تقويم كفاءة تقنيات مختلفة لاستخلاص وتنقية فايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطة TYLCV

رقيب عاكف العاني* مصطفى علي عذاب* سمير عبد الرزاق حسن حمد*

استلام البحث 10، حزيران، 2010
قبول النشر 26، تشرين الاول، 2010

الخلاصة :
تهدف الدراسة الى تقويم كفاءة طرق مختلفة في استخلاص وتنقية فايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطة (TYLCV). وقد أمكن الحصول على عزلة نقية للفايروس خالية من أي احتمال للتلوث بفايروسات أخرى تصيب العائل نفسه وتنقل بالناقل نفسه .*Bemisia tabaci* Genn باعتماد النباتات المشخصة ومدة حضانة الفايروس في جسم الناقل. أظهرت النتائج إن الفايروس موضوع البحث يصيب نباتات التبغ البري *Nicotiana glotinosa* بدون ظهور أعراض مرئية على النبات ، وعدم استجابة نباتات التبغ *Nicotiana tabaccum* var. *White Burley* للإصابة بالفايروس. بلغت مدة حضانة الفايروس في جسم الناقل 21 ساعة، مما يشير إلى أن الفايروس هو *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). وأظهرت النتائج كفاءة عالية للمذيب العضوي كحول البيوتانول في ترويق العصارة وتخليصها من المادة الخضراء والبروتينات النباتية ، كما أن استعمال محلول دارئ الاستخلاص سترات الصوديوم بدالة حامضية 8 مدعما بمواد مختزلة مانعة لأكسدة المواد الفينولية ومواد مخلبية EDTA كان ملائما للحفاظ على حيوية الفايروس ومنع تكتله أو تحطمه أثناء الاستخلاص. بلغت كمية الفايروس التي تم الحصول عليها من 100 غم أنسجة نباتية مصابة 3.05 ملغم ، ونسبة امتصاص 1.4 على الطولين الموجيين 260 : 280 وتعد هذه النسبة قياسية لهذا الفايروس.

الكلمات المفتاحية: فايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطة ، تقنيات ، تنقية ، استخلاص.

المقدمة :

يعود فايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطة *Tomato yellow leaf curl begomovirus* (TYLCV)، جنس Begomovirus، عائلة Geminiviridae) إلى مجموعة الفايروسات التوأمية Geminiviruses التي تعد من أكثر الفايروسات انتشارا وأهمية في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية ومنطقة حوض البحر الأبيض المتوسط وتسبب خسائر كبيرة للمحاصيل الزراعية [1 ، 2]. ويمثل فايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطة عاملا محددا لزراعة الطماطة في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية وتصل نسبة الخسائر التي يسببها حتى 100% [3 ، 4 ، 5 ، 6 ، 7 ، 8]. وذكر أن فايروس TYLCV من أكثر الفايروسات انتشارا على محصول الطماطة في العراق وتصل الإصابة به إلى 100 % وتتراوح الخسائر التي يسببها 50 – 90 % خصوصا إذا حدثت الإصابة في مرحلة مبكرة من نمو النبات [9].
ينقل فايروس TYLCV في الحقول بواسطة الذبابة البيضاء .*Bemisia tabaci* Genn والتي تنقل الفايروس بطريقة باقية عابرة ولا ينقل عن طريق البيض إلى الأجيال التالية من الحشرة ، وتستغرق مدة حضانة الفايروس في جسم الحشرة 20 – 24 ساعة [6 ، 7 ، 8 ، 10 ، 11 ، 12].

اعتمدت طرق متعددة لاستخلاص وتنقية الفايروس ، واستعملت محاليل دارئة متنوعة لهذا الغرض [13 ، 14 ، 15]. وأضيفت للمحاليل الدارئة مواد مختزلة ومركبات مخلبية EDTA لمنع أكسدة المركبات الفينولية وتكتل الفايروس والحفاظ على حيويته [15 ، 16 ، 17]. واستعملت مذيبات عضوية عديدة لترويق العصارة مثل البيوتانول والكلوروفورم أو خليط من البيوتانول والكلوروفورم و Triton x-100 [14 ، 15 ، 18]. وجرى ترسيب الفايروس من العصارة بواسطة PEG [13 ، 17 ، 18].
أجريت هذه الدراسة بهدف تقويم كفاءة عدة مذيبات عضوية في الاستخلاص وتنقية فايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطة.

