وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة الكوفة - كلية الزراعة

التشخيص والتوصيف الكامل لبعض الفايروسات الممرضة والداخلية لنبات الخيار ومقاومتها باستعمال بعض العوامل الاحيائية وغير الاحيائية

اطروحة تقدمت بها الطالبة

حوراء إسماعيل عباس الياسري

إلى مجلس كلية الزراعة - جامعة الكوفة

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الدكتوراه

في العلوم الزراعية – أمراض النبات / الفايروسات

بإشراف

أ. د. **فضل عبد الحسين الفضل**

1444هـ

2023 م

بسم الله الرحمن

الرحيم

﴿ يَرْفَعِ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا

الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ ۚ وَاللَّهُ بِمَا تَعْمَلُونَ خَبِيرٌ ﴾

صدق الله العلي العظيم

سورة : المجادلة

الاية : 11

الاهداء

إلى من أرسل رحمة للعالمين محمد الأمين وإلى آله الطيبين الطاهرين عليهم أفضل الصلاة وأتم التسليم.

إلى سيدي ومولاي صاحب العصر والزمان الإمام الحجّة المنتظر.

أهدي هذا الجهد المتواضع ..

حوراء

شكر وتقدير

الحمد لله واسع النعم والصلاة والسلام على حبيب رب العالمين محمد المصطفى وعلى اله الطيبين الطاهرين . أحمدُ الله حمداً كثيراً على عظيم نعمهِ وعظيم سلطانهِ الذي أمدني بالصبر و أعانني لإكمال هذا الجهد المتواضع .

بعد أن وفقني الله عز وجل في إتمام اطروحتي هذه ، لا يسعني إلاَّ أن أتقدم بشكري الجزيل وامتناني الى من امدوني بالعطاء والحنان وسهروا على راحتي الى اللذين اديا رسالتهما نحوي الى من احسنا تربيتي والدّي الحبيبين .

شكري و تقديري وامتناني الى الاستاذ الدكتور فضل عبد الحسين خليل الفضل الذي اشرف على هذه الدراسة لجهوده المتميزة في المتابعة العلمية وإسداء الإرشادات والتوجيهات المستمرة طيلة مدة البحث والسعي جاهدا لإنجاحها متمنية له دوام الصحة والتوفيق.

وعرفانا بالجميل اقدم شكري وامتناني الى الدكتور اسامة ناظم كاظم العيساوي لما قدمه لنا من يد العون طيلة مدة البحث متمنية له التوفيق والنجاح الدائم

كما اقدم شكري وتقديري الى عمادة كلية الزراعة / جامعة الكوفة واخص بالذكر الاستاذ الدكتور علاء عيدان حسن واقدم شكري الى رئاسة قسم وقاية النبات والى اساتذتي في قسم وقاية النبات اللذين اعانوني في دراستي واقدم شكري الى الاستاذ المساعد الدكتور وسام عدنان راضي الجعيفري والدكتورة بيداء محسن الشكري كما اوجه شكري الى الاستاذ الدكتور هادي مهدي عبود والاستاذ الدكتور نعيم من وزارة العلوم والتكنلوجيا لتزويدي بمادة الكيتوسان المستخدمة بالدراسة ، واتقدم بالشكر الى مديرية الزراعة في النجف الاشرف والى مدير مشاتل البستنة والغابات الاستاذ عباس الوائلي والاستاذ اياد سميسم وكذلك اشكر فرع الارشاد الزراعي في منطقة القزوينية واخص بالذكر الاستاذ ناصر مهدي . وعرفانا بالجميل أقدم شكري وامتناني الى الزميل بهاء جودة الخفاجي والزميل احمد كريم عباس لما قدموه لي من عون ولا يفوتني أن أشكر زملائي في الدراسات العُليا في قسم الوقاية وأخص بالذكر أفراح دينار هادي و عفاف أركان عليوي وحوراء رزاق ظاهر مع خالص امنياتي للجميع بالموفقية والنجاح الدائم .

شكري وتقديري الى افراد عائلتي جميعا ...

وفي الختام اتقدم بالشكر والتقدير والامتنان لكل من مد لي يد العون لانجاز هذا البحث.

حوراء

تعهّد إنجاز الطالب عمله البحثي

أتعهّد بان أنجاز هذه الاطروحة **التشخيص والتوصيف الكامل لبعض الفايروسات الممرضة والداخلية لنبات الخيار ومقاومتها باستعمال بعض العوامل الاحيائية وغير الاحيائية** قد تمّ بجهدي وإدراكًا منّي للمسؤولية القانونية ، أصرح بموجب هذا أنني كتبت هذه الأطروحة بنفسي وأن جميع محتويات الأطروحة قد تم الحصول عليها بالوسائل المشروعة.

التوقيع:

إســـم الطالبة : حوراء اسماعيل عباس الياسري

عنوان الاطروحة : التشخيص والتوصيف الكامل لبعض الفايروسات الممرضة والداخلية لنبات الخيار ومقاومتها باستعمال بعض العوامل الاحيائية وغير الاحيائية

مجال الدراسة: امراض نبات / فايروسات

التاريخ : 6 / 4 / 2023

شهادة المشرف العلمي

أقر بان أنجاز هذه الأطروحة الموسومة بـ **التشخيص والتوصيف الكامل لبعض الفايروسات الممرضة والداخلية لنبات الخيار ومقاومتها باستعمال بعض العوامل الاحيائية وغير الاحيائية** التي قدمتها الطالبة حوراء اسماعيل عباس الياسري قد جرى تحت اشرافي في كلية الزراعة / جامعة الكوفة بمراحلها كافة. وهي من متطلبات نيل شهادة الدكتوراه في تخصص امراض النبات/ فايروسات وبناء على ذلك ارشحها للمناقشة..

التوقيع:

إســـم المشرف: أ.د. فضل عبد الحسين خليل الفضل

اللقب العلمي: استاذ

التأريخ:

توصية رئيس القسم

بناء على ترشيح السيد المشرف العلمي وتقرير الخبيرين العلميين أرشح الرسالة للمناقشة .

التوقيع:

الأســـم واللقب العلمي: أكرم علي محمد

رئيس قسم وقاية النبات

التأريخ:

شهادة الخبير اللغوي

اطلعت على الأطروحة الموسومة بعنوان / التشخيص والتوصيف الكامل لبعض الفايروسات الممرضة والداخلية لنبات الخيار ومقاومتها باستعمال بعض العوامل الاحيائية وغير الاحيائية وقد قومتّها لغويًا وأصبحت مؤهلة للمناقشة من الناحية اللغوية .

التوقيع:

إســم الخبير اللغوي: رشا حسين عبد

اللقب العلمي: مدرس مساعد

التخصص العام : اللغة العربية

التخصص الدقيق : لغة

الكلية : التربية الاساسية

التأريخ:

شهادة الخبيرين العلميين

أطلعنا على أطروحة الدكتوراه الموسومة التشخيص والتوصيف الكامل لبعض الفايروسات الممرضة والداخلية لنبات الخيار ومقاومتها باستعمال بعض العوامل الاحيائية وغير الاحيائية وقوُمت علميًا بالتقارير المرفقة ووُجدت مؤهلة للتقديم للمناقشة .

التوقيع:

اسم الخبير العلمي الأول :د. نوفل حسين خضير

اللقب العلمي: استاذ

الكلية: العلوم

الجامعة: الكوفة

التأريخ: / /2023

التوقيع:

اسم الخبير العلمي الثاني :د .نورس عبد الاله صادق

اللقب العلمي: استاذ مساعد

الكلية : العلوم والهندسة الزراعية

الجامعة: بغداد

التأريخ:/ /2023

قرار لجنة المناقشة

استنادا الى محضر مجلس كلية الزراعة المرقم أ . م . س /116 والمنعقد بتاريخ 12/ 2023/3 بشأن تشكيل لجنة مناقشة أطروحة الدكتوراه التشخيص والتوصيف الكامل لبعض الفايروسات الممرضة والداخلية لنبات الخيار ومقاومتها باستعمال بعض العوامل الاحيائية وغير الاحيائية للطالبة حوراء اسماعيل عباس الياسري. نقر نحن رئيس لجنة المناقشة وأعضاءها باننا قد أطلعنا على الأطروحة وناقشنا الطالبة بمحتواها وبما له علاقة بها بتاريخ / /2023 ووجدناها جديرة بالقبول لنيل درجة أطروحة الدكتوراه بتخصص أمراض النبات / فايروسات بتقدير امتياز

رئيس اللجنة
الدكتور معاذ عبد الوهاب عبد العالي
أستاذ
كلية الزراعة / جامعة تكريت
/ / 2023

عضوًا
الدكتور عدنان عبد الجليل لهوف
أستاذ
كلية الزراعة / جامعة الكربلاء
/ / 2023

عضوًا
الدكتور موسى نعمه مزهر
أستاذ
كلية العلوم/جامعة الكوفة
/ / 2023

عضوًا
الدكتور علاء عيدان حسن
أستاذ
كلية الزراعة / جامعة الكوفة
/ / 2023

عضوًا
الدكتور وسام عدنان راضي
أستاذ مساعد
كلية الزراعة / جامعة الكوفة
/ / 2023

عضوًا (المشرف)
الدكتور فضل عبد الحسين خليل
أستاذ
كلية الزراعة / جامعة الكوفة
/ / 2023

مصادقة عميد كلية الزراعة :صُدّقت هذه الاطروحة من قبل مجلس كلية الزراعة - جامعة الكوفة بجلسته المرقمة المنعقد بتاريخ ../../2023

أ.د. علاء عيدان حسن

عميد كلية الزراعة / جامعة الكوفة

/ / 2023

شهـادة الخبيــر الإحصائي

اطلعت علـى الأطروحـة الموسـومة بـ التشـخيص والتوصـيف الكامـل لبعض الفايروسات الممرضة والداخليـة لنبـات الخيـار ومقاومتهـا باسـتعمال بعض العوامـل الاحيائيـة وغيـر الاحيائيـة وقـد قومتّهـا إحصـائياً ووجـدتها صـالحة للمنـاقشة .

التوقيع:

إســـم الخبير الاحصائي:احمد محمد حسين

اللقب العلمي:استاذ مساعد

القسم العلمي:وقاية النبات

الكلية:الزراعة

الجامعة:الكوفة

المستخلص

اجريت هذه الدراسة بهدف التشخيص والتوصيف الجزيئي للفايروسات التي تصيب نباتات الخيار في حقول منطقة الحيدرية في محافظة النجف ، بالإضافة إلى تحديد العناصر الفايروسية الداخلية العكسية الموجودة في جينوم نبات الخيار المصاب و مدى فاعليتها ، واستحثاث المقاومة الجهازية ضد الفايروسات الممرضة ، باستخدام بعض العوامل الإحيائية وغير الإحيائية .

اتضح من خلال استخدام تقنية Next generation sequencing (NGS)، واستعمال برامج المعلوماتية الحياتيةBioinformatics أن أعراض الموزائيك الشديد على نباتات الخيار في حقول الحيدرية ناتجة عن اصابة مشتركة بين فايروس *Tomato leaf curl palmpur virus* و *Squash vein yellowing virus* وسجلت هذه الفايروسات في المركز الوطني لمعلومات التقانة الاحيائية NCBI حيث سجل الفايروس *Squash vein yellowing virus* isolate SqVYV / Iraq تحت رقم ادخال (ON229619) *Tomato leaf curl palampur virus* isolate Babylon1segment DNA-A تحت رقم ادخال ON229618 و *Tomato leaf curl Palampur virus* isolate Babylon1segment DNA- B تحت رقم ادخال ON229620. ومن خلال دراسة التقارب الوراثي تبين أن الفايروس TLCPV كان الأقرب للعزلات الايرانية ، أما الفايروس SqVYV كان الأقرب إلى عزلة الأراضي المحتلة الفلسطينية ، و وجد من خلال رسم الخرائط الوراثية أن فايروس SVYV يشفر بروتين متعدد Polyprotein ، بينما TLCPV DNA-A يشفر6 بروتينات هي (AC1، AC2، AC3 ، AC4، AV1 و AV2) في حين كان TLCPV DNA-B يشفر بروتينين هما (BC1 وBV1) .

كما وجد فايروسين كاملين متداخلين في جينوم نبات خيار مصاب هما CsatAV يحتوي على 7 مناطق تشفر بروتينات (MP ، PTZ00440 ، antiphage-ZorA-4 ، RT-like ، RT-LTR ، RNase- H-2 ، RT- Rnase-HI) وCsatBV يحتوي على 8 مناطق تشفر بروتينات (DUF5864 ، RT-LTR ، RVT-1 ، RT-RnaseH-2 ، RNase-HI ، RNase-HI ، RVT-2) كما تم تاكيد وجود قطعتي RT من فايروسات ToffiV و Caulimovirus-sme .

تبين وجود تغاير بين الحامض النووي DNA الكلي لنبات الخيار المصاب، وآخر سليم من خلال فقد في المنطقة الجينية للجين 23SrRNA أطلق عليها تسمية 23SrRNA Iraq ، و مناطق تغاير شديد في المناطق الجينية rpS16 وYcf2 وسميت rpS16 Iraq وYcf2 Iraq . كما اتضح أن الاصابة الفايروسية أثّرت على التعبير الجيني للجين Ycf2 الا انها لم تؤثر على الجينات الاخرى كل من rpS16 و23SrRNA .

Abstract

أكدت الدراسة أن الفايروس المسبب لأعراض الموزائيك و تجعد الأوراق والتقزم أعطى نسبة اصابة 100% وشدة اصابة 82 % للخيار وكذلك أدت إلى خفض في معايير النمو المقاسة (أطوال المجموعين الجذري والخضري وأوزانهما الجافة بالاضافة إلى المساحة السطحية للورقة) وكذلك خفض شديد في نسبة الكلوروفيل الكلي وعنصري النتروجين والبوتاسيوم ولم تؤثر على عنصر الفسفور ، كما انها قللت من عدد ثمار الخيار ووزنه. وحُسبت نسبة الخسائر الاقتصادية الناتجة عن هذه الاصابة الفايروسية حيث كانت 47.27 – 53.2 % / دونم .

كما تبين أن غمر البذور، أو سقي النباتات ، أو رشها بالبكتريا *Bacillus amyloliquefaciens* ، الميلاتونين ، الكيتوسان منفردة اوالتوليفات المزدوجة لهذه العوامل لها القدرة على استحثاث المقاومة الجهازية لنبات الخيار ضد الاصابة الفايروسية بجعله متحمل للاصابة ، كما أنها أدت إلى تحسين الصفات الظاهرية المقاسة ، و المتمثلة (أطوال المجموعين الجذري والخضري وأوزانهما الجافة ، بالاضافة إلى المساحة السطحية للورقة) والصفات الفسلجية المتمثلة بنسبة الكلوروفيل الكلي ، والعناصر المغذية الكبرى NPK . كما أنها أدت إلى زيادة في أعداد ثمار نباتات الخيار و أوزانها. واتضح أن التوليفات المزدوجة (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الميلاتونين ، بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الكيتوسان ، محلولي الميلاتونين والكيتوسان) أعطت أفضل النتائج في استحثاث المقاومة الجهازية للنباتات من خلال خفضها لنسبة الأصابة وشدتها . كما أنها أعطت أفضل النتائج في تحسن الصفات الظاهرية والصفات الفسلجية وايضا أدت إلى زيادة في أعداد ثمار نباتات الخيار و أوزانها . كما أن استعمال التوليفات أعلاه في مساحة دونم واحد حقق فائدة مالية تراوحت بين (38.4 - 62.6) % .

قائمة المحتويات

تسلسل	الموضوع	الصفحة
.1	**Introdection المقدمة**	1
.2	**Literatures Review استعراض المراجع**	**3**
2.1	الأهمية الاقتصادية للأمراض الفايروسية على القرعيات	3
.2.1.1	فايروس تجعد اوراق الطماطة البلمبوري *Tomato leaf curl palmpur Virus* (TLCPV)	4
.2.1.2	فايروس اصفرار عروق القرع *Squash vien yellowing virus* (SVYV)	6
.2.2	الفايروسات الداخلية العكسية Endogenous Pararetroviruses (EPRVs)	8
.2.3	تأثير الاصابة الفايروسية على فسلجة النبات المصاب Physiology of Virus infected plant	10
.2.4	تأثير الاصابة الفايروسية على البلاستيدات الخضراء Effect of viral infection on chloroplasts	12
2.5	تقنية تسلسل الجيل القادم اوتسلسل الجينوم الكلي Next generation sequencing (NGS) or Whole Genome Sequencing (WGS)	15
2.6	تقنيات المعلوماتية الحياتية : Bioinformatics techniques	17
2.6.1	برنامج المستكشف للتسلسل المتكرر Repeat explorer program	17
2.6.2	برنامج Geneious	18
2.6.3	استحثاث المقاومة الجهازية Induced systemic resistance (ISR)	20
2.7	الميلاتونين Melatonin	22
2.8	الكيتوسان Chitosan	25
2.9	بكتريا *Bacillus amyloliquefaciens*	28
3	**مواد وطرائق العمل Materials and Methods**	**31**
3.1	المواد المستخدمة في العمل	31
3.1.1	الاجهزة والادوات المستخدمة	31

3.1.2	المواد الكيميائية	32
.3.2	طرائق العمل	33
3.2.1	مصدر الفايروس	33
3.2.2	استعمال تقنية التسلسل الكامل للحامض النووي (RNA , DNA) للنباتات المصابة (Next Generation Sequencing ، NGS)	33
3.2.2.1	. تجهيز العينات وارسالها لشركة DNA LINK	33
3.2.2.2	قراءة التسلسل الكلي للاحماض النووية DNA و RNA في عينة نبات خيار مصاب	34
3.2.3	تحليل البيانات بواسطة برامج المعلوماتية الحياتية Bioniformatics	34
3.2.3.1	الاوساط الزرعية المستخدمة لتنمية وحفظ بكتريا *Bacillus amyloliquefaciens*	39
3.2.3.2	الوسط البكتيري المغذي الصلب Nutrient Agar	39
3.2.3.3	الوسط البكتيري المغذي السائل Nutrient Broth	39
3.2.4	وسط البطاطا السائل Potato Sucrose Broth (PSB)	39
3.2.5	تحضير لقاح بكتريا *Bacillus amyloliquefaciens*	39
3.2.6	تحضير محلول الميلاتونين Melatonin	40
3.2.7	تحضير الكيتوسانChitosan	40
3.2.8	اختبارتأثير بين بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول Melatonin ومحلول Chitosan	41
3.2.9	محلول دارئ الاستخلاص الفوسفاتي المبرد	41
3.2.10	العدوى الميكانيكية	41
3.2.11	تعقيم التربة لاستخدامها في التجربة الحقلية	41
3.2.11.1	التجارب الحقلية	42
3.2.11.2	اختبار فاعلية غمر بذور نبات الخيار لمدة 30 دقيقة ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة ضد الاصابة الفايروسية	42
3.2.11.3	اختبار فاعلية سقي نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة ضد الاصابة الفايروسية	43

3.2.12	اختبار فاعلية رش نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة ضد الاصابة الفايروسية	46
3.2.13	تقدير النسبة المئوية للاصابة لنباتات الخيار	48
3.2.14	قياس شدة الاصابة الفايروسية للتجربة ومتابعة الاعراض	49
3.2.15	تقدير مساحة اوراق نباتات التجارب الحقلية باستخدام برنامج Image J	50
3.2.16	تقدير نسبة الكلوروفيل الكلية في أوراق نباتات التجارب الحقلية بعد 14 يوما من ظهور الاعراض الفايروسية	51
3.2.16.1	تقدير نسب محتوى نباتات التجارب الحقلية من العناصر الكبرى NPK بعد 14 يوماً من ظهور الاعراض الفايروسية	51
3.2.16.2	هضم العينات النباتية المراد اختبار نسب العناصر الكبرى NPK فيها بطريقة حامض الكبريتيك مع السيلينيوم	51
3.2.16.3	تقدير النسبة المئوية لعنصر النتروجين N الكلي في اوراق نباتات التجارب الحقلية (بجهاز كلدال Kheldal)	52
3.2.16.4	تقدير النسبة المئوية لعنصر الفسفورP الكلي في اوراق نباتات التجارب الحقلية (بجهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer)	53
3.2.17	تقدير النسبة المئوية لعنصر البوتاسيوم K الكلي في اوراق نباتات التجارب الحقلية (بجهاز اللهب الضوئي FLAME Photometer)	54
3.2.17.1	حساب الربح المتحقق لنتائج المعاملات المطبقة حقليا على محصول الخيار المزروع في مساحة دونم واحد (2500م2)	54
3.2.17.2	حاصل غمر بذور الخيار بالماء فقط لمدة 30 دقيقة قبل الزراعة في مساحة دونم (المقارنة)	55
3.2.17.3	حساب الربح المتحقق لمعاملة غمر بذور نبات الخيار بالتوليفة المزدوجة المتكونة من بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الميلاتونين	55
3.2.17.4	الربح المتحقق لمعاملة سقي نبات الخيار بالماء فقط (مقارنة)	56
3.2.17.5	الربح المتحقق لمعاملة سقي نبات الخيار بالتوليفة المزدوجة المتكونة من بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الميلاتونين	56
3.2.17.6	حساب الربح المتحقق لمعاملة رش نبات الخيار بالماء فقط (مقارنة)	57

57	حساب الربح المتحقق لمعاملة رش نبات الخيار بالتوليفة المزدوجة المتكونة من بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الكيتوسان	3.2.18
58	التحليل الاحصائي للبيانات	3.2.19
59	**Results and Discussion النتائج والمناقشة**	**4**
59	الأعراض المرضية على نبات الخيار المصاب بالفايروسات *Squash vein yellowing virus* isolate SVYV/Iraq و *Tomato leaf curl Palampur virus* isolate Babylon1	4.1
61	تقنية تسلسل الجيل القادم (Next Generation Sequencing ، NGS) للاحماض النووية DNA و RNA لنبات خيار مصاب بالفايروسات *Squash vein yellowing virus* isolate SVYV/Iraq و *Tomato leaf curl Palampur virus* isolate Babylon1	4.2
63	ربط قراءات التسلسلات الخام للأحماض النووية الكاملة RNA، DNA لعينات نبات الخيار المصاب في برنامج Geneious	4.3
64	الكشف عن التسلسلات الكاملة للفايروسات المرضية الموجودة في الجينوم الكامل لنباتات الخيار (DNA , RNA) من خلال برامج المعلوماتية الحياتية	4.3.1
65	الكشف عن التسلسل الكامل لعزلة فايروس اصفرار العروق على القرع *Squash vein yellowing virus* isolate SVYV/Iraq	4.3.2
67	الكشف عن التسلسل الكامل لعزلة فايروس التفاف اوراق الطماطة البلمبوري *Tomato leaf curl Palampur virus* isolate Babylon1 (TLCPV)	4.4
70	الكشف عن الاحماض النووية المتكررة في برنامج Repeat Explorar .	4.5
74	الفايروسات الداخلية العكسية الموجودة في جينوم نباتات الخيارمن خلال برنامج المعلوماتية الحياتية	4.5.1
74	الفايروس الداخلي العكسي CsatAV- Iraq الموجودة في جينوم نباتات الخيار من خلال برنامج Geneious	4.5.2
75	الفايروس الداخلي العكسي CsatBV-Iraq الموجودة في جينوم نباتات الخيارمن خلال برنامج Geneious	4.6
77	عدد النسخ والنسب المئوية وعامل النسخ TPM Transcripts Per Kilobase Million (قياس التعبير الجيني) للفايروسات المرضية والفايروسات الداخلية العكسية	4.7
79	دراسة العلاقة التطورية والاشجار الوراثية Phylogenetic trees للفايروسات المرضية المشخصة في نبات الخيار	4.8

4.9	دراسة العلاقة التطورية والاشجار الوراثية Phylogenetic trees للفايروسات الداخلية المشخصة في نبات الخيار	85
4.10	التغاير الوراثي الحاصل في الجينوم الكامل DNA للبلاستيدات الخضراء في خلية نبات خيار مصابة بالفايروسات *Squash vein yellowing virus* isolate SVYV/Iraq و *Tomato leaf curl Palampur virus* isolate Babylon1	87
4.11	التعبير الجيني لجميع جينات البلاستيدات الخضراء في خلية نبات خيار مصابة بالفايروسات *Squash vein yellowing virus* isolate SVYV/Iraq و *Tomato leaf curl Palampur virus* isolate Babylon1	101
4.12	فاعلية غمر بذور نبات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة ضد الاصابة الفايروسية	106
4.12.1	التغيرات الظاهرية	106
4.12.1.1	فاعلية غمر بذور نبات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة في خفض نسبة وشدة الاصابة الفايروسية	106
4.12.1.2	فاعلية غمر بذور نبات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على معايير النمو الجذري والخضري	108
4.12.1.3	فاعلية غمر بذور نبات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على اعداد ووزن الثمار الكلي لثلاث جنيات	111
.4.12.2	التغيرات الفسلجية	112
.4.12.2.1	فاعلية غمر بذور نبات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على نسبة الكلوروفيل الكلي	112
.4.12.2.2	فاعلية غمر بذور نبات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على نسب العناصر الكبرى NPK في الاوراق	114
4.13	فاعلية سقي نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة ضد الاصابة الفايروسية	119
.4.13.1	التغيرات الظاهرية	119
.4.13.1.1	فاعلية سقي نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة في خفض نسبة وشدة الاصابة الفايروسية	119
.4.13.1.2	فاعلية سقي نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على معايير النمو الجذري والخضري	120

.4.13.1.3	فاعلية سقي نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على اعداد ووزن الثمار الكلي	124
.4.13.2	التغيرات الفسلجية	125
.4.13.2.1	فاعلية سقي نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على نسبة الكلوروفيل الكلي	125
.4.13.2.2	فاعلية سقي نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على نسب العناصرالكبرى NPK في الاوراق	127
.4.14	. اختبار فاعلية رش نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة ضد الاصابة الفايروسية	130
.4.14.1	التغيرات الظاهرية	130
.4.14.1.1	فاعلية رش نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة في خفض نسبة وشدة الاصابة الفايروسية	130
.4.14.1.2	فاعلية رش نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على معاييير النمو الجذري والخضري	131
.4.14.1.3	فاعلية رش نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على اعداد ووزن الثمار	135
.4.14.2	التغيرات الفسلجية	136
.4.14.2.1	فاعلية رش نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على نسبة الكلوروفيل الكلي	136
.4.14.2.2	فاعلية رش نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على نسب العناصر الكبرى NPK في الاوراق	138
.4.15	الخسائر الاقتصادية لمحصول الخيار المصاب بالفايروس *Squash vein yellowing virus* isolate SVYV/Iraq في الزراعة المكشوفة لمساحة دونم واحد	141
4.16	الربح الصافي المتحقق من استعمال افضل المعاملات على محصول الخيار المصاب بالفايروس *Squash vein yellowing virus* isolate SVYV/Iraq في الزراعة المكشوفة لمساحة دونم واحد	142
4.17	تأثيرنوع المعاملات على أوزان ثمار الخيار لنباتات سليمة وأخرى مصابة بالفايروس *Squash vein yellowing virus* isolate SVYV/Iraq.	143
.5	**الاستنتاجات والتوصيات**	**144**

	Conclusions and Recommendations	
144	Conclusions الاستنتاجات	.5.1
146	Recommendations التوصيات	.5.2
147	**Reference المصادر**	**6**

قائمة الجداول

الصفحة	**الموضوع**	**تسلسل**
31	**Materials and Methods مواد وطرائق العمل**	**3**
31	الاجهزة و الادوات المستخدمة في البحث	3.1
32	المواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة	3.2
32	البرامج المستخدمة في الدراسة	3.3
49	دليل تطور الاعراض للنباتات الملقحة بمستخلص نبات خيار ظاهرة عليه اعراض الموزائيك الشديد	
59	**Results and Discussion النتائج والمناقشة**	**4**
61	قراءة جهاز Nanodrop للأحماض النووية DNA و RNA لنبات الخيار المصاب بالفايروسات *Squash vein yellowing virus* isolate SVYV/Iraq و *Tomato leaf curl Palampur virus* isolate Babylon1	4.1
78	عدد النسخ والنسب المئوية وعامل النسخ (قياس التعبير الجيني) للفايروسات المرضية والفايروسات الداخلية العكسية	4.2
88	مواقع التغاير والحذف في اربع اصناف واثنين من الهجن لنبات خيار سليم مقارنة بنبات خيار مصاب بالفايروسات *Tomato leaf curl Palampur virus* isolate Babylon1 و *Squash vein yellowing virus* isolate SVYV/Iraq	4.3
88	التسلسلات المتغايرة والمحذوفة في جينات اربع اصناف واثنين من هجن نبات خيار سليم مقارنة بنبات خيار مصاب بالفايروسات *Tomato leaf curl Palampur virus* isolate Babylon1 و *Squash vein yellowing virus* isolate SVYV/Iraq	4.4
110	فاعلية غمر بذور نبات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على معايير النمو الجذري والخضري.	.4.5

112	فاعلية غمر بذور نبات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على عدد ووزن الثمار الكلي لثلاث جنيات .	.4.6
116	فاعلية غمر بذور نبات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على نسب العناصر الكبرى NPK في الاوراق	.4.7
123	فاعلية سقي نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة معايير النمو الجذري والخضري.	4.8
125	فاعلية سقي نبات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على عدد ووزن الثمار الكلي لثلاث جنيات	4.9
128	فاعلية سقي نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على نسب العناصر الكبرى NPK في الاوراق.	4.10
134	فاعلية رش نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على معاييير النمو الجذري والخضري	.4.11
136	فاعلية رش نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على اعداد ووزن الثمار التجميعي	4.12
139	فاعلية رش نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على نسب العناصر الكبرى NPK في الاوراق	4.13
141	الخسائر الاقتصادية الناتجة عن الاصابة بالفايروسات *Squash vein yellowing virus* isolate SVYV/Iraq لمحصول الخيار لمساحة دونم واحد	4.14
142	الربح الصافي المتحقق من استعمال افضل المعاملات خليط من البكتريا *B. amyloliquefaciens* وmelatonin في الزراعة المكشوفة لمساحة دونم واحد	.4.15
143	تأثيرنوع المعاملات على أوزان ثمار الخيار لنباتات سليمة وأخرى مصابة بالفايروس *Squash vein yellowing virus* isolate SVYV/Iraq.	4.16

قائمة الاشكال

التسلسل	الموضوع	الصفحة
.2	**استعراض المراجع Literatures Review**	**3**
2.1	جسيمة الفايرون التوأمية لجنس *Begomoviruses*	5
2.2	جسيمة فايروس *Squash Vein Yellowing Virus*	7
2.3	التركيب الكيميائي للميلاتونين	22
2.4	التركيب الكيميائي للكيتوسان	25
3	**مواد وطرائق العمل Materials and Methods**	**31**
3.1	ا التعامل مع البيانات وتحليلها بواسطة برامج المعلوماتية الحياتية Bionformatics للكشف عن الفايروسات الداخلية في جينوم نبات الخيار المصاب .	37
3.2	التعامل مع البيانات وتحليلها بواسطة منصة Geneious prime للحصول على التسلسلات الكاملة المراد الاستعلام عنها و توصيفها.	38
3.3	واجهة برنامج Image J	50
.4	**النتائج والمناقشة Results and Discussion**	**59**
4.1	الأعراض المرضية على نباتات خيار مصاب باصابة مشتركة بين فايروسات *Squash vein yellowing virus* isolate SVYV/Iraq و *Tomato leaf curl Palampur virus* isolate Babylon1 حيث أن الدائرة تشير إلى أعراض الموزائيك والتجعد.	59
4.2	A- الترحيل الكهربائي للحامض النووي DNA لنبات الخيار المصاب حيث ان:L هو Ladder ، C هو Control (المقارنة القياسية للشركة الفاحصة) و DNA CD : نبات الخيار . B- السهم يشير الى حزم RNA لنبات الخيار المصاب بعد ترحيلهاعلى هلام الاكاروز اما علامة الصح فتشير الى المنحنيات وعددها ثمانية والتي تمثل انواع RNA ومدى تركيزها في العينة والممثلة لحزم الحامض النووي RNA في جهاز Bioanalyzer .	62
4.3	الخريطة الوراثية لفايروس اصفرار عروق القرع العزلة العراقية *Squash Vein Yellowing Virus* isolate SVYV/Iraq	65
4.4	الخريطة الوراثية المرسومة في برنامج Geneious لفايروس تجعد اوراق الطماطة البلمبوري *Tomato leaf curl Palampur virus* isolate Babylon1 حيث ان A – تمثل قطعة DNA-A للفايروس والتي تحتوي على ست جينات ، B- تمثل قطعة	69

	DNA-B للفايروس والتي تحتوي على جينين	
71	تقرير HTML report الذي يظهر التسلسل الكامل لفايروس TLCPV بعد تحليل القراءات الخام للحامض النووي DNA في برنامج مستكشف التسلسلات المتكررة Repeat Explorar في رقم تجمع 6 و بطول 2753 زوج قاعدة الذي يمثل TLCPV DNA-A و تجمع 4 وبطول 2719 الذي يمثل TLCPV DNA-B	4.5
72	تقرير HTLM report في برنامج المستكشف Repeat Explorar الذي يظهر وجود الفايروسات الداخلية في جينوم نبات الخيار.	4.6
74	الخريطة الوراثية للفايروس الداخلي في جينوم نبات الخيار CsatAV-Iraq	4.7
75	الخريطة الوراثية للفايروس الداخلي في جينوم نبات الخيار CsatBV-Iraq	4.8
80	الشجرة الوراثية لعزلة فايروس اصفرار عروق القرع *Squash vein yellowing virus* isolate SVYV/Iraq مع 14 عزلة فايروسية حيث تمثل الارقام الموجودة درجة التقارب بين هذه العزلات	4.9
82	الشجرة الوراثية لعزلة تجعد اوراق الطماطة البالمبوي *Tomato leaf curl Palampur virus* isolate Babylon1 segment DNA-A (باللون الاحمر) مع 20 عزلة فايروسية حيث تمثل الارقام الموجودة درجة التقارب بين هذه العزلات والعزلة خارج المجموعة متمثلة بالفايروس Caulifower Mosaic Virus	4.10
83	الشجرة الوراثية لعزلة تجعد اوراق الطماطة البالمبوي *Tomato leaf curl Palampur virus* isolate Babylon1 segment DNA-B (باللون الاحمر) مع 16عزلة فايروسية حيث تمثل الارقام الموجودة درجة التقارب بين هذه العزلات والعزلة خارج المجموعة متمثلة بالفايروس Caulifower Mosaic Virus	4.11
86	الشجرة الوراثية للفايروسين الداخليين CsatAV-Iraq و (CsatBV-Iraq باللون الاحمر) مع 32 فايروس داخلي من جنس *Florendovirus* حيث تمثل الارقام الموجودة درجة التقارب بين هذه الفايروسات والفايروس خارج المجموعة *Caulifower Mosaic Virus*	4.12
89	الخريطة الوراثية لجينوم بلاستيدة نبات خيار *Cucumis sativas* صنف Superina (Nickerson Zwaan Holland) مصاب بالفايروسات *Squash vein yellowing virus* isolate SVYV/Iraq و *Tomato leaf curl Palampur virus* isolate Babylon1	4.13
90	التطابق Pairwise Identity بين جينومات بلاستيدات التسلسلات المرجعية لبعض اصناف الخيار السليم مع تسلسل جينوم بلاستيدات نبات مصاب بالفايروسات *Squash Vein Yellowing Virus* و *Tomato leaf curl Palampur virus* حيث ان منطقة rps16 Iraq هي منطقة التغاير الاولى الواقعة ضمن الجين rps16، علما ان (1)	4.14

	يمثل جينوم البلاستيدات الخضراء لصنف خيار المصاب ، اما (2) فتمثل جينومات البلاستيدات الخضراء لبعض اصناف الخيار	
91	التطابق Pairwise Identity بين جينومات بلاستيدات التسلسلات المرجعية لبعض اصناف الخيار السليم مع تسلسل جينوم بلاستيدات نبات مصاب بالفايروسات *Squash Vein Yellowing Virus* و *Tomato leaf curl Palampur virus* حيث ان منطقة Ycf2 gene Iraq هي منطقة التغاير الثانية الواقعة ضمن الجين Ycf2 gene ، علما ان (1) يمثل جينوم البلاستيدات الخضراء لصنف خيار المصاب ، و (2) فتمثل جينومات البلاستيدات الخضراء لبعض اصناف الخيار	4.15
92	التطابق Pairwise Identity بين جينومات بلاستيدات التسلسلات المرجعية لبعض اصناف الخيار السليم مع تسلسل جينوم بلاستيدات نبات مصاب بالفايروسات *Squash Vein Yellowing Virus* و *Tomato leaf curl Palampur virus* حيث ان منطقة 23SrRNA gene Iraq هي منطقة التغاير الثالثة الواقعة ضمن الجين23SrRNA والمنطقة الجينية المحذوفة 23 SrRNA gene Iraq علما ان (1) يمثل جينوم البلاستيدات الخضراء لصنف خيار المصاب ، (2) فتمثل جينومات البلاستيدات الخضراء لبعض اصناف الخيار	4.16
94	نسبة تطابق Pairwise Identity جينومات بلاستيدات التسلسلات المرجعية لبعض اصناف الخيار السليم مع بعضها في برنامج Geneious للمنطقةالجينية rps16 Iraq الواقعة ضمن الجين rps16.	4.17
95	نسبة تطابق Pairwise Identity جينومات بلاستيدات التسلسلات المرجعية لبعض اصناف الخيار السليم مع بعضها في برنامج Geneious للمنطقةالجينية Ycf2 gene Iraq الواقعة ضمن الجين Ycf2 gene	4.18
96	نسبة تطابق Pairwise Identity جينومات بلاستيدات التسلسلات المرجعية لبعض اصناف الخيار السليم مع بعضها في برنامج Geneious للمنطقةالجينية 23 SrRNA gene Iraq الواقعة ضمن الجين 23SrRNA والمنطقة الجينية S rRNA gene Iraq 23	4.19
98	نسب تطابق Pairwise Identity ومناطق الحذف بين جينومات بلاستيدات التسلسلات المرجعية لهجن خيار سليم مع تسلسل جينوم بلاستيدات نبات مصاب بالفايروسات *Squash Vein Yellowing Virus* و *Tomato leaf curl Palampur virus* وجينومات بلاستيدات بعض اصناف خيار سليم حيث ان : A) التطابق في المنطقة الجينة rps16 Iraq بين هجينين خيار سلم . B) التطابق في المنطقة الجينة 23SrRNA . علما ان 1) تمثل جينوم صنف الخيار المصاب . 2) تمثل هجن الخيار السليم	4.20
99	نسب تطابق Pairwise Identity ومناطق الحذف بين جينومات بلاستيدات التسلسلات المرجعية لهجن خيار سليم مع تسلسل جينوم بلاستيدات نبات مصاب بالفايروسات	4.21

	حيث *Squash Vein Yellowing Virus* و *Tomato leaf curl Palampur virus* ان : A) التطابق في المنطقة الجينة Ycf2 Iraq. B) التطابق في المنطقة الجينة 23SrRNA . علما ان 1) تمثل جينوم صنف الخيار المصاب 2) تمثل هجن الخيار السليم	
4.22	مقدار الضرر الحاصل على اجزاء من الجينوم الكامل DNA البلاستيدة الخضراء في نبات خيار نتيجة الاصابة بالفايروسات *Squash vein yellowing virus* isolate SVYV/Iraq و *Tomato leaf curl Palampur virus* isolate Babylon1وتأثيره على التعبير الجيني من خلال التطابق Pairwise alignment في برنامج Genious علما ان (1) جينوم الحامض النووي DNA للبلاستيدات الخضراء لصنف خيار المصاب ، (2) جينوم الحامض النووي RNA للبلاستيدات الخضراء لصنف خيار مصاب	103
4.23	فاعلية غمر بذور نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة في خفض نسبة وشدة الاصابة الفايروسية	107
4.24	فاعلية غمر بذور نبات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على نسبة الكلوروفيل الكلي (ملغم .100غم $^{-1}$)	114
4.25	فاعلية سقي نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة في خفض نسبة وشدة الاصابة الفايروسية.	120
4.26	فاعلية سقي نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على نسبة الكلوروفيل الكلي في الاوراق	126
4.27	فاعلية رش نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة في خفض نسبة وشدة الاصابة الفايروسية	131
4.28	فاعلية رش نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على نسبة الكلوروفيل الكلي	137

قائمة المختصرات

التسلسل	المختصر	التفاصيل
1	AMV	*Alfalfa mosaic virus*
2	B. a	*B. amyloliquefaciens*
3	BSMV	*Barley stripe mosaic virus*
4	Bp	Base pair

Basic Local Alignment Search Tool	BLAST	5
Bean yellow mosaic virus	BYMV	6
Cetyl Trimethyl ammonium Bromide	CTAB	7
Chitosan	Chi	8
chloroplast DNA	cpDNA	9
Chloroplast ferredoxin I	Fd	10
Colony-Forming Unit	CFU	11
Cota Protein	CP	12
Cucumber mosaic virus	CMV	13
Deoxyribo Nucleic Acid	DNA	14
DNA Complementary	cDNA	15
DNA Data Bank of Japan	DDBJ	16
double-distilled water	ddH2O	17
Endogenous pararetroviruses	EPRVs	18
Ethylene Diamine Tetra Acetic acid	EDTA	19
European Molecular Biology Laboratory	EMBL	20
Fig mosaic virus	FMV	21
glycine decarboxylase	GDC	22
Gram	Gm	23
Growth Promting Rhizobacteria	PGPR	24
potential of Hydrogen	pH	25
Indole Acetic Acid	IAA	26
Induced Systemmic Resistance	ISR	27
Italian ringspot virus	IRSV	28
Melatoninn	Mel	29
Melon necrotic spot virus	MNSV	30
Micro liter	µL	31

mitochondrial DNA	mtDNA	32
National Center for Biotechnology Information	NCBI	33
Next generation sequencing	NGS	34
nuclear ribosomal DNA	nrDNA	35
Nutrient Agar	NA	36
Open reading frames	ORFs	37
Plasmodesmata	PD	38
Polymerase Chain Reaction	PCR	39
Polyvinylpyrrolidone	PVP	40
Post Entry Quarantine	PEQ	41
Potato Dextrose Broth	P.D.A.	42
Potato virus y	PVY	43
Randomized Complete Block Design	RCBD	44
Reactive oxygen species	ROS	45
Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction	RT-PCR	46
Ribo Nucleic Acid	RNA	47
Squash leaf curl virus	SLCuV	48
Squash mosaic virus	SMV	49
Systemic Acquired Resistance	SAR	51
Tomato leaf curl Palampur virus	ToLCPMV	52
Tomato mosaic virus	TMV	53
Tomato spotted wilt virus	TSWV	54
Tris borate EDTA	TBE	55
Tris EDTA Buffer	TEB	56
Zucchini yellow mosaic virus	ZYMV	57

الفصل الاول

المقدمة Introduction

1. المقدمة Introduction

يعد محصول الخيار(*Cucumis sativus* L.) من أهم نباتات العائلة القرعية في العراق ، التي تتوفر ثمارها في الأسواق على مدار السنة ، وتزرع زراعة مكشوفة او مغطاة . بلغت المساحة المزروعة لهذا المحصول في العراق 69502 دونم في عام 2019 ويعادل انتاجها 149302 طن وبغلة مقدارها 2152.3 كغم /دونم (الجهاز المركزي الاحصائي ، 2019) .

تصاب القرعيات في العراق ومنها نبات الخيار بالعديد من الآفات منها الحشرات والمسببات الممرضة التي تسبب اضراراً اقتصادية تُؤثر على الإنتاج كماً ، ونوعاً ، قد تصل الخسائر في الحاصل الى% 100 في بعض الآفات اعتمادا على الظروف البيئية والصنف المزروع (صادق واخرون ، 2021 ؛ Hernandez و اخرون ،2021) . وقد توسعت زراعتها بشكل كبير بسبب الزيادة السكانية والطلب المتزايد عليها مما نتج عنهُ انتشاراً للأوبئة والآفات الفايروسية ، التي سببت أمراضاً وبائية في كثير من بلدان العالم مما نتج عنها خسائر كبيرة أثرت على اقتصاد تلك البلدان (صادق واخرون ، 2021 ؛ Lopez واخرون 2022).

ومن أهم الأمراض الفايروسية على نباتات الخيار في العالم ، التي يكون مداها العائلي واسع هي موزائيك الخيار , *Cucumber mosaic* ، الاصفرار الكاذب على البنجر *Beet pseudo-yellows*، اصفرار عروق الخيار , *Cucumber vein-yellowing* ، الاصفرار على القرعيات المنقول بالمن , *Cucurbit aphid-borne yellows* ، الاختلال الأصفر والضمور على القرعيات *Disorder cucurbit yellow stunting* مجموعة فايروس الموزائيك الذهبي على الفاصولياء , Begomoviruses ،التبقع المتنخر على البطيخ *Melon necrotic spot* ، مجموعة فايروسات واي البطاطا ,Potyviruses ، اصفرار العروق على القرع ,*Squash vein-yellowing* , مجموعة فايروس موزائيك التبغ Tobamoviruses , موزائيك القرع Squash Mosaic ، مجموعة فايروس الذبول المبقع على الطماطه Tospoviruses ، فايروس تجعد القمة في البنجر Beet curly top و مجموعة فايروسات متعددة الأوجه المنقولة بالنيماتودا Nepoviruses (صادق واخرون ، 2021 ؛ Jailani واخرون ،2021). كما تم الكشف مؤخرا عن قدرة بعض الفايروسات النباتية على تداخل حامضها النووي وارتباطه مع الحامض النووي للعائل ، التي أطلق عليها تسمية الفايروسات الداخلية العكسية Endogenous pararetroviruses (EPRVs) وهذه الفايروسات تحت ظروف الاجهاد ممكن أن تحدث اصابة للعائل الموجودة فيه ، وهنا يكون حدوث الاصابة من داخل النبات وليس من خارجه ,وبتطور العلوم والتقنيات الخاصة بمعرفة التسلسل النيوكليوتيدي أصبح بالإمكان الكشف

عن هذه الفايروسات ومعرفة مواقعها في جينوم العائل وهذه التقنية هي تسلسل الجيل القادم Next generation sequencing NGS) (2019, Alisawi) . ومن أكثر الأجناس فاعلية في تداخلها مع الجينوم النباتي هي , *Soymovirus, Petuvirus, Badnavirus Caulimovirus* , *Florendovirus* (Diop واخرون , 2018) .هناك العديد من العوامل التي تجعل النباتات مقاومة مثل امتلاكها وسائل تثبط ، أو تقلل من أضرار الاصابة بالممرضات في الظروف البيئية الملائمة لحدوث تلك الاصابات وهذه تعرف بالمقاومة الجهازية المستحثة Induced Systemic Resistance (ISR)، ومن هذه الوسائل الوقائية هي الوسائل الدفاعية المستحثة induced defence (شريف , 2012)

وقد استعملت بعض أنواع بكتريا Plant Growth Promoting Rhizobacteria PGPR)) لتحفيز المقاومة حيث وجد عند استعمال الاجناس البكتيرية *Pseudomonas fluorescens*، *Bacillus subtilis* و *Azotobacter chroococcum* بشكل مفرد وخليط أدى إلى استحثاث المقاومة الجهازية ضد فيروس CMV وكذلك حسّن من مؤشرات نمو نبات الخيار كما خفض نسبة الاصابة وشدتها (الياسري , 2016 ؛ الفضل,2017) .

نظراً لأهمية الأمراض الفايروسية ، ولعدم وجود دراسة سابقة عن التغايرات الحاصلة في جينومات البلاستيدات نتيجة الاصابة ولقلة الدراسات عن الفايروسات الداخلية الموجودة في جينوم النباتات ، فقد هدفت هذه الدراسة الى مقاومة بعض الفايروسات المسببة لأمراض نباتات الخيار باستخدام بعض العوامل الإحيائية وغير الإحيائية المحفزة للمقاومة ، ومعرفة المسببات الممرضة التي تصيب نباتات الخيار في حقول الحيدرية ، بالإضافة الى معرفة فاعلية العناصر الفايروسية الداخلية داخل الخلية المصابة و دورها في نسبة الاصابة وشدتها باستعمال تقنية NGS لذا شملت الدراسة المحاور الآتية :

1- الكشف عن وتشخيص وتوصيف السلالات الفايروسية المرضية في نبات الخيار.
2- تشخيص الفايروسات الداخلية الموجودة في جينوم نبات الخيار و مدى فاعليتها .
3- الكشف عن التغييرات الوراثية الحاصلة في جينوم البلاستيدات الخضراء لنبات خيار مصاب وتعد هذه الدراسة الأُولى في العالم إذ لم نجد دراسات سابقة مشابهة.
4- معرفة تأثير استعمال البكتريا *Bacillus amyloliquefaciens* و مادتي الميلاتونين Melatonin والكيتوسان Chitosan بشكل مفرد وتوليفاتهما المزدوجة في استحثاث المقاومة لنبات الخيار ضد الاصابة الفايروسية.
5- تحديد الخريطة الوراثية ومحتويات الجزء غير المشفر من جينوم نبات الخيار .

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literature Review

2. مـراجـــعة المـصـــادر Literatures Review

2.1. الأهمية الاقتصادية للأمراض الفايروسية على القرعيات :

تتصف فايروسات القرعيات بمداها العوائلي الواسع ، وأن أكثرها تنقل عن طريق مجموعة متنوعة من النواقل وتصيب المحاصيل في جميع أنحاء العالم. عشرون من هذه الفايروسات تسبب أوبئة شديدة ، مما يؤدي في بعض الأحيان إلى إصابة المحاصيل بنسب كبيرة ، وإحداث ضرر كبيرفيها ، مما يؤدي إلى التسبب بخسائر اقتصادية كبيرة على محاصيل القرعيات وغيرها من العوائل النباتية (Lecoq و Katis ، 2014).

أنّ تنوع سلالات فايروسات القرعيات ، وتعدد طرائق نقلها ، والمدى العائلي الواسع لها ، جعل الأعراض التي تظهرها على عوائلها مهمة اقتصادياً (مكوك واخرون 2008) . وتختلف الأعراض التي تسببها تلك الفايروسات باختلاف العائل النباتي ، وسلالة الفايروس ، وهي مابين أعراض بقع موضعية ، أو تنخر وموزائيك وتبرقش واصفرار، وقد يحدث تشوه في الأوراق والثمار . كما تسبب الاصابة بهذا الفايروس تقزم السلاميات وقصرها وصغر في حجم الأوراق إلى النصف ، و قلة في عدد الازهار والثمار. كما أن بعضها يسبب فشل في عقد الثمار . (مكوك واخرون 2008؛ الياسري واخرون 2016) . إن هذه الأعراض تؤدي إلى ضعف نمو المحصول المصاب وقلة انتاجيته ورداءة نوعيته ، حيث أن اصابة الثمار وتشوهها والتأثير على كمية الانتاج ونوعيتهِ تزيد من كونها مهمة اقتصادياً

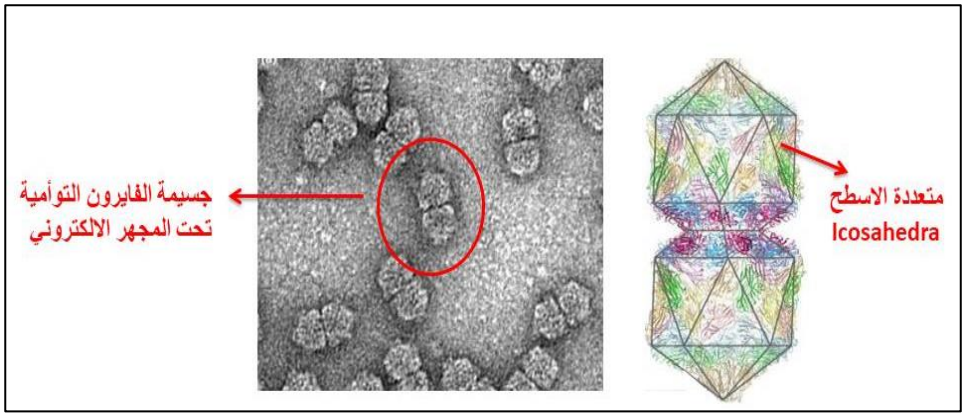
يوجد هناك العديد من الفايروسات التي تؤدي الى خسائر كبيرة منها فايروس الموزائيك الأصفر على الكوسا *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) هو أحد الفايروسات المهمة على القرعيات ويسبب أضرار جسيمة ، وبنسبة اصابة عالية ، حيث تشمل الأعراض التي يظهرها هذا الفايروس على الشجر (الكوسا) الموزائيك الذي يشتد بتقدم المرض ، وصغر المساحة السطحية للأوراق وأعناق الأوراق . أما الأعراض على نبات الخيار فتكون بشكل موزائيك ، وتقزم النبات ، في حين تكون الأعراض على البطيخ بشكل بقع جهازية صفراء تتحول بتقدم الاصابة إلى موزائيك ويتوقف نمو النبات كما تظهر بثور خضراء داكنة في الأوراق الحديثة وتشوه الأوراق والثمار وصغر حجمها(Kaldis واخرون ، 2018) .

و من فايروسات القرعيات أيضاً فايروس موزائيك الخيار *Cucumber mosaic virus* إذ أن لهذا الفايروس مدى عائلي واسع ، وتتباين أعراضه من نبات لآخر وتكون الأعراض بشكل عام موزائيك ، وتقزم وتشوه الأوراق كما تظهر الأعراض على الثمار بشكل موزائيك أصفر يبدأ من قاعدة الثمرة ثم يتشر إلى بقية الثمرة وبتقدم نضج الثمرة تصبح ذات لون أخضر باهت وقد تظهر عليها بروزات باللون الأخضر كما تسبب غالبا تشوه الثمار . (مكوك واخرون 2008 ؛ الياسري واخرون 2016) . كما أن فايروس (CMV) ينتج عنهُ خسائر في غلة المحاصيل مع أضرار اقتصادية خطيرة (Sofy واخرون ، 2020).

كما يعد مرض تجعد أوراق قرع الكوسا أحد أكثر الأمراض الفايروسيةً التي تسبب اضرارا على القرعيات في أنحاء العالم كافة . و في العراق وجد أن انتشار مرض تجعد أوراق القرع على محصول قرع الكوسا في مناطق زراعته ناتج عن الاصابة المشتركة لفايروسين هما فايروس تجعد أوراق الطماطة البلامبوري (ToLCPMV) *Tomato leaf curl Palampur virus* وفايروس تجعد أوراق القرع (SLCuV) *Squash leaf curl virus* . كما أن استعمال الأصناف المقاومة في العراق لا تجدي نفعا عند العدوى بالإصابة المختلطة (المساري واخرون ،2020) .

2.1.1. فايروس تجعد اوراق الطماطة البلمبوري *Tomato leaf curl Palmpur virus* (TLCPV) :

يعود فايروس تجعد أوراق الطماطة البلمبوري TLCPV وحسب اللجنة الدولية لتصنيف الفيروسات ICTV لعام 2021 إلى عائلة *Geminiviridae* ، جنس*Begomovirus* وهي فايروسات صغيرة غير مغلفة ذات حامض نووي من نوع single strand DNA احادي الشريط حلقي ، وتكون جسيمة الفايرون الكاملة توأمية متعددة الأسطح Icosahedra ذات ابعاد 22 × 38 نانومتر وطبقة بروتين واحدة كما في الشكل (1.2) (Fiallo-Olivé واخرون ،2021 ؛ Dhkal واخرون ، 2022) .



شكل (2.1) جسيمة الفايرون التوأمية لجنس *Begomovirus* (Fiallo-Olivé واخرون ،2021)

يتكون الجينوم من قطعتين من الحامض النووي الاولى هي DNA-A ويبلغ عدد النيوكليوتيدات فيها 2756 نيوكليوتيدة . أما القطعة الثانية DNA-B فيبلغ عدد النيوكليوتيدات فيها 2719 نيوكليوتيدة (Kulshreshtha واخرون ، 2019 ؛ Shafiq واخرون ، 2019 ؛ Materatski واخرون ،2021) .

إن القطعةDNA-A تحتوي على ست جينات هي AC1، AC2، AC3 ، AC4، AV1 و AV2 وهذه الجينات مسؤولة عن بداية حدوث الاصابة من خلال تفاعل بروتين الفايروس المنتج مع بروتين العائل ، وأيضاً عن تضاعف الفايروس ، واسكات جينات العائل وضراوة الفايروس وحركته الجهازية ، في حين أن القطعة DNA-B تحتوي على جينين فقط هما BC1 مسؤولة عن انتاج بروتين الحركة الفايروسية من خلية لأُخرى و BV1 مسؤول عن حركة الفايروس من وإلى داخل نواة العائل (Kulshreshtha واخرون ،2019 ؛ Roshan واخرون ،2020 ؛ Fiallo-Olivé واخرون،2021)

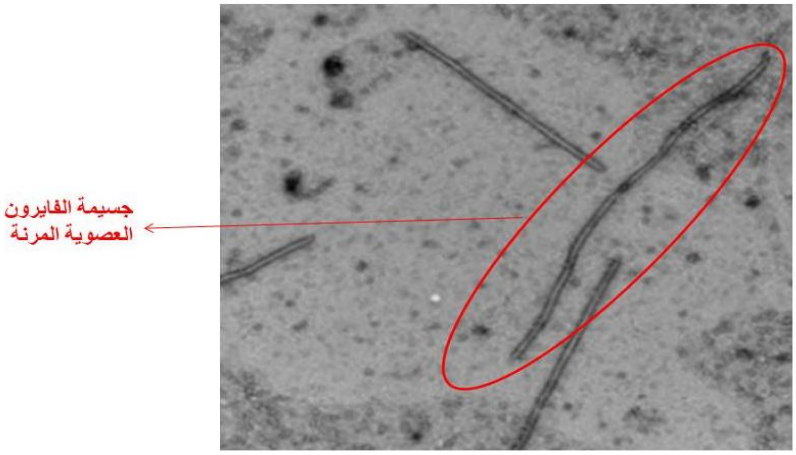
ينتقل هذا الفايروس عن طريق الذبابة البيضاء *Bemisia tabaci* وهو أحد فيروسات *Begomovirus* التي تصيب النباتات ذوات الفلقة الواحدة ، وذوات الفلقتين و تسبب أمراضاً وخيمة ، وخسائر كبيرة في مختلف المحاصيل في جميع أنحاء العالم . وتسهم في انعدام الأمن الغذائي في البلدأن النامية ، ممّا شكلت تهديدا خطيرا لزراعة القرعيات ومن بينها نباتات الخياروالبطيخ في آسيا ، وأمريكا الشمالية والجنوبية ، وأفريقيا ، وأوروبا خلال العقود الثلاثة الماضية بالإضافة إلى القرعيات ، فهو يصيب نباتات الطماطة والفلفل والباذنجأن (Hanley-Bowdoin واخرون 2013 ؛Abkhoo و Mehraban ، 2020 ؛ Fiallo-Olivé واخرون ،2021 ؛ Ramazani واخرون ،2022 ؛ Kumari واخرون ،2022 ؛ Dhkal واخرون ،

2022) . وكذلك يصيب الادغال *Chenopodium sp* و *Heliotropium europaeum* ، يسبب فايروس TLCPV وباءً مدمراً على محاصيل الخيار ، والبطيخ ، وقرع الكوسا ، حيث كانت نسب الاصابة به تتراوح من 50 - 100 ٪ ويحدث المرض في البيوت البلاستيكية والأنفاق البلاستيكية و المزارع المفتوحة . إن انتشاره السريع أدى إلى ظهور تهديد جديد خطير للإنتاج الزراعي في جميع أنحاء الشرق الأوسط.(Heydarnejad واخرون ، 2013)

تمثلت الأعراض بشكل عام بتجعد الأوراق و الموزائيك الخفيف بشكل بقع خضراء غير منتظمة متبادلة مع بقع صفراء ، والتفاف الأوراق للأسفل ، وأيضاً تشوه البراعم ، والثمار، وضعف النمو ثم توقفه ، وصغر حجم الأوراق و اصفرار شديد، وتخطط نخري . تختلف هذه الأعراض باختلاف النوع النباتي ، و الصنف النباتي والعزلة الفايروسية (Sabouri و Heydar Nezhad ،2013 ؛ Dhkal واخرون (a) ،2020 ؛ Dhkal و اخرون (b) ،2020 ؛ Hanamasagar واخرون ، 2021 ؛ Venkataravanappa واخرون 2021 ؛ Kumari واخرون ،2022) .

2.1.2. فايروس اصفرار عروق القرع *Squash vien yellowing virus* (SVYV)

اكتشف فايروس اصفرار عروق القرع لأول مرة في فلوريدا Florida في الولايات المتحدة في عام 2003 (Hernandez واخرون ، 2021) .صنفت اللجنة الدولية لتصنيف الفيروسات ICTV لعام 2022 هذا الفايروس إلى عائلة *Potyviridae* جنس *Ipomovirus* و يتصف الفايروس بكون الجسيمة الفايروسية عصوية مرنة flexible filamentous بطول 840 نانومتر تقريبا كما في الشكل (2.2) ويكون حامضها النووي من النوع الرايبي موجب مفرد الشريط $ssRNA^+$ والوزن الجزيئي لبروتين الغطاء البروتيني يتراوح بين 41–35 كيلو دالتون وعدد النيوكليوتيدات الكلي بلغ 9836 نيوكليوتيدة يحتوي على اطار قراءة مفتوح واحد يشفر بروتين متعدد polyprotein (Adkins واخرون ، 2007 ؛ Li واخرون ،2008 ؛ Inoue-Nagata و اخرون ،2022) .



شكل (2.2) جسيمة فايروس *Squash Vein Yellowing Virus* (Adkins واخرون، 2007).

يتم نقل الفايروس عن طريق الذبابة البيضاء *Bemisia tabaci* بالطريقة غير الباقية non-persistent manner كما أنه ينقل ميكانيكيا وبالتطعيم (Inoue-Nagata و اخرون ،2022) . أن الاصابة بفايروس اصفرار عروق القرع SqVYV تؤثر على تفضيل ، واستقرار ، و وضع البيض للذبابة البيضاء وقد عزيّ سبب ذلك إلى التغيير الحاصل في لون النباتات المصابة (Shrestha واخرون 2019) . كما كان التطور من البيضة إلى البالغة أقصر بمقدار 3 أيام على نباتات القرع المصابة بالعدوى وعاشت الإناث أطول بنسبة 25٪ ولديهن خصوبة أعلى في نباتات القرع المصابة (Shrestha واخرون 2017) .

وجد أن الحشرة الذبابة البيضاء *Bemisia tabaci* تنجذب إلى النباتات المصابة بالفايروسات ، حيث أن الاصابة الفايروسية تزيد من ارتفاع نسبة الاحماض الامينية الحرة في العائل النباتي مما يؤدي إلى حدوث إصابة مشتركة (Guo واخرون ،2019).

اقتصر المدى العائلي على الأنواع في عائلة القرعيات Cucurbitaceae (في القرع والبطيخ)، واستبعدت الأنواع في عائلات *Amaranthaceae* و *Apocynaceae* و *Asteraceae* و *Chenopodiaceae* و *Fabaceae* و *Malvaceae* و *Solanaceae* (Adkins واخرون ،2007) ،وجد أنه يصيب بعض الأدغال مثل *Momordica charantia L* و *Cucumis melo var. dudaim (*L.*) Naud* (Shrestha واخرون ،2016)

كانت الأعراض على القرع بشكل موزائيك ، وتجعد الأوراق وشحوبها واصفرار عروقها (Hernandez واخرون ، 2021) . أما على البطيخ فكانت الأعراض بشكل ذبول جهازي وأصفرارٍ للأوراق مع نخر على الأوراق والسيقأن . في بعض الحالات الشديدة تؤدي إلى موت النبات ، وكذلك يحصل تدهور قشرة البطيخ ، وتعفن داخلها ، مما يؤدي إلى ثمار غير قابلة للتسويق (Webster واخرون ،2010 ؛ Reingold واخرون،2016) .

2.2. الفايروسات الداخلية العكسية (EPRVs) Endogenous Pararetroviruses :

إن التقدم في تقنية معرفة التسلسل النيوكليوتيدي الكامل للنبات العائل Next generation sequencing (NGS) و ظهور الاصابة الفايروسية على النبات بظروف الاجهاد من دون حدوث اصابة خارجية أدّى إلى اكتشاف الفايروسات الداخلية العكسية Endogenous pararetroviruses EPRVs في النباتات (Alisawi ، 2019) .

إن الفايروسات الداخلية العكسية (EPRVs) هي عبارة عن احماض نووية مزدوجة الشريط تعود إلى عائلة فايروس موزائيك القرنابيط *Caulimoviridae* ، وهي من فايروسات الاستنساخ العكسي ، تكون مدمجة داخل جينوم العائل النباتي ، التي يفترض أنها نشأت منذ 1.6 مليار سنة (Schmidt واخرون ، 2021 ؛ Richert-Pöggeler واخرون ،2021)
معظم هذه الفايروسات غير معدية بسبب التجزئة ، واعادة الترتيب تفتقر إلى جين متكامل وقد يحدث التكامل من خلال انزيمات اعادة تركيب العائل وآلية اصلاح الحامض النووي ، كما أنّ نسخ قليلة من الجينومات الفايروسية تحوي اطارات قراءة مفتوحة سليمة نسبيا Open reading frames (ORFs) ، التي من المحتمل أن تكون قادرة على اعادة التركيب ، مما يؤدي إلى تجديد فايروس قادرعلى احداث الاصابة (Schmidt واخرون 2021) .

إن أجناس هذه الفايروسات المشخصة هي (*Caulimovirus* ,*Soymovirus* *Cavemovirus* *Solendovirus* , *Petuvirus* , *Badnavirus*, *Rosadnavirus*, *Tungroviru* و*Florendovirus* ويعد *Florendovirus* الجنس الأكثر وجوداً في المملكة النباتية (Geering و Hull ، 2012 ؛ Diop واخرون ، 2018).
يقوم الجينوم النباتي من خلال عامل اسكات الجين Gene silencing للسيطرة على بعض هذه الفايروسات، وابطال قدرتها على احداث العدوى، بحيث لا يستطيع التحرر من مواقعه ، ويبقى ساكناً كجزء طبيعي من جينوم العائل ، وينقل عبر الاجيال ، وهذه تعرف بالوراثة اللاجينية (Schmidt واخرون 2021) .

تميل الفايروسات الداخلية العكسية إلى الاختباء في المناطق غير المتجانسة في جينوم العائل، التي ربما تعمل على استقرارها من خلال آليات الوراثة اللاجينية، ومن ثم الحد من شدة الضرر، والسماح بالاحتفاظ بها على المدى الطويل في الجينوم (Schmidt واخرون 2021) .

أما البعض الآخر فلا يخضع لهذا العامل نتيجة لارتباطه الضعيف بجينوم العائل وكونه غير مستقر Unstable وتقوم عوامل الاجهاد بكسر سكون هذه الفايروسات، واعادة تنشيط هذه التسلسلات الفايروسية من خلال الاستنساخ العكسي Reverse transcription ، وتتحول من الـ DNA إلى mRNA ثم إلى DNA مرة اخرى وتقوم بتشكيل جسيمات فايروسية كاملة بعد تكوينها للغلاف البروتيني واعادة التركيب ومن ثمّ تكوين فايروسات غالبا ما تكون مرتبطة بامراض مدمرة. لم يعرف لحد الآن ما إذا كان لهذه الوحدات دور في مساندة أو تضاد الاصابات الفايروسية التي تقوم بها فايروسات من العائلة نفسها أو من مجموعة RNA (Geering واخرون ،2014 ؛ Alisawi ، 2019).

ومن الفايروسات الداخلية المسجلة ، التي أعادت فاعليتها باحداث الاصابةعلى النباتات هي :

- فايروس شفافية عروق البيتونيا *Petunia vein clearing virus* من جنس *Petuvirus*
- فايروس تخطط الموز *Banana streak virus* من جنس *Badnavirus* .
- فايروس شفافية عروق التبغ *Tobacco vein clearing virus* من جنس *Soymovirus* (Geering واخرون ،2014 ؛ Alisawi ، 2019).
- في العراق مؤخرا وجد أن الفايروس الداخلي في نبات التين *Fig badnavirus-1* يشترك مع فايروس FMV في احداث الإصابة المرضية (زغير واخرون ، 2021).

كما تم الكشف عن وجود بعض الفايروسات الداخلية العكسية في بعض النباتات حيث تم الكشف عن الفايروس الداخلي EPRVs *Lyc* من جنس *Caulimovirus* في جينوم نبات الطماطة وكذلك كشف عن وجود فايروسين داخليين يعودان إلى جنسي *Caulimovirus* و*Florendovirus* (العابدي واخرون ، 2021 ؛ الخفاجي واخرون ، 2022) و الفايروس الداخلي *Tobacco vein clearing viru* من جنس *Soymovirus* في جينوم نبات الطماطة (Abass و Lahuf , 2023) وايضا الفايروس الداخلي *Caulimovirus-VUn* من جنس *Caulimovirus* في نبات اللوبيا(عباس ، 2023).

تحتوي الفايروسات الداخلية العكسية على مناطق بروتينية مشفرة من ضمنها منطقتين موجودة في كل الفايروسات الداخلية العكسية وهما RT و المسؤول عن عملية الاستنساخ العكسي من RNA إلى cDNA من خلال انزيم الاستنساخ العكسي Reverse Transcriptase والمنطقة البروتينية RnaseH المسؤولة عن تضاعف الحامض النووي DNA للفايروس الداخلي ونسخه بأعداد كثيرة ومنع تكوين أشرطة RNA (الخفاجي ،2022).

2.3. تـأثير الاصـابة الفايروسـية علـى فسـلجة النبـات المصـاب Physiology of Virus infected plant :

التفاعل بين النبات والفايروس يؤدي إلى تغييرات كبيرة في فسلجة النبات مما يؤثر على أدائه فتنعكس بشكل تغيرات ظاهرية على أجزاء النبات المختلفة قد تكون هذه التغيرات المرضية كثيرة ، وشديدة على عوائلها التي تصيبها مثل الإصابة بالاصفرار أو النخر أو تبقع الأوراق أو التشوه الشديد ، على الرغم من أن الفايروسات لا تحتوي على أية أنزيمات ، سموم أو مواد أخرى تعد مساهمة في الإمراضية Pathogenicity ، مع ذلك يمكن القول أن الحامض النووي الفايروسي (RNA , DNA) هو العنصر الوحيد المسبب للمرض . ولكن مجرد وجود الحامض النووي الفايروسي ، أو الفايروس الكامل في النبات وحتى بتراكيز عالية لا يعد سبباً كافياً لظهور الأعراض المرضية ، إذ أن بعض الفايروسات قد تتواجد في النباتات بتراكيز عالية تعطي أعراض مرضية أقل حدة من أخرى موجودة في النباتات بتراكيز قليلة (قاسم ،2011 ؛ شريف ، 2011 ؛ Ertunc ، 2020 ؛ الفضل ، 2021 ؛ Mofunanya واخرون ، 2021) .

وهذا يدل على أن الأعراض المرضية الفايروسية على النبات لا ترجع بالأساس إلى استنزاف العناصر الغذائية التي حرفت باتجاه تخليق الفايروس ذاته فقط ، ولكن إلى تأثيرات أخرى للفايروس أكثر تأثيراً على أيض العائل . إن هذه التأثيرات ربما تأتي عن طريق تحفيز الفايروس للعائل على تخليق بروتينات جديدة تكون بعضها مواد فعالة بيولوجياً (انزيمات ، هرمونات ، سموم ... الخ) يمكن أن تتعارض مع الأيض الطبيعي للعائل (قاسم ، 2011؛ شريف ، 2011؛ الفضل ، 2021 ؛ Biju واخرون ، 2022) .

يمكن تلخيص أهم التأثيرات الفسلجية التي يحدثها الفايروس في عائله النباتي عند تحقيقه للإصابة بما يأتي :

1. تؤثر الاصابة الفايروسية بشكل عام على أيض النبات الأولي ، والثانوي مما يؤدي إلى ظهور الأعراض المرضية قد تصل إلى موت النبات او أجزاء منه .
2. تؤثر الاصابة الفايروسية على عملية التنفس ، ففي بداية الاصابة ممكن أن يزداد التنفس وثم ينخفض بشكل كبيرعند تقدم الاصابة .
3. يؤثر على انزيمات الاكسدة مثل إنزيمات بيروكسيداز peroxidase (POD) و بوليفينول أوكسيديز polyphenol oxidase (PPO).
4. خفض في محتوى الكلوروفيل مما يؤدي إلى تقليل التمثيل الضوئي في الخلايا ، وكذلك الزيادة في الكروتين و الاكزانثول ، مما يؤدي إلى ظهور أعراض التغيرات اللونية كالاصفرار و الموزائيك .

5. تؤثر الاصابة الفايروسية على ايض الكاربوهيدرات ، حيث تزداد الكاربوهيدرات القابلة للذوبان في حال الاصابة ببعض الفايروسات تتجمع في الأوراق المصابة لقلة استعمال الأوراق لها وكذلك عدم انتقالها إلى الاجزاء الأخرى ؛ بسبب حدوث ضرر في اللحاء من خلال انسداد الانابيب المنخلية sieve tube مما يؤدي إلى ظهور أعراض التجعد والالتفاف بالإضافة إلى سمك الورقة.

6. تؤثر الاصابة الفايروسية على عملية النتح ، حيث يحدث خلل في التوازن المائي عند الاصابة الفايروسية إذ يقل محتوى الماء النسبي relative water content (RWC) مما يؤدي أعراض الذبول أو تيبس الأوراق .

7. تسبب الاصابة الفايروسية خللاً في أيض الهرمونات النباتية ، مثلاً : تنخفض مستويات الأوكسين Auxin بشكل كبير في النباتات المصابة بالفيروس ، الذي يتحكم في العديد من جوانب تكوين الأعضاء النباتية ،وتطورها ، ونموها ، مما يؤدي إلى أعراض ضعف النمو ، والتقزم ، وصغر حجم الأوراق ، والثمار، وحدوث التشوهات .

8. تؤثر الاصابة على الاحماض النووية الخلوية والرايبوسومات ، حيث أنها تؤثر على تخليق rRNA لخلايا العائل ، وهذا التأثير يتباين باختلاف الفايروس وسلالاته ، ووقت الاصابة ، ونوع العائل ، ونوع النسيج المصاب ، كما وجد أن كمية RNA الفايروس المخلقة تساوي كمية RNA الخلية المدمر بسبب الاصابة . لم يثبت تاثير الحامض النووي الفايروسي على DNA العائل رغم وجود هكذا احتمال ولغاية انجاز هذه الدراسة.

9. التأثير على الاحماض الأمينية من خلال زيادة في بعض الاحماض الأمينية مثل الجلوتامين Glutamine والاسبارجين Asparagine وظهور حامض الببيبيكولك Pipecolic ومن ثمّ تغير نوع البروتينات ، وتراكيزها في النبات المصاب ، كما تحصل زيادة في الأحماض الأمينية الحرة ، التي تجذب الحشرات الناقلة للفايروسات مثل الذبابة والمن .

10. نقص في عنصر النتروجين : تستهلك الفايروسات35-60 % من النتروجين الموجود في النبات المصاب ، وعلى الرغم من نقصه في النبات إلا أن الفايروس يسيطر على العمليات الحيوية في الخلية ومن خلال التحلل المائي لبروتينات العائل يحصل على النتروجين لبناء نفسه وتضاعفه .

11. يعد الفسفور مكون أساسي في كل الفايروسات ولا يعرف مصدر الفسفور الفايروسي إلا أن بعض التجارب أكدت حصول زيادة في كمية الفسفور الفايروسي مع انخفاض في كمية الفسفور غير الذائب في الخلايا .

(قاسم ،2011؛ شريف ، 2011 ؛ Guo واخرون ،2019 ؛ Ertunc ، 2020 ؛ Mofunanya واخرون ، 2021 ؛ Müllender واخرون ،2021 ؛ الفضل ، 2021 ؛ Biju واخرون ، 2022)

2.4. تـأثير الاصـابة الفايروسـية علـى البلاسـتيدات الخضـراء Effect of viral infection on chloroplasts :

تعد البلاستيدات الخضراء واحدة من أكثر العضيات ديناميكية في الخلية النباتية، إذ يكون لها عدة وظائف مهمة في الخلية ، مثل : عملية البناء الضوئي ، كما تقوم بتجميع الهرمونات النباتية الرئيسة ، وتلعب دوراً فعالاً في الاستجابة الدفاعية ، كما لها دور مهم للإشارات بين العضيات المختلفة ومن ناحية أخرى ، تعد الفايروسات استراتيجيات تعالج فيها البيئة الداخلية للخلية المضيفة. إذ تتعرض البلاستيدات الخضراء ، وهي هدف رئيسي للفايروسات ، لأضرار هيكلية ، ووظيفية هائلة في أثناء العدوى الفايروسية ، حيث أنها تؤثر على معدل تركيب البناء الضوئي للنباتات المصابة مما يؤدي إلى ظهور أعراض الاصفرار، والموزائيك على الأوراق ، مع انخفاض تركيز الكلوروفيل فيها ومن ثمَّ تنخفض الكاربوهيدرات ، كما يصاحب تضاعف الفايروس استهلاك المواد النتروجينية ،التي تدخل في صنع الاحماض الأمينية ، والقواعد النتروجينية ، التي تدخل في تكوين الحامض النووي للفايروس (شريف ، 2012 ؛ Bhattacharyya وChakraborty ،2018).

ومن الاضرار المباشرة التي تسببها الفايروسات على البلاستيدات الخضراء كما ذكرها (Zhao واخرون ، 2016 ؛ Bhattacharyya وChakraborty ،2018) :

1. تغير الفايروسات التركيب الحيوي للدهون والافراط في التعبير عن بروتينات ربط الدهون .
2. تؤثر العدوى الفايروسية على ايونات الكالسيوم Ca^{2+} وبالتالي قد يؤثر ذلك على الخصائص الكيميائية الاحيائية لبروتينات المستشعر synaptotagmin (SYTA) التي تشبه Ca^{2+} ، التي بدورها تساعد المكون الفايروسي على التحرك من خلال (Plasmodesmata PD) للحركة من خلية إلى خلية) .
3. تحبس البروتينات الفايروسية العديد من البروتينات الموضعية بالبلاستيدات الخضراء في العصارة الخلوية.
4. مظهر غير طبيعي للبلاستيدات الخضراء ، مثل منتفخة أو كروية، تكسر غشاء البلاستيدات الخضراء - النتوءات المقيدة أو البلاستيدات الخضراء على شكل الأميبويد (نوع من الامتدادات الأنبوبية الديناميكية من البلاستيدات الخضراء).
5. انخفاض أعداد البلاستيدات الخضراء وتجميعها في مناطق من دون أخرى في النبات
6. تغير الهياكل الخارجية غير المنتظمة للغشاء مثل الحويصلة المحيطية .
7. تغييرات المحتوى داخل البلاستيدات الخضراء مثل الحويصلات الصغيرة أو الفجوات ، الكيس الغشائي الكبير ، حبيبات النشا العديدة و / أو المتضخمة .

8. إن العدوى الفايروسية تؤثر على مستويات التعبير عن الجينات المرتبطة بالبلاستيدات الخضراء (Chaturvedi واخرون ، 2016) .

تستغل الفايروسات بنية الغلاف المزدوج للبلاستيدات الخضراء للانتشار داخل الخلية النباتية من خلال احتواء غلاف الفايروس بروتين مضمن مطابق للببتيد العابر لبروتينات البلاستيدات الخضراء مما يساعد الفايروس على العبور والانتقال . على الرغم من أن البلاستيدات الخضراء تعاني من نقص في آلية إسكات الجينات ، إلا أنها تثير الاستجابة المناعية ، التي يثيرها المستجيب ضد مسببات الأمراض الفايروسية. إذ تتفاعل المنتجات الجينية لفايروسات مختلفة مع بروتينات البلاستيدات الخضراء المختلفة داخل العضية أو السايتوبلازم ، وتثير استجابة الدفاع كما تسبب عدوى الفايروس في تحريض / تراكم محسّن للقنوات الأنبوبية ، التي تشارك في كل من الانتشار الفايروسي والدفاع المضاد للفايروسات حيث يتم نقل إشارة رجعية شديدة الحساسية بوساطة الاستجابة من البلاستيدات الخضراء إلى النواة، وأيضا من خلال بروتين تحديد المواقع للبلاستيدات الخضراء ، تتحرك الفايروسات داخل الخلايا وبينها ، وكذلك يحدث الموت الخلوي المبرمج من خلال التفاعل مع الغلاف الفايروسي لإسكات الجينات ، تتداخل بروتينات البلاستيدات الخضراء مع آلية الدفاع المضاد للفايروس (Bhattacharyya و Chakraborty ، 2018).

تحدث الاصابة الفايروسية تدمير في صفائح الكرانا ، مما يؤدي إلى انخفاض مستويات صبغات البناء الضوئي أو انزيم Ribulose-1،5-bisphosphate carboxylase-Oxygenase (rubisco) (الذي يشارك في الخطوة الأولى لتثبيت الكاربون ، التي يتم من خلالها تحويل ثاني أوكسيد الكاربون في الغلاف الجوي إلى جزيئات غنية بالطاقة مثل الجلوكوز داخل الكائنات التي تقوم بعملية البناء الضوئي) ، وأيضا انخفاض في سرعة التفاعل الكيموضوئي (الذي يشطر جزيئات الماء إلى اوكسجين حر) ، أو يحدث انخفاض في كميات البروتينات المتخصصة التي ترتبط بجزيئات النظام الضوئي (قاسم ، 2011) .

أدت عدوى فايروس موزائيك الخيار (CMV) على المدى الطويل إلى انخفاض معدلات التمثيل الضوئي والتنفس ، كما ظهرت هذه النتائج أن اضطراب التمثيل الضوئي ، ونقل الإلكترون التنفسي بواسطة CMV أثر أيضًا على الأنظمة المضادة للأكسدة ، مما أدّى إلى الإجهاد التأكسدي في العضيات المختلفة (Song واخرون ، 2009) ، التفاعل بين الغلاف البروتيني لـ CMV و Fd I Chloroplast ferredoxin I هو المحدد الأساسي لظهور أعراض الموزائيك في التبغ (Qiu واخرون ، 2018) كما أن عدوى فايروس موزائيك الشعير الشريطي *Barley stripe mosaic virus* (BSMV) تحفز الإجهاد التأكسدي للبلاستيدات الخضراء (Wang واخرون ،2021).

إن الخلية المصابة بفايروس TMV تحتوي بلاستيدات خضراء أكبر ب (20٪) من خلية نبات سليم و أن الخلايا المصابة بفايروس ZYMV اصغر(19%) و كلاهما يحتوي على عدد أقل من البلاستيدات الخضراء (Zechmann واخرون ، 2021) .

حدوث تشوهات في البلاستيدات الخضراء لخلايا نبات بنجر السكر المصاب بفايروس موزائيك الخيار على شكل غلاف مكسور من البلاستيدات الخضراء مع وجود العديد من كريات النشا الطويلة، كما كشفت المقاطع الرقيقة للغاية ، وجود جسيمات بلورية في البلاستيدات الخضراء ، كما للاصابة تأثيرات خطيرة تقلل من وظائف البلاستيدات الخضراء في نباتات بنجر السكر ، التي قد تضر بعملية التمثيل الضوئي (Mokbel واخرون ، 2020).

2.5. تقنية تسلسل الجيل القادم اوتسلسل الجينوم الكلي Next generation sequencing (NGS) or Whole Genome Sequencing (WGS) :

يتم اعتماد تقنية تسلسل الجيل القادم (NGS) على نطاق واسع ، وهي طريقة لمعرفة التسلسل لملايين الأجزاء من الحامض النووي ،كما لها قدرة على تحليل عدة جينات أو مناطق جينية باستعمال اختبار واحد مقارنة بالطرائق التقليدية ،وايضا للجينوم بأكمله ، فقد تطور استعمال NGS كما هو الحال مع أية تقنية جديدة (Yohe واخرون ، 2017) . حيث أتاح ظهور تسلسل الجيل القادم (NGS) تحديد الطفرات ورسم خرائط لها بسهولة في مدة قصيرة ، وبتكلفة منخفضة نسبيًا . يعد تحديد الطفرات الجينية والجينات التي تكمن وراء التغيرات المظهرية أمرًا ضرورياً ، لفهم مجموعة واسعة من الوظائف الاحيائية. كما أن لها اهمية بتسهيل اساليب تحرير الجينوم ، واحداث الطفرات للعديد من المحاصيل المهمة جعلت تقنيات NGS إجراءات رسم الخرائط ، والتسلسل أكثر جدوى وأصبحت أداة أساسية لعلماء وراثة المحاصيل لتحديد وتوصيف الاختلافات الجينية المرتبطة بالسمات المهمة اقتصاديًا. فقد تم تطوير العديد من الأساليب الجينية المتقدمة عالية الإنتاجية والقائمة على NGS وتطبيقها في محاصيل مختلفة. كما انها ساعدت في تحديد الاختلافات الوظيفية التي تحدث في الجينات (Sahu واخرون ، 2020) .

أن الفايروسات تسبب خسائر كبيرة في غلة ، وجودة المحاصيل المختلفة ، ومن ثمّ فأن الكشف عن الفايروسات ، وتشخيصها هو أمر ضروري ؛ لتحسين انتاج المحاصيل وله أهمية كبيرة فيما يتعلق بالأمن الغذائي العالمي . على الرغم من أن اعتماد التقنيات الجزيئية مثل RT-PCR قد زاد من سرعة تشخيص الفايروسات ودقته ، لكنها تسمح فقط باكتشاف الفايروسات المعروفة ، التي يحددها الباحث اعتمادا على الأعراض . لذلك ، لا يمكن كشف الفايروسات غير المعروفة وتشخيصها ، وأيضا هذه الاختبارات تكون بطيئة ومكلفة ، ولذلك تم تطوير طرائق للكشف عن فايروسات متعددة في آنٍ واحدٍ من هذه الطرائق هي NGS ، التي تعتمد على استخلاص الجينوم الكامل ، فأصبح الأن محورًا رئيساً في هذا المجال ؛ لأن هذه التقنية لا تسمح بالتحيز والفرضيات. وايضا تم تطوير بروتوكولات NGS القادرة على تشخيص العديد من الفايروسات المعروفة وغير المعروفة الموجودة في النباتات المصابة ، فربما تكون أعراض الأمراض غائبة أو غير محددة أو تسببها فايروسات متعددة ومن خلال هذه التقنية تم اكتشاف فايروسات جديدة لم تكن معروفة سابقا هي فايروسات *Cytorhabdovirus* (Jones واخرون ، 2017 ؛ Pecman واخرون ، 2017 ؛ Raza و Shahid، 2020) .

تتصف هذه التقنية بالحصول على تشخيص سريع وغير مكلف وموثوق به لأي عدوى فايروسية معينة ومن ثمّ معرفة طريقة مكافحة هذه العوامل الممرضة في كل مكان والسيطرة عليها. أحدثت

التطورات الأخيرة في تقنيات تسلسل الجيل التالي NGS والمعلوماتية الاحيائية تغييرًا جذريًا في البحث عن مسببات الأمراض الفايروسية وتشخيصها (Massart واخرون ، 2014) .

إن لعمليات التشخيص الحديثة ، وتطور هذه التقنيات دورا مهما في الحجر الزراعي في استراليا ، يلعب الحجر الصحي بعد الدخول Post Entry Quarantine (PEQ) دورًا مهماً في المعركة ضد دخول فايروسات وسلالات نباتية جديدة إلى أستراليا. تم اعتراض أكثر من 150 نوع من مسببات الأمراض النباتية الغريبة بما في ذلك عدد من مسببات الأمراض فايروسية المهمة مثل (*Plum pox virus*, *Grapevine fan leaf nepovirus*, *Citrus tristeza virus*). وهذا يسلط الضوء على أهمية ضمأن اختبار أفضل التطورات العلمية والتشخيصية وتقييمها وتنفيذها باستمرار في أثناء تطورها (Raza و Shahid ، 2020 ؛ Whattam واخرون ، 2021) ، من المهم أن نفهم علم الجينوم الفايروسي فأن تقدم تقنيات NGS أنسب منصة للتسلسل السريع لفايروسات النبات ، مما يكون لدينا فهم أفضل لتضاعف الفايروسات ومسببات الأمراض. من ناحية أخرى ، تلعب قواعد البيانات الاحيائية الأولية ، مثل بنك الجينات GenBank وبنك بيانات DNA الياباني DNA Data Bank of Japan (DDBJ) والمختبر الأوروبي للبيولوجيا الجزيئية European Molecular Biology Laboratory (EMBL) دورًا مهمًا في استرداد البيانات وتحليلها. (Raza وShahid ، 2020). أما في العراق فقد استخدمت تقنية NGS لأول مرة على نبات الطماطة سنة 2021 لتحديد التسلسل النيوكليوتيدي الكامل لفايروس TYLCV (العابدي واخرون ، 2021) ، وكذلك تم معرفة التسلسل الكامل للعزلة العراقية لفايروس موزائيك التين *Fig mosaic emaravirus* (FMEV)(زغير واخرون ، 2021) كما شخص فايروس موزائيك وتبرقش وتشوه ثمار الباذنجأن (*Eggplant mild leaf mottle virus* (EMLMV) الخفاجي واخرون ، 2022) .

2.6. تقنيات المعلوماتية الحياتية Bioinformatics techniques :

المعلوماتية الاحيائية هي فرع جديد من فروع العلوم ، الذي يتعامل مع استحواذ ، وتخزين ، وتحليل ونشر البيانات الاحيائية بمساعدة علوم الكمبيوتر وتكنولوجيا المعلومات. فهي قادرة على تحليل كمية هائلة من البيانات الاحيائية بسرعة وفاعلية من حيث التكلفة . في العقود الماضية ، تم إنشاء معلومات تسلسل هائلة بسبب التقدم في تقنيات تسلسل الحامض النووي والبروتين. أصبح من الضروري تقدير أوجه التشابه بين التسلسلات الاحيائية للحصول على معلومات مخفية موجودة داخل التسلسل ولتتبع العلاقة التطورية الموجودة داخل التسلسلات (Samal واخرون ،2021).

2.6.1. برنامج المستكشف للتسلسل المتكرر Repeat explorer program:

يشكل الحامض النووي المتكرر أجزاء كبيرة من الجينومات النووية النباتية والحيوانية ، ومع ذلك فإنه يظل أقل مكونات الجينوم تميزًا في معظم الأنواع التي تمت دراستها حتى الأن (Novák واخرون ، 2013). يعد برنامج RepeatExplorer الذي يحوي مجموعة من الأدوات البرمجية للتحليل الخطي لمحتويات الحامض النووي المتكررمن ضمن بيانات تسلسل الجيل القادم ، فهو يكشف عن التكرارات الترادفية المرتبطة بالعناصر ، وأيضًا للكشف عن عائلات التكرارات الترادفية المشتتة ، التي يمكن الوصول إليها عبر واجهة الانترنيت web . ويتم فيه استعمال خوارزمية تجميع التسلسل المستند إلى الرسم البياني ، وأن هذه الخوارزمية تسهل تحديد التكرار في أي جينوم ، باستعمال كميات صغيرة نسبيًا من قراءات التسلسل القصير، فهو مثالي لتحليل قراءات تسلسل الجيل القادم NGS(Novák واخرون ، 2013 ؛ Silva واخرون ،2019 ؛ Vitalesواخرون 2020 ؛ العابدي واخرون .2021) .

كما تتوفر فيه أدوات إضافية للمساعدة في اجراء شرح توضيحي للعناصر، و في تصنيف التكرارات المحددة ، وتحديد التكررارات الترادفية كما استعمل كمصدر معلومات لاستنتاج العلاقات التطورية بين الأصناف وإجراء تحليل مقارن للتكرارات للنوع الواحد ، وكذلك بين الأنواع المتعددة. يسمح الخادم بتحليل عدة ملايين من قراءات التسلسل ، مما يؤدي عادةً إلى تحديد معظم عمليات تكرار النسخ العالية ، والمتوسطة في جينومات النبات. كما أنّه يكشف عن جميع Sat DNAs لنوع معين من الكائنات ، الذي يعد من بين أكثر DNA تكرارا الموجود في جينومات حقيقيات النوى ، حيث أنها تشارك في مجموعة متنوعة من الأدوار البايولوجية ، من

كونها مكونات لبناء كروموسومات مهمة إلى تنظيم الجينات. (Novák واخرون ، 2013 ؛ KtsSilva واخرون ،2019 ؛ Vitalesواخرون 2020 ؛ Novák واخرون ،2020) .

وأيضا يمكن أن يكشف عن تسلسلات الاحماض النووية الفايروسية الموجودة في قراءات تسلسلات النبات الكلية لنبات مصاب ، وكذلك يكشف عن الفايروسات الداخلية الموجودة في الجينوم النباتي (العابدي واخرون ،2021).

2.6.2. منصة Geneious:

إن منصة Geneious هو أحد وأكثر المنصات الرائدة ، وغير المجانية في المعلوماتية الحياتية . فهو قاعدة بيانات متخصصة ، و أداة بحث قوية يحتوي حزمة من البرامج ، وأدوات تحليل التسلسلات و يبسط تحليلات النشوء والتطور كما يمكن من خلاله تحديد DNA البلاستيدات الخضراء chloroplast DNA (cpDNA) والحامض النووي الرايبوسومي النووي nuclear ribosomal DNA (nrDNA) والحامض النووي للميتوكوندريا mitochondrial DNA (mtDNA) (Ripma واخرون ،2014).

يستخدم البرنامج لدمج القراءات الأمامية والعكسية للقراءات الخام Raw reads حيث تتراصف القراءات الامامية مع القراءات العكسية المطابقة لها ، وتجرى هذه العملية قبل البدء بتشخيص هوية التسلسلات بالبرامج الأخرى لاحقا (العابدي ، 2021؛ زغير، 2021 والخفاجي ، 2022)

يحوي على Map to reference وهي أداة تربط قراءات التسلسلات غير المعروفة ، وتطابقها مع قراءات التسلسلات المعروفة ، وبذلك يمكن معرفة أوجه التشابه بينها وبين التسلسل المرجعي ، كما أن هذه الأداة تقدم النتائج بشكل تقرير تحدد فيه النسبة المئوية للتسلسل المشخص للحامض النووي الكلي ، وأيضا عدد النسخ لهذا التسلسل ، كما يمكن من خلاله رسم الشجرة الوراثية للكائن المشخص (العابدي واخرون ،2021 ؛ الخفاجي ، 2022).

من تقنيات المعلوماتية الحياتية Bioinformatics الأخرى هي (NCBI) National Center for Biotechnology Information وهو المركز الوطني لمعلومات التكنلوجيا الاحيائية في الولايات المتحدة الامريكية يوفر مجموعة كبيرة من موارد المعلومات والبيانات الاحيائية لدعم البحوث في جميع أنحاء العالم ، بما في ذلك قاعدة بيانات تسلسل الحامض النووي بنك الجينات GenBank و Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (العابدي واخرون ، 2021 ؛ Sayers واخرون .2021) .

إن (BLAST) هو عبارة عن برنامج عبر الإنترنت وهو من الأدوات الأساسية لأبحاث علوم الحياة ، فمن خلاله يمكن إجراء مقارنة التسلسلات الأولية (تسلسل الأحماض الأمينية للبروتينات أو النيوكليوتيدات في تسلسل الحامض النووي DNA و / أو الحامض النووي الريبي RNA) مع تسلسل قاعدة البيانات وبحسب الدلالة الاحصائية (العابدي واخرون ، 2021 ؛ Samal واخرون ، 2021). يحتوي هذا البرنامج خمسة أنواع يتم تمييزها بناءً على نوع التسلسل (نيوكليوتيدات أو البروتين) :

1- BLASTn : يقارن بين تسلسل النيوكليوتيدات المراد معرفته بقاعدة بيانات تسلسل النيوكليوتيدات.
2- BLASTp : يقارن بين تسلسل بروتيني مراد معرفته بقاعدة بيانات تسلسل بروتين.
3- BLASTx : يقارن بين تسلسل النيوكليوتيدات يراد معرفة البروتين المتنج منه بقاعدة بيانات تسلسل البروتين .
4- tBLASTn : يقارن تسلسل بروتيني مراد معرفة التسلسل النيوكليوتيدات المنتج له بقاعدة بيانات تسلسل النيوكليوتيدات .
5- tBLASTx : يقارن تسلسل النيوكليوتيدات المراد معرفتها بقاعدة بيانات تسلسل النيوكليوتيدات

كذلك يستعمل لاستخراج المعلومات المخفية الموجودة في التسلسلات الإحيائية. كما أنها تستخدم لتحديد الميزات المختلفة مثل التنبؤ بالبنية ثلاثية الأبعاد لجزيئات البروتين ، ودراسة التفاعلات الجزيئية ، واستخراج المعلومات المفيدة من البيانات الاحيائية.وذلك لأن تسلسل البروتين يتم الحفاظ عليه أكثر من تسلسل النيوكليوتيدات ، فأن برامج BLAST تنتج نتائج أكثر موثوقية ، ودقة عند التعامل مع ترميز الحامض النووي (Samal واخرون ،2021).

2.7. استحثاث المقاومة الجهازية Induced systemic resistance (ISR) :

يعد الجهاز المناعي عملية مهمة لبقاء النبات ، إذ طورت النباتات استجابات للتعامل مع الضغوط اللاأحيائية ، مثل : نقص العناصر . وكذلك مع الضغوط الأحيائية التي تسببها العوامل الاحيائية ، مثل : مسببات الأمراض والحشرات. تقتصر بعض هذه الاستجابات على المنطقة المصابة ، أو تنتشر بشكل منتظم بعيدًا عن المنطقة المصابة لجميع مناطق النبات .وهذه الاستجابات هي المقاومة الجهازية المكتسبة Acquired Resistance Systemic (SAR) والمقاومة الجهازية المستحثة Induced systemic resistance (ISR) (Romera واخرون ، 2019 ؛ Timmermann واخرون 2020) .

تحدث المقاومة الجهازية المكتسبة (SAR) عن طريق مسببات الأمراض والحشرات ، بينما تحدث المقاومة الجهازية المستحثة ISR بواسطة الكائنات الدقيقة المفيدة التي تعيش في منطقة الجذور ، مثل البكتيريا والفطريات. يمكن لهذه الاحياء المجهرية المرتبطة بالجذور ، إلى جانب التأثير على تغذية النبات ونموه ، أن تعزز دفاعات النبات ، مما يجعل النبات بأكمله أكثر مقاومة لمسببات الأمراض والآفات . في السنوات الأخيرة ، وجد أن الميكروبات المفيدة التي تحفز المقاومة الجهازية المستحثة ISR يمكن أن تحفز كل من الاستجابات الفسيولوجية والمورفولوجية لنقص الحديد في نباتات ذوات الفلقتين ، كما تعد المقاومة الجهازية المستحثة (ISR) التي تسببها الميكروبات المفيدة آلية دفاعية مهمة ، وفعالة ، لتحفيز النبات ومهاجمة المسببات المرضية . تعتمد آليات الدفاع مثل ISR على تنظيم دقيق للتعبير الجيني. تؤدي التفاعلات بين الجينات ومنتجاتها إلى ظهور دوائر معقدة تعرف باسم شبكات تنظيم الجينات Gene Regulatory Networks (GRNs) تساعدهذه الشبكة في إيجاد تفاعلات تؤدي إلى تحفيز المقاومة المستحثة بين الجينات (Romera واخرون ، 2019 ؛ Timmermann واخرون 2020) .

هناك العديد من الهرمونات وجزيئات الإشارة ، مثل الإيثيلين Ethylene ، والأوكسين auxin وأوكسيد النتريك nitric oxide كمنظمات رئيسة لكلتا العمليتين ، على الرغم من أن حامض الساليسيليك salicylic acid (SA) هو مكون أساسي لـ SAR ، إلا أن هذه الاشارة تعزز بشكل حصري المقاومة الجهازية وليس الموضعية (Romera واخرون ،2019 ؛ Vlot واخرون ، 2021) .

إن البكتيريا الجذرية المعززة لنمو النبات Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) يمكن أن تثير مقاومة جهازية (ISR) ، إن بعض البكتريا المسببة للأمراض على الأوراق يمكن أن تحفز إطلاق مركبات من جذور النباتات في منطقة الجذور بعض هذه المركبات

تجتذب بشكل انتقائي الميكروبات التي تحفز ISR ، التي يمكن أن تحمي الأجيال النباتية المتعاقبة التي تنمو على التربة نفسها من الأمراض ، كما يمكن لبكتريا PGPR أيضًا تنشيط التعبير الجيني المرتبط بالدفاع ، الذي يمكن أن تحث النبات على رد فعل دفاعي أقوى (Rehman واخرون ، 2020 ؛ Vlot واخرون ، 2021) .

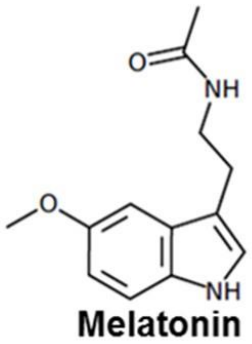
تظهر البكتيريا الجذرية التي تعزز نمو النبات (PGPR) تفاعلات تآزرية ، وعدائية مع كائنات التربة الدقيقة وتقوم بمجموعة من الأنشطة ذات الأهمية البيئية ، حيث أنها تعزز نمو النبات من خلال تسهيل تحمل الإجهاد الحيوي وغير الحيوي ودعم تغذية النباتات العائلة . نظرًا لفاعليتها في دعم نمو النبات ، تعد PGPRs بديلاً صديقًا للبيئة للأسمدة الكيميائية الخطرة (Basu واخرون ، 2021) . وللبكتريا PGPR دور مفيد كمواد أحيائية خضراء في تخفيف عبئ الظروف الملحية العالية على الصفات المورفولوجية ، والصفات الفيزيائية ، والكيميائية للمحاصيل النباتية ، كما أنها أداة مفيدة في تحسين قوة البذور والإنبات السريع للبذور وتوحيد نمو الشتلات (Ha-Tran واخرون،2021).

يمكن أن تستحث المقاومة الجهازية بعوامل غير احيائية مثل : أوكسيد الزنك النانوي ، الذي استخدم كعامل وقائي ، وعلاجي ضد فايروس موزائيك التبغ ، وأدّى إلى خفض شدة المرض (Abdelkhalek و Al-Askar ، 2020). وأيضا استخدم المستخلصات المائية من جذور عرق السوس ونباتات الثوم ، القرنفل وحامض الساليسيليك ضد فايروس موزائيك التين *Fig* (FMV) *Mosaic Virus* كان لها الأثر في تقليل شدة الأعراض التي يسببها الفايروس، وزيادة مؤشرات نمو النبات مثل عدد الأوراق ، ارتفاع النبات ، محتوى الأوراق من الكلوروفيل وعناصر النيتروجين والفوسفور (Zagier واخرون ،2021) .

يؤثر كل من SAR و ISR على الاشارات المتبادلة للهرمونات النباتية ، نحو تعزيز الدفاع ضد مسببات الأمراض ، والتي تؤدي في الوقت نفسه إلى مزيد من التغييرات في دفاع النبات ، والتفاعلات بين ميكروبات- النبات ، والتفاعلات بين النبات - النبات. لذلك أن مثل هذه التفاعلات بين الكائنات الحية يمكن دمجها في استراتيجيات وقائية نباتية عالية الفاعلية (Vlot واخرون ، 2021) .

2.8. الميلاتونين Melatonin :

الميلاتونين (N-acetyl-5-methoxytryptamine) هو جزيء أحيائي غير سام ينتج في غدة صنوبرية للحيوانات كهرمون حيواني ، و جزيئة اشارة في أنسجة مختلفة من النباتات . تم اكتشاف الميلاتونين في النباتات في عام 1995 ، له مجموعة كبيرة من الوظائف في الحيوانات وأيضًا يلعب دورا في فسيولوجيا النبات (Arnao و Hernández-Ruiz ، 2015 ؛ Arnao و Hernández-Ruiz ، 2019 ؛ Wei واخرون ،2018 ؛ Sharif واخرون ،2018) .



شكل (2.3) التركيب الكيميائي للميلاتونين (Patel واخرون ، 2020)

يتم إنتاج العديد من مركبات الميلاتونين الداخلي الوسيطة في عضيات خلوية مختلفة ، مثل السايتوبلازم والشبكة الإندوبلازمية والبلاستيدات الخضراء ، التي إما تسهل أو تعيق الخطوات الأنزيمية اللاحقة. اعتمادًا على المسارات . تختلف المواقع الخلوية النهائية لتخليق الميلاتونين إما في السايتوبلازم أو البلاستيدات الخضراء ، مما قد يؤثر بشكل مختلف على طريقة عمل الميلاتونين في النباتات (Back واخرون ، 2016) .

لقد اثبتت كثير من الأبحاث المتاحة حول الميلاتونين أنه جزيئ إشارات لا غنى عنه ينتجه النبات داخليًا وهو مهم للغاية في الحفاظ على نمو النبات وتطوره بالإضافة إلى ذلك ، يلعب ادواراً مهمة كعامل مضاد للإجهاد ضد الضغوطات اللاأحيائية ، مثل : الجفاف ، والملوحة ، ودرجات الحرارة المحيطة المنخفضة ، والمرتفعة ، والأشعة فوق البنفسجية ، والمواد الكيميائية السامة (Arnao و Hernández-Ruiz ، 2015 ؛ Arnao و Hernández-Ruiz ، 2019) ، وكذلك ضد الضغوطات الاحيائية الناتجة عن المسببات المرضية ، حيث يسبب الإجهاد الاحيائي أضراراً جسيمة للمحاصيل الزراعية في جميع أنحاء العالم ويزيد من مخاطر الجوع في العديد من المناطق (Moustafa-Farag واخرون ،2020) .

في بعض الاحيأن الميلاتونين المنتج داخليًا لا يكفي لمعالجة الضغوطات الاحيائية واللاحيائية القاسية . لهذا السبب ، تم اضافة الميلاتونين خارجيا من أجل الحفاظ على مناعة النبات

والقدرة على النمو الطبيعي (Sharif واخرون ،2018) . فقد اظهر الميلاتونين أنشطة فعالة ضد مسببات الأمراض النباتية ، حيث وجد أن الميلاتونين يلعب دورًا رئيسا في مقاومة النبات لفطر *Botrytis cinerea* ، كذلك لم يكتفِ الميلاتونين بالقضاء على فايروس تجويف جذع التفاح *Apple stem grooving virus* (ASGV) عند اضافته على براعم التفاح في المختبر، مما جعله مفيدًا لإنتاج نباتات خالية من الفايروسات ، وأيضا خفض الاصابة بفايروس موزائيك التبغ *Tobacco mosaic virus* (TMV) وتركيز الفايروس في شتلات التبغ البري *Nicotiana glutinosa* و الطماطة *Solanum lycopersicum* المصابة (Zhao ، واخرون 2016 ؛ Moustafa-Farag واخرون ،2020) .

كما أن استعمال الميلاتونين (100 مايكرومول) لزيادة مقاومة الباذنجأن لعدوى *Alfalfa mosaic virus* (AMV). كما أن الرش الورقي باستعمال الميلاتونين أدّى إلى زيادة معنوية في المعايير الظاهرية (الفروع ، طول الجذر ، عدد الأوراق ، مساحة الأوراق ، والكتلة الاحيائية للأوراق) ، محتوى الكلوروفيل ، إنزيمات مضادات الأكسدة ، والتعبير الجيني لبعض الإنزيمات مقارنة بالنباتات المصابة ، كما أنه قلل من الضرر التأكسدي الناجم عن AMV من خلال تقليل بيروكسيد الهيدروجين وأنيونات الأكسيد الفائق وجذور الهيدروكسيل وMalondialdehyde (Sofy واخرون ،2021) .

إن اضافة الميلاتونين خارجيا قلل من أنواع الأوكسجين التفاعلية Reactive oxygen species (ROS) وموت الخلايا الناجم عن الضغوط اللاأحيائية ، والأحيائية عن طريق إصلاح الميتوكوندريا، بالإضافة إلى تنظيم الجينات الخاصة بالإجهاد ، وتفعيل جينات البروتينات المرتبطة بالإمراض والإنزيمات المضادة للأكسدة تحت الضغط الاحيائي واللاأحيائي (Li واخرون ، 2017 ؛ Sharif واخرون ،2018) .

إن الميلاتونين ينظم العديد من العمليات الاحيائية المهمة للنباتات ، بما في ذلك التخليق الحيوي للرايبوسومات ، والتمثيل الغذائي للدهون ، والتمثيل الغذائي للكربوهيدرات ، وتخزين البروتين مثل البروتينات التي تتحمل الإجهاد ، و أيضاً البروتينات التي تنتج ATP كجزء من تحلل السكر كما أن دورة حامض الستريك يتم تنظيمها بواسطته . وجد أن الميلاتونين يخفف التأثيرات المثبطة لضغط كلوريد الصوديوم على إنبات البذور من خلال تعزيز إنتاج الطاقة ، كما له دور في إنبات بذور الخيار في ظل ظروف الإجهاد (Ding واخرون ، 2018) .

كما انه يشارك في تنظيم نمو النبات وتحسينه ، حيث يحفز النمو في السيقان ، ويحفز تكوين الجذور وكذلك انبات البذور، و له القدرة على تأخير الشيخوخة ، من خلال حماية عمليات

البناء الضوئي وأيضاً دوره كمعدل للتعبير الجيني في النباتات. كما يظهر أن الميلاتونين يتصرف بطريقة مشابهة لهرمون الأوكسين ، حيث تربط الاستجابات الفسيولوجية ، التي ينتجها الميلاتونين مع عمل الأوكسين ، مثل تعزيز نشاط النمو، وقدرة التجذير. بالإضافة إلى ذلك يعد الميلاتونين هو احتمال ممتاز، لتحسين المحاصيل، وزيادة عدد الثمار ووزنها (Arnao و Hernández-Ruiz ، 2015 ؛ Arnao و Hernández-Ruiz ، 2019 ؛ Medina-Santamarina واخـــــــرون ،2021) .

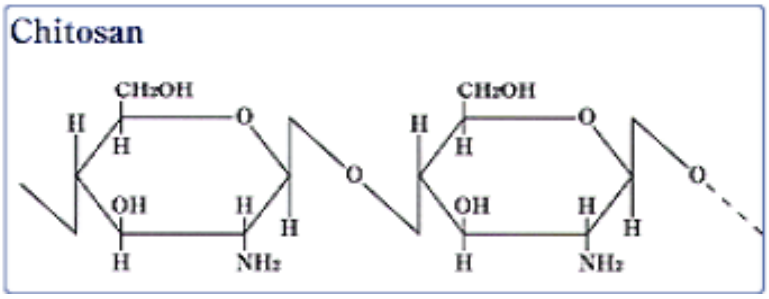
وجد أن أوراق الطماطة المعاملة بالميلاتونين قد تحتوي على كيوتين أكثر سمكًا من أوراق الطماطة غير المعاملة ، كما أنه يزيد من مستوى الشمع الجلدي في أوراق الطماطة حيث حصلت زيادة في نسخ الجينات المرتبطة بالشمع (Ding واخرون ،2018).

كما وجد أن الميلاتونين المضاف إلى الجذور قد زاد من التمثيل الضوئي عن طريق تنظيم حركة الثغور، وتحسين امتصاص الطاقة الضوئية ونقل الإلكترون . بالإضافة إلى ذلك ، حسنت معاملة الميلاتونين استتباب الأكسدة ، والاختزال عن طريق تحفيز أنشطة إنزيمات مضادات الأكسدة ومن ثمّ خفض الإجهاد التأكسدي ، مما أدّى إلى تخفيف زيادة التمثيل الضوئي من تعطل التوازن الخلوي ، في حين ساهم تحسين توازن الأكسدة والاختزال في الحفاظ على التمثيل الضوئي العالي (Li واخرون ، 2017) .

كما أنه يقلل بشكل كبير من نسبة الفقد في أثناء التخزين بعد الحصاد بين الفواكه والخضروات المختلفة. علاوة على ذلك ، فأن تنظيم التعبير الجيني ، والاشارات المتبادلة مع الهرمونات النباتية الأخرى ، هو عامل مهم آخر للميلاتونين ، حيث أنه ينظم عملية التمثيل الغذائي للهرمونات النباتية ، وارتفاع أو انخفاض مستوياتها في النبات ، وتنظيم عناصر الاشارات ، و يؤثر الميلاتونين على الاستجابة النهائية للأوكسين auxin ، والجبريلينات gibberellins ، السيتوكينين cytokinins ، حامض الأبسيسيك abscisic acid ، إيثيلين ethylene ، حامض الساليسيليك salicylic acid ، جاسمونيك jasmonates ، براسينوستر ويدات brassinosteroids، بولي أمينpolyamines وستريغولاكتون strigolactones. إن الأدوار المتنوعة للميلاتونين في نظام النبات ممكن أن تكون مفيدة في تعزيز إنتاج المحاصيل الصديقة للبيئة ،وضمان سلامة الغذاء (Sharif واخرون ،2018 ؛ Arnao و Hernández-Ruiz ، 2021 ؛ Sofy واخرون ، 2021) .

2.9.الكيتوسان Chitosan :

أطلق على الكيتوسان لأول مرة مصطلح Hoppe Seyler نسبة إلى العالم الذي اكتشفه ، وهو متعدد السكريات الخطية وهو يتألف من N-acetyl-d-glucosamine و N- glucosamine. يتم تصنيعه عن طريق معالجة مادة الكايتين بمادة قلوية مثل هيدروكسيد الصوديوم ، التي تنتج 40-80٪ ديستيلاتيد كيتوسأن chitosan deacetylated (Kumari واخرون 2020 ؛ Chakraborty واخرون ، 2020).



شكل (2.4) التركيب الكيميائي للكيتوسأن (Kumari واخرون 2020).

كما أنه يعد من المركبات الطبيعية القابلة للتحلل الاحيائي وغير السامة ، وأيضاً هو من أكثر البوليمرات الطبيعية وفرة ، ويوجد على نطاق واسع في جميع أنحاء الطبيعة ، كما أنّه منخفض التكلفة ومتعدد الأغراض ،يحتوي العديد من الخصائص الفيزيائية ، والكيميائية والاحيائية المرغوبة لتطبيقات مختلفة في الزراعة ، والصيدلة ، وصناعات الطب الأحيائي ، و يمكن أن يخفف تطبيقه على النباتات من الاستعمال الواسع لمبيدات الآفات الكيميائية (Malerba و Cerana ، 2018 ؛ Kumari واخرون ، 2020 ؛ Chakraborty واخرون ، 2020 ؛ Yu واخرون ، 2021 ؛ Shahrajabian واخرون ، 2021 ؛ Subhan واخرون ، 2021).

يستخرج الكيتوسان من القشرة الخارجية للروبيأن ، والمحار ، والكركند ، وسرطأن البحر ، وكذلك جدرأن الخلايا الفطرية ، و نظرًا لقابليتها للتحلل الأحيائي وعدم السمية البيئية والتوافق الأحيائي ، فهو مورد مثالي للزراعة المستدامة ؛ لذلك يستخدم كمحفز لنمو النبات من خلال التأثير على العمليات الفسيولوجية للنبات مثل امتصاص المغذيات ، وانقسام الخلايا ، واستطالة الخلية ، والتنشيط الأنزيمي ، وتوليف البروتين ، الذي يمكن أن يؤدي في النهاية إلى زيادة الانتاج . حيث يعمل كمحفز لمنع نمو مسببات الأمراض النباتية ، وتغيير استجابات دفاع النبات عن طريق إطلاق العديد من المسارات الأيضية المفيدة (Chakraborty واخرون ، 2020).

حيث تعمل على تحفيز أنظمة دفاع النبات ضد هجوم العوامل الممرضة (البكتيريا ، الفطريات ، الفايروسات ، الديدأن الخيطية و الحشرات) ، وتسهل امتصاص المغذيات من قبل النباتات ،

والتحكم في تجهيز العناصر الكبرى والصغرى ، وتحسين مقاومة النباتات للضغوط اللاأحيائية والأحيائية كما أنه يقلل من عملية النتح من خلال التحكم في فتح الثغور وغلقها وأيضاً يمكن استعماله كطلاء للبذور. علاوة على ذلك ، يمكن أن يكون فعالًا في تعزيز الكائنات الدقيقة المحللة للكايتين وإطالة عمر التخزين من خلال معاملات ما بعد الحصاد ، كما أنه يحسن الإطلاق البطيء للمغذيات في الأسمدة. وايضا يمكنه معالجة التربة الملوثة من خلال إزالة المعادن الثقيلة الموجبة والأنيونية (Yuواخرون ، 2021 ؛ Shahrajabian واخرون ، 2021 ؛ Subhan واخرون ، 2021).

إن الكيتوسان يتحكم في الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض النباتية عن طريق منع نموها وتكوّن الأبواغ ، كما أنه يقلل من قابلية الجراثيم للبقاء والإنبات وعن طريق تعطيل غشاء الخلية. وأيضاً يحفز المقاومة المتعددة في النباتات عن طريق تحفيز و / أو تثبيط أنشطة كيميائية أحيائية مختلفة أثناء تفاعل مسببات الأمراض النباتية.كما أن له تأثير إيجابي في إثراء التنوع الاحيائي في منطقة الجذور ويعد أداة فعالة لحماية النباتات (Hassan و Chang ، 2017 ؛ Malerba و Cerana ، 2020 ؛ Popletaeva وArslanova ، 2021) .

يحفز تطبيق الكيتوسان على النباتات معدل التمثيل الضوئي ومحتوى الكلوروفيل ، وإغلاق الثغور. كما أنه يعزز الإنزيمات المضادة للأكسدة ، ويحث على إنتاج الأحماض العضوية والسكريات والأحماض الأمينية ، وإشارات الإجهاد ، إلى جانب ذلك ، يتم استعمال هذا المركب كمركب مضاد للنتح من خلال الرش الورقي في العديد من النباتات مما يقلل من استعمال المياه ويضمن الحماية من الآثار السلبية الأخرى ، وأيضا يساهم في تحسين معايير نمو النبات. بالإضافة إلى ذلك ، فهو يؤدي إلى مقاومة ممتازة للجفاف ، والملح والضغط على درجات الحرارة المنخفضة (Hidangmayum واخـــــــرون ، 2019 ؛ Kocięcka و Liberacki، 2021 ؛ Subhan واخرون ، 2021) .

يعد الكيتوسان مثبط فعال لفايروس موزائيك التبغ *Tobacco mosaic virus* (TMV) على نبات التبغ *Nicotiana glutinosa* ، وخفض تراكم الحامض النووي الفايروسي، و الغلاف البروتيني في البروتوبلاست بالإضافة إلى ذلك ، تسبب في إنتاج أنواع الأكسجين الفعالة (ROS) والتنظيم المستحث لمختلف الجينات المستجيبة للدفاع (Guo و اخرون ، 2020).

إن استعمال الكيتوسان مع بكتريا المقاومة الأحيائية أدّى إلى زيادة معنوية في النمو الخضري وحاصل الثمارلنبات الفراولة (Mukta واخرون ، 2017) . كما تم تقييم تأثير PGPR والكيتوسان على نمو نبات الفلفل الحلو المزروع في ظل أنظمة ملوحة مختلفة ،حيث أدّى تطبيق

بكتريا *Bacillus thuringiensis* و chitosan إلى تحسين نمو النبات ومحتوى الكلوروفيل ، وإنتاجية الفاكهة. على العكس من ذلك ، تم تقليل أكسدة الدهون ، وجذور الاوكسجين التفاعلية بشكل كبير في النباتات المجهدة (ALKahtani ، 2020) .

أدى استعمال الكيتوسان النانوي ضد فايروس*Bean yellow mosaic virus* (BYMV) إلى تقليل شدة المرض ، و زيادة ملحوظة في مؤشرات النمو ، وكلوروفيل التمثيل الضوئي ، ومؤشر ثبات الغشاء ، والمحتوى المائي. بالإضافة إلى ذلك ، تمت زيادة مضادات الأكسدة الأنزيمية ، وغير الأنزيمية ، والبروتين الذائب بشكل كبير. بينما تم تقليل بيروكسيد الهيدروجين ، وبشكل عام يعد الكيتوسان عاملاً مضاداً للفايروسات مع أنه آمن ، واقتصادي (Sofy و اخرون ، 2020).

ادى استعمال الكيتوسان إلى انخفاضً كبير في شدة المرض بفايروس موزائيك الخيار CMV كما حسن من مؤشرات النمو ، محتوى كلوروفيل الأوراق ، الهرمونات النباتية (مثل حامض الأسيتيك الإندول ، حامض الجبريليك ، حامض الساليسيليك وحامض الجاسمونك) ، ومضادات الأكسدة غير الأنزيمية ومضادات الأكسدة الأنزيمية مقارنة بالنباتات المصابة بالفايروس. كما أظهرت جميع النباتات المعاملة مستويات تعبير متزايدة لبعض جينات الدفاع الجهازية في تخفيف عدوى الفايروس. (Sofy واخرون ، 2021).

2.10. بكتريا *Bacillus amyloliquefaciens* :

تنتمي البكتريا *Bacillus amyloliquefaciens* إلى جنس *Bacillus* وعائلة *Baciliaceae* وشعبة *Firmicutes*، وهي توجد في بيئات مختلفة كالأغذية والنباتات والحيوانات والتربة . (WoldemariamYohannes واخرون ، 2020 ؛ Ngalimat واخرون 2021).

تتصف هذه البكتريا بكونها موجبة لصبغة كرام ،عصوية الشكل كما أنها تكون أبواغ داخلية أما المستعمرات فهي سريعة النمو ، متجعدة ، باهتة ، جافة ، بيضاء اللون ، غير منتظمة ، مفصصة ومسطحة على وسط Nutrient Agar ، كما ثبت أن البكتيريا مستقرة تحت درجات الحرارة العالية وضغوط الأس الهيدروجيني ، فهي تحتفظ بنشاطها الكامل بعد ساعة عند 100 درجة مئوية و مدى pH من (2-10) حيث يمكن أن تتكيف مع البيئات القاسية . (Sutyak واخرون ، 2008 ؛ Sharma واخرون ، 2013 ؛ Qian واخرون 2020 ؛ Ngalimat واخرون 2021) .

تعد بكتريا *B. amyloliquefaciens* أحد البكتريا المعززة لنمو النبات (PGPB) نظرا لقدرتها على اصلاح النتروجين وإذابة الفوسفات ، و انتاج مركبات عضوية متطايرة ، كما تنتج الحديد والهرمونات النباتية مثل : الجبرلينات ، وحامض السالسالك ، وحامض الأبسيسك ، وحامض الجاسمونك ، وكذلك المركبات المضادة للمسببات المرضية . علاوة على ذلك ، تنتج مجموعة من الإنزيمات المختلفة مثل: α-amylase ، protease ، lipase ، cellulase ، xylanase ، pectinase ، aminotransferase ، barnase ، peroxidase و laccase. وأيضاً الببتيدات غير الرايبوسومية ، كما تنتج السكريات مثل : (الجلوكوز والسكروز واللاكتوز والمانيتول) وهذه المنتجات لها أدوار مهمة في عملية المقاومة الاحيائية وتعزيز نمو النبات (Kim واخرون ، 2017 ؛ Wu واخرون 2019 ؛ Qian واخرون 2020 ؛ Ngalimat واخرون 2021) .

وجد أن الأيض الثانوي لهذه البكتريا آمن نسبياً بالنسبة للطيور، والثدييات البرية ، والكائنات المائية ، والمفصليات غير المستهدفة (Authority واخرون ، 2021) .

يعد استعمال عوامل المقاومة الأحيائية لإدارة مسببات الأمراض النباتية بمثابة استراتيجية أكثر أماناً ، واستدامة من أجل إنتاجية زراعية آمنة ومربحة . إن هذه البكتيريا الجذرية التي تعزز نمو النبات اثبتت قدرتها للمقاومة الاحيائية ضد العديد من مسببات الأمراض الفطرية والبكتيرية فهي تسبب تغيرات شكلية في أغشية البلازما وجدران الخلايا والأبواغ ، كما في مقاومتها للفطر *Fusarium. graminearum* ، فطر *Sclerotinia min* ، فطر *Rhizoctonia solani*. و فطر *Phytophthora citrophtora* كما أنها تتسبب في تراكم لأنواع الأوكسجين التفاعلية ،

وكذلك في موت خلايا الممرض ، بالإضافة إلى منتجات التمثيل الغذائي الثانوي و تنظيم الجينات المشاركة في تخليق هذه المنتجات داخل النبات على أنها ذات نشاط مضاد لمجموعة واسعة من الأنواع البكتيرية ، مثل : البكتريا المسببة لمرض قرح الحمضيات *Xanthomonas axonopodis*. (Sutyak واخرون ،2008 ؛ Gu واخرون ،2017 ؛ Shafi واخرون ، 2017 ؛ Zaccardelli واخرون ،2020 ؛ Qian واخرون ، 2020 ؛ European Food Safety Authority (EFSA) واخرون ، 2021)

ومع ذلك ، هناك معرفة محدودة فيما يتعلق بتأثيرها ضد الفايروسات. فقد تم معرفة تأثيرها المضاد للفايروسات في نباتات الطماطة ،حيث خفضت معاملات الغمر أو رش الأوراق أو الاضافة للتربة إلى ما يصل إلى 80٪ من الإصابة بفايروس ذبول الطماطة ، وقد أدّى غمر درنات البطاطا في البكتريا إلى تأخير تراكم فايروس البطاطس Y. كشف التحليل النسخي لمجموعة من الجينات المرتبطة بحامض الساليسيليك (SA) . إن المقاومة الجهازية مرتبطة بحامض الساليسيليك ضد الفايروسات ناتج عن تحفيز مسار إشارات SA في الطماطة بعد المعاملة بالبكتريا ، وأنماط التعبير الجيني في النبات للاستجابة لعدوى الفايروس (TSWV) *Tomato spotted wilt virus* و(PVY) *Potato virus Y* ، و الآلية المثيرة للاهتمام لحماية النبات عن طريق بكتريا *B. amyloliquefaciens* هي أنها تنتج التركيزات شبه المميتة من البتيدات الدهنية الحلقية والمواد المتطايرة مما تحفز مسارات المقاومة الجهازية المستحثة (ISR) ، التي تحمي النباتات من هجمات الميكروبات المسببة للأمراض والفايروسات والديدأن الخيطية. من المحتمل أن يكون تحفيز ISR بواسطة نواتج الأيض الثانوية البكتيرية ، هو الآلية الرئيسة المسؤولة عن عمل المقاومة الاحيائية .(Chowdhury واخرون ، 2015 ؛ Beris واخرون 2018) .

تمتلك بكتريا *B. amyloliquefaciens* العديد من الصفات المعززة لنمو النبات ، مثل : إنتاج حامض الحديد siderophores ، ومركبات الإندول 3- حامض الخليك ، و ACC deaminase ، والفوسفاتاز ، و phytases ، وسيانيد الهيدروجين HCN ، والسليولاز ، وإذابة الزنك ، والعداء لمسببات الأمراض التي تنتقل عن طريق التربة. كما أن التلقيح بهذه البكتريا أدى إلى زيادة كبيرة في خصائص التربة الجذرية (أنشطة الإنزيم ، إنتاج Indole Acetic Acid (IAA) ، التنفس الميكروبي ، الكتلة الاحيائية الميكروبية) ، ومحتوى المغذيات (K ، P ، Zn، Fe ، Cu، Mn) (Sharma واخرون ، 2013) .

كما عزلت البكتريا *B. amyloliquefaciens* من مشروب ألبأن مخمر، ووجد أن البكتريا تنتج مركبًا تم تحديده لاحقًا على أنه بروتين يمتلك نشاطًا قويًا مضادًا لبعض مسببات الأمراض للانسأن (Sutyak واخرون ، 2008) .

كمـا أظهـرت نباتـات رشـاد أذن الفـأر *Arabidopsis thaliana* المعرضـة للمركبـات العضوية المتطايرة الناتجة عن بكتريا*B. amyloliquefaciens* زيادة في الكتلـة الاحيائيـة بمقدار ضعفين ، وزيادة في طول الجذر وزيادة في الوزن الرطب للنبات (Wu واخرون ، 2019) .

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

3. مواد وطرائق العمل Materials and Methods

3.1.المواد المستخدمة في العمل :

3.1.1. الاجهزة والادوات المستخدمة : استخدمت الاجهزة المدرجة في الجدول (3.1) خلال مدة الدراسة.

جدول (3.1) الاجهزة و الادوات المستخدمة في البحث

التسلسل	اسم الجهاز	المنشأ
1	حمام مائي هزاز water bath	صيني
4	حاضنة incubator	صيني
5	جهاز الترحيل الكهربائي Electrophoresis	ـــــ
7	مجمدة Freezer	ـــ
9	ماصات دقيقة Micropipettes	بلجيكا
10	المؤصدة Autoclve	اليابان
11	ميزان حساسSensitive balance	المانيا
12	جهاز قياس الرقم الهيدروجيني pH-meter	صيني
14	جهاز المطياف الضوئي UV- Visible Spectrophotometer	صيني
18	أدوات خاصة بالماصة الدقيقة Micropipette tips	صيني
19	أنابيب الابندروف Eppendorf tubes	صيني
21	أنابيب اختبار Test tube	محلي

3.1.2. المواد الكيميائية : استخدمت المواد الكيميائية المدرجة في الجدول (3.2) خلال مدة الدراسة.

جدول (3.2) المواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة

تسلسل	المادة الكيميائية
5	Distilled Water
6	(Ethelene-diamine tetraacetic acid) EDTA
8	Absolute Ethanol (70%)
11	Carborundum
12	KH_2PO_4
13	Na_2HPO_4
14	Nutrient Agar
15	(PSB) Potato Sucrose Broth
22	ammonia acetate
23	Tri Sodium Citrate AR
24	Ammonuim sulphate AR
25	Nutrient Agar
26	Nutrient Broth
27	Melatonin
28	Chitosan
29	acetic acid

جدول (3.3) البرامج المستخدمة في الدراسة

ت	البرامج	الرابط
1	Geneious prime	/ https://www.geneious.com
2	Repeat Explorar	/ http://repeatexplorer.org
3	BLAST	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
4	Repbase	/ https://www.girinst.org/repbase
5	Image J	https://imagej.nih.gov/ij/download.html

3.2. طرائق العمل :

3.2.1. مصدر الفايروس :

جمعت عينات من اوراق نباتات خيار ظاهرة عليها اعراض الموزائيك الشديد والتجعد من حقول ناحية الحيدرية في النجف الاشرف بتاريخ 5- 10 - 2020 وضعت العينات في أكياس بلاستيكية وحفظت في درجة حرارة - 20 مْ .

3.2.2. استعمال تقنية تسلسل الجيل القادم للحامض النووي (DNA , RNA) للنباتات المصابة (Next Generation Sequencing , NGS):

3.2.2.1. تجهيز العينات وارسالها لشركة DNA LINK الكورية :

نظراً لسرعة تحلل الحامض النووي الرايبي RNA ولحفظه من التحطيم ومنع تدهوره جهز محلول ملحي RNA Later من عدة محاليل ملحية (Kruse واخرون ، 2017) لتحفظ به عينات الأوراق المصابة عند ارسالها لشركة DNA LINK وكما يأتي :

- **المحلول الأول : وزن 73.5 غم من ملح Tri Sodium Citrate AR وأضيف له 175 ما من ddH_2O ووضع في بيكرو أكمل الحجم إلى 250 مل باضافة ddH_2O.**

- المحلول الثاني : تم اذابة 46.5 غم من Ethylen diamine tetra acetic acid (EDTA) في 175 مل من ddH_2O بعدها أضيف له 23 غم من NaOH ثم تم قياس pH ، الذي يجب ان يكون 8 بعدها أكمل الحجم إلى 250 مل باضافة ddH_2O ثم تم تعقيمه .
- تم تسخين 350 مل من ddH_2O في بيكر زجاجي ، وأضيف له 15 مل من محلول EDTA (المحلول الثاني) ثم أضيف له 9.5 مل من محلولTri Sodium Citrate AR (المحلول الاول) .
- وزن 262 غم من ملح Ammonuim sulphate AR وأضيف إلى مزيج المحلولين السابقين وسخن حتى اذابته تماما لمدة 30 دقيقة ثم ترك ليبرد ثم وضع في الثلاجة .
- اخذ 0.5 غم من عينات أوراق الخيار المصابة كل على انفراد وسحقت في النيتروجين السائل سحق بسيط ثم وضعت في أنابيب ابندروف وأضيف لها محلول RNA Later ملئ الانبوبة واعطيت الرقم 1 (CR1) .
- أخذت عينات أخرى من الأوراق المصابة 0.5 سم وضعت من دون سحق في أنابيب الابندروف وأضيف لها محلول RNA Later ملئ الانبوبة واعطيت الرقم 2 (CR2).
- غلفت أنابيب الابندروف المجهزة بشريط البارافيلم وحفظت في الثلاجة في درجة حرارة 4 مْ لحين ارسالها للشحن إلى الشركة الفاحصة .

3.2.2.2. قراءة التسلسل الكلي للأحماض النووية DNA و RNA في عينة نبات خيار مصاب :

أجريت قراءة التسلسل الكلي للحامضين النوويين من قبل شركة DNA LINK في كوريا الجنوبية ، استعملت العدة المكتبية TruSeq DNA Nano 350bp لقراءة تسلسل DNA الكلي وانتاج قراءات خام بطول 350 زوج قاعدة لكل قراءة ، والعدة المكتبية TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plant لقراءة تسلسل RNA الكلي ، وانتاج قراءة خام بطول 151 زوج قاعدة لكل قراءة ، و باستعمال منصة Novaseq6000 Illumina وبرنامج bcl2fastq2 Basecalling Software (الاصدار2.20) .

3.2.2.3. تحليل البيانات بواسطة برامج المعلوماتية الحياتية Bioniformatics :

بعد اكمال الشركة قراءة التتابع للحامضيين النوويين تم الحصول على ملفين للقراءات الخامRaw Reads احدهما يحتوي على القراءة الأمامية الكلية Forwad ، والآخر يحتوي على القراءة العكسية الكلية Revers ، تم دمج القراءتين في منصة Geneious للحصول على القراءات المزدوج Pairing Reads ثم تحليل هذه القراءات كما في الشكل (1.3) و الشكل (2.3)

ومن أجل ما يأتي :

a. حساب تغطية جينوم DNA the coverage of genome sequencing حسب المعادلة اللآتية :

تغطية جينوم DNA =(عدد القراءات الكلية × طول القراءة) / حجم الجينوم النباتي

= (89893674 × 151) / 367000000 قاعدة

X 36.9 =

b. الكشف عن الفايروسات المرضية الموجودة في جينوم نباتات الخيار من خلال منصة Geneious و برنامج BLAST.

c. الكشف عن التعبير الجيني لجينات الفايروسات المرضية في منصة Geneious و برنامج Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

d. حساب عدد نسخ الاحماض النووية (DNA , RNA) من خلال المعادلة (عباس ، 2023) :

$$The\ number\ of\ copies\ of total\ (\ DNA, RNA) = \frac{A.R. \times R.L.}{R.S.L.}$$

حيث أن :

A.R. : Assembled Reads عدد القراءات المرتبطة بالتسلسل المرجعي .

R.L. : Read Length طول القراءة .

R.S.L. : Reference Sequence Length طول التسلسل المرجعي

e. حساب النسب المئوية للاحماض النووية (RNA , DNA) من خلال المعادلة (Khaffajah واخرون ، 2022) :

$$Genome\ proportion\ = \frac{A.R}{R.R.} \times 100\%$$

حيث أن :

A.R : Assembled reads عدد القراءات المرتبطة بالتسلسل المرجعي .

R.R. : Raw Reads العدد الكلي للقراءات الخام .

f. حساب مقدار التعبير الجيني الحقيقي من خلال حساب عامل القياس لكل مليون قراءة Transcripts Per Kilobase Million TPM :

من خلال حساب :

$$RPK\ Reads\ Per\ Kilobase = \frac{A.R.}{(S.L.)} Kbp$$

حيث أن :

RPK Reads Per Kilobase هو عدد القراءة لكل كيلو قراءة

A.R. : Assembled Reads عدد القراءات المرتبطة بالتسلسل المرجعي .

R.L. : Sequence Length طول التسلسل .

ثم حساب عامل التحجيم لكل مليون Per Million:

$$per\ million = \frac{RPK}{1000000}$$

$$TPM = \frac{RPK}{Per\ million}$$

g. الكشف عن التقارب الوراثي للسلالة المتحصل عليها مع بعض العزلات من خلال رسم الشجرة الوراثية في منصة Geneious.

h. رسم الخريطة الجينومية للفايروسات المرضية في منصة Geneious .

i. الكشف عن التغايرات الوراثية الحاصلة في جينوم البلاستيدات الخضراء في منصة Geneious .

j. الكشف عن التعبير الجيني للبلاستيدات لنبات خيار مصاب في منصة Geneious

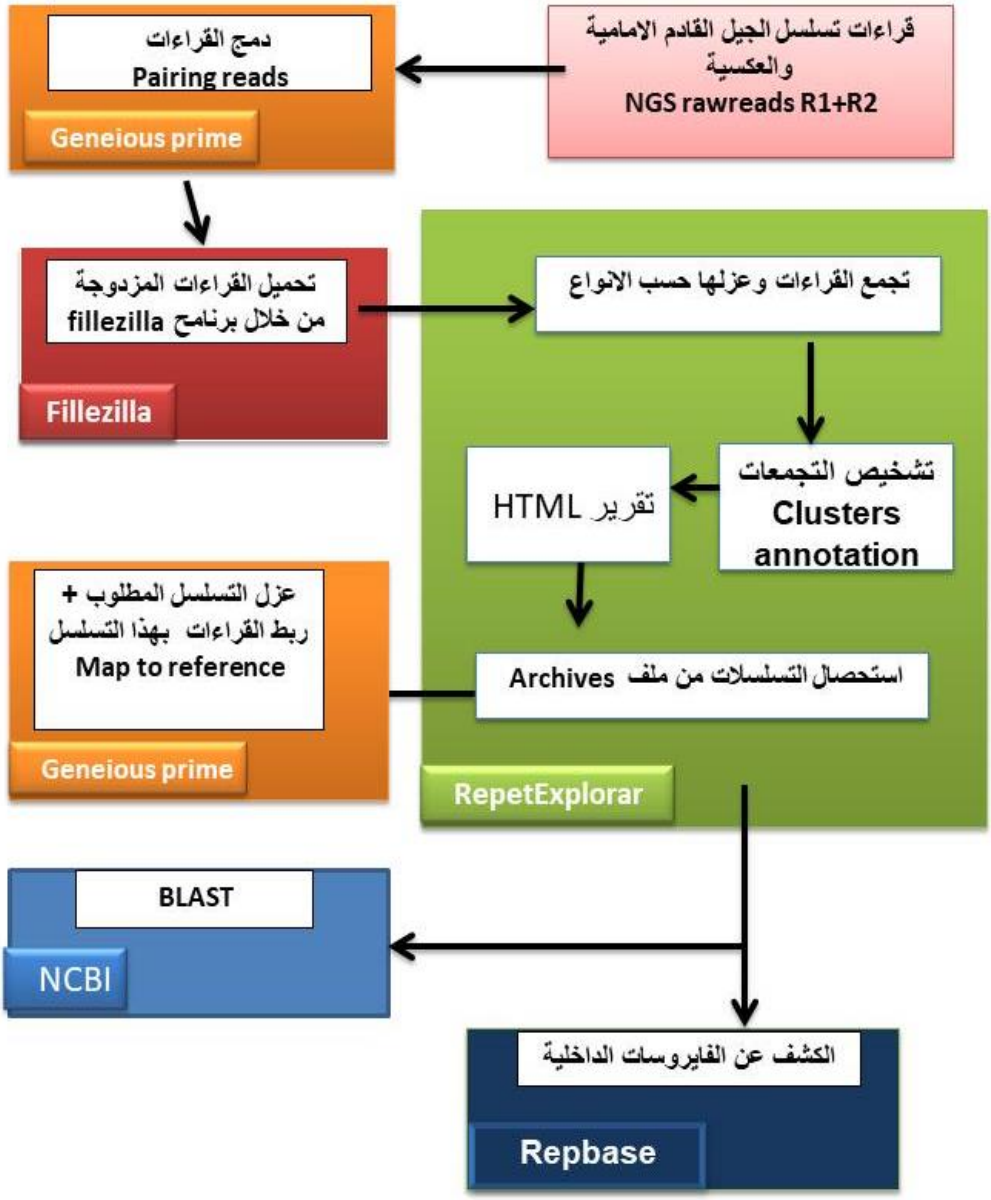
k. رسم الخريطة الجينومية للبلاستيدات الخضراء في نبات الخيار المصاب .

l. الكشف عن وجود فايروسات داخلية عكسية من خلال برنامج Repeat Explorar.

m. الكشف عن الفايروسات الداخلية العكسية من خلال منصة Geneious .

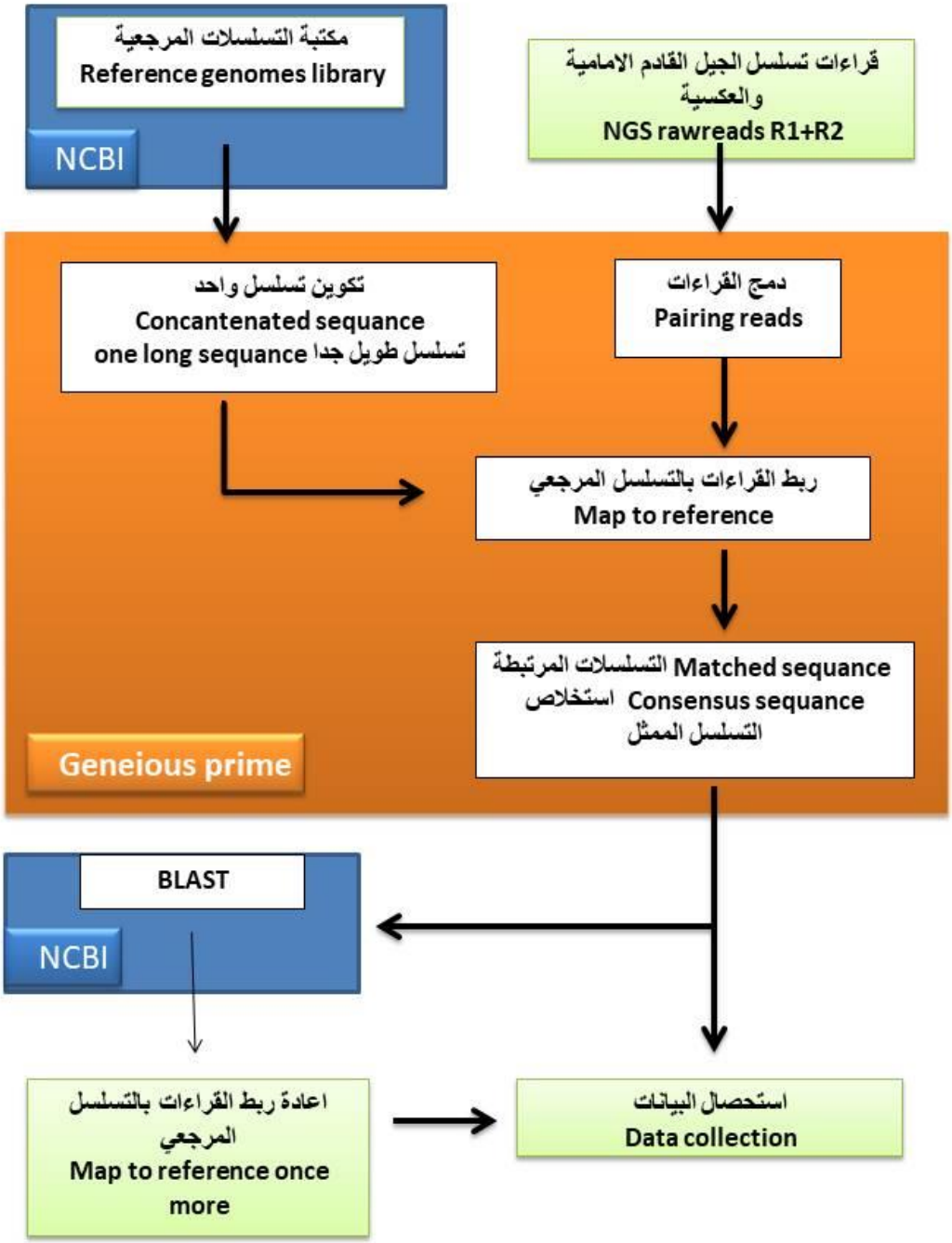
n. معرفة أنواع الفايروسات الداخلية العكسية في برنامج Repbase ، وتسجيلها في معهد الأبحاث والمعلومات الوراثية في كاليفورنيا GIRI، والخاص بتسجيل التسلسلات المتكررة ، و العوامل الوراثية المتنقلة في الاحماض النووية .

o. تسجيل الفايروسات المرضية المكتشفة في عينة نبات الخيار المصاب في المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية NCBI .



شكل (3.1) التعامل مع البيانات وتحليلها بواسطة برامج المعلوماتية الحياتية Bionformatics للكشف عن الفايروسات الداخلية في جينوم نبات الخيار المصاب

.



شكل (3.2) التعامل مع البيانات وتحليلها بواسطة منصة Geneious prime للحصول على التسلسلات الكاملة المراد الاستعلام عنها و توصيفها.

3.2.3. الاوساط الزرعية المستخدمة لتنمية بكتريا *Bacillus amyloliquefaciens* وحفظها

3.2.3.1. الوسط البكتيري المغذي الصلب Nutrient Agar :

تم اذابة 28غم من وسط Nutrient Agar الجاهز في لتر من الماء المقطر ثم وزع في دوارق حجم 250 مل ثم عقم بوساطة جهاز المؤصدة في درجة حرارة 121ْم وضغط 15 باوند / انج^2 لمدة 20 دقيقة ، وبعد الانتهاء من التعقيم تركت الدوارق لتبرد ، ثم حفظت في الثلاجة لحين الاستعمال (الياسري واخرون ،2016).

3.2.3.2. الوسط البكتيري المغذي السائل Nutrient Broth :

ذوّب (4 غم) من NB في (100 مل) من الماء المقطر وأضيف له 20 مل من الكليسيرول بعدها وزع على 10 أنابيب زجاجية وضع في كل انبوبة 10 مل من الوسط ثم تم تعقيمه بجهاز المؤصدة في درجة حرارة 121ْم وضغط 15 باوند / انج^2 لمدة 20 دقيقة وبعد انتهاء التعقيم ترك ليبرد بعدها تم اخذ مسحة بواسطة Loop من البكتريا المستعملة في البحث و زراعتها في الأنابيب ثم تركت البكتريا يومين لتنمو ، وجمدت بدرجة حرارة - 20 م ْ لحفظها طول مدة البحث واستعمالها عند الحاجة .

3.2.3.3. وسط البطاطا السائل Potato Sucrose Broth (PSB) :

قطعت 200 غم من البطاطا بعد تقشيرها إلى قطع صغيرة ووضعت على نار هادئة لمدة 15 دقيقة ، بعدها تم ترشيحها بواسطة شاش معقم ، واخذ مستخلص البطاطا ، ثم أكمل الحجم إلى لتر وأضيف له 10 غم من السكر ثم وزع الوسط على دوارق سعة 250 مل ، ثم عقمت بجهاز المؤصدة في درجة حرارة 121ْم وضغط 15باوند / انج^2 لمدة 20 دقيقة ، وبعد انتهاء التعقيم تركت الدوارق لتبرد وبعدها استعملت لاكثار البكتريا (الياسري واخرون ،2016)..

3.2.4. تحضير لقاح بكتريا *Bacillus amyloliquefaciens* :

تم استيراد البكتريا من شركة Asymmetry البريطانية ولأول مرة في العراق ، ثم تمت تنميها على الوسط السائل PSB لمدة 48 ساعة بدرجة 28 ±2 مº ، تم حساب وحدة تكوين المستعمرة Colony-Forming Unit (CFU) للبكتريا باستعمال تقانة التخافيف العشرية باستخدام 9 أنابيب اختبار بعد ترقيمها ، حيث وضع 9 مل من الماء المقطر المعقم لكل انبوبة ثم أضيف 1 مل من البكتريا للانبوبة الاولى للحصول على التخفيف 10^{-1} ثم نقل 1 مل من الانبوبة الاولى إلى الأنبوبة الثانية لتحضير 10^{-2} وهكذا وصولاً إلى التخفيف 10^{-9}. ثم أضيف 1 مل من

كل تخفيف إلى طبق بتري معقم ثم صب فوقها الوسط الزرعي المعقم .N.A وحركت الأطباق حركة بسيطة بشكل دائري لتوزيع البكتريا بالتساوي داخل الطبق بعدها حضنت الأطباق في درجة حرارة 28 ±2 م° لمدة 48 ساعة ، وحسبت عدد المستعمرات الناتجة من كل تخفيف وقدر العدد بطريقتين ، أحدهما طريقة الحساب اليدوية ثم طبقت المعادلة بضرب عدد المستعمرات في مقلوب التخفيف ، وبناءً على ذلك تم الحصول على كثافة عددية 1.8 × 10^{11} خلية / مل .

أما الطريقة الأخرى فكانت باستخدام برنامج (Image J) ومن خلال التقاط صور واضحة للأطباق النامية عليها البكتريا ثم فتح البرنامج ومن قائمة File نختار open ثم يتم اختيار صورة الطبق المراد معرفة عدد المستعمرات فيه ثم من ايقونة الدائرة تم تحديد الطبق واهمال حواف الطبق ، ثم من قائمة Edit تم اختيار clear outside ، بعدها الذهاب إلى قائمة Image واختيار Type ثم 16-bit ، ثم الرجوع إلى القائمة Image مرة أخرى واختيار Adjust ثم Threshold ظهرت نافذة فيها مؤشرات تم تحريك المؤشرات يمينا ويسارا حتى تحددت المستعمرات الموجودة ثم Apply ، بعدها الذهاب إلى قائمة Process واختيار Binary ثم Watershed ، ثم قائمة Analyze واختيارAnalyze particles ظهرت نافذة حدد فيها size (10-10000) وكذلك تم تحديد القائمة Display result ، Clear results ، Add mangager وExclude on edges ثم نضغط على Ok ومن ثمً تم حساب المستعمرات وظهور نافذتان ، من نافذة Results وآخر رقم على يسار النافذة ، هو الذي يمثل عدد المستعمرات . بعدها تم تكرار هذه الخطوات لثلاثة مكررات ثم تم استخراج المعدل وتطبيق المعادلة ، التي هي عدد المستعمرات في مقلوب التخفيف وقد كان ناتج الكثافة العددية 2.2× 10^{11} خلية / مل (Li واخرون ،2021).

3.2.5. تحضير محلول الميلاتونين Melatonin:

استعملت مادة الميلاتونين المجهزة من شركة Now الامريكية بشكل منتج دوائي وحضر منه تركيز 1.8 ملغم . لتر-1 (باذابة 0.018 ملغم / لتر ماء مقطر) ثم استعمل في المعاملات اللاحقة (Li واخرون ، 2017 ؛ Zhao واخرون ، 2019) .

3.2.5. تحضير الكيتوسانChitosan:

ذوب (1 غم) من الكيتوسان في (40 مل) ماء مقطرمعقم يحتوي على (9 مل) حامض أسيتيك acetic acid مع التحريك المستمر ثم أخذ (1مل) من هذا المحلول في لتر ماء مقطر للحصول على تركيز 25 ملغم . لتر$^{-1}$ واستعمل في المعاملات اللاحقة (Rendina و اخرون 2019) .

3.2.7. اختبار تأثير محلول Melatonin ومحلول Chitosan على البكتريا *Bacillus amyloliquefaciens*:

اخذ (1مل) من المحلول الأخير المجهز للتجربة الحقلية ووضع في طبق بتري ثم صب فوقه الوسط المغذي الصلب NA وحُرّك حركة موضعية ، وترك ليتصلب ، ثم زرعت عليه البكتريا بشكل تخطط وحضنت لمدة 48 ساعة بدرجة حرارة 28 ±2 م° ، كررت الخطوات نفسها مع محلول الكيتوسان ، ولوحظ نمو البكتريا على الوسط الحاوي على مادة الميلاتونين وأيضا الحاوي على مادة الكيتوسان مما يعني لا يوجد تضاد بينهما وبين البكتريا .

3.2.7. محلول دارئ الاستخلاص الفوسفاتي المبرد :

ذوّب 1.42غم/ لتر من Na_2HPO_4 ثم ذوّب 1.362 غم/ لترمن KH_2PO_4 كل على انفراد ثم مزج 51 مل من محلول الأول مع 49 مل من محلول الثاني للحصول على التركيز 1.01 مولاري وتم قياس دالة الحامضية و كانت pH = 7 (الياسري واخرون ، 2016).

3.2.8. العدوى الميكانيكية :

تم سحق (1 غم) من أوراق نبات خيارالمصاب مع 4 مل من محلول دارئ الاستخلاص الفوسفاتي المبرد ثم مرر العصير المستخلص من خلال طبقتين من الشاش ثم وزع على أنابيب ابندروف وحفظها لحين الاستعمال . مسحت أوراق نباتات الاختبار باللقاح الفايروسي بعد تعفيرها بمادة الكاربوراندم 600 مش (الياسري واخرون ،2016) ، ثم غسلت النباتات الملقحة بالماء بعد 1 -2 دقيقة من العدوى .

3.2.9. تعقيم التربة لاستخدامها في التجربة الحقلية :

تم خلط التربة مع البتموس بنسبة 1:2 ثم استخدم (2 مل) من الكحول الاثيلي تركيز 70 % للتعقيم لكل كيلو غرام من التربة ثم قلبت التربة وتم تغطيتها بالنايلون لمدة يومين بعدها كشفت التربة وقلّبت للتخلص من الكحول وتركت تحت الشمس لمدة يومين ، ليتطاير كل الكحول الموجود ثم وزعت على الأكياس المخصصة للزراعة ، التي بحجم 5 كيلو للزراعة فيها لاحقا (الياسري واخرون ، 2016) .

3.2.10. التجارب الحقلية :

أجريت هذه التجارب في احد مشاتل مديرية الزراعة في النجف الاشرف بتاريخ 8- 3- 2021 ولغاية 15- 6 -2021 وتضمنت هذه التجربة عاملين وسبعة معاملات لكل عامل بثلاثة مكررات على وفق تصميم القطاعات RCBD وتمت الزراعة بأكياس بلاستيكية سعة 5 كيلو و تربة معقمة . (حدثت اصابة للنباتات بحشرة الذبابة البيضاء لذا تم مكافحتها باستعمال المبيد فيرتمك vertimec من شركة syngenta) .

3.2.10.1. اختبار فاعلية غمر بذور نبات الخيار لمدة 30 دقيقة ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة ضد الاصابة الفايروسية :

تضمنت التجربة عاملين (نباتات سليمة ، نباتات ملقحة بالفايروسات) وسبعة معاملات وبثلاث مكررات :

أ- معاملات العامل الاول :

1- بذور غمرت بالماء ثم زُرعت.

2- بذور غمرت بالبكتريا *B. amyloliquefaciens* بكثافة عددية 2.2×10^{11} وحدة تكوين مستعمرة / مل ثم زرعت.

3- بذور غمرت بمحلول الميلاتونين Melatonin بتركيز 1.8 ملغم . لتر$^{-1}$ ثم زرعت.

4- بذور غمرت بمحلول الكيتوسان Chitosan بتركيز 25 ملغم . لتر$^{-1}$ ثم زرعت.

5- بذور غمرت بخليط من البكتريا *B. amyloliquefaciens* بكثافة عددية 2.2×10^{11} وحدة تكوين مستعمرة / مل و محلول الميلاتونين Melatonin بتركيز 1.8 ملغم . لتر$^{-1}$ ثم زرعت.

6- بذور غمرت بخليط من البكتريا *B. amyloliquefaciens* بكثافة عددية 2.2×10^{11} وحدة تكوين مستعمرة / مل و محلول الكيتوسان Chitosan بتركيز 25ملغم . لتر$^{-1}$ ثم زرعت.

7- بذور غمرت بخليط من بمحلول الكيتوسان Chitosan بتركيز 25 ملغم . لتر$^{-1}$ و محلول الميلاتونين Melatonin بتركيز 1.8 ملغم . لتر$^{-1}$ ثم زرعت.

ب- نباتات ملقحة بالفايروس:

1- بذور غمرت بالماء و زرعت ولقحت بمستخلص من نبات خيار ظاهر عليه أعراض الموزائيك الشديد بعمر 6-8 أوراق .

2- بذور غمرت بالبكتريا *B. amyloliquefaciens* بكثافة عددية 2.2×10^{11} وحدة تكوين مستعمرة / مل ثم زرعت ، بعدها لقحت النباتات بمستخلص النبات المصاب بعمر6-8 أوراق.

3- بذور غمرت بمحلول الميلاتونين Melatonin بتركيز 1.8 ملغم . لتر$^{-1}$ ثم زرعت ، بعدها لقحت النباتات بمستخلص النبات المصاب بعمر6-8 أوراق.

4- بذور غمرت بمحلول الكيتوسان Chitosan بتركيز 25 ملغم . لتر$^{-1}$ ثم زرعت ، بعدها لقحت النباتات بمستخلص النبات المصاب بعمر6-8 أوراق.

5- بذور غمرت بخليط من البكتريا *B. amyloliquefaciens* بكثافة عددية 2.2×10^{11} وحدة تكوين مستعمرة / مل و محلول الميلاتونين Melatonin بتركيز 1.8 ملغم . لتر$^{-1}$ ثم زرعت بعدها لقحت النباتات بمستخلص النبات المصاب بعمر6-8 أوراق.

6- بذور غمرت بخليط من البكتريا *B. amyloliquefaciens* بكثافة عددية 2.2×10^{11} وحدة تكوين مستعمرة / مل و بمحلول الكيتوسان Chitosan بتركيز 25 ملغم . لتر$^{-1}$ ثم زرعت ، بعدها لقحت النباتات بمستخلص النبات المصاب بعمر6-8 أوراق.

7- بذور غمرت بخليط من بمحلول الكيتوسان Chitosan بتركيز 25 ملغم . لتر$^{-1}$ ومحلول الميلاتونين Melatonin بتركيز 1.8 ملغم . لتر$^{-1}$ ثم زرعت بعدها ، لقحت النباتات بمستخلص النبات المصاب بعمر6-8 أوراق.

سجلت النتائج بأخذ نسبة الاصابة وشدتها والاطوال للمجموعين الجذري والخضري ، وكذلك الاوزان الطرية ، والجافة للمجموعين الجذري ، والخضري ونسبة الكلوروفيل ومساحة الورقة والعناصر NPK وعدد الثمار ووزنها .

3.2.10.2. اختبار فاعلية سقي نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة ضد الاصابة الفايروسية :

تضمنت التجربة عاملين (نباتات سليمة ، نباتات ملقحة بالفايروسات) وسبعة معاملات وبثلاث مكررات :

أ- نباتات سليمة

1. سقي نباتات المقارنة غير الملقحة المزروعة في تربة معقمة 100 مل من الماء فقط .

2. اضافة 100 مل من البكتريا *B. amyloliquefaciens* بكثافة عددية 2.2 ×10^{11} وحدة تكوين مستعمرة / مل والمجهزة بشكل مزرعة سائلة على وسط PSB لجذور نباتات الخيار ، التي بعمر 4-5 أوراق و المزروعة في تربة معقمة ثم كررت الاضافة نفسها بعد ثلاثة أيام.
3. اضافة 100 مل من محلول الميلاتونين Melatonin بتركيز 1.8 ملغم . لتر$^{-1}$ لجذور نباتات الخيار ، التي بعمر 4-5 أوراق و المزروعة في تربة معقمة ثم كررت الاضافة نفسها بعد ثلاثة أيام.
4. اضافة 100 مل من محلول الكيتوسان Chitosan تركيز25 ملغم . لتر$^{-1}$ لجذور نباتات ، التي بعمر 4-5 أوراق و المزروعة في تربة معقمة ثم كررت الاضافة نفسها بعد ثلاثة أيام.
5. اضافة خليط متكون من 50 مل من البكتريا *B. amyloliquefaciens* بكثافة عددية 2.2 ×10^{11} وحدة تكوين مستعمرة / مل و50 مل محلول الميلاتونين بتركيز 1.8 ملغم . لتر$^{-1}$ لجذور نباتات الخيار ، التي بعمر 4-5 أوراق و المزروعة في تربة معقمة ثم كررت الاضافة نفسها بعد ثلاثة أيام.
6. اضافة خليط متكون من 50 مل من البكتريا *B. amyloliquefaciens* بكثافة عددية 2.2 ×10^{11} وحدة تكوين مستعمرة / مل و50 مل الكيتوسان Chitosan بتركيز 25 ملغم . لتر$^{-1}$ لجذور نباتات الخيار، التي بعمر 4-5 أوراق ، والمزروعة في تربة معقمة ، ثم كررت الاضافة نفسها بعد ثلاثة أيام.
7. اضافة خليط متكون من 50 مل من بمحلول الكيتوسان Chitosan بتركيز 25 ملغم . لتر$^{-1}$ و50 مل من محلول الميلاتونين Melatonin بتركيز 1.8 ملغم . لتر$^{-1}$ لجذور نباتات الخيار ، التي بعمر 4-5 أوراق و المزروعة في تربة معقمة ثم كررت الاضافة نفسها بعد ثلاثة أيام.

ب- نباتات ملقحة بالفايروس:

1. سقي نباتات مزروعة في تربة معقمة بالماء فقط ثم لقحت بمستخلص من نبات خيار ظاهرة عليه أعراض الموزائيك الشديد بعمر 6-8 أوراق.
2. اضافة 100 مل من البكتريا *B. amyloliquefaciens* بكثافة عددية 2.2 ×10^{11} وحدة تكوين مستعمرة / مل والمجهزة بشكل مزرعة سائلة على وسط PSB لجذور نباتات الخيار ، التي بعمر 4-5 أوراق و المزروعة في تربة معقمة ثم كررت الاضافة نفسها بعد ثلاثة أيام وبعد الاضافة الاخيرة بثلاثة أيام لقحت النباتات بمستخلص النبات المصاب بعمر6-8 أوراق.
3. إضافة 100 مل من محلول الميلاتونين Melatonin بتركيز 1.8 ملغم . لتر$^{-1}$ لجذور نباتات الخيار ، التي بعمر 4-5 أوراق و المزروعة في تربة معقمة ثم كررت الاضافة

نفسها بعد ثلاثة أيام وبعد الاضافة الاخيرة بثلاثة أيام لقحت النباتات بمستخلص النبات المصاب بعمر6-8 أوراق.

4. اضافة 100 مل من محلول الكيتوسان Chitosan بتركيز 25 ملغم . لتر$^{-1}$ لجذور نباتات ، التي بعمر 4-5 أوراق و المزروعة في تربة معقمة ثم كررت الاضافة نفسها بعد ثلاثة أيام وبعد الاضافة الاخيرة بثلاثة أيام لقحت النباتات بمستخلص النبات المصاب بعمر6-8 أوراق.
5. إضافة خليط متكون من 50 مل من البكتريا *B. amyloliquefaciens* بكثافة عددية 2.2 ×10^{11} وحدة تكوين مستعمرة / مل و50 مل محلول الميلاتونين بتركيز 1.8 ملغم . لتر$^{-1}$ لجذور نباتات الخيار ، التي كانت بعمر 4-5 أوراق و المزروعة في تربة معقمة ثم كررت الاضافة نفسها بعد ثلاثة أيام وبعد الاضافة الاخيرة بثلاثة أيام لقحت النباتات بمستخلص النبات المصاب بعمر6-8 أوراق.
6. اضافة خليط متكون من 50 مل من البكتريا *B. amyloliquefaciens* بكثافة عددية 2.2 ×10^{11} وحدة تكوين مستعمرة / مل و50 مل الكيتوسانChitosan بتركيز25 ملغم . لتر$^{-1}$ لجذور نباتات الخيار ، التي بعمر 4-5 أوراق و المزروعة في تربة معقمة ثم كررت الاضافة نفسها بعد ثلاثة أيام وبعد الاضافة الاخيرة بثلاثة أيام لقحت النباتات بمستخلص النبات المصاب بعمر6-8 أوراق.
7. اضافة خليط متكون من 50 مل من محلول الكيتوسان Chitosan بتركيز 25 ملغم . لتر$^{-1}$ و50 مل من محلول الميلاتونين Melatonin بتركيز 1.8 ملغم . لتر$^{-1}$ لجذور نباتات الخيار ، التي بعمر 4-5 أوراق و المزروعة في تربة معقمة ثم كررت الاضافة نفسها بعد ثلاثة أيام وبعد الاضافة الاخيرة بثلاثة أيام لقحت النباتات بمستخلص النبات المصاب بعمر6-8 أوراق.

سجلت النتائج لنسبة الاصابة وشدتها والاطوال للمجموعين الجذري ، والخضري وكذلك الأوزان الطرية ، والجافة للمجموعين الجذري ، والخضري ، ونسبة الكلوروفيل ، ومساحة الورقة والعناصر NPK وعدد الثمار ووزنها .

3.2.10.3. اختبار فاعلية رش نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة ضد الاصابة الفايروسية :

تضمنت التجربة عاملين (نباتات سليمة ، نباتات ملقحة بالفايروسات) وسبعة معاملات وبثلاث مكررات :

أ- نباتات سليمة

1. رش نباتات المقارنة غير الملقحة المزروعة في تربة معقمة بالماء فقط .
2. رشّت نباتات الخيار ، التي بعمر 4-5 أوراق و المزروعة في تربة معقمة بـ 30 مل من البكتريا *B. amyloliquefaciens* بكثافة عددية 2.2×10^{11} وحدة تكوين مستعمرة / مل والمجهزة بشكل مزرعة سائلة على وسط PSB ثم كرر الرش بعد ثلاثة أيام.
3. رشّت نباتات الخيار ، التي بعمر 4-5 أوراق ، و المزروعة في تربة معقمة بـ 30 مل من محلول الميلاتونين Melatonin بتركيز 1.8 ملغم . لتر$^{-1}$ ثم كرر الرش بعد ثلاثة أيام.
4. رشّت نباتات الخيار ، التي بعمر 4-5 أوراق و المزروعة في تربة معقمة بـ 30 مل من محلول الكيتوسان Chitosan بتركيز 25 ملغم . لتر$^{-1}$ ثم كرر الرش بعد ثلاثة أيام.
5. رشّت نباتات الخيار ، التي بعمر 4-5 أوراق و المزروعة في تربة معقمة بخليط مكون من 15 مل من البكتريا *B. amyloliquefaciens* بكثافة عددية 2.2×10^{11} وحدة تكوين مستعمرة / مل و15 مل محلول الميلاتونين Melatonin بتركيز 1.8 ملغم . لتر$^{-1}$ ثم كرر الرش بعد ثلاثة أيام.
6. رشّت نباتات الخيار ، التي بعمر 4-5 أوراق و المزروعة في تربة معقمة بخليط مكون من 15 مل من البكتريا *B. amyloliquefaciens* بكثافة عددية 2.2×10^{11} وحدة تكوين مستعمرة / مل و15 مل محلول الكيتوسان Chitosan بتركيز 25 ملغم . لتر$^{-1}$ ثم كررالرش بعد ثلاثة أيام.
7. رشّت نباتات الخيار ، التي بعمر 4-5 أوراق و المزروعة في تربة معقمة بخليط مكون من 15 مل من بمحلول الكيتوسان Chitosan بتركيز 25 ملغم . لتر$^{-1}$ و15 مل من محلول الميلاتونين Melatonin بتركيز 1.8 ملغم . لتر$^{-1}$ ثم كررالرش بعد ثلاثة أيام.

ب – نباتات ملقحة بالفايروس :

1. لقحت نباتات مزروعة في تربة معقمة بمستخلص من نبات خيار ظاهرة عليه أعراض الموزائيك الشديد بعمر 6-8 أوراق .
2. رشّت نباتات الخيار ، التي بعمر 4-5 أوراق و المزروعة في تربة معقمة بـ 30 مل من البكتريا *B. amyloliquefaciens* بكثافة عددية 2.2×10^{11} وحدة تكوين مستعمرة / مل والمجهزة بشكل مزرعة سائلة على وسط P.S.B ثم كرر الرش بعد ثلاثة أيام وبعد الاضافة الاخيرة بثلاثة أيام لقحت النباتات بمستخلص النبات المصاب بعمر6-8 أوراق.
3. رشّت نباتات الخيار ، التي بعمر 4-5 أوراق و المزروعة في تربة معقمة بـ 30 مل من محلول الميلاتونين Melatonin بتركيز 1.8 ملغم . لتر$^{-1}$ ثم كرر الرش بعد ثلاثة أيام وبعد الاضافة الاخيرة بثلاثة أيام لقحت النباتات بمستخلص النبات المصاب بعمر6-8 أوراق.
4. رشّت نباتات الخيار ، التي بعمر 4-5 أوراق و المزروعة في تربة معقمة بـ 30 مل من محلول الكيتوسان Chitosan بتركيز 25 ملغم . لتر$^{-1}$ ثم كرر الرش بعد ثلاثة أيام وبعد الاضافة الاخيرة بثلاثة أيام لقحت النباتات بمستخلص النبات المصاب بعمر6-8 أوراق.
5. رشّت نباتات الخيار، التي بعمر 4-5 أوراق و المزروعة في تربة معقمة بخليط مكون من 15 مل من البكتريا *B. amyloliquefaciens* بكثافة عددية 2.2×10^{11} وحدة تكوين مستعمرة / مل و15 مل محلول الميلاتونين Melatonin بتركيز 1.8 ملغم . لتر$^{-1}$ ثم كرر الرش بعد ثلاثة أيام وبعد الاضافة الاخيرة بثلاثة أيام لقحت النباتات بمستخلص النبات المصاب بعمر6-8 أوراق.
6. رشّت نباتات الخيار ، التي بعمر 4-5 أوراق و المزروعة في تربة معقمة بخليط مكون من 15 مل من البكتريا *B. amyloliquefaciens* بكثافة عددية 2.2×10^{11} وحدة تكوين مستعمرة / مل و15 مل بمحلول الكيتوسان Chitosan بتركيز 25 ملغم . لتر$^{-1}$ ثم كرر الرش بعد ثلاثة أيام وبعد الاضافة الاخيرة بثلاثة أيام لقحت النباتات بمستخلص النبات المصاب بعمر6-8 أوراق..
7. رشّت نباتات الخيار ، التي بعمر 4-5 أوراق و المزروعة في تربة معقمة بخليط مكون من 15 مل من بمحلول الكيتوسان Chitosan بتركيز 25 ملغم . لتر$^{-1}$ و15 مل من محلول الميلاتونين Melatonin بتركيز 1.8 ملغم . لتر$^{-1}$ ثم كرر الرش بعد ثلاثة أيام وبعد الاضافة الاخيرة بثلاثة أيام لقحت النباتات بمستخلص النبات المصاب بعمر6-8 أوراق.

سجلت النتائج وحسبت نسبة الاصابة وشدتها والأطوال للمجموعين الجذري ، والخضري ، وكذلك الاوزان الطرية ، والجافة للمجموعين الجذري ، والخضري ، ونسبة الكلوروفيل ومساحة الورقة والعناصر NPK وعدد الثمار ووزنها .

3.2.11. تقدير النسبة المئوية لإصابة نباتات الخيار بالفايروس :

تم حساب نسبة الاصابة لكل معاملة ملقحة بمستخلص النبات المصاب من خلال المعادلة الآتية :

% للاصابة = عدد النباتات المصابة / العدد الكلي للنباتات المزروعة × 100% . (الياسري واخرون ،2016).

3.2.12. قياس شدة الاصابة الفايروسية للتجربة ومتابعة الأعراض :

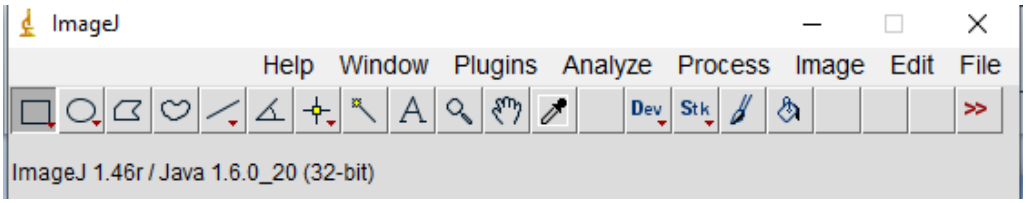
تمت مراقبة تطور الأعراض وشدتها على النباتات الملقحة وتم تقيمها على أساس مدرج من 10 درجات لتطور الأعراض الظاهرة عليها كالآتي :

جدول (3.4) دليل تطور الأعراض لنباتات خيار ظاهرة عليها أعراض الموزائيك الشديد

صورة الاعراض	درجة الاصابة	وصف الاعراض	% شدة الاصابة
	0	نبات سليم	0
	2	موزائيك خفيف (تحلل الكلوروفيل بنسبة بسيطة)	20
	4	موزائيك شديد (تحلل الكلوروفيل بنسبة شديدة)	40
	6	موزائيك شديد (تحلل الكلوروفيل بنسبة شديدة) وتجعد الأوراق	60
	8	موزائيك شديد (تحلل الكلوروفيل بنسبة شديدة) و وتجعد شديد الأوراق وصغر حجمها	80
	10	موزائيك شديد (تحلل الكلوروفيل بنسبة شديدة) وتجعد الأوراق وصغر حجمها مع تشوهها وتقزم النبات	100

% شدة الاصابة = (عدد النباتات × درجة اصابتها / العدد الكلي للنباتات المفحوصة × اعلى درجة اصابة في السلم) × 100%

3.2.13. تقدير مساحة أوراق نباتات التجارب الحقلية باستخدام برنامج Image J



شكل (3.3) واجهة برنامج Image J

تم تقدير مساحة الأوراق من خلال اختيار أوراق عشوائية لجميع المعاملات (بواقع 3 مكررات للمعاملة الواحدة)

1- ثبتت الورقة النباتية المراد قياس مساحتها على ورقة A4 وكتابة رمز المعاملة لتعريفها وبجانبها مسطرة وتم مسحها ضوئيا بجهاز Scanner وحفظ الصورة.

2- فتح برنامج Image J ومن قائمة File ثم open تم اختيار صورة الورقة المؤخوذة سابقا .

3- نضغط على ايقونة وحدد على المسطرة الموجودة في الصورة cm واحد أوأكثر ثم االذهاب إلى Analyze واختيار set scale ظهرت نافذة كتبت عدد السنتمترات ، التي تم تحديدها على المسطرة في مربع known distance وكتبت وحدة cm في المربع unit of length وحدد Global ثم OK.

4- نضغط على ايقونة وحددت الورقة النباتية في الصورة .

5- من قائمة Edit تم اختيار clear outside ومن ثمّ تم ازالة الخلفية لصورة الورقة النباتية .

6- من قائمة image تم اختيار Adjust ثم color threshold ظهرت نافذة تحتوي عدة مؤشرات نحرك يمينا ويسارا لتحديد الورقة النباتية لتصبح باللون الأحمر أو الأسود ثم select.

7- من قائمة Analyze تم اختيار Measure تظهرنافذة Results تحتوي على مساحة الورقة Area (Cosmulescu واخرون، 2020) .

3.2.14. تقدير نسبة الكلوروفيل الكلية في أوراق نباتات التجارب الحقلية بعد 14 يوما من ظهور الأعراض الفايروسية :

تم تقدير الكلوروفيل للمعاملات في مختبر مديرية الزراعة في النجف بأخذ أوراق عشوائية من ثلاث مكررات لكل معاملة ثم وزن 1غم من الأوراق الغضة ، وتم سحقها بالهاون الخزفي مع 10 مل من الأسيتون ثم اخذ الراشح وترك الراسب ، ووضعت في أنابيب اختبار مع تعليم كل معاملة بعدها تمت معايرة لجهاز الطيف الضوئي (UV- Visible Spectrophotometer) بوضع كمية من الاسيتون في الخلية الزجاجية للجهاز بعدها نقل المستخلص لكل مكرر للمعاملات المختلفة كلا على حدة ، وأُخذت الخلية الزجاجية للجهاز، وأخذت القراءات للاطوال الموجية 663 و645 بعدها تم حساب كمية الكلوروفيل على وفق المعادلة الآتية :

تركيز الكلوروفيل = 20.2 ×(قراءة االجهاز بطول موجي 645 nm) + 8.02 (قراءة االجهاز بطول موجي 663 nm) ×(حجم المستخلص / 1000× وزن عينة الورقة المؤخوذة) (زغير ، 2021) .

3.2.15. تقدير نسب محتوى نباتات التجارب الحقلية من العناصر الكبرى NPK بعد 14 يوماً من ظهور الأعراض الفايروسية :

أجريَ تحليل العناصر من قبل مختبر فدك المركزي للتحليلات التابع للعتبة العلوية المقدسة وكما يأتي :

3.2.15.1. هضم العينات النباتية المراد اختبار نسب العناصر الكبرى NPK فيها بطريقة حامض الكبريتيك مع السيلينيوم :

1- أخذت عينات من أوراق نباتات التجربة الناضجة بعد 14 يوما من ظهور الأعراض الفايروسية ووضعت في أكياس ورقية وتركت مفتوحة لتجف لمدة 48 ساعة
2- اخذ 0.5 غم من العينات الجافة ، والمطحونة ، والمنخولة ووضعت في أنبوبة الهضم ، ثم أضيف لها 10 مل من حامض الكبريتيك المركز على دفعتين لتجنب الفوران .
3- ثم أضيف له 1 غم من مساعد الهضم , Selenium reagent mixture: 1.6% $CuSO_4$ 96.8% Na2SO4 وخلط المزيج وترك لليوم التالي .
4- وضعت أنابيب الهضم بجهاز الهضم بدرجة حرارة 150 مه لمدة نصف ساعة ، ثم رفعت الحرارة إلى 380 مه لمدة ثلاث ساعات ، ثم اخرج انبوب الهضم وترك ليبرد وهنا يجب ان تكون لون العينة شفافاً او أصفر فاتح .

5- أضيف لـه القليل من المـاء المقطر وحرك ببطـئ ثم أكمل الحجم إلـى 100 مل بالمـاء المقطر . (الزعبي واخرون ، 2013) .

3.2.15.2. تقـدير النسـبة المئويـة لعنصـر النتـروجين N الكلـي فـي أوراق نباتـات التجارب الحقلية (بجهاز كلدال Kheldal) :

1- تم هضم العينة بالطريقة المذكورة اعلاه.

2- رشح المحلول الناتج من عملية الهضم كاملا ووضع في دورق سعة 100 مل ، وأكمل الحجم بالماء المقطر .

3- لتقدير نظامية H_2SO_4 0.01 ، وذلك باستخدام جهاز المعايرة الآلي حيث اخذ حجم 10 مل ، من محلول Tris 0.01 النظامي وتم قياس درجة الحموضة pH لها لتكون 5 وتحسب نظامية H_2SO_4 :

عيارية حامض الكبريتيك = (عيارية محلول Tris / حجم حامض الكبريتيك المستخدم للمعايرة)×10

4- وضع 1 مل من محلول حامض البوريك H_3BO_3 المشبع المضاف له صبغة Bromocrecol green و1 مل من الماء المقطر في طبق التبخير، ثم وضع الطبق تحت رأس انبوب المكثف بحيث يلامس المحلول.

5- أخذ 10 مل من العينة المهضومة بواسطة ماصة ، ثم وضعت في دورق التقطير سعة 100 مل ، ثم أضيف له 10 مل من محلول NaOH النظامي .

6- ثم أوصل دورق التقطير مع المحلول إلى وحدة التقطير وتم البدء بعملية التقطير .

7- بعد 4 دقائق جمع 35 مل من المادة المقطرة تم ايقاف عملية التقطير وغسل رأس المكثف بقليل من الماء المقطرالى طبقة التبخير .

8- وباستخدام جهاز المعايرة الآلي تم معايرة المادة المقطرة بمحلول H_2SO_4 0.01 نظامي إلى درجة حموضة pH بلغت 5 .

9- ثم وضع في طبق التبخير 5 مل من محلول H_3BO_3 مع الكاشف المختلط (0.5 غم من بروم كريزول الاخضرو0.1 غم من أحمر مثيل في 100 مل من الايثانول 95%).

10- تم اجراء عملية التقطير وجمع 35-40 مل من المحلول المقطر .

11- تم غسل رأس المكثف إلى طبق التبخير ثم تمت المعايرة بحامض H_2SO_4 0.01 نظامي حتى تحول اللون الأخضر إلى اللون الوردي الفاتح .

12- تم حساب عنصر النتروجين من خلال المعادلة (الزعبي واخرون ، 2013) :

N% = (حجم H_2SO_4 المستخدم لمعايرة العينة – حجم الحامض المستخدم للشاهد) × عيارية الحامض × حجم محلول الهضم / حجم السحب × وزن العينة ×1000) ×100×14

3.2.15.3. تقدير النسبة المئوية لعنصر الفسفورP الكلي في أوراق نباتات التجارب الحقلية (بجهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer):

1. تم هضم العينة الطريقة بنفسها المذكورة اعلاه.
2. حضر محلول فوسفات قياسي بتركيز 50 ملغم / لتر فسفور حيث ذوب 0.2196 غم من KH_2PO_4 المجفف بدرجة حرارة 105 مه لمدة ساعة إلى القليل من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى اللتر ، ثم حضر منه محاليل قياسية (0.5 ، 1 ،1.5، 2 ، 2.5) ملغم / لتر
3. حضر كاشف باترون :

أ- من اذابة 25 غم من مولبيدات الامونيوم H_2O 4. $(NH_4)6MO_7O_{24}$ في 400 مل ماء مقطر مسخن بدرجة 50 مه ثم ترك ليبرد.

ب- ذوب 1.25 غم من فاندات الامونيوم (NH_4VO_3) في 300 مل ماء مقطر مغلي ، ثم ترك ليبرد بعدها نقل إلى الى دورق سعة 1000 مل .

ت- أضيف لها بحذر250 مل من حامض الآزوت ثم أضيف محلول مولبيدات الامونيوم ببطئ وحرك المزيج وأكمل الحجم إلى لتر بالماء المقطر.

4. وضع 5 مل من العينة المهضومة في دورق سعة 50 مل ثم أضيف لها 20 مل من الماء المقطر ثم أضيف 5 مل من كاشف بارتون (محلول مولبيدات فاندات الامونيوم) ، وتم مزجها جيدا ثم أكمل الحجم بالماء المقطر.
5. ترك المزيج لمدة 30 دقيقة لتصل شدة اللون إلى أقصاها بحسب درجة الحموضة ، فاذا كانت 0.2 عياري فاللون لا يتشكل ، أما اذا كانت 0.6 عياري فاللون يتشكل ببطئ ، والتركيز المناسب هو 0.5 عياري .
6. حضر الشاهد والمحاليل القياسية وتم معاملتهم معاملة العينة.
7. تم قراءة شدة اللون الاصفر للشاهد والمحاليل القياسية والعينات على جهاز Spectrophotometer على طول موجي 430 نانومتر .
8. تم رسم خط بياني بين قراءات الامتصاص الضوئي وتراكيز الفسفور في المحاليل القياسية وتم حساب نسبة الفسفور من خلال المعادلات (الزعبي واخرون ، 2013) :

P ملغم/ كغم = (وزن العينة)/(التركيز من المنحنى × حجم المحلول الكلي)

P% = (وزن العينة × 10000)/(التركيز من المنحني × الحجم للمحلول الكلي).

3.2.15.4. تقدير النسبة المئوية لعنصر البوتاسيومK الكلي في أوراق نباتات التجارب الحقلية (بجهاز اللهب الضوئي FLAME Photometer) :

1. وزن 0.2 غم من العينة المجففة والمطحونة وتم هضمها بالطريقة المذكورة في فقرة هضم العينات النباتية.
2. ذوب 1.91 غم من كلوريد البوتاسيوم KCl المجفف على درجة حرارة 105 مه في دورق سعة 1000 مل بالماء المقطر وأكمل الحجم إلى اللتر.
3. اخذ من المحلول المجهز 2 ،4 ،6 ،8 ،10 ،15 ،20 مل أضيفت إلى دوارق سعة 100 مل، وتم اكمال احجامها بمحلول اسيتات الامونيوم وبذلك تم الحصول على التراكيز 20 ،40 ،60 ،80 ،100 ،150 ،200 ملغم / لتر .
4. رشحت محاليل العينات ونقلت إلى دوارق سعة 100 مل وأكملت احجامها إلى 100 مل بالماء المقطر .
5. تم قراءة المحاليل بجهاز التحليل الطيفي باللهب Flame Photometer وتم حساب نسب البوتاسيوم الكلي من خلال المعادلة (الزغبي واخرون ، 2013) :

K% = (وزن العينