Evaluate the efficiency of soaking tomato seed in β-aminobutyric acid and Bion to protect tomato plants from Tomato mosaic virus infection

تقييم كفاءة غمر بذور الطماطة بحامض البيوتريك والمنشط النباتي بايون لحماية نباتات الطماطة من الاصابة بفايروس موزائيك الطماطة

باسم حسن خضير ميسر مجيد جرجيس
قسم وقاية النبات- كلية الزراعة / جامعة بغداد

الملخص

أجريت الدراسة لتقييم كفاءة حامض البيوتريك والمنشط النباتي البايون في حماية نباتات الطماطة من الاصابة بفيروس موزائيك الطماطة لدى غمر بذورها بهذين المركبين. تضمنت هذه الدراسة تجارب اجريت في البيت الزجاجي واخرى في البيت البلاستيكي في قسم وقاية النبات، كلية الزراعة - جامعة بغداد. احتوت تجارب البيت الزجاجي الكشف الحيوي والمصلي عن الفيروس باستعمال اختبار اليزا وتحضير عزلة نقية من الفايروس باستعمال اختبار البقعة الموضعية المفردة. اما تجارب البيت البلاستيكي فاحتوت على تقييم اداء حامض البيوتريك والبايون في خفض تضاعف الفايروس والكشف عن ذلك بواسطة الاختبار الحيوي والاختبار المصلي وتقدير فاعلية انزيم البيروكساید وكذلك تحديد نسبة الاصابة بفيروس موزائيك الطماطة. اظهر استعمال حامض البيوترك بنسبة 1% نسبة تثبيط في عدد البقع الموضعية المتكونة على عائل الاختبار (التبغ البري) بلغت 69.56 % وكذلك اختزال في حجم البقع الموضعية المتكونة بنسبة36.3 % أما معاملة البايون بنسبة 1% فلم تظهر فروق معنوية. نتائج التقييم المصلي بواسطة اختبار اليزا أوضحت تفوق حامض البيوتريك 1% على البايون ومعاملة المقارنة حيث كانت 0.047 ،0.113، 0.118 على التتابع وهذه النتائج تؤكد نتائج الاختبار الحيوي للفايروس. أظهر استعمال حامض البيوتريك 1% وجود فروق معنوية في التغير بامتصاص انزيم البيروكساید بلغت 99.85 أما المعاملة بـ 1% بايون فلم تظهر فروق معنوية. أظهر حامض البيوتريك 1% فروقا معنوية في خفض نسبة الاصابة بفايروس موزائيك الطماطة إذ كانت 22.21 % بينما في معاملة البايون لم توجد فروقا معنوية. هذه النتائج تؤكد تفوق معاملة غمر بذور الطماطة في 1% حامض البيوتريك على معاملة غمر البذور في 1% بايون .

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the efficacy of β-aminobutyric and Bion in protecting tomato plant from tomato mosaic virus infection when soaking tomato seeds in these compounds. This study was included experiments conducted in the glass house and in the plastic house at Department of plant protection, College of Agriculture- University of Baghdad. The glass house experiments included the biological and serological detection of the virus by using ELISA and preparation of pure isolate from the virus by using the single local lesion technique. While the plastic house experiments included the evaluation of performance of β-aminobutyric and Bion in reducing virus multiplication by biological and serological assay and the estimation of peroxidase activity and also percentage of virus infection was recorded. BABA 1% was showed the highest percentage of inhibition in number of local lesions formation on *N. glutinosa* which was reached 69.56%, and the size reduction of local lesion was 36.3% while there was no significant differences in 1% Bion treatment. Results of ELISA absorbance value were showed superiority of 1% BABA on 1% Bion and control which were 0.047, 0.113, 0.118 respectively, these results confirmed the results of the biological evaluation of the virus. BABA 1% was showed significant difference in the change of peroxidase absorption which was 99.85 while Bion 1% was not showed a significant difference. BABA 1% was caused a significant reduction percentage of ToMV infection which was 22.21% while Bion 1% was not significantly reduced virus infection percentage.

المقدمة

يعد محصول الطماطة Mill *Lycopersiconn esculentum* من محاصيل الخضر المهمة في العالم وفي العراق. يصاب نبات الطماطة بالعديد من المسببات المرضية ومنها الامراض الفايروسية وخصوصا مجموعة فايروسات tobamoviruses والتي تضم فيروس موزائيك الطماطة Tomato mosaic virus(ToMV) وفايروس موزائيك التبغ Tobacco(TMV mosaic virus) التي أصبحت مصدر تهديد للمزارعين والباحثين في مجال انتاج بذور سليمة (Madhusudhan et al., 2008).

ظهرت المقاومة المكتسبة الجهازية systemic acquired resistance (SAR)في النبات كوسيلة دفاع واسعة الطيف والتي اكتشفت من قبل Ray عام 1901 . استخدمت لأجل تحفيزها العديد من المواد الكيمياوية التي ظهرت كمنشطات للـ SAS ضد العديد من المسببات المرضية النباتية (Mandal, 2008)

في السنوات الاخيرة زاد اهتمام الباحثين باستعمال المواد الكيمياوية التي تستحث مقاومة النبات ضد الممرضات وقد جرب حامض البيوتريك(BABA) β-amino butyric acid والمنشط النباتي البايون Bion في استحثاث SAR في العديد من المسببات المرضية والتي شملت الفطريات والفيروسات والبكتريا والنيماتودا (Cohen,2002 و Mandal, 2008) .

نظرا لتوافر اشارات محدودة حول استخدام BABA و Bionفي استحثاث المقاومة المكتسبة الجهازية ضد فيروسات النبات ولأجل التوسع بفهم تأثير كل منهما في فيروس موزائيك الطماطة ToMV فقد أجريت هذه الدراسة والتي شملت: تشخيص ToMVباعتماد نباتات الاختبار indicator plants ومصليا بواسطة اختبارالادمصاص المناعي المرتبط بالانزيم-ELISA Immune stripe وتهيئة عزلة نقية من الفيروس علاوة على تقييم كفاءة معاملة غمر بذورالطماطة بمركبي الاستحثاث (BABA و Bion) في حماية نباتات الطماطة من الاصابة بفيروس موزائيك الطماطة باستعمال المعايير التالية:

أ- التقييم الحيوي للفايروس باستعمال اختبار البقعة الموضعية local lesion assay.
ب- التقييم المصلي لتضاعف الفايروس باستعمال اختبار ELISA.
ج- تقييم الفعالية الانزيمية لأنزيم البيروكساید Peroxidase عن طريق حساب التغير في امتصاصه.
د- حساب نسبة الاصابة بالفايروس.

المواد وطرائق العمل

جمع العينات. جمعت نباتات طماطة مصابة تظهر عليها اعراض الموزائيك بشكل واضح من احد حقول كلية الزراعة – جامعة بغداد، ابو غريب للموسم 2010- 2011 علمت النباتات وتأريخ الجمع ومكانه وحفظت في مجمدة لحين اجراء التجارب اللاحقة. هيئت مجموعة من النباتات الكاشفة (الدالة) بعمر مناسب والمذكورة في الجدول (1) والتي استعملت في الكشف الأولي عن وجود الفيروس في العينات التي تم جمعها بعد اجراء العدوى الصناعية وملاحظة الأعراض التي ظهرت على هذه النباتات بعد العدوى. تم تأكيد التشخيص الأولي بطريقة الأختبار السيرولوجي باعتماد ELISA- Immunostrip.

اللقاح الفايروسي والعدوى الميكانيكية

حضر لقاح فايروس موزائيك الطماطة باستخدام اوراق نباتات تبغ *Nicotiana tabacum* var. Turkish حديثة التكوين تظهر عليها أعراض الأصابة بالفايروس. سحق غرام واحد من الاوراق المصابة مع 5 مل محلول داريء فوسفاتي (pH 7.0) في هاون خزفي مبرد. مرر المستخلص عير طبقتين من قماش الململ ثم اخذ الراشح واستعمل كلقاح فايروسي. أجريت العدوى الميكانيكية باستعمال السبابة والابهام بعد تعفير أسطح أوراق نباتات الاختبار بمادة الكاربوراندم carborundum 600 مش وبعد الانتهاء من عملية العدوى غسلت الأوراق المعداة بالماء مباشرة. (حضر المحلول الداريء الفوسفاتي باذابة 1.362 غم \ لتر من $KH2PO_4$ مع 1.42 غم \ لتر من Na_2PO_4 بنسبة 49 سم^3 من المحلول الاول مع 51 سم^3 من المحلول الثاني (العاني و راثي، 1984) . حفظت النباتات في البيت الزجاجي واستمرت المتابعة اليومية لها لملاحظة ظهور الأعراض ونوعها.

تحضير نباتات الاختبار والاكثار

عقمت مجموعة من الاصص ذات ابعاد 15×13سم بواسطة هايبوكلوريد الصوديوم sodium hypochloride تركيز 6% حيث غمرت لثلاث ساعات ثم غسلت جيدا بالماء لازالة بقايا المحلول المعقم. ملئت الاصص بخليط من تربة مزيجية وبتموس بنسبة1:1 معقمة بواسطة الموصدة في درجة حرارة 121 ^{o}س وضغط 1.5 بار لمدة ساعة وزرعت ببذور نباتات الاختبار والاكثارالمذكورة في الجدول (1) ووضعت في البيت الزجاجي التابع لقسم وقاية النبات/ كلية الزراعة-جامعة بغداد. فردت النباتات لنبات واحد في كل اصيصوغطيت بقماش الململ لتجنب الحشرات وروعي تسميدها اسبوعيا بسماد اليوريا 2 غم لكل اصيص ورشها بمبيد الكونفيدور200 Confidor SL لتجنب الحشرات والحلم اسبوعيا وبجرعة قدرها 2 غم / لتر.

اكثار الفيروس

استعمل التبغ *Nicotiana tabacum* var Turkish L الذي يستجيب للعدوى الميكانيكية بالفايروس بشكل موزائيك جهازي كعائل اكثار للفايروس بشكل رئيسي بالاضافة الى التبغ *N. tabacum* var samsum.

تشخيص الفيروس

أستخدمت النباتات الكاشفة فضلا عن الادمصاص المناعي المرتبط بالانزيم بشكل Immunostrip ELISA لتشخيص الفيروس وكالاتي :

الكشف عن الفايروس بواسطة النباتات الكاشفة

استعملت مجموعة من النباتات الكاشفة في تشخيص فيروس موزائيك الطماطة جدول (1) والذي يوضح أسماء النباتات ونوع الأعراض التي تظهر عليها بعد العدوى الميكانيكية.

جدول – 1 الكاشفة المستخدمة في تشخيص فيروس موزائيك الطماطة.

اسم العائل	الاسم الانكليزي	الاسم العلمي	الاعراض
الطماطة	Tomato	*Lycopersicon esculentum* Mill.	موزائيك جهازي
التبغ	Tobacco	*Nicotiana tabacum* var Turkish L.	موزائيك جهازي
التبغ	Tobacco	*Nicotiana glutinosa*	بقع موضعية متنخرة
الزربيح	Chenopodium	*Chenopodium amaranticolor* Reyn and Coste	بقع موضعية متنخرة
الداتورا	Datura	*Datura stramonium* L.	بقع موضعية متنخرة
الخيار	Cucumber	*Cucumis sativus* L.	لا تظهر اعراض
اللوبيا	Cowpea	*Vigna unguiculata* L.	لا تظهر اعراض

الكشف المصلي

أجري كشف مصلي عن وجود فيروس موزائيك الطماطة باستعمالالمصل المضاد للفايروس المجهز بشكل أشرطة من قبل شركة Agdia biofords الامريكية وأجري الاختبارحسب الطريقة الموصى بها من قبل الشركة المجهزة وكالاتي:

1- أخذ 0.15 غم من أوراق النبات المراد اختباره ووضعها في كيس الاستخلاص الحاوي على محلول داريء فوسفاتي Phosphate Buffer saline (PBS).

2- سحقت العينة النباتية بواسطة مدقة هاون Pestle بشكل جيد .

3- غمرت نهاية الشريط (flash kit) في كيس الاستخلاص لمسافة 0.5 سم في المستخلص .

4- سجلت النتائج بعد 3-5 دقائق من وضع الشريط بالمستخلص وهو الوقت الازم لحدوث التفاعل المتخصص بين الانتيجين Antigen والجسم المضاد للفيروسAntibody

تحضير عزلة نقية للفايروس

حضرت عزلة نقية من فيروس موزائيك الطماطة باستعمال طريقة العزل من البقعة الموضعية الواحدة التي تتكون على التبغ البري ***Nicotiana glutinosa*** . حيث أعديت مجموعة نباتات تبغ بري بلقاح فايروسي مأخوذ من أوراق تبغ *N. tabacum* var Turkish L مصابة وبعد يومين من العدوى بدأت أعراض البقع الموضعية بالظهور على أوراق التبغ البري الملقحة. أعديت نباتات تبغ صنف Turkish مرة أخرى بمستخلص البقع المأخوذ من التبغ البري وكررت العملية أكثر من مرة لضمان نقاوة العزلة الفايروسية لاستخدامها بالتجارب اللاحقة.

تهيئة البيت البلاستيكي

حضر بيت بلاستيكي بأبعاد 36×5 م. أجريت مجموعة من العمليات الزراعية شملت حراثة وتنعيم وشق مروز وتسميد عضوي لتربة البيت البلاستيكي ونصب منظومة ري بالتنقيط بين منقطة وأخرى 40 سم . حضرت الدايات وذلك بزراعة بذورطماطة (صنف وجدان) حساس للاصابة بالفايروس يوم 5 \ 12\ 2011 بأقداح بلاستيكية صغيرة حاوية على خليط تربة مزيجية مع بتموس بنسبة 1:1 معقمة بواسطة الموصدة درجة حرارة 121 سº وضغط 1.5 بار لمدة ساعة ثم نقلت للبيت البلاستيكي بتأريخ 12 \ 1\ 2012 . كانت المسافة بين نبات واخر 40 سم وبين معاملة واخرى 80 سم وأتخذ نباتين حارسين بين معاملة وأخرى لتجنب التداخل ما بين المعاملات.

تحضير حامض البيوتريك β -aminobutyric acid

حضر محلول اساس من حامض البيوتريك β -aminobutyric acid (BABA) المجهز من قبل شركة Sigma Aldrich الالمانية بإذابة 5غم من الحامض في 100 مل ماء مقطر (Cohen ، 2002).

تحضير المنشط النباتي البايون Bion

حضر محلول اساس من البايون المجهز من قبل شركة Novartis الأميركية بشكل محلول قابل للبلل يحتوي على 50% مادة فعالة بإذابة 1 غم من المنشط في 100 مل ماء مقطر باستخدام جهاز الدوار المغناطيسيmagnetic stirrer لضمان الذوبان التام.

معاملة البذور

غمرت بذور الطماطة صنف وجدان بأطباق بتري حاوية على محلولي الاستحثاث (BABA و Bion) بتركيز 1% المحضرة من المحلول الأساس والماء المقطر كمقارنة لمدة 4 ساعات زرعت البذور بالتأريخ المذكور بالفقرة أعلاه وأعديت البادرات بعمر 3-4 أوراق حقيقية بتأريخ 25 \ 1\ 2012 وتضمنت هذه التجربة المعاملات التالية:

1- غمر بذور الطماطة بمحلول الحامض تركيز1% لمدة 4 ساعات مع عدوى ميكانيكية باللقاح الفايروسي .
2- غمر بذور الطماطة بمحلول المنشط النبات بتركيز 1% لمدة 4 ساعات مع عدوى ميكانيكية باللقاح الفايروسي.
3- غمر بذور الطماطة بمحلول الحامض تركيز1% لمدة 4 ساعات بدون عدوى ميكانيكية باللقاح الفايروسي.
4- غمر بذور الطماطة بمحلول المنشط النبات بتركيز 1% لمدة 4 ساعات بدون عدوى ميكانيكية باللقاح الفايروسي.
5- غمر بذور الطماطة بالماء المقطر لمدة 4 ساعات مع عدوى ميكانيكية باللقاح الفايروسي.
6- غمر بذور الطماطة بالماء المقطر لمدة 4 ساعات بدون عدوى ميكانيكية باللقاح الفايروسي.

المعايير المستخدمة للكشف عن كفاءة عاملي الأستحثاث

1- حساب نسبة الاصابة

حسبت نسبة الأصابة بالفايروس لكل معاملة بعد 10 أيام من ظهور أعراض الاصابة على نباتات المقارنة حددت ثلاثة نباتات من كل مكرر وبشكل عشوائى حيث علمت هذه النباتات ولجميع المعاملات ، و حسب عدد النباتات المصابة كل سبعة أيام بعد 10 ايام من ظهور الإصابة على معاملة المقارنة ولثلاثة أسابيع .

2- التقييم الحيوي للفايروس

أجريت عملية تقييم لنباتات الطماطة المعاملة بمركبي الاستحثاث باستعمال اختبار البقعة الموضعية المنفردة The local lesion assay على نبات التبغ البري***N. glutinosa*** الذي يستجيب للاصابة بفيروس موزائيك الطماطة بتكوين بقع موضعية متنخرة بعد2-3 من العدوى الفايروسية . أخذت عينات ورقية من نباتات الطماطة من البيت البلاستيكي وعمل منها مستخلص أعديت به نباتات تبغ بري ***N. glutinosa***وبعد 4 أيام سجلت النتائج حيث حسب عدد وحجم البقع الموضعية المتكونة وكذلك حسبت نسبة التثبيط لعدد البقع ونسبة الاختزال بحجم البقعة الموضعية المتكونة لمعاملات التجربة . كانت نباتات التبغ البري المعداة بمستخلص أوراق الطماطة بعمر 5 أوراق حقيقية . أستعملت ثلاث نباتات تبغ لكل معاملة وأعديت ورقتين من كل نبات. حسبت نسبة تثبيط عدد البقع الموضعية المتكونة على نبات الاختبار حسب المعادلة التالية (Zhang et al., 2010):

$$I\% = (C- T) \times 100/ C$$

حيث I % = نسبة تثبيط عدد البقع الموضعية
C = عدد البقع الموضعية على نباتات المقارنة
T = عدد البقع الموضعية على نباتات المعاملة.

التقييم المصلي للفايروس

أجري تقيم مصلي لتضاعف الفايروس في النباتات المعاملة بمركبي الاستحثاث اضافة الى نباتات المقارنة باستعمال اختبار اليزا المزدوج للفيروس بالأجسام المضادة Double antibody sandwich- ELISA (DAS- ELISA)المجهز من قبل شركة Agdia biofords حيث أخذت عينات أسبوعية لمدة 4 أسابيع من بعد العدوى بالفيروس لمتابعة تضاعف الفايروس في نباتات المعاملة المعداة بالفايروس. أخذ غرام واحد من عينات طماطة ورقية وسحقت بوجود 1 مل من داريء الأستخلاصExtraction Buffer بواسطة هاون خزفي ثم أمرر المستخلص عبر طبقتين من قماش الململ . اخذ الراشح وأجري عليه الاختبار المصلي بواسطة DAS- ELISA وتضمن الأختبار الخطوات الاتية:

1- حضر مخفف التغطية الحاوي على كلوبيولينات كاما المناعية IgG المتخصصة باضافة 100مايكرو ليتر من IgG الى 10 مل من داريء التغطية درجة حموضته pH= 9.6. هذا المحلول حضر انيا في المختبر ثم بواسطة micropipetteأضيف 100 مايكروليتر من محلول التغطية لكل حفرة من حفر أطباق اليزا. حضرت التخافيف حسب توصية الشركة المجهزة للمصول (Agdia biofords).
2- وضعت أطباق اليزا في اناء الترطيبHumid Box لمنع حدوث تبخر من على أسطح الأطباق وحضنت في بدرجة 37^{o} م لمدة 3 ساعات.
3- غسلت الحفر بمحلول الغسل PBST حموضته (pH) 9.6 وكررت عملية الغسل مرتين بفاصل 5 دقائق بين غسلة وأخرى.
4- أضيف 100 مايكروليتر من مستخلص أوراق الطماطة لكل حفرة من حفر طبق اليزا. ان عدد العينات التي فحصت هو 96 عينة.
5- حضنت الأطباق في ثلاجة بدرجة 5^{o} م الى اليوم التالي .
6- فرغت الأطباق وغسلت بمحلول الغسل PBST 7 مرات.

7- حضر معقد الاجسام المضادة IgG المرتبطة بأنزيم الفوسفات القاعدي Alkaline phosphatase انيا وذلك بتخفيفه في داريء Enzyme conjugated Buffer باذابة 100 مايكرولتر من المعقد مع 10 مل من الداريء.
8- أضيف 100 مايكرولتر من الأنزيم المحضر بواسطة micropipette الى حفر طبق اليزا .
9- حضنت الأطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 37º لمدة اربعة ساعات .
10- حضر محلول المادة الأساس p-Nitrophenyl phosphate (PNP) قبل 15 دقيقة تقريبا قبل نهاية فترة حضن الأطباق وذلك باذابة 5 حبات من المادة في 20 مل Substrate Buffer درجة حموضته = 9.8 .وحسب الشركة المجهزة للمصول.
11- أضيف 100 مايكرو ليتر من محلول PNP لكل حفرة ثم تركت الاطباق بدرجة حرارة الغرفة لمدة 20-60 دقيقة .
12- قرأت الامتصاصية بواسطة قاريء اليزا ELISA reader التابع لمختبر فايروسات النبات - قسم وقاية النبات- كلية الزراعة / جامعة بغداد وعلى طول موجي 405º نانو ميتر.

تقديرالفاعلية الانزيمية لانزيم البيروكساید Peroxidase

قدرت فاعلية أنزيم البيروكساید Peroxidaseبعد 25 يوم من العدوى الميكانيكية باللقاح الفايروسي لتقييم كفاءة كل من حامض البيوتريك (BABA) و المنشط النباتي البايون (Bion) في استحثاث المقاومة ورفع مستوى هذا الأنزيم في النباتات المعاملة حسب طريقة الصوفي 2001 وكالأتي :
1- أخذت 15 غم من أوراق الطماطة لكل معاملة ووضعت في صندوق ثلجي بعد غسلها وتجفيفها بأوراق الترشيح .
2- سحقت الأوراق باستعمال هاون خزفي مبرد بوجود 50 مل من داريء فوسفاتي تركيزه 0.2 مولاري ودرجة حموضته = 7 محتوي على كلوريد الصوديوم تركيز 0.2 مولاري ودرجة حرارة الخليط 4 سºتقريبا ، ثم حفظ المستخلص بأنابيب اختبار.
3- أخضع المستخلص لعملية انتباذ مبرد بواسطة جهاز الطرد المركزي لمدة 30 دقيقة بسرعة 5000 دورة بالدقيقة وبدرجة حرارة 4 سº ومن ثم وضع الرائقSupernatant في أنابيب الاختبار.
4- اخذ3 مل من خليط التفاعل الذي حضرانيا في المختبر وأضيف له 0.1 مل من الرائق ومن ثم حددت امتصاصية الأنزيم بجهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer على طول موجي420º نانوميتر حيث أخذت6 قراءات بين قراءة وأخرى30 ثانية.
5- حسب مقدار التغير في الامتصاصية على ضوء المعادلة التالية:

التغير يالامتصاصية = $\Delta A / T \Delta / 0.1 \Delta$

حيث ان ΔA = مقدار التغير في قراءة المطياف الضوئي
ΔT = مقدار التغير بالزمن للقراءات
0.1 = الوزن الطري من المستخلص

مكونات خليط التفاعل

يتكون خليط التفاعل من المركبات التالية:
1- كوايكول Guicol تركيز 0.05 مولار حُضر بوضع 1.36 مل منه في دورق حجمي سعة 250 مل وأكمل الحجم الى 250 مل ماء مقطر.
2- بيروكسيد الهيدروجين $30\%H_2O_3$ تركيز 0.02 مولار حُضر باضافة 0.56 مل منه في دورق حجمي سعة 250 مل وأكمل الحجم الى 250 مل ماء مقطر (حُضر آنياً) .
3- محلول ترس بيسTris- base تركيز 0.04 مولار مع 1 مولار NaCl و pH = 7 . حضر من اذابة 1.211 غم ترس بيس و 14.16 غم NaCl في كمية من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني الى 7 باستعمال HCl 1 مولار ثم أكمل الحجم الى 250 مل ماء مقطر.

خلطت المحاليل السابقة بنسبة 1 : 1 : 1 مع 7 اجزاء ماء مقطر قبل الاستعمال مباشرة ويبدأ التفاعل باضافة 0.1 مل من المستخلص النباتي الحاوي على الأنزيم ويتابع التغير بالامتصاص بالضوء كل 30 ثانية ولمدة 3 دقائق على طول موجي 420 نانوميتر.

التحليل الاحصائي:

نفذت التجربة وفق تصميم القطاعات العشوائية الكاملة (RCBD) وحللت النتائج باستخدام برنامج Gene stat.4تم مقارنة معدلات المعاملات باستعمال أقل فرق معنوي LSD عند مستوى معنوية 0.05 وتضمنت كل معاملة ثلاث مكررات(الراوي وخلف الله ، 1980).

النتائج والمناقشة

تشخيص الفيروس

1- نباتات الاختيار

الأعراض على التبغ *Nicotiana tabacum* var Turkish L . أظهرت نباتات التبغ أعراض توضح للعروق في الأوراق الحديثة للنبات بعد 3-4 أيام من العدوى تطورت في مابعد الى أعراض موزائيك مصحوبة بمناطق خضراء غامقة مع تشوه وتكوين Blistersوهذا يتفق مع ما ذكره (Agrios, 2005).

الأعراض على التبغ البري *Nicotiana glutinosa*.استجابت نباتات التبغ البري للعدوى الميكانيكية بتكوين بقع موضعية متنخرة بعد 2-3 أيام من تأريخ العدوى بدون ظهور أعراض اصابة جهازية وهذا يتفق مع ماذكره (Zaitlin, 2000)

الأعراض على الزربيح *Chenopodium amaranticolor Reyn and Coste*

استجاب الزربيح للعدوى الميكانيكية بتكوين بقع موضعية متنخرة بعد 4-10 أيام من العدوى الميكانيكية بالفيروس بدون حصول أعراض اصابة جهازية (Zaitlin, 2000).

الأعراض على الداتورا *Datura stramonium* .

أظهرنبات الداتورا أعراض بقع موضعية متنخرة بعد 2-3 أيام من العدوى بالفيروس وبدون أعراض اصابة جهازية.(Hollings and Huttinga, 1976).

الأعراض على الخيار*Cucumis sativus* L .

أستعمل نبات الخيار الذي لايستجيب للاصابة بفايروس موزائيك الطماطة حيث لم تظهر أعراضا عند تلقيحه بمستخلص الفيروس ميكانيكيا وهذا يتفق مع ماذكره Jung وأخرون ، (2000).

الاعراض على اللوبيا.*Vigna unguiculata* L.

لم تظهر أعراض عند عدوى نبات اللوبيا بمستخلص الفيروس ميكانيكيا .

كفاءة مركبي الاستحثاث في خفض نسبة الاصابة بفايروس موزائيك الطماطة

أدت معاملة بذور الطماطة بمحلول حامض البيوتريك تركيز 1% الى خفض معنوي في نسبة الاصابة بفايروس موزائيك الطماطة كمعدل للأسابيع الثلاثة بعد ظهور الاصابة على نباتات المقارنة اذ بلغت نسبة اصابه النباتات 22.21 %بينما لم تظهر المعاملة بالمنشط النباتي البايون تركيز 1% اي انخفاض معنوي بنسبة الاصابة التي كانت 37.48 % مقارنة مع نباتات المقارنة التي أظهرت 43.6 % كما موضحة في الجدول (2) هذه النتائج تؤكد تفوق حامض البيوتريك في خفض نسبة الاصابة بفايروس موزائيك الطماطة .

التقييم الحيوي لعاملي الاستحثاث

تشير نتائج التقييم الحيوي باستعمال اختبار البقعة الموضعيةThe local lesion assay لمستخلص أوراق الطماطة المعاملة بمركبي الاستحثاث على نبات التبغ البري ***N. glutinosa*** كعائل اختبار الذي يستجيب للأصابة بتكوين بقع موضعية متنخرة الى كفاءة حامض البيوتريك في خفض عدد البقع المتكونة وكذلك اختزال اقطار هذه البقع وبالتالي زيادة تثبيط البقع الموضعية لنباتات الطماطة المعاملة بالحامض و المختبرة على العائل التشخيصي (التبغ البري) ***N. glutinosa*** بلغ معدل عدد البقع الموضعية المتكونة عند استعمال عصير نباتات الطماطة المعاملة بحامض البيوتريك في العدوى الميكانيكية على نبات التبغ البري 9.83 بقعة في حين بلغ عدد البقع 23.58 بقعة في معاملة البايون وكان معدل قطر البقعة الواحدة المتكونة في معاملة الحامض 0.39 سم في حين كان قطرها 0.76 سم في معاملة البايون أما معاملة المقارنة فكان معدل عدد البقع 32.3 بقعة ومعدل قطر البقعة الواحدة 0.85 سم وعند حساب نسبة التثبيط لعدد البقع فقد كانت في معاملة الحامض 69.65 % وأعلى اختزال بقطر البقعة الواحدة 54 % في الجدول (3) الأمر الذي يبدو فيه قدرة حامض البيوتريك على خفض تضاعف فايروس موزائيك الطماطة وبالتالي خفض تركيز الفايروس ضن الانسجة النباتية الذي أدى الى خفض عدد البقع الموضعية وتتفق مع ما ذكره Siegrist وأخرون (2000) ان لحامض البيوترك القدرة على تقليل تضاعف الفايروس عن طريق اعادة تنشيط انواع الاوكسجين النشط reactive oxygen species (ROS) و بيروكسيد الهايدروجينH_2O_2 واللذان يعملان على زيادة عمل أكسدة الليبيدات خلال تفاعل فرط الحساسية Hypersensitive reaction .(HR)

التقييم المصلي

أظهرت نتائج اختبار اليزا للمحتوى الانزيمي المزدوج DAS-ELISAعند طول موجي 405º نانوميتر تفوق معاملة حامض البيوتريك على المنشط النباتي البايون فقد أظهر أقل تضاعف للفيروس داخل نباتات الطماطة المعامل بذورها بالحامض و بلغ معدل القراءات الأربعة (الأسابيع الاربعة) من بعد اللقاح الفيروسي 0.047 مقارنة بالبايون 0.113 بينما أظهرت معاملة المقارنة الموجبة 0.118 أما نباتات المقارنة السالبة (السليمة) فقد كانت 0.012 (جدول (4). هذه النتائج تؤكد نتائج التقييم الحيوي لأختبار البقعة الموضعيةThe local lesion assayوتؤكد كفاءة حامض البيوتريك في خفض تضاعف فيروس موزائيك الطماطة داخل نبات الطماطة أما بالنسبة للبايون فلم يظهر خفض معنوي في تضاعف الفايروس مما يشير الى عدم كفاءة غمر البذور بهذا العامل ومن المحتمل أن يعود السبب في ذلك الى محدودية امتصاص بذور الطماطة للبايون (Shailasree وأخرون ، 2002) الأمر الذي أدى الى قلة كفاءته في تحفيز المقاومة المكتسبة الجهازية SAR .

الفاعلية الأنزيمية لأنزيم البيروكسايد Peroxidase

أظهرت معاملة غمر بذور الطماطة بحامض البيوتريك تفوق واضح في تحفيز انتاج أنزيم البيروكسايد في نباتات الطماطة المعداة بفيروس موزائيك الطماطة من خلال حساب فاعلية هذا الأنزيم حيث أظهرت النباتات المعاملة بالحامض تغير في الكثافة البصرية لأنزيم البيروكسايد بلغت 99.85على طول

موجي 420º نانوميتر بينما معاملة البايون لم تظهر تغير واضح في الكثافة البصرية حيث كانت 32.87 أما معاملة المقارنة كانت 31.39 جدول (5) . هذه النتائج تشير الى كفاءة معاملة غمر بذور الطماطة بحامض البيوتريك على استحثاث أنزيم البيروكسايد وهو أحد البروتينات ذات العلاقة بالأمراضية والذي يزداد تركيزه بعد الاصابة بالمسببات المرضية (Howell واخرون، 1996)، (Strobel واخرون، 1999).

جدول 2. تأثير مركبي الاستحثاث في خفض النسبة المئوية للاصابة بفايروس موزائيك الطماطة

المعاملة	معدل النسبة المؤية للاصابة تأريخ تقدير نسبة النباتات المصابة (10 أيام بعد ظهور أعراض الاصابة على نباتات المقارنة)			المعدل
	اسبوع	اسبوعين	ثلاث اسابيع	
BABA1%	8.33	20.8	37.5	22.21
Bion1%	16.66	37.5	58.3	37.48
ماء مقطر(مقارنة)	25	41.7	62.5	43.6
LSD P=0.05	11	16.36	9.45	12.27

جدول 3.تأثيرمركبي الاستحثاث فيعدد وقطر البقع الموضعية

المعاملة	عدد البقع الموضعية	حجم البقع الموضعية (سم)	نسبة التثبيط في عدد البقع%	نسبة الاختزال في قطر البقعة%
BABA1%	9.83	0.32	69.65	36.3
Bion1%	23.58	0.47	27	1.36
مقارنة	32.3	0.47	0.00	0.00
LSDP=0.05	3.26	0.05	10.15	7.59

جدول 5. قيم امتصاص اختبار اليزا على طول موجي 405 نانوميتر لنباتات الطماطة المعداة بفيروس موزائيك الطماطة

المعاملة	معدل قراءات اليزا تاريخ القراءات (بعد اسبوع من العدوى باللقاح الفيروسي)				
	اسبوع	اسبوعين	ثلاثة اسابيع	اربع اسابيع	المعدل
BABA 1%	0.021	0.012	0.063	0.094	0.047
Bion 1%	0.048	0.069	0.158	0.178	0.113
مقارنة (+)	0.046	0.063	0.175	0.191	0.118
مقارنة (-)	0.011	0.013	0.013	0.013	0.012
LSD P=0.05	0.005	0.005	0.003	0.004	0.004

جدول 5. تأثير غمر بذور الطماطة بمحلولي الاستحثاث في استحثاث أنزيم البيروكسايد ضد فايروس موزائيك الطماطة

المعاملة	التغير في امتصاصية انزيم البيروكساید
BABA 1% + ToMV	99.85
Bion 1% + ToMV	32.87
BABA 1%	25.96
Bion 1%	25.57
مقارنة +	31.39
مقارنة -	26.47
LSD P=0.05	4.61

المصادر

الصوفي ، محمد عبدالرزاق. 2001. فصل أنزيم البيروكسيديز وتنقيته وتوصيفه من الحليب النباتي لنبات الديباج Calotorpisprocera وامكانية استخداماته التطبيقية. رسالة ماجستير. قسم الصناعات الغذائية. كلية الزراعة. جامعة بغداد. 96 صفحة.

العاني، رقيب عاكف وياش بال راثي.1984. فايروسات النبات، أساسيات التجارب العملية، مطبعة جامعة بغداد 274 .صفحة

الراوي ، خاشع محمود وعبدالعزيز محمد خلف الله. 1980. تصميم وتحليل التجارب الزراعية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة الموصل. مؤسسة دار الكتب للطباعة والنشر. 488 صفحة

Cohen, Y. 2002. β- amino butyric acid-induced resistance against plant pathogens. The American Phytopathological Society 86: 448-457.

Howell , C.R. ; L.E. Hanson ; R.D. Stipanovie and L.S. Puckhaber. 1999. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of (*Rhizoctonia solani*) by seed treatment with (*Trichoderma virens*) . Phytopathology . 248-252.

Howell, C.R.; L.E. Hanson; R.D. Stipanovie and L.S. Puckhaber. 1999. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of (*Rhizoctonia solani*) by seed treatment with (*Trichoderma virens*) . Phytopathology. 248-252.

Jang, Y.S., S. I. Sohn, M. H. Wang. 2006. The hrpN gene of *Erwinia amylovora* stimulates tobacco growth and enhances resistance to *Botrytis cinerea*. Planta. 223:449-456.

Madhusudhan, K. N., S.A. Deepak., H.S. Prakash., G.K. Agrawal., N. S.Jwa and R. Rakwal. 2008. Acibenzolar-S-methyl (ASM)-Induced Resistance against Tobamoviruses Involves Induction of RNA-Dependent RNA polymerase (RdRp) and Alternative Oxidase (AOX) Genes.

Mandal,B.,S.Mandal.,A.S.Csinos.,N.Martinez., A. K.Culbreath., and H. R. Pappu. 2008. Biological and Molecular Analyzing of the Acibenzolar-S- Methyl-Induced Systemic Acquired Resistance in Flue-Cured Tobacco against Tomato spotted wilt virus. Phytopathology. 98:196-204.

Mandal, B., S. Mandal., A.S.Csinos., N. Martinez., A. K. Culbreath., and H. R. Pappu. 2008. Biological and Molecular Analyzing of the Acibenzolar-S- Methyl-Induced Systemic Acquired Resistance in Flue-Cured Tobacco against Tomato spotted wilt virus. The American Phytopathological society 98:196-204.

Siegrist, J., Orober, M., and Buchenauer, H. 2000. Beta-aminobutyric acid –mediated enhancement of resistance in tobacco to tobacco mosaic virus depends on the accumulation of salicylic acid. Physiol. Mol. Plant pathol. 56:95-106.

Siegrist, J., Orober, M., and Buchenauer, H. 2000. Beta-aminobutyric acid –mediated enhancement of resistance in tobacco to tobacco mosaic virus depends on the accumulation of salicylic acid. Physiol. Mol. Plant Pathol. 56:95-106.

Strobel , N.E. ; C. Ji ; S. Gopalan ; J.A. Kuc and S.X. He. 1996. Induction of systemic acquired resistance in cucumber by *Pseudomonas syrinage* pv. Syringae 61 Hrpzpss protein . The Plant Journal. 9 (4) : 431-439.

Zhang, W., X. Yang., D. Qiu., L. Guo., H. Zeng., J. Mao., Q. Gao. 2010. Pea T1- Induced systemic acquired resistance in tobacco follows salicylic acid- dependent pathway. Mol. Biol. Rep.