الحي) فمنعت الاصابة اواعاقت ظهورها.استهدفت هذه الدراسة اختبار مكافحة فايروس موزاييك الرقي (WMV) باستعمال بعض المستخلصات النباتية والمضاد الحيوي Mitomycin-C والمبيد الفطري البافستين والمركبين الفينولبين البارا امينو فينول والنفثالين التجاري.

مواد البحث وطرائقه

أولاً: جمع عينات الاوراق المصابة وتشخيص الفايروس: جمعت عينات من نباتات قرع صنف محلي ظهرت على اوراقها اعراض الموزاييك الاخضر وبثرات خضراء وتشوه من حقول منطقة القبة قرب الموصل وذلك في الموسم الصيفي (النصف الاول من شهر تموز) لسنة 2011، سحقت الاوراق في هاون خزفي مع المحلول المنظم الفوسفاتي KH2PO4 عياريته 0.01 مولاري واس هيدروجيني 7.6 بنسبة2:1 وزن: حجم (وزن اوراق: حجم محلول منظم)، رشح العصير خلال طبقتين من الموسلين ولقحت به اوراق عشرة نباتات قرع وهو من النباتات الكاشفة لفايروس موزاييك الرقي (WMV) (Adlrez واخرون،1974 والبياتي،1987 وBrunt واخرون 1996). اخذت الاوراق التي ظهرت عليها الا عراض وتم الكشف عن الفايروس بطريقة

البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الأول.

الاليزا Das-ELISA المباشرة باستعمال طبق البوليسترين المعامل مسبقا بمحلول الجلوبيولينات المناعية النقية طراز IgG المخفف في محلول التغطية Coating Identekit Buffer ، واجري الاختبار وفق التعليمات المرفقة بالشركة البريطانية المنتجة للموصول وهي " شركة نيوجين الاوربية لانتاج المصول" NEOGEN Europe Conningham Building, Auchincrive Ayr,Ayrshire Scotland, KA6 5HW-United Kingdom. وكما يأتي:

1- أُضيف الى حفر العمود الاول 100 ميكروليتر من العينة القياسية الموجبة المجهزة من قبل الشركة المنتجة مع اضافة 100 ميكروليتر من عصير اوراق القرع المصابة في العمود الثاني والذي حضر مع محلول الاستخلاص Tissue Extraction Buffer المزود من قبل الشركة المنتجة للمصول بنسبة 10:1 وزن اوراق: حجم المحلول، ثم رشح المحلول بطبقتين من الموسلين، اخذ رائق كل عينة واخضع لاختبار الأليزا المباشر اما في العمود الثالث فتم اضافة 100 ميكروليتر من عصير اوراق قرع سليمة، حضن الطبق في درجة 4 م° لمدة 24 ساعة في حمام ثلجي.

2- غُسلت الحفر بالمحلول المنظم الفوسفاتي(Phosphate Buffer Saline- Tween-20 (PBS-T بواسطة قنينة غسل ثلاث مرات مع قلب الطبق وتفريغه من محلول الغسل في كل مرة مع فترة خمس دقائق بين غسلة واخرى.

3- أُضيف لكل حفرة مستعملة من الطبق 100 مايكروليتر من المحلول المنظم المترابط Conjugate Bufer والمكون من محلول الكلوبيولين المناعي النقي طراز IgG المرتبط بانزيم الفوسفاتيز القاعدي Alkaline Phosphatase.

4- حُضن الطبق في درجة 37 م° لمدة ساعة واحدة في حاضنة بعد وضعه في كيس من النايلون المقفل.

5- غُسل الطبق كما في الفقرة (2) اعلاه.

6- أُضيف 100 ميكروليتر من محلول المادة الاساس P-Nitro Phenol Phosphate وهي مادة كاشفة عديمة اللون تتحول الى اللون الاصفر بفعل انزيم الفوسفاتيز القاعدي الى الحفر المستعملة، ترك الطبق عند حرارة المختبر (25 ± 2) م° في مكان مظلم لمدة ساعة.

7- أُوقف التفاعل بإضافة 50 ميكروليتر من هيدروكسيد الصوديوم NaOH تركيز 3 مولاري الى كافة الحفرالمستعملة للطبق. نُفذ الأختبار في مختبر الفايروسات التابع لقسم وقاية النبات، كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل. حفظت عزلة الفايروس بعد تشخيصها باختبار الأليزا على نباتات قرع صنف محلي ورشت النباتات رشات وقائية كل 20 يوم بالمبيد الحشري ادفاثيون 400 بنسبة 1.5 مل / لتر ماء لمنع الاصابات الحشرية، استمر تجديد العزلة على نباتات قرع جديدة بتلقيحها ميكانيكيا لاستعمالها في الاختبارات اللاحقة.

ثانياً: تحضير المواد المثبطة للفايروس:

1- إعداد مساحيق الاوراق لنباتات اليوكالبتوس والثويا والرغيلة: تم الحصول على اوراق نباتات اليوكالبتوس *Eucalyptus camaludelensis* والثويا *Thuja orientalis* و الرغيلة *Chenopodium album* من حقول كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل، اجريت عملية التجفيف بغسل الاوراق بالماء ووضعها على انفراد فوق اوراق الجرائد في الظل لضمان تجفيفها بالكامل وتقليل فقد الزيت مع التقليب المستمر بوجود تيار هوائي للاسراع في عملية التجفيف (الدجوي، 1996)، استغرق اكتمال جفاف الاوراق 9، 3، 5 ايام للانواع النباتية الثلاثة على التوالي تحت درجة 35-38 م°. سحقت الاوراق الجافة في هاون خزفي ثم مررت عبر بمنخل قياس 1500 مش لجعلها بشكل مسحوق ناعم ومتجانس. حفظت في قناني معتمة في الثلاجة بدرجة حرارة 4 م° لحين الاستعمال.

2- تحضير المستخلصات المائية والكحولية لاوراق نباتات اليوكالبتوس والثويا والرغيلة: حضرت المستخلصات المائية لاوراق النباتات المذكورة حسب طريقة طريقة Riose واخرون (1987). اضيف 10غم من كل مسحوق الى 100مل من الماء المقطر في دوارق زجاجية سعة 250 مل وضعت الاوراق في المازجة الكهربائية Blender مع اضافة الثلج المجروش اثناء عملية الطحن لمنع ارتفاع درجة حرارة المزيج، نقلت العينات الى بيكر وعرضت للرج باستعمال المازج المغناطيسيMagnatic rotary stirrer ، حرك المزيج لمدة 60 دقيقة ثم ترك لمدة 24 ساعة في الثلاجة عند 4 م° لتمام النقع. رشح مزيج المستخلصات عبر ورق الترشيح نوع What man No.1 تحت التفريغ في قمع بخنر، ركز الراشح حسب طريقة Al-Ani واخرون (2010)

بالحمام المائي عند درجة حرارة 40-50 م° للتخلص من الماء الزائد مع الرج المستمر للمستخلصات لضمان عدم ترسيب المادة الفعالة في القعر لمنع احتراقها، و ترك الراشح ليجف بشكل مادة شبه صلبة، اما بالنسبة للمستخلصات الكحولية فقد تم اذابة الكمية ذاتها من المساحيق الجافة المستعملة انفا في 100مل من الكحول الاثيلي تركيز 96% تم اتبعت نفس خطوات تحضير المستخلص المائي. وضعت جميع المستخلصات في قناني معتمة وحفظت في الثلاجة لحين الاستعمال. تم تحضير التراكيز القياسية للمستخلصات المائية والكحولية حسب الطريقة التي ذكرها النعمان (1998) اذ تم وزن غرام واحد من كل من المستخلص المائي والكحولي لاوراق نباتات اليوكالبتوس والثويا والرغيلة والمحضرين مسبقا كل على حدة في 10 مل من الماء المقطر اما المستخلص الكحولي فتم اضافة قطرات من الكحول الاثيلي لاذابته، بعد ذلك تمت اضافة 10 مل من الماء المقطر وبذا تم الحصول على 100ملغم/ مل كتركيز قياسي من كل من المستخلص المائي والكحولي. تم تحضيرالتراكيز 50 و25 و12.5 ملغم / مل بالنسبة للمستخلصات المائية للثويا والرغيلة واليوكالبتوس وكذلك اعتمدت ذات النسبة للمستخلصين الكحوليين الثويا والرغيلة، اما مستخلص اليوكالبتوس الكحولي فتم اعتماد التراكيز25 و 12.5 و6 ملغم/ مل، وذلك لان التراكيز 50% سبب حرقا للاوراق

3- تحضير محلول المضاد الحيوي الميتومايسين "سي": تم استعمال العبوة الصيدلانية للمضاد الحيوي الميتومايسين" سي" Mitomycin C التي تحوي على 240 ملغم من مادة كلوريد الصوديوم و 10ملغم من المادة الفعالة Mitomycin C وزن1 و 0.7 و 0.4 ملغم / لتر ووضعت في انابيب صغيرة محكمة القفل وضعت في الثلاجة، تم اذابة كل وزن في 1000مل من الماء المقطر وتمت الاذابة قبل الاستعمال مباشرة.

4- تحضير محلول المبيد كارباندازيم: تم اخذ 0.5 مل حسب التركيز الموصى به من قبل شركة البرج لصناعة المبيدات الزراعية المنتجة و1 مل و1.5 مل من المبيد كارباندازيم Carbendazim الذي يحوي على 500 غم من المادة الفعالة واضيف كل حجم في دورق زجاجي نظيف ومعقم يحوي 1000 مل من الماء المقطر وتم تحضير التخافيف قبل الاستعمال مباشرة.

5- تحضير محلول مركب البارا امينوفينول: اخذ وزن 1 غم و 3 غم و 6 غم من المركب بارا امينوفينولPara aminophenol اذ تم اذابة كل وزن في 1000مل من الماء المقطر في دورق نظيف ومعقم وتمت الاذابة قبل الاستعمال مباشرة.

6- تحضير محلول النفثالين التجاري: سحقت كمية من مادة النفثالين التجاري في هاون خزفي للحصول على مسحوق ناعم وغربلت جيدا بمنخل بقياس 1500مش، تم وزن1غم و 3 غم و6 غم من المسحوق واذابتها كل على انفراد في 1000مل من الماء المقطر وتم مزج التخافيف بواسطة المازج المغناطيسي لمدة 10 دقيقة لكل تخفيف. وتمت الاذابة قبل الاستعمال مباشرة.

ثالثاً: اختبارات تثبيط فايروسي موزاييك الرقي(WMV) خارج وداخل النسيج الحي

أ- معاملة العصير الفايروسي بالمواد المثبطة (المعاملة خارج النسيج الحي in vitro): حضرت خمسة مل من عصير اوراق نباتات القرع المصابة بعزلة الفايروس وخلطها مع حجم مماثل من كل تركيز من تراكيز المواد المثبطة المشار اليها انفا كلا على انفراد، ومزجت جيدا وترك المزيج لمدة عشرة دقائق في درجة حرارة المختبر تم بعد ذلك تلقيح خمسة اوراق مفصولة لنبات الزربيح *Chenopodium amaranticolor* ميكانيكيا موضوعة في احواض خاصة بعد رشها بالكاربوراندم، وضعت النباتات الملقحة في غرفة مضاءة بالفلورسنت الابيض وحفظت لحين ظهور الاعراض وحساب عدد البقع الموضعية على نبات الزربيح، وتم حساب النسبة المئوية للتثبيط لكل مادة حسب المعادلة التالية:

$$\text{النسبة المئوية للتثبيط} = \frac{\text{المقارنة} - \text{المعاملة}}{\text{المقارنة}} \times 100$$

ب - معاملة النباتات بالمواد المثبطة (معاملة النسيج الحي in vivo): نُفذت التجربة في البيت البلاستكي وفق تصميم القطاعات العشوائية(RCBD) الكاملة بواقع ثلاث قطاعات ضم القطاع الواحد 12 معاملة من المعاملات المذكورة انفا وبخمس مكررات لكل معاملة وذلك بغمر قطعة من القطن الطبي بالتراكيز المحضرة من المعاملات المختلفة ومن ثم مسح السطح العلوي والسفلي لاوراق خمسة نباتات قرع سليمة بمرحلة نمو اربعة

اوراق، ثم لقحت النباتات بالعصير الفايروسي المستخلص من نباتات مصابة بعزلة الفايروس وذلك بعد 72 ساعة من المعاملة بالمواد المثبطة، تم حساب النسبة المئوية للتثبيط لكل مادة حسب المعادلة السابقة.

النتائج والمناقشة

أولاً: تشخيص فايروس موزائيك الرقي (WMV): اظهر التشخيص المصلي الذي اجري باستعمال الاليزا المباشرة DAS-ELISA وكما مبين في الشكل (1) ان الفايروس المسبب هو فايروس موزائيك الرقي (WMV) اذ ظهر اللون الاصفر في حفر العينات المصابة في الطبق والذي لوحظ بالعين المجردة ولم يظهر في حفر العينات السليمة كما اظهر جهاز المطياف القارئ الملحق بمنظومة الاليزا نوع teach UK معدل قراءة الامتصاصية للعينة المصابة على الطول الموجي 405 والتي بلغت 0.69 فيما بلغت معدل القراءة للعينة السليمة 0.16، كما ان ظهور البقع الموضعية على اوراق الزربيح *C. amaranticolor* الملقحة ميكانيكيا بعزلة الفايروس بهيئة بقع موضعية مصفرة هو تشخيص حيوي اثبت وجود الفايروس وفعاليته، (Adlrez واخرون،1974و Auger واخرون،1974 و Shawkat و Fegla، 1979و Al-Musa وMansour، 1982 والبياتي،1987 و قاسم والبيضاني،2010).

ثانيا: أ- تأثير المواد المثبطة بخلطها مع العصير الحاوي على الفايروس (المعاملة خارج النسيج الحي): اظهرت النتائج المبينة في الجدول (1) ان كافة المواد التي استعملت في تثبيط فايروس موزائيك الرقي (WMV) في العصير الخام كان لها تأثير تثبيطي عالي في الاوراق المفصولة لنبات الزربيح *C. amaranticolor* بدلالة عدم وجود البقع الموضعية اذ بلغت لبعض المواد 100%. تدل النتائج ان هناك فرقا معنوية احصائيا بين القيم الممثلة للمعاملات المختلفة وقيمة المقارنة بالنسبة للنبات المصاب ويفسر ذلك ان الفايروس في العصير الخام في تماس مباشر مع المواد المثبطة وان التأثير المباشر الذي تبديه هذه المواد في تثبيط الفايروس راجع الى ارتباطها مع البروتين الفايروسي التركيبي (الكابسيد) وارباك عملية تفكيكه في بدء عملية التضاعف او تعمل على إعاقة حركة الفايروس بين الخلايا، او قد تمنع الجسيمات الفايروسية من مناطق دخول الخلية وذلك لاشغالها من قبل هذه المركبات، وربما يكون التأثير على رايبوسوم الخلية النباتية فيؤدي الى اعاقة عملية التضاعف، فضلا عن ماذكرهReitz واخرون (2008) في ان الزيوت الموجودة في المستخلصات النباتية تعمل كغشاء واقي على سطح الورقة لاعاقة اختراق الفايروس. وهذه النتائج تتطابق مع كثير من البحوث التي اشارت الى كفاءة المواد المستعملة انفا في تثبيط الفايروس خارج النسيج الحي فقد ذكر Al-Ani وآخرون (2011) الى ان نسبة التانينات في مستخلص الثويا *T. orientals* تصل الى 70% والتي اثرت مباشرة على الفايروس. و من المعروف ان التانينات لها تأثير تثبيطي فعال على الفايروسات وذلك لارتباطها مع البروتين الفايروسي باواصر هيدروجينية توقف عمله الحيوي وتتأكسد التانينات بأنزيم "الاوكسديز متعدد الفينول" Polyphenol oxidase لتتحول الى" كينونات" Quinones وهي مركبات اكثر تأثيراً على الفايروسات، وفي هذا المجال اشار قاسم (2011) الى ارتباط التانينات مع ايون النحاس وحدوث كسر في سلسلة الرنا الفايروسي المزدوج والمفرد الخيط، اشار Deepth واخرون (2007) الى التأثير التثبيطي للمستخلص المائي والكحولي لاوراق الثويا لفايروسي موزائيك الطماطة (ToMV) *Tomato mosaic virus* وموزائيك التبغ(TMV) *Tobacco mosaic virus* عند مزج المستخلص مع العصير الخام لكلا الفايروسين ومعاملته لاوراق التبغ .Necotena glutinosa اشار Singab واخرون (2011) الى احتواء الزيوت الاساسية في اوراق اليوكالبتوس على مركبات فينولية واهمها مركبي الكارفاكرول Carvacrol و الثايمول Thymol وقد ذكر Dunkie واخرون (2010) الى ان التأثير على الفايروس ناتج عن احتواء المركبين المذكورين على مجموعة الهيدروكسيل OH التي ترتبط مع البروتين الفايروسي فتعمل على تثبيط عمله.

ب - تثبيط فعالية فايروس WMV بمعاملة نباتات القرع بالمواد المثبطة داخل النسيج الحي: اثبتت نتائج تثبيط الفايروس داخل النسيج الحي بالمعاملات المختلفة والتي التي استعملت في تثبيط الفايروس خارج النسيج الحي و لغاية 14 يوم من التلقيح كفاءة عالية للمواد، فيما انخفضت النتائج بعد عشرين يوماً من التلقيح بالفايروس وكما مبين في الجدول (2)، اذ اظهر المستخلص الكحولي لليوكالبتوس بتركيز 25 ملغم / مل ومحلول البارا امينو فينول بتركيز 6 غم/ لتر كفاءة عالية في تثبيط الفايروس بلغت 100% تلتها معاملة الثويا الكحولي بتركيز 50 ملغم / مل ومستخلص الرغيلة المائي بتركيز 50 ملغم / مل اذ اعطت نسبة تثبيط بلغت 93,3% فيما ابدى المبيد بافستين بتركيز 0.5 مل / لتر نسبة قليلة في تثبيط الفايروس بلغت 20% تلاه المستخلص المائي لليوكالبتوس بتركيز12,5 ملغم/ مل بنسبة تثبيط بلغت 6,6 % ان نتائج التثبيط العالية لجميع

الجدول (1): التأثير التثبيطي للمعاملات المختلفة على فايروس موزائيك الرقيWMV باستعمال النبات الكاشف C.amaranticolur (خارج النسيج الحي).

Table (1): The inhibitory effect of various treatments on (WMV) Watermelon mosaic virus using indicator plant C.amaranticolur (1n vitro)

النسبة المئوية للتثبيط Percentage of inhibition	*متوسط عدد البقع / ورقة *Average number of spots /leaf	التركيز Conc.	المعاملات treatments
100 97 87	0 a 0.6 a b 2.6 d e f	1 mg/L 0.7 0.4	الميتومايسين Mitomycin
100 93 90	0 a 1.4 a-d 2 b-f	6 g/L 3 1	امينوفينول Aminophenol
98 95 90	0.4 a-b 1 a-d 2 b-f	6 g/L 3 1	النفثالين Naphthalene
90 87 81	2 b-f 2.6 d-f 3.8 e-f	1.5 ml/L 1 0.5	بافستين Bavstin
100 93 87	0 a 1 a-d 2.6 d e f	50 mg/ml 25 12.5	ثويا كحولي Alcohol / thuja
100 89 83	0 a 2.2 c-f 3.4 e f	50 mg/ml 25 12.5	ثويا مائي Aquest / thuja
99 94 87	0 a 1.2 a-d 2.6 d e f	50 mg/ml 25 12.5	رغيلة كحولي Alcohol / chenopodium
100 91 89	0 a 1.8 a-e 2.2 c-f	50 mg/ml 25 12.5	رغيلة مائي Aquest / chenopodium
100 97 94	0 a 0.6 a b 1.2 a-d	25 mg/ml 12.5 6	يوكالبتوس كحولي Alcohol / eucalyptus
96 96 82	0.8 a b c 0.8 a b c 3.6 e f	50 mg/ml 25 12.5	يوكالبتوس مائي Aquest / eucalyptus
0	20 g		نبات مصاب Infected plant
100	0 a		نبات سليم Healthy plant

* تمثل القيم معدل عدد البقع في خمسة اوراق مفصولة
القيم التي تحمل حروفا مشتركة لا تختلف معنويا عن مستوى احتمال 5%

* Values represent the average of number of spots in the five separated leaves.
Values that bore joint does not significantly differ from the 5% probability of level

المعاملات تتفق مع معدل قراءات اليزا على الطول الموجي405 نـانومتر لعينـات من اوراق ملقحـة بالفـايروس ومعاملة بالمعاملات المختلفة وكما مبين في الشكل (2) اذ كان هـناك فروق معنوية واضحة بين العينات المعاملة وخاصة في التراكيز العالية وبين عينة المقارنة.

الجدول (2): التأثير التثبيطي للمعاملات المختلفة على فايروس موزائيك الرقيWMV باستعمال النبـات الكاشف Vicia faba داخل النسيج الحي.

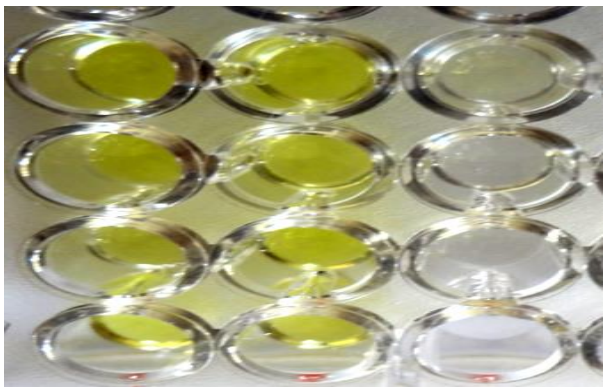
Table (2): The inhibitory effect of various treatments on (WMV) Watermelon mosaic virus using Vicia faba (1n vivo).

*% للتثبيط بعد 20 يوم inhibition after 20 day%	*% للتثبيط بعد 14يوم inhibition after 14 day%	التركيز Conc.	المعاملات treatments
80 e-b 60 e-h 40 g h I	100 a 100 a 66.6 d-g	1 mg/L 0.7 0.4	الميتومايسين Mitomycin
100 a 73.3 c-f 60 e-h	100 a 93.3 a b 80 b-e	6 g/L 3 1	امينوفينول Aminophenol
86.6 b c 60 e-h 40 g h i	100 a 80 b-e 66.6 d-g	6 g/L 3 1	النفثالين Naphthalene
80 b-e 60 e-h 20 i j	100 a 80 b-e 33.3 h i j	1.5 ml/L 1 0.5	بافستين Bavstin
93.3 a b 60 e-h 53.3 e-h	100 a 86.6 b c 80 b-e	50 mg/ml 25 12.5	ثويا كحولي Alcohol / thuja
86.6 b c 66.6 d-g 53.3 e-h	a 100 80 b-e 73.3 c-f	50 mg/ml 25 12.5	ثويا مائي Aquest / thuja
86.6 b c 53.3 e-h 40 g h i	93.3 a b 80 b- e 73.3 c-f	50 mg/ml 25 12.5	رغيلة كحولي Alcohol / chenopodium
b 93.3 a 86.6 b c 73.3 c-f	100 a 93.3 a b 93.3 a b	50 mg/ml 25 12.5	رغيلة مائي Aquatic/ chenopodium
100 a 86.6 b c 60 e-h	100 a 100 a 93.3 a b	25 mg/ml 12.5 6	يوكالبتوس كحولي Alcohol/ eucalyptus
33.3 h i j 13.3 i j k 6.6 j k	86.6 b c 40 g h i 13.3 i j k	50 mg/ml 25 12.5	يوكالبتوس مائي Aquatic / eucalyptus
0 k	0 k		infected plant نبات مصاب
100 a	100 a		healthy plantنبات سليم

* تمثل القيم متوسط ثلاث قطاعات
القيم التي تحمل حروفا مشتركة لا تختلف معنويا عن مستوى احتمال 5%

* Values represent mean of three sectors
Values that bore joint does not significantly differ from the 5% probability of level

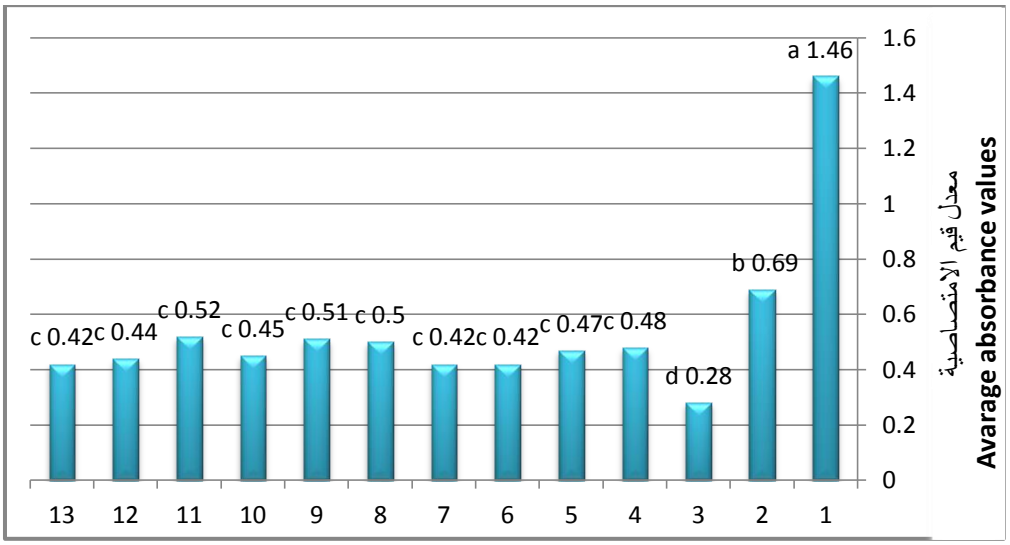
ان كفاءة التثبيط كانت عالية بعد 14 يوم من المعاملة وهذا راجع الى امتصاص هذه المركبات وتأثيرها على الفايروس وهو داخل النبات الا ان كفاءة التثبيط قلت بعد عشرين يوم وهذا يتوافق مع ماشار اليه السعيدي (2004) من ان فعل المثبطات سواء بتحفيز النبات على تكوين مواد مثبطة لتضاعف الفايروس اوبشكل مباشر بالتدخل في عمليات تضاعف الفايروس ليست مستمرة بشكل لانهائي اذ تنخفض بعدها فعالية هذه المواد وقد يعود السبب في ذلك الى تفكيك وتكسر المادة المثبطة والتي قد تكون مع الفايروس معقد ضعيف. ويكون هذا التفكك بدرجات متفاوتة مما نتج عنها اختلافات في قدرة الفايروس على احداث الاصابة في النبات وهذا مما يقود الى الاقتراح بان المثبطات المتكونة تعمل لوقت قصير مختزلة بذلك نشاط وفعالية الفايروس، و ذكر قاسم واخرون (2006) ان كفاءة التثبيط تقل مع مرور الوقت وذلك قد يكون بسبب تحول هذه المركبات الى مواد غير مؤثرة على فسلجة النبات العائل بسبب العمليات الايضية للنبات. عموماً فان تثبيط تطور الاصابة الفايروسية الجهازية قد يعود الى اليات عدة محتملة، اذ قد يثبط المستخلص حركة الفايروس من والى اللحاء واذا ماكان الطور المتحرك لفايروسي موزائيك الرقي(WMV) هو الحامض الرايبي العاري عندها يكون التثبيط الجهازي بسبب تقليل امراضية او فعالية الحامض النووي وهذا يتلائم مع العديد من البحوث التي اشارت الى ذلك (Lindner واخرون، 1960 و Fraser و Whenham، 1978) وقد تكون لسرعة تكوين الفينولات او التانينات او البروتينات المرافقة للمقاومة المحفزة في النبات العائل وتداخلها في الية عمل المستخلص فضلا عن مدة بقاء هذه المؤثرات دور في تفاوت المدة الزمنية اللازمة لبلوغ المقاومة المحفزة اعلى مستوياتها او ادناها. ان نتائج تثبيط فايروس موزائيك الرقي(WMV) داخل النسيج الحي تتفق مع ما اشار اليه العديد من الباحثين من تأثير المواد انفة الذكر على تثبيط الفايروسات داخل خلايا النبات اثبت حمد (2000) الى ان المستخلص الكحولي لنبات الثويا حقق تثبيطا تاما لفايروس تجعد واصفرار اوراق الطماطا (TYLCV) *Tomato yellow leaf curl virus*وعزى هذا التأثير الى احتواء المستخلص على نسبة عالية من التانينات و ذكر Shukla وآخرون(2007) الى ان المستخلص الذي اطلق عليه Thuja30وهو مشتق من الثويا *T. orientalis* له تأثير فعال في خفض نسبة الاصابة بفايروس موزائيك الرقي (WMV) على محصول الخيار، وكذلك توصل Al-Ani وآخرون(2010) الى ان مستخلص الثويا الكحولي بتركيز 6غم/ لتر ثبط تضاعف فايروس التفاف اوراق البطاطا (PLRV) *Potato leafroll virus* بنسبة 81.72%. اشار Nayudu (2008) ان الرش بمبيد البافستين ادى الى التخفيف من اعراض الاخضرار في اوراق فستق الحقل *Peanut green mosaic virus* (PGMV) وهذا التأثير الحاصل من قبل المبيد ناتج عن المادة الفعالة للبافستين وهي Carbendazim وهي مماثلة لعمل الكايتين Kinetin المثبطة للفايروس. وجد Sumbali و Mehrotta (2009) انه عند اضافة المبيد الى التربة انخفضت شدة اعراض موزائيك التبغ على نبات التبغ وعمل ايضاً على تأخير تحطيم الكلوروفيل في النبات.



الشكل (1): الكشف عن فايروس (WMV) باستعمال اختبار الاليزا البصري اذ يظهر اللون الاصفر في العمودين المخصصين لكل من العينة الموجبة المجهزة من قبل الشركة المنتجة والعمود الثاني يمثل العينة النباتية المصابة وعدم ظهور اللون في العمود الثالث المخصص لعينة النبات السليم.

Fig. (1): Detection of WMV using ELISA test appears as optical yellow color appears in columns allocated to each of the positive sample supplied by the manufacturer and the second column represents the sample of infected plant. Colorless of the third column allocated for healthy plant sample.

اشار قاسم (2011) ان التأثير التثبيطي للمضاد الحيوي الميتومايسين على الفايروسات راجع الى تماثل تأثيره مع "السايكلوهكساميد" Cyclohyxamid والذي يثبط تخليق البروتين الفايروسي لتداخله مع وظيفة الرنا الناقل aminoacyl-RNA. اما مادة النفثالين التجاري فلم تشر المصادر الى تأثيرها التثبيطي على الفايروسات لذلك فان هذه النتائج ربما تعد اول اشارة لتأثير هذه المادة على تضاعف الفايرس في النبات العائل. ان استعمال هذه المواد قد يفتح مجالا للتوسع في دراسة تنقية المركبات المثبطة من هذه المواد وتحديد طبيعتها الكيميائية كذلك التوسع في دراسة فعالية هذه المواد لتشمل فايروسات اخرى.



الشكل (2): قراءات الاليزا لعينات من الاوراق المصابة والمعاملة بالمثبطات المختلفة.

Fig.(2): ELISA readings infected leaf samples treated with various inhibitors.

(1) العينة القياسية الموجبة (2) النبات المصاب (3) النبات السليم (4) مبيد بافستين 1.5 مل/ لتر (5) محلول النفثالين 6غم/لتر، (6) محلول الميتومايسين 1بالمليون (7) محلول 4- امينوفينول 6غم/ لتر (8) مستخلص الثويا المائي 50 ملغم/ مل (9) مستخلص الثويا الكحولي 12.5 ملغم/مل (10) مستخلص الرغيلة المائي 50ملغم/مل، (11) مستخلص الرغيلة كحولي 50ملغم/مل (12) مستخلص اليوكالبتوس المائي 25ملغم/ مل (13) مستخلص اليوكالبتوس الكحولي 6ملغم/مل.

(1) standard sample positive (2) infected plant(3) healthy plant (4) fungicide bavstin 1 ml /L (5) naphthalene solution 6g/L(6) mitomycin solution 0.7mg/L (7) aminophenol solution 6 g/L (8) Aqueous extract of thuja 50 mg / ml (9) Alcoholic extract of thuja 50 mg / ml (10) Aqueous extract of chenopodium 25mg/ml (11) Alcoholic extract of chenopodium 50 mg/ml(12)Aqueous extract of eucalyptus 25 mg / ml (13) Alcoholic extract of eucalyptus 25 mg / ml.

القيم التي تحمل حروفا مشتركة لاتختلف معنويا عن مستوى احتمال 5% كل قيمة في العمود تمثل متوسط ثلاث مكررات القيم في الأعمدة تمثل الامتصاصية على الطول الموجي 405 نانوميتر.

Values that bore joint does not differ significantly from the 5% level of probability The values in the columns represent the absorbance at 405 nm. Each value in the columns represent the average of three replicates.

EFFECT OF SOME PLANT EXTRACTS AND OTHER COMPOUNDS IN *Watermelon mosaic virus* (WMV)

Ahmed, B.A. N.A m
Plant Protection Dept., College of Agriculture and Forestry, Mosul University. Iraq
E-mail: ban_alnamy@yahoo.com

ABSTRACT

ELIZA test using antiserum to *Watermelon mosaic virus* (WMV) positive reaction with extract from squash plants showing mosaic, blistering and malformation leaves which indicate that the virus under study is WMV, the identification was confirmed by biological assay using quantitative indicator plant *Chenopodium amaranticolor* which respect chlorotic local lesions. The antibiotic Mitomycin, Para aminophenol, Chenopodium, alcoholic and aquatic extracts of thuja and chenopodium, and alcoholic extract of Eucalyptus at a high conc. showed a high inhibition on WMV *in vitro* when mixed with disease plant juice directly whereas the lowest inhibition effect resulted when used Bavastin at conc.0.5ml/L (3.8 spot / leaf). The alcoholic extract of Eucalyptus and Para aminophenol showed a high inhibitor effect on WMV *in vivo*, followed by alcoholic extract of Thuja and aquatic extract of Chenopodium, Bavastin and aquatic extract of Eucalyptus showed restricted effects on virus at 0.5ml /L and 12.5mg / ml respectively,. The higher inhibition of all treatments particularly at a high concentration were compatible with ELISA test results at 405nm.

Keywards: *Watermelon mosaic virus*, Plant extracts, Deferent compounds.

Received: 26/2/2013, Accepted: 27/5/2013.

المصادر

البيـاتي، كـريم عبـدالله حسـن (1987). اسـتخدام الزيـوت المعدنيـة فـي مقاومـة فـايروس تبـرقش الرقـي *Watermelon mosaic virus* على قرع الكوسة *Cucurbita pepo L.* رسالة ماجستير، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل.

حمد، سميرعبد الرزاق(2000). تأثير بعض المستخلصات ومنظمات النمو في فايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطة TYLCV. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة بغداد.

الدجوي، علي (1996). موسوعة انتاج النباتات الطبية والعطرية - الكتاب الثاني – مكتبة مدبولي- مصر الطبعة الاولى، 392 ص.

السعيدي، ساجد صلاح الدين سليم (2004). تحفيز المقاومة في نبات الطماطة *Lycopersicon esculentum Mil*l ضد الاصابة بفايروس موزائيك الطماطة *Tomato Mosaic Virus* عن طريق مستخلصات نباتية، اطروحة دكتوراه، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية.

قاسم، نبيل عزيز (2011). فايروسات النبات. دار العلا للطباعة والنشر، الموصل، 555 صفحة.

قاسم، نبيل عزيز وحميد حمود علي ومحمد عدنان عبد المالك عيسى (2006). دراسة تأثير بعض المستخلصات النباتية والمضادات الحياتية على فايروس موزائيك الخيار *Cucumber mosaic virus* *مجلة زراعة الرافدين، 34 (4):134-139.*

قاسم، نبيل عزيز ونصير كاظم البيضاني(2010). الحد من انتشار الفايروسات المسببة للموزائيك على قرع الكوسة باستخدام وسائل مختلفة من المكافحة الحقلية ودراسة تأ ثيرها على الكلوروفيل. *مجلة علوم الرافدين، 21 (2):21-31.*

النعمان، أديبة يونس شريف (1998). التأثير الجزيئي لبعض المستخلصات النباتية على نمو وايض عدد من الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام، اطروحة دكتوراه، كلية العلوم جامعة الموصل.

Adlrez, W.C. (1974). Distribution of watermelon mosaic1 and 2 in Florida. *Phytopathology. 64:350-353.*

Al-Ani, R.A ; S.N.H. Diwan and M.A. Adhab (2010). Efficiency of *Thuja oientalis* and *Artimisia cam*pestris extracts to control o*f Potato leaf roll virus*(PLRV) in potato plants. *Agriculture and Biology Journal of North America. 1: 579-583.*

Al-Ani, R.A. ; M.A. Adhab ; S.A.H. Hamad and S.N.H. Diwan (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: 5149-5155.*

Al-Musa, A. and A-Mansour(1982). Some properties of *Watermelon mosaic virus* in Jordan. *Plant Disease. 66:330-331.*

Auger, J. ; O. Eseaffi and F. Nome (1974). Occurrence of *watermelon mosaic Virus* on cucurbit in Chile. *Plant Disease Report. 52:599-602.*

Brunt, A. ; K. Grabtree and J. Gibbs, Eds.(1996).Plant Viruses Online:Descriptions and Lists from the VIDE Database.

Coutts, B. (2006). Virus diseases of cucurbit crops. Western Australia Department of Agriculture. DAFWA Farm note 166.

Deepthi, N. ; K.N. Madhusudhan ; A.C. Udayshankar ; H.B. Kumar ;H.S. Prakash and H.S. Shetty (2007). Effect of plant extract and acetone Precipitated proteins from six medicinal plant against *Tobamovirus* Infection. *International Journal of Virology.3:80-87.*

Dunkic, V ; N. Bezic ; E. Vuko and D. Cukrov (2010). Antiphytovirul activity of *Satareja montana L.*ssp. vanegata (Host) P.W.ball essential oil and phenol compounds on CMV and TMV. *Molecules. 15:6713-6721.*

Fraser, R.S.S. and R. J. Whenahm (1978).Chemotherapy of plant disease with methyl benzimidazol -2yl- carbamet:effects on plant growth and multiplication of *Tobacco mosaic virus*. *Physiology and Plant Pathology.13: 51 – 64.*

Lindner, R.C. ; P.C. Cheo ; H. C. Kirkpatric ; and H.C. Govindu (1960). Some effect of 8- Azaguanine on *Tobacco mosaic virus* replication. *Phytopathology, 50: 884 – 889.*

Mahy, B.W. ; M.H. Van Regenmortel (2008). "Encyclopedia of Virology". *3rd Ed. Elsevier Ltd. 2865 pp.*

Nayudu, M.V(2008). Plant Viruses. Tata Mc Graw-Hill Education. New Delhi .249pp.

Reitz, S.R. ; G. Maiorino ; S.O. Ison ; R. Sprenkel ; A. Crescenzi and Momol (2008).Integrating plant essential oils and kaolin for the sustainable management of thrips and Tomato spotted wilt on tomato. *Plant Disease. 92: 878-886.*

Riose, J.L. ; M.C. Recio and A. Villar (1987). Antimicrobial activity of selected plants employed in the Spanish Mediterranean area. *Jurnal Ethnopharmacology, 21: 139-152.*

Shawkat, A.B. and G.I. Fegla(1979). Identification of two viruses from eggplant and *Cucurbita pepo* in Iraq. *Plant Disease, 63:235-238.*

Shukla, A.; S. Srivastava and J.P. Tiwari (2007). Effect of plant extracts and derivatives, butter milk and virus inhibitory chemicals on *watermelon mosaic virus* infection in cucumber. 10th *Plant Virus Epidemiology Symposium, 15 – 19.*

Singab, A-N.N. Ayoub ; E. Al-Sayed ; O. Martiskainen ; J. Sinkkonen. and K. Pihlaja (2011). Phenolic constituents *of Eucalyptus camaldulensis* Dehnh, with potential antioxidant and cytotoxic activities. *Records of Natural Products. 5:271-280.*

Sumbali, G. ; R.S. Mehrotta (2009). Principles of Microbiology. Tata Mc Graw-Hill Education. New Delhi.926pp.