الكفاءة التثبيطية لبعض المستخلصات النباتية في تضاعف فيروس البطاطا واي Potato Y Potyvirus (PVY)

** عبد القادر خضير العزاوي ، *رقيب عكف العاني ، * ميسر مجيد جرجيس
* قسم وقاية النبات – كلية الزراعة – جامعة بغداد – أبو غريب
** الهيئة العامة للبحوث الزراعية – وزارة الزراعة ، جمهورية العراق

المستخلص

أجريت هذه التجربة بهدف تحديد كفاءة مستخلصات نباتات العفص (أوراق ، أغصان وثمار) *Thuja orientalis* L. والأوراق التويجية للقرنفل *Eugenia caryophyllala* Thunb وقشور الرمان *Punica granatum* L. في تضاعف فيروس البطاطا واي Potato Y potyvirus (PVY) حيث تم تحضير المستخلصات الكحولية للنباتات المذكورة واختبرت الكفاءة التثبيطية لمستخلص كل نبات وبتراكيز مختلفة. واعتمد اختبار الاليزا المصلي Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) في متابعة وتقدير تركيز الفيروس في النباتات المعاملة. أوضحت النتائج التي تم الحصول عليها من هذه التجربة إن رش نباتات البطاطا المعداة بعزلة الفيروس موضوع البحث والتي تم الحصول عليها من قسم المختبرات المركزية لمشروع إنتاج تقاوي البطاطا التابع لمركز إباء للأبحاث الزراعية الملغي ،بمستخلص نبات العفص و مستخلص قشور الرمان و حامض التانيك بتركيز5 غم/لتر قد أدى إلى اختفاء الفيروس تماماً من النباتات المعاملة بعد 8 ، 16 ، 16 يوماً من الرش بالتتابع . لم يؤد رش نباتات البطاطا المعداة بعزلة نفس الفيروس بمستخلص قشور الرمان بالتركيز 3 غم/لتر إلى اختفاء كلي للفيروس. في حين اختفى الفيروس عند رش النباتات المعداة بمستخلص العفص بنفس التركيز بعد 17 يوماً .أما المستخلص الكحولي للأوراق التويجية لنبات القرنفل فلم يظهر تأثيرا في تثبيط الفيروس وبالتراكيز المستعملة، إذ أدى رش نباتات البطاطا المعداة بنفس عزلة الفيروس إلى خفض بسيط لتركيز الفيروس في بداية المعاملة ثم ارتفع التركيز ثانية بعد 8 أيام من الرش. أضفر رش النباتات السليمة بالتركيز 5 غم/لتر لكل من مستخلص العفص و قشور الرمان حماية للنباتات من الإصابة مدة 12 ، 8 أيام بالتتابع. و لم يظهر على النباتات المعاملة بالمستخلصات أية اعرض مظهرية أو تأثيرات سمية مرئية. يتضح من نتائج هذه التجربة إن المادة الرئيسية الفعالة في مستخلصات النباتات الثلاثة المدروسة هي حامض التانيك، ويوجد هذا الحامض بتركيز عالية في نبات العفص وقشور الرمان مما يتطلب إجراء دراسات لاحقة لإثبات فعاليتها ضد مجاميع أخرى من الفيروسات. كما يتطلب إجراء تجارب أخرى حول إمكانية تحويل المستخلصات إلى تركيبة يمكن استعمالها على نطاق واسع في السيطرة على الأمراض الفيروسية.

The Iraqi Journal of Agricultural Science 39 (5) : 109-117 (2008) Azawi et al.

Inhibitory Activity Of Some Plant Extracts On The Multiplication Of Potato Virus Y (PVY).

AL-Azawi, A.K., R.A. Al-Ani and M.M. Jarjees

ABSTRACT

This experiment was conducted to determine the inhibitory efficiency of thuja *Thuja orientalis* L. (leaves, branches, fruits) extract, petal leaves of *Eugenia caryophyllala* extract and peel of pomegranate *Punica granatum* L. on the multiplication of potato Y potvirus (PVY). The alcoholic extracts were prepared for the above plants and the inhibitory activity for each plant extract was tested at different concentration levels. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) as a serological test was used to determine the virus concentration in treated plants. Results showed that the application of extracts from Thuja, pomegranate peel and tannic acid on the PVY inoculated plants at 5 g/l led to complete inhibition of the virus multiplication within 8, 16 and 16 days respectively. The spraying of pomegranate peel extract at 3g/l on the PVY inoculated plants was not completely inhibited the virus, while the spraying of thuja extract at the same concentration was inhibited the virus multiplication within 17 days from inoculation. The application of Thuja and pomegranate peel extracts were protected the plants from viral infection for 12 and 8 days respectively. There was no inhibitory effect observed on plants treated with the extract of petal leaves of *Eugenia caryophyllala*. Results of this experiment also indicated that the major active ingredient in studied plants is tannic acid. There was no significant damage occurred on the treated plants.

المقدمة

تحتوي الكثير من النباتات على مواد و مركبات تمتلك المقدرة على التثبيط والحد من تضاعف الفيروسات (5، 11، 20، 22،24، 25). و تشمل هذه المواد في الغالب مركبات فينولية و بروتينات عزي إليها في كثير من الحالات فشل العدوى الميكانيكية بالفيروسات (12، 21). ولقد أجريت محاولات عديدة لتوظيف هذه المركبات في مقاومة الفيروسات و الحد من أضرارها . حيث درس تأثيرها على فيروس موزائيك التبغ (1، 22، 27) وفيروس Cucumis virus 2 (30)، و فيروس البطاطا واي (PVY) (13) و فيروس البطاطا اكس (PVX) (11،25) و فيروس تجعد و اصفرار أوراق الطماطة Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV)(5، 9،10). و قد قسمت المركبات النباتية التي تمتلك تأثيراً على تضاعف الفيروسات إلى أقسام عدة هي: Lignins , Terpenoids , Furocomarins , Alkaloids و بروتينات (32). ومن البروتينات النباتية التي تمتلك تأثيراً تثبيطياً في الفيروسات مجموعة أطلق عليها البروتينات المثبطة للرايبوسوم Ribosome Inactivating Proteins (RIPs) (7، 18) و توجد في النبات أما على هيئة سلسلة واحدة (Type I) أو سلسلتين (Type II) و كلاهما بروتينات قاعدية . وقد وجد إن نبات *Mirabilis jalaba L.* يحوي في أوراقه و جذوره بروتينات مضادة للفيروسات Antiviral Proteins و ذو فعالية ضد العدوى الميكانيكية لبعض الفيروسات (17، 29 ، 31) . و هو من النوع (Type I) وقد أطلق عليه Mirabilis antiviral proteins (MAP) وزنه الجزيئي 24.2 كيلو دالتون و ذو كفاءة عالية في تثبيط العديد من الفيروسات. و أمكن استخلاص بروتينات من نباتات الداتورة *Datura stramonium L.* لها تأثير كبير على تضاعف فيروس البطاطا واي PVY (3،23).ونظرا لأهمية فيروس البطاطا واي Potato Y Potyvirus (PVY)على محصول البطاطا *Solanum tuberosum L.* في العراق وجسامة الخسائر التي يسببها في الحاصل فقد أجريت هذه الدراسة بهدف تحديد كفاءة مستخلصات نباتات العفص *Thuja orientalis L.* ، القرنفل *Eugenia caryophyllala* Thunb وقشور الرمان *Punica granatum L.* في تضاعف فيروس البطاطا واي (PVY) .

مواد البحث و طرائقه

تحضير العينات:

جمعت عينات العفص (أوراق ، أغصان ، و ثمار) من حقول كلية الزراعة – جامعة بغداد ، و تم الحصول على الأوراق التويجية لنبات القرنفل و قشور الرمان من الأسواق المحلية . جففت العينات النباتية في فرن كهربائي بدرجة حرارة 40 – 45 س^0 لمدة سبعة أيام وطحنت بوساطة مجرشة كهربائية نوع Jank and Kunkel Gomb H U-cok G. حاوية على غربال 1.5 مش. جمعت المساحيق الناتجة في أكياس نايلون و حفظت بدرجة حرارة –20 س^0 لحين الاستعمال .

الاستخلاص الكحولي للعينات :

أضيف إلى 100 غم من مسحوق كل من العفص و قشور الرمان و القرنفل 300 مل كحول اثيلي 80 % كل على انفراد و عرض الخليط للرج مدة 24 ساعة بواسطة رجاج كهربائي . رشح المستخلص خلال ورقة ترشيح Whatman – 2 في قمع بخنر تحت التفريغ . كررت عملية الاستخلاص مرتين و ركز الراشح الكلي في حمام مائي بدرجة حرارة 40 – 42 س^0 حتى الحصول على عجينة كثيفة القوام مائلة للون الأسود و حفظ في قناني زجاجية بدرجة - 20 س^0 (14).

مصدر الفيروس والمصل المضاد :

تم الحصول على عزلة نقية من فيروس البطاطا واي والمصل المضاد للفيروس نفسه من قسم المختبرات المركزية لمشروع إنتاج تقاوي البطاطا التابع لمركز إباء للأبحاث الزراعية الملغي وان مصدر المصل المضاد والمصل المضاد المرتبط بإنزيم الفوسفاتيز القاعدي هو شركة Bioreba - Switzerland.

حضر اللقاح الفيروسي بسحق أوراق بطاطا مصابة بعزلة الفيروس أعلاه في محلول دارئ فوسفاتي ذو تركيز 0.1 مولاري يحوي 0.2 % Diethyldithiocarbamate (DIECA) بدرجة حموضة pH 7.0 وبمعدل 1 غم أوراق

/ 4 مل محلول دارئ . رشح المستخلص عبر طبقتين من قماش الموسلين ثم استعمل في العدوى الميكانيكية.

اختبار فعالية المستخلصات :

حضرت تراكيز 3 , 5 , 6 , 8 غم/لتر من كل مستخلص في ماء مقطر و أضيف لكل منها مادة Tween 20 – بنسبة 0.1 % . رشت تراكيز المستخلصات التي تم تحضيرها على نباتات البطاطا صنف ديزريه المعداة ميكانيكيا بفيروس البطاطا واي في مرحلة 3- 5 أوراق بعد 48 ساعة من موعد إجراء العدوى و بمعدل 10 نباتات لكل تركيز . رشت نباتات بطاطا أخرى معداة بالفيروس نفسه بالماء المقطر الحاوي على نسبة 0.1% من مادة Tween – 20 و رشت نباتات بطاطا سليمة بالمستخلصات المشار إليها آنفا وبنفس التراكيز للمقارنة . أخذت عينات ورقية من وسط وقمة نباتات البطاطا العشرة المعاملة بعد 4 , 8 , 12 , 16 يوماً من عملية الرش و تم فحصها سيرولوجيا للكشف عن وجود الفيروس فيها باعتماد تقنية اختبار الاليزا المصلي و جهاز قياس الطيف الضوئي (4، 8) .

تحديد مدة حماية النباتات المعاملة من الإصابة بالفيروس:

انتخب تركيز المستخلص الذي أعطى أعلى نسبة تثبيط للفيروس ورشت به نباتات بطاطا سليمة صنف ديزريه بمعدل 5 نباتات لكل معاملة . وضعت النباتات المعاملة في قفص خشبي محاط من جميع جوانبه بقماش الململ ثم أجريت للنباتات المعاملة عملية عدوى بوساطة حشرات المن *Myzus persica* حيث وضعت 25 حشرة من متغذية مسبقا على نباتات بطاطا مصابة ب PVY بعد ساعة من الرش و تركت نباتات بطاطا أخرى للصنف نفسه غير مرشوشة للمقارنة (شاهد) وقد وضع عليها حشرات من حاملة للفيروس. تم متابعة وجود الفيروس في النباتات مصليا باستخدام تقنية اختبار الاليزا بعد 4 ,8 , 12 , 16يوماً من الرش وقدر مقدار امتصاص العينات للضوء على الطول الموجي 405 نانومتر و حسبت نسبة التثبيط حسب المعادلة الآتية :

$$\text{نسبة التثبيط} = \frac{\text{الامتصاص في المقارنة} - \text{الامتصاص في المعاملة}}{\text{الامتصاص في المقارنة}} \times 100$$

اختبار فعالية حامض التانيك في تثبيط فيروس البطاطا واي :

رشت خمس نباتات بطاطا صنف ديزريه معداة بفيروس البطاطا واي في مرحلة نمو 3-5 أوراق ، بمحلول حامض التانيك تركيز 5 غم/لتر بوجود مادة Tween-20 بنسبة 0.1% بعد 48 ساعة من العدوى الميكانيكية بالفيروس ورشت نباتات أخرى معداة بالفيروس نفسه بالماء المقطر المعقم بوجود 0.1% Tween-20 للمقارنة. جرت متابعة تقدير الفيروس في النباتات المعاملة بتقنية اختبار الاليزا بعد 4, 8, 12,16 يوما من المعاملة وكذلك تم تقدير امتصاص العينات للضوء على طول موجي قدره 405 نانومتر .

تشخيص المادة الفعالة:

شخصت المادة الفعالة للمستخلصات النباتية المستعملة بواسطة كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة Thin Layer Chromatography (TLC) . وضع لوح زجاجي (20 x 20 سم مطلي بمادة اوكسيد الألمنيوم Alumium oxide بسمك 0.25 سم في فرن كهربائي (oven) بدرجة حرارة 100– 110 س^0 مدة 15 دقيقة لتنشيط مادة اوكسيد الألمنيوم (13) . وضع 10 مايكرو لتر من العينات القياسية وعينات المستخلصات (المحضرة بإذابة 20 غم من كل مستخلص في 10 مل كحول اثيلي 50 %) (28) بشكل بقع على خط أفقي بمسافة 2 سم عن الحافة السفلية للوح وبنفس المسافة بين عينة وأخرى . وضع اللوح الزجاجي بعد جفاف العينات عمودياً في الوعاء المخصص الحاوي على 100 مل من المذيب Butanol : acetic acid : water بنسبة(5 : 1 : 4) بحيث كان مستوى المذيب أوطأ من البقع . ترك المذيب يصعد في اللوح لغاية 2 سم عن الحافة العليا ثم ترك

ليجف بدرجة حرارة المختبر (16) ثم رش بمحلول كلوريد الحديديك Ferric chloride ($FeCl_3$) تركيز 1 % في الكحول الاثيلي 95 % لإظهار البقع (29) .

النتائج و المناقشة :

اختبار فعالية المستخلصات:

أوضحت النتائج إن للمستخلص الكحولي لنبات العفص فعالية كبيرة في التأثير على تضاعف فيروس البطاطا واي ، فقد أدى رش النباتات المعداة بالفيروس بتراكيز 5 , 6 , 8 غم/لتر ماء إلى تثبيط كامل لتضاعف الفيروس بعد 8 أيام من الرش ، و بعد 17 يوماً عند رش النباتات المعداة بالتركيز 3غم/لتر ، إذ لم يظهر الفحص باختبار الاليزا تفاعلاً موجباً عند هذه التراكيز للفترات المذكورة شكل (1) ، في حين أدى رش النباتات المعداة بمستخلص قشور الرمان بالتراكيز 6 , 8 غم / لتر إلى تثبيط تضاعف الفيروس كلياً بعد 12 يوماً ، و بعد 16 يوماً بالتركيز 5 غم/لتر و لم يؤدي رش المستخلص بالتركيز 3 غم / لتر إلى تثبيط كلي لتضاعف الفيروس شكل (2). أما المستخلص الكحولي للقرنفل فلم يظهر تأثيرا كبيراً في تضاعف الفيروس للتراكيز المستخدمة ، إذ أدى رش النباتات المعداة إلى خفض بسيط لتركيز الفيروس في بداية المعاملة ثم ارتفع ثانية بعد 8 أيام من الرش ، شكل (3) . و قد يعزى تفوق مستخلص العفص على مستخلص قشور الرمان في التأثير على تضاعف الفيروس إلى احتوائه على نسبة كبيرة من المواد الفينولية ولاسيما التانينات، إذ تبلغ نسبتها في العفص بين 50-70 % (2) بينما لا تتجاوز هذه النسبة 20 – 30 % في قشور الرمان (6) . وقد سجل إن مستخلص أوراق و أغصان العفص ذو قدرة على تثبيط فيروس موزائيك التبغ بنسبة 99 % (27) . و قد تم التوصل إلى نتائج مشابهة عند استعمال المستخلص الكحولي لأوراق و ثمار العفص لتثبيط تضاعف فيروس تجعد و اصفرار أوراق الطماطة (5).

تحديد مدة الحماية بالمستخلصات من الإصابة بالفيروس :

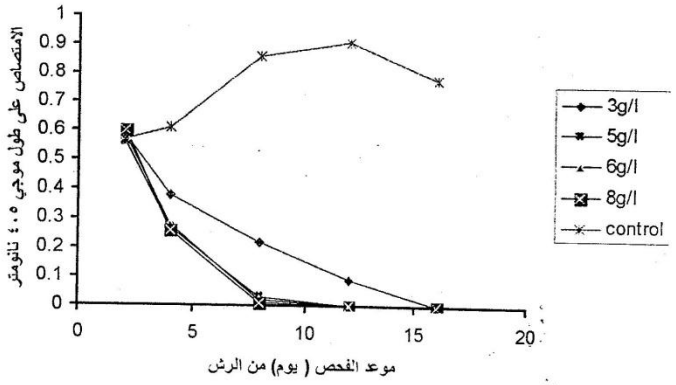
أدى رش نباتات البطاطا السليمة بمستخلص نباتات العفص و قشور الرمان بالتركيز 5 غم/لتر إلى حماية النباتات من الإصابة بالفيروس مدة 12 و 8 أيام بالتتابع، حيث جرت متابعة ظهور أعراض الإصابة على الأوراق إضافة إلى فحصها بوساطة اختبار الاليزا والذي أعطى نتائج سالبة للمدد المذكورة جدول (1) . أشارت بعض الدراسات إلى كفاءة بعض المستخلصات النباتية في منع حدوث الإصابة بالفيروسات عند رشها على النباتات (5) ، و لم يظهر على النباتات المعاملة بالمستخلصات التي استعملت للمقارنة أية تأثيرات سلبية مظهرية أو سمية قياساً بنباتات المقارنة. و قد يعزى السبب إلى تحول المركبات الفينولية إلى مركبات أخرى غير مؤثرة في فسلجة النبات .

اختبار فعالية حامض التانيك في تثبيط فيروس البطاطا واي:

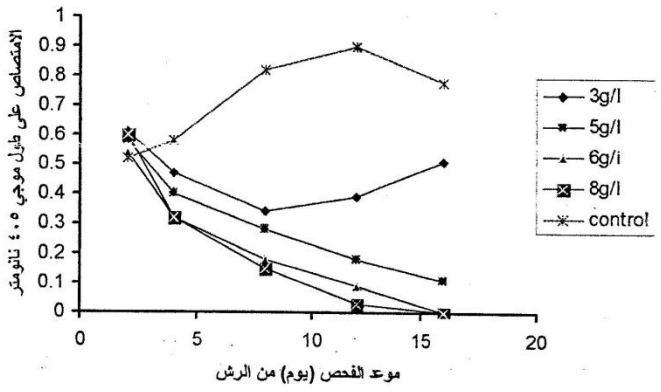
أظهرت نتائج اختبار الاليزا تفاعلا سالبا عند فحص النباتات المعداة بالفيروس والمرشوشة بالتركيز 5 غم/لتر من حامض التانيك حيث يعتقد أن هذا الحامض قد أدى إلى تثبيط تضاعف الفيروس وبنسبة تصل إلى 72% بعد 12 يوماً من المعاملة ، و إلى اختفاء الفيروس تماماً بعد 16 يوماً من المعاملة شكل (4) . إن هذه النتائج تعطي مؤشراً إلى إن المادة الفعالة في مستخلص كل من العفص و قشور الرمان هي حامض التانيك . وقد أشير إلى إن حامض التانيك أعطى تثبيطاً كاملاً لفيروس Cucumis virus 1 (26) ، وتم التوصل إلى إن المجزأ الثاني (خلات الاثيل) أعطى تثبيطاً كاملاً لفيروس تجعد و اصفرار أوراق الطماطة (TYLCV) مقارنة بالمجزأ الأول (الايثر ثنائي الاثيل) والمجزأ الثالث (المائي) (5) ، وعزى ذلك إلى وجود المركبات الفينولية متوسطة القطبية خصوصاً حامض التانيك. وتؤكد نتائج هذه الدراسة والتي تدعمها تجربة الكشف عن المادة الفعالة بواسطة كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) وجود حامض التانيك في مستخلص نبات العفص.

إن نتائج هذه التجربة تشير بوضوح إلى كفاءة مستخلص نبات العفص و قشور الرمان في الحد من تضاعف فيروس البطاطا واي (PVY) ، حيث إن الجزء الرئيسي من هذه المستخلصات هو مركبات فينولية و خصوصا حامض التانيك ، وكما أظهره اختبار التشخيص

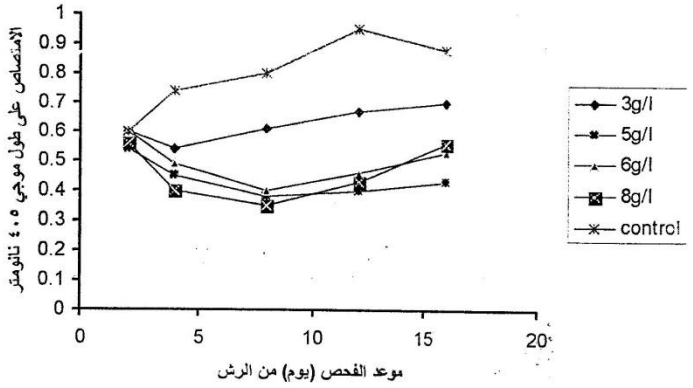
بتقنية كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) وأكدته المقارنة بكفاءة حامض التانيك في تثبيط تضاعف الفيروس . وأظهرت النتائج أيضا إن كفاءة مستخلص العفص قد تفوقت على حامض التانيك عند استعمالها بنفس التركيز مما يشير إن هناك مواداً أخرى في مستخلص العفص تعمل على زيادة كفاءة المستخلص في تثبيط تضاعف الفيروس. و قد أشير في المراجع إلى وجود مواد بروتينية في بعض النباتات ذات تأثير تثبيطي قوي لفعالية الفيروسات (7، 19، 31) . إن ميكانيكية تأثير المركبات الفينولية على الفيروس لم تحدد بشكل دقيق إلا إن الاعتقاد هو أنها تكون معقداً مع بروتينات غلاف الفيروسات عن طريق تكوين أواصر هيدروجينية بين مجاميع الكاربوكسيل في المركبات الفينولية و مجاميع الأمين في البروتينات تؤدي إلى ترسيبها و إيقاف فعاليتها (18) و بالتالي إيقاف تضاعف الفيروس . و لا يستبعد أن تكون أحد الميكانيكيات هو أن بعض هذه المركبات تؤدي إلى تحفيز تكوين بروتينات لها القدرة على تثبيط فاعلية الفيروس عن طريق ارتباطها مع الحامض النووي ومنع تضاعفه بوساطة أنزيم التضاعف أو منع استنساخه . فقد ذكر إن بعض النباتات تحوي على بروتينات تمتلك تأثيرا تثبيطياً في الفيروسات أطلق عليها Ribosome-inactivating proteins (7، 19). كما استخلص بروتين له القدرة على تثبيط العديد من الفيروسات من نبات *Mirabilis jalaba* L. و إن هذه البروتينات تؤثر على الرايبوسومات و توقف عملية ترجمة أل mRNA إلى بروتينات (31) . و لا يستبعد إن تأثيرا مشابهاً لما ذكر قد تكون ضد فيروس البطاطا واي عند رش النباتات بالمستخلصات النباتية قيد الاختبار.



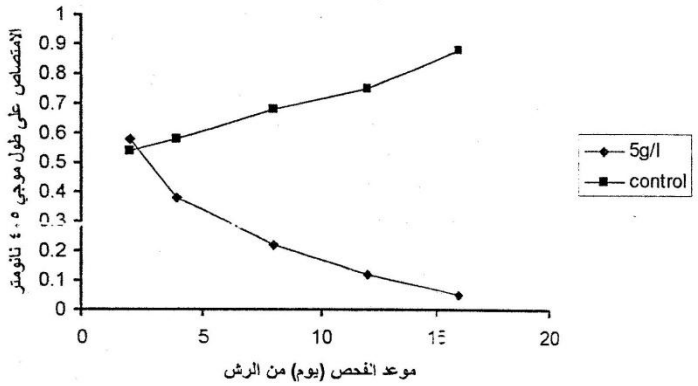
شكل 1. قيم اختبار الاليزا لعصير نباتات البطاطا المعداة بفيروس البطاطا واي (PVY) و المرشوشة بمستخلص نبات العفص **Thuja** بعد يومين من العدوى.



شكل 2. قيم اختبار الاليزا لعصير نباتات البطاطا المعداة بفيروس البطاطا واي(PVY) و المرشوشة بمستخلص قشور الرمان Pomegranate peel بعد يومين من العدوى.



شكل 3. قيم اختبار الاليزا لعصير نباتات البطاطا المعداة بفيروس البطاطا واي(PVY) و المرشوشة بمستخلس الجراثيم الزهرية لنبات القرنفل Carnation بعد يومين من العدوى.



شكل 4. قيم اختبار الاليزا لعصير نباتات البطاطا المعداة بفيروس البطاطا واي(PVY) و المرشوشة بحامض التانيك Tannic acid بعد يومين من العدوى.

جدول (1). مدة حماية نباتات البطاطا ضد الإصابة بفيروس البطاطا واي (PVY) عند معاملتها ببعض المستخلصات النباتية بتركيز 5 غم/لتر.

مصدر المستخلص* Source of extract	مدة الحماية (يوم)			
	4	8	12	16
نبات العفص *Thuja orientalis*	-	-	-	+
قشور الرمان *Punica granatum*	-	-	-	+
المقارنة control (الرش بدون مستخلص)	-	+	-	+

+ تفاعل موجب باختبار تقنية الاليزا يشير إلى وجود الفيروس.

- تفاعل سالب باختبار تقنية الاليزا يشير إلى عدم وجود الفيروس

* لقحت النباتات بالفيروس بعد ساعة من عملية رش المستخلصات باستخدام حشرات المن *Myzus persicae*.

المصادر

1- الجريصي ، ياسر حسين زيدان . 1998. استخدام مستخلص نبات *Chenopodium mural* لتثبيط فيروس موزائيك الطماطة (Tomato Mosaic Virus) وتحفيز مقاومة نبات الطماطة ضده. رسالة ماجستير، قسم علوم الحياة، كلية العلوم الجامعة المستنصرية. 89 صفحة.

2- الشماع، علي عبدالحسين. 1989. العقاقير وكيمياء النباتات الطبية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. مطبعة بيت الحكمة. ص 101-111.

3- العاني، رقيب عاكف، أسامة ناظم العيساوي و شعلان علوان المشايخي. 2002. عزل بروتينات لها القدرة

على تثبيط تضاعف فيروس البطاطا واي (PVY) من نباتات الداتورة . جرش للبحوث والدراسات ص 9-21.

4- جرجيس، ميسر مجيد. 2000. استخدام اختبار اليزا للكشف السريع عن فيروس البطاطا واي (Potato virus Y) في حقول البطاطا في العراق. مجلة وقاية النبات العربية، 18 : 46-50.

5- حمد، سمير عبدالرزاق. 2000 . تأثير بعض المستخلصات النباتية و منظمات النمو في فيروس تجعد واصفرار أوراق الطماطة. رسالة ماجستير، كلية الزراعة جامعة بغداد. 94 صفحة.

6- دلالي، باسل كامل و صادق حسن الحكيم. 1987. تحليل الأغذية. جامعة الموصل، وزارة التعليم العالي و البحث العلمي- جمهورية العراق. 563صفحة.

7- Barbieri, L., M.G. Batelli, and F. Stirpe . 1993. Ribosome inactivating proteins from plants. Biochem. Biophys. Acta. 1154: 237-282.

8- Clark, M.F. and A.N. Adams. 1977. Characteristics of microplate method of Enzyme – Linked Immunosorbent Assay for the detection of plant viruses . J. Gen. Virol. 34: 475- 483.

9- El- Dougdoug, Kh. A., R.M. Taha and A.M. Kheder. 2001. Application of some natural substance to control yellow leaf curl disease in tomato plants. Egpt. J. Biotechnol. 9: 80-93.

10- El- Dougdoug, Kh.A., H.A. Hana and R.A. Doud. 2007. Elimination of some viruses infecting tomato plants by phyto-antivirus. Research J. of Agriculture and Biological Science 3(6): 994-1001.

11- Erkan, S. and U. Yorganci. 1982. Investigations on the inhibition of potato virus X (PVX) infectivity by some plant extracts. J. Turk. Phytopathol. 11: 61-75.

12- Gibbs, A. and B. Harrison. 1980. Plant Virology The principles. Edward Arnold. London.

13- Gupta, V.K. and S.P. Raychaudhuri. 1972. Inhibition of potato virus Y by the leaf extracts of *Callistemon lanceolatus* and *Syzygium cumini*. Indian Phytopathology 25: 108-112.

14- Harborn, J.B. 1973. Phytochemical method. Halsted Press . John Wiely and sons, New York , pp. 278.

15- Hull, R. 2002. Matthews Plant Virology. 4th edition. Academic Press. Pp 1001.

16- Klocke, J.A., B.V. Wagenen and M.F. Balandrin. 1986. The ellagitannine geranin and its hydrolysis products isolated as insect growth inhibitors from semi-arid land plant. Phytochemistry 25: 85-91.

17- Kubo, S., I. Ikeda, S. Imoizumi, Y. Takanami and Y. Mikami. 1990. Potent plant virus inhibitor found in *Mirabilis jalapa* L. Ann. Phytopathol. Soc. Jap. 56: 481-487.

18- Matthews, R.E.F. 1980. Plant Virology. Academic Press, New York. 2 nd edition. Pp. 897 .

19- Mehta, A.D. and R.S. Boston. 1998. Ribosome inactivating proteins. Pages 145-152. In: A look Beyond Transcription: Mechanisms determining mRNA stability and translation in plants. J. Bailey-Serres and D.R. Gallie, eds. American Society of plant Physiology , Rockville, Mo.

20- Murphy, J.F., G.W. Zehunder, D.J. Schuster, E.J. Sikora, J.E. Poiston and J.W. Kloepper. 2000. Plant growth-promoting rhizobacterial mediated protection of tomato against tomato mottle virus. Plant Dis.84: 779-784.

21- Noordam, F.C. 1973. Identification of plant viruses, methods and experiments. Center for Agriculture Publishing and Documentation . Wageningen, The Netherlands pp. 207.

22- Noronba, A. B., M. Amelia , V. Alxandra , R. De-Gaetano and M. Vicente. 1993. Protection against tobacco mosaic virus induced by some caryophyllales plant extracts .Microbiology73: 75 – 80 (Abstr.).

23- Ropert, Y., T. Woodford, and D. Griblot. 2000. Some epidemiological approach to the control of aphid-borne virus diseases in seedpotato crops in northern Europe. Virus Research 71: 33-47.

24- Sanger, R.B.S. and M.K. Dhingra. 1982. Potato virus inhibitor from Neem leaf extract. J. Indian Potato Assoc. 9: 143-149.

25- Sanger, R.B.S., M.K. Dhingra, S. Kumer and M.P. Parihar. 1984. Inhibitor of potato

virus X by *Rosa banktia* leaf sap. J. Indian potato Assoc. 2: 134 -135.

26- Sharma , Y.R. and J.S. Chohan. 1973. Inhibition of cucumis Virus 1 in extract of leaf and seeds of different plants. Indian Phytopathology 26: 172-173.

27- Simons J.N., R. Suidler and LM. Moss. 1963. Succulent type plant as a source of plant virus inhibition. Phytopathology 53: 677-683.

28- Stahl, E. 1969. Thin-Layer Chromatography, a laboratory hand book 2nd ed. Fully revised and expended . Translated by M.R.F. Answorth. Springer-verlog, New York. Shukla, D.D., C.W. Ward and A.A. Brunt. 1994. The potyviridae. C.A.B. International, U.K. 561 pp.

29- Takanami, Y., S. Kumata, T. Ikeda and S., Kubo . 1990. Purification and characterization of the anti-plant viral protein from *Mirabilis jalapa* L. Ann. Phytopathol . Soc. Jpn. 56:488-494.

30- Vasudeva, R.S. and T.K. Nariani. 1952. Host range of bottle gourd mosaic virus and its inactivation by plant extract. Phytopathology 42: 149-152.

31- Vivanco, J.M, Querci, M. and L.F. Salazar. 1999. Antiviral and Antiviroid activity of MAP-containing extracts from *Mirabilis jalaba* roots . Plant Disease 83:1116-1121.

32-Zipf, A. 1995. Mechanisms of antiviral protein activity in higher plants. Pages 133-146. In: Antiviral proteins in higher plants. CRC Press, Boca Raba, FL.