المواد وطرائق العمل:

الحصول على عزلة الفايروس النقية وتكثيرها:
وضعت مجموعة من حشرة الذبابة البيضاء .*B. tabaci* خالية من الفايروس (جمعت من نباتات باذنجان ونقلت إلى نباتات طماطة للتأكد من خلوها من الفايروس)، على نباتات طماطة مصابة بفايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطة مدة 24

*جامعة بغداد – كلية الزراعة – قسم وقاية النبات

ساعة لاكتساب الفايروس. نقلت الحشرات من النبات المصاب بواسطة شافطة إلى مجموعة من النباتات الكاشفة *Nicotiana glutinosa* ، *Nicotiana tabacum* var. *White Burley* بمعدل 5 حشرات/نبات. نقلت مجموعة من الحشرات خالية من الفايروس إلى نباتات طماطة سليمة للمقارنة. وضعت النباتات في غرفة النمو بدرجة حرارة 22 - 25 °م وشدة إضاءة 800 لوكس بفترة إضاءة 16 ساعة و 8 ساعات ظلام لمتابعة ظهور الأعراض. ولاستبعاد احتمال كون الفايروس احد فايروسات الطماطة الأخرى التي تنقل بنفس الحشرة الناقلة حددت مدة الحضانة في جسم الناقل.

تحديد مدة حضانة الفايروس في جسم الناقل: وضعت مجموعة من الذبابة البيضاء غير حاملة للفايروس على نبات طماطة مصاب بالفايروس في قفص أبعاده (25 × 27 × 44)سم محاط بقماش ململ. تركت الحشرات تتغذى مدة 4 ساعات ثم نقلت بواسطة شافطة إلى مجموعة من نباتات طماطة سليمة. تركت الحشرات تتغذى على النباتات السليمة للفترات 1 ، 2 ، 8 ، 16 ، 24 ساعة وكانت النباتات ترش بعد كل فترة بمبيد كونفيدور 200 Confidor SL(Imidacloprid 200g/L) لإبادة الحشرات. نقلت النباتات إلى غرفة النمو وتمت متابعة ظهور الأعراض. استعمل لكل نبات 10 – 15 حشرة ولكل فترة خمسة نباتات [19].

استخلاص وتنقية الفايروس: سحقت كمية من أوراق نباتات طماطة مصابة بالفايروس TYLCV ، أخذت بعد 3 – 4 أسابيع من العدوى ووضعت تحت التجميد بدرجة -20°س مدة ثلاثة أيام ، في خلاط كهربائي مع محلول دارئ سترات الصوديوم الثلاثية (100 ملي مولاري سترات الصوديوم الثلاثية ، 60 ملي مولاري كبريتيد الصوديوم (Na_2SO_3)، 18.5 مول فيتامين C ، و5 مليمول EDTA بدالة حامضية 8 مضافا إليه 2- mercaptoethanol بنسبة 1%) ورشح المستخلص من خلال أربع طبقات من قماش الململ. قسم الراشح إلى أربعة أقسام ، أضيف للقسم الأول Triton x-100 بنسبة 25% وترك على مازج كهربائي بدرجة 4°س لليوم التالي [20]. أضيف للجزء الثاني من الراشح 10% بيوتانول وترك لمدة ساعة على رجاج كهربائي بدرجة 4°س. أضيف للقسم الثالث حجم مساوي من الكلوروفورم وترك المزيج مدة ساعة على رجاج كهربائي بدرجة 4°س. أضيف للقسم الرابع نصف حجمه من خليط من البيوتانول والكلوروفورم (1:1)، وترك المزيج مدة ساعة على مازج كهربائي بدرجة 4°س. أجريت على المعاملات الأربعة عملية طرد مركزي بسرعة 5000 دورة/دقيقة مدة 20 دقيقة في جهاز طرد مركزي نوع Universal II واخذ الجزء الطافي.

أضيف للطافي 7% من Poly Ethylene Glycol (PEG) وزنها الجزيئي 6000 و 0.2 مولاري من كلوريد الصوديوم NaCl وتركت على مازج كهربائي للذوبان مدة 24 ساعة. اخضع المستخلص لعملية طرد مركزي بسرعة 5000 دورة/دقيقة مدة 30 دقيقة. أضيف للراسب 1 مل من محلول دارئ الإذابة (10 ملي مولاري سترات الصوديوم الثلاثية ، 1 ملي مولاري EDTA بدرجة حموضة 8 مضافا إليه 0.1% 2-mercaptoethanol). أجريت على المعلق عملية طرد مركزي بسرعة 5000 دورة/دقيقة مدة 10 دقائق واخذ الطافي. مرر الرائق خلال مرشح Millipore قطره 0.41 ملي مايكرون واخضع المستخلص لعملية فصل غشائي ، في أكياس ديلزة ذات نفاذية 12000. وضعت الأكياس بعد إحكام غلقها في إناء زجاجي يحوي 500 مل ماء مقطر مع التحريك بواسطة مازج كهربائي مدة 24 ساعة بدرجة 4°س. قدر تركيز الفايروس في المستخلص النقي بقياس مقدار الامتصاص على طول موجي 260 نانوميتر حسب المعادلة الآتية:

$$\text{تركيز الفايروس} = \frac{\text{الامتصاص على 260 نانومتر}}{\text{معامل الانطفاء (7.7)}} \times \text{مقلوب التخفيف}$$

الاختبار الحيوي للفايروس المنقى:
جمعت مجموعة من حشرة الذبابة البيضاء من قفص التربية بوساطة شافطة متصلة بأنبوب زجاجي طول 20 سم وقطر 3 سم. أغلقت فوهة الأنبوب بغشاء Parafilm M إنتاج شركة (American can company) وتركت الحشرات في الأنبوب مدة ساعة. غمرت فوهة الأنبوب الزجاجي في إناء زجاجي سعة 25 مل يحتوي 5 مل من تحضيرة الفايروس النقية مضافا إليها 25% سكروز. غلق الإناء الزجاجي بشريط لاصق اصفر لغرض جلب الحشرات إلى تحضيرة الفايروس للتغذية عبر الغشاء وغلف ثلثا الأنبوب من طرفه العلوي بشريط لاصق اسود لمنع الحشرات من التجمع في النهاية العليا للأنبوبة والنزول إلى الغشاء. تركت الحشرات تتغذى مدة ساعتين لاكتساب الفايروس. نقلت الحشرات إلى قفص حاوٍ على نباتات طماطة سليمة وتركت مدة 48 ساعة للتغذية ثم رشت بمبيد كونفيدور للتخلص منها.

النتائج والمناقشة:

الأعراض على نبات *Nicotiana glutinosa*: لم تظهر على هذا النبات أعراضا ظاهرية إلا انه عند ترك مجموعة من حشرات الذبابة البيضاء تتغذى على هذا النبات مدة 24 ساعة ثم نقلت إلى نباتات طماطة سليمة لمدة 24 ساعة ، ظهرت على هذه

النباتات أعراض تجعد بعد 25 يوما من العدوى. وقد أشارت بعض المصادر الى حساسية هذا النبات للإصابة بـ TYLCV بدون ظهور أعراض مرئية على النبات [21 ، 22]. إن إصابة نباتات التبغ البري بالفايروس بدون ظهور أعراض يدل على أن الفايروس هو فايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطة TYLCV وليس فايروس تجعد أوراق التبغ *Tobacco leaf curl virus* (TLCV) الذي يصيب الطماطة وينقل أيضا بالذبابة البيضاء ، إذ أن TLCV يصيب *Nicotiana glutinosa* بظهور أعراض تجعد مع تكون زوائد على العروق.

الأعراض على نبات *Nicotiana tabacum* var. *White Burley*: لم يستجب هذا النبات للعدوى بالفايروس إذ لم تظهر أعراض على نباتات الطماطة عند إجراء عدوى رجعية منه إلى نباتات طماطة سليمة. إن هذا يشير إلى أن الفايروس قيد الدراسة هو TYLCV وبذلك أمكن تمييزه عن الفايروس تجعد اوراق الطماطة *Tomato leaf curl virus* (ToLCV) الذي يصيب هذا النبات بظهور أعراض تحزم اخضر حول العروق وتغضن الأوراق وتجعدها فضلا عن تقزم النبات وينقل أيضا بالذبابة البيضاء *B. tabaci* [23] ، وقد أشار Mansour و Al-Musa [21] والعاني وآخرون [22] إلى عدم استجابة هذا النبات لفايروس TYLCV.

تحديد مدة حضانة الفايروس في الناقل

ظهرت أعراض إصابة على نباتات الطماطة التي عرضت لحشرات من *B. tabaci* حاملة للفايروس لمدة 21 ساعة، ولم تظهر على النباتات التي عرضت لحشرات حاملة للفايروس مدة 4 ، 6 ، 8 ساعات وظهرت على نباتين من اصل 5 نباتات بعد 16 ساعة من تعريض النباتات لحشرات حاملة للفايروس ، وأصيبت جميع النباتات بعد 24 ساعة من التعريض. إن هذه النتائج تشير إلى أن الفايروس قيد الدراسة هو TYLCV وهذا يتفق مع ما أشير إليه في دراسات سابقة [6 ، 7 ، 21 ، 24]. وبذلك أمكن تمييز الفايروس عن فايروس TLCV الذي تبلغ مدة حضانته في الناقل 4 ساعات وعن ToLCV الذي تبلغ مدة حضانته 6 ساعات وكلاهما يصيب نبات الطماطة وينقلان بنفس الناقل *B. tabaci*.

تنقية الفايروس: أظهرت النتائج كفاءة البيوتانول في ترويق مستخلص الفايروس وإزالة المادة الخضراء منه وهذا يتفق مع ما ذكره الكويتي والعاني [25] من كفاءة البيوتانول بهذا الخصوص. وبلغت نسبة الامتصاص على الطولين الموجيين 260 : 280 ، 1.4 وهذا يتفق مع ما ذكره [15 و 26] والذين توصلوا إلى نسب امتصاص 1.38 و 1.5 بالتتابع.

لم يكن للكلوروفورم او خليط البيوتانول والكلوروفورم تأثير يذكر في ترويق العصارة وبلغت نسبة الامتصاص على 260 : 280 ، 1.26 و 1.27 بالتتابع. وهذا يتفق مع ما توصل اليه Luisoni وآخرون [15] والكويتي والعاني [25] من عدم كفاءة الكلوروفورم في ترويق العصارة مقارنة بالبيوتانول. ظهر إن اقل المذيبات كفاءة هو Triton x-100 إذ بلغت نسبة الامتصاص للفايروس المنقى بهذه الطريقة على 260 : 280 ، 0.97 وتعد واطئة جدا مقارنة بـ 1.4 عند استعمال البيوتانول في الترويق وهذا يتفق مع ما ذكره الكويتي والعاني [25] عند تنقية فايروس البطاطا A (PVA).

بلغ تركيز الفايروس المنقى 0.43 ملغم/مل وبلغت الحصيلة الكلية 3.05 ملغم/100 غم من الأنسجة النباتية المصابة. وتعد هذه الحصيلة جيدة مقارنة بما حصل عليه Muniyappa وآخرون [13] حيث حصلوا على 10 مايكروغرام/100 غم أنسجة نباتية ، وما حصل عليه Luisoni وآخرون [15] ، 5 – 10 ملغم/كغم أنسجة مصابة. وقد يعود سبب هذا التفاوت إلى خطوات التنقية حيث ذكر انه كلما زادت خطوات التنقية ارتفعت كمية الفايروس المفقودة [27].

اختبار حيوية الفايروس المنقى: ظهرت أعراض الإصابة بالفايروس على نباتات الطماطة التي عرضت لحشرات *B. tabaci* تركت تتغذى على الفايروس المنقى عبر غشاء Parafilm مما يشير إلى إمكانية نقل الفايروس عبر الغشاء وان الفايروس المنقى بقي محتفظا بحيويته أثناء التنقية ، فضلا عن كفاءة طريقة التنقية المتبعة في هذه الدراسة. وقد أشار Cohen وآخرون [28] و Czosnek وآخرون [20] إلى إمكانية نقل الفايروس النقي عبر غشاء من Parafilm. وربما يعود الحفاظ على حيوية الفايروس إلى استعمال دارئ الستريت الذي يعد من المحاليل التي تحافظ على الفايروس وتمنع تحطمه [13] ، فضلا عن أن إضافة مواد مختزلة منعت أكسدة المركبات الفينولية وبالتالي منعت تكتل الفايروس وتثبيط فعاليته [20 ، 29].

إن دراسة خصائص الفايروس الحيوية والجزيئية يتطلب الحصول على عزلة نقية للفايروس. وقد أمكن الحصول على عزلة نقية لـ TYLCV باعتماد النباتات المشخصة وعلاقة الفايروس بالناقل *B. tabaci* ، فقد استجابت نباتات التبغ *N. glutinosa* للعدوى بالفايروس بدون ظهور أعراض مرئية استدل عليها من إجراء عدوى رجعية من هذا النبات الى نباتات طماطة. ولم تستجب نباتات التبغ *N. t.* var. *White Burley* للعدوى بالفايروس. وبلغت مدة حضانة الفايروس في الناقل 21 يوما وهذه الخصائص تنطبق على خصائص فايروس TYLCV [21 ، 22]. استبعد كون الفايروس

TLCV لان الأخير يصيب التبغ البري ويسبب ظهور تجعد ونمو زوائد ورقية من العرق الرئيسي للسطح السفلي للورقة ، ومدة حضانته في الناقل *B. tabaci* 4 ساعات فقط ، كما استبعد كونه ToLCV الذي ينقل بنفس الناقل لأنه يصيب التبغ *N. t.* var. *White Burley* بظهور أعراض تحزم اخضر حول العروق وتغضن الأوراق وتجعدها فضلا عن تقزم النبات ومدة حضانته في الناقل 6 ساعات [23 ، 24]. وبعد الحصول على عزلة نقية للفايروس أمكن التوصل إلى طريقة سهلة لاستخلاصه وتنقيته باستعمال البيوتانول لترويق العصارة والحصول على كمية ملائمة من الفايروس من العائل التكثيري.

المصادر:

1. Czosnek H. and H. Laterrot. 1997. A worldwide survey of *Tomato yellow leaf curl viruses*. Archives of Virology 142: 1391–1406.
2. Markham P.G., I.D. Bedford, S. Liu and M.S. Pinner. 1994. The transmission of geminiviruses by *Bemisia tabaci*. Pesticide Science 42: 123–128.
3. Moriones, E. and J. Navas-Castillo. 2000. *Tomato yellow leaf curl virus*, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. Virus Res., 1:123-134.
4. Idris, A., S. Smith, and J.K. Brown. 2001. Ingestion, transmission and persistence of chino del tomate virus (CdTV), a new world begomovirus, by old and new world biotypes of the whitefly vector *Bemisia tabaci* (Genn). Ann. Appl. Biol., 139: 145-154.
5. Valverde, R. A., P. Lotrakul, A.D. Landry, and J.E. Boudreaux. 2001. First report of *tomato yellow leaf curl virus* in Louisiana. Plant Dis. 85: 230.
6. زايد، محمد علي وخليل، جبر عبد الله وشقرون، محمد عبد المجيد. 2006. التسجيل الأول لفايروس اصفرار وتجعد أوراق الطماطم على محصول الطماطم في ليبيا. مجلة وقاية النبات العربية 24: 134.
7. زايد، محمد علي وخليل، جبر عبد الله وشقرون، محمد عبد المجيد. 2007. حصر وتعريف فيروس اصفرار وتجعد أوراق البندورة/الطماطم في المنطقة العربية. مجلة وقاية النبات العربية 25: 65.
8. Ajlan, A.M., G.A.M. Ghanem and K.S. Abdulsalam. 2007. *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) in Saudi Arabia: Identification, partial characterization and virus-vector relationship. Arab Journal of Biotechnology 10 (1):179-192.
9. شفيق، حسين لطيف. 1983. دراسات على تشخيص ومقاومة فايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطة في البيوت البلاستيكية. رسالة ماجستير – كلية الزراعة / جامعة بغداد.
10. Delatte, H., A. Dalmon, D. Rist, I. Soustrade, G. Wuster, J.M. Lett, R.W. Goldbach, M. Peterschmitt, and B. Reynaud. 2003. *Tomato yellow leaf curl virus* can be acquired and transmitted by *Bemisia tabaci* (Gennadius) from Tomato fruit. Plant Dis. 87: 1297-1300.
11. Delatte,H., H. Holota, F. Naze, B. Eynaud, and J. Lett. 2005. *Tomato yellow leaf curl*, tomato Reunion Overseas Department. New Disease Reports, 10:145-153.
12. Raj, S.K., M.S. Khan, and R. Singh. 2005. *Tomato leaf curl virus*: New Delhi strain. New Disease Reports, 11:226.
13. Muniyappa, V., M.M. Swanson, G.H. Duncan and B.D. Harrison. 1991. Particle purification, properties and epitope variability of Indian *tomato leaf curl geminivirus*. Ann. Appl. Biol. 118: 595 – 604.
14. Al–Bitar, L. and E. Luisoni. 1994. *Tomato yellow leaf curl virus*: serological evaluation of purification steps. European and Mediterranean plant protection Organization, International Agriculture Center, Wageningen (NL).
15. Luisoni, E., R.G. Milne and M. Vecchiati. 1995. Purification of *Tomato yellow leaf curl virus*,

ageminivirus. Microbiology 18: 253-260.

16. McDaniel, L.L. and J.H. Tsai. 1990. Partial characterization and serological analysis of *Pseudo-curly top virus*. Plant Disease 74: 17-21.

17. Morallis, F., A, Niessen, B. Ramirez and M. Castano. 1990. Isolation and partial characterization of geminivirus causing bean dwarf mosaic. Phytopathology 80: 96-101.

18. Sawalha, H.D., A. Mansour, and M. El-Khateeb. 1999. Purification, antiserum production, biological and molecular studies of *Tomato yellow leaf curl virus*. PhD. Thesis, University of Jordan. pp. 155.

19. Reddy, K.S. and R.C. Yaraguntaiah. 1981. Virus–vector relationship in leaf curl disease of Tomato. Indian Phytopathology 34 (3): 310–313.

20. Czonek, H., R. Ber, Y. Autignus, S. Cohen, N. Navot and D. Zamir. 1988. Isolation of *tomato yellow leaf curl virus*, a geminivirus. Phytopathology 78:508 – 512.

21. Mansour, A. and A. Al–Musa. 1992. *Tomato yellow leaf curl virus*: Host range and virus–vector relationships. Plant Pathology 41: 122 – 125.

22. العاني، رقيب عاكف وعذاب، مصطفى علي وحمد، سمير عبد الرزاق حسن. 2010. تشخيص فايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطة مصليا وبايولوجيا وتحديد سلالاته في العراق. مجلة زراعة الرافدين 38(2): (تحت الطبع).

23. Osaki, T. and T. Inouye. 1981. *Tobacco leaf curl virus*. CMI/AAB description of plant viruses. No. 232.

24. Morilla, G., C. Antunez, E.R. Bejarano, D. Janssen and I.M. Cuadrado. 2003. A new *Tomato yellow leaf curl virus* strain in Southern Spain. Plant Disease 87(8): 1004.

25. الكويتي، نورس عبد الإله والعاني، رقيب عاكف. 1999. التوصل إلى طريقة سهلة لتنقية فايروس A البطاطا (PVA) ودراسة خصائصه المصلية. مجلة إباء للأبحاث الزراعية 9: 321 – 330.

26. Dolores, L.M. 1995. Isolation and characterization of a virus causing the leaf curl disease of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in the Philippines. College, Laguna (Philippines).

27. Kado, C. and H.O. Agrawal. 1972. Principles and techniques in plant virology, Van Nostrand Reinhold Company. New York. pp. 688.

28. Cohen, S., J.E. Duffus, R.C. Larsen, H.Y. Liu and R.A. Flock. 1983. Purification, serological, and vector relationships of *Squash leaf curl virus*, a whitefly-transmitted geminivirus. Phytopathology 73: 1669-1673.

29. [29] Givord, L., D. Fargette, B. Kounounguissa, J.C. Thouvenel, B. Walter and M.H.V. Van Regenmortel. 1994. Detection of geminiviruses from tropical countries by double monoclonal antibody ELISA using antibodies to *African mosaic virus*. Agronomie 14: 327-333.

Evaluation the efficiency of different techniques for extraction and purification of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV)

Rakib A. AlAni *** ***Mustafa A. Adhab* ***Samir A.H. Hamad****

*College of Agric., Univ. of Baghdad

Abstract:

This study was conducted to evaluate the efficacy of different techniques for extraction and purification of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). An isolate of the virus free of possible contamination with other viruses infecting the same host and transmitted by the same vector *Bemisia tabaci* Genn. was obtained. This was realized by indicator plants and incubation period in the vector. Results obtained revealed that the virus infect *Nicotiana glutinosa* without visible symptoms, while *Nicotiana tabaccum* var. *White Burley* was not susceptible to the virus. The incubation period of the virus in the vector was found to be 21 hrs. These results indicate that the virus is TYLCV. Results showed that Butanol was more effective in clarification the sap and eliminate of plant proteins and chlorophyll. The use of citrate buffer at pH 8 amended with reducing agents and EDTA to prevent the oxidation of phenolic compound was found to be suitable in maintaining the biological activity of the virus during extraction. The quantity of the virus obtained was 3.05 mg/100 gm leaves with absorption ratio of 1.4 at 260/280 nm which represent standard value for TYLCV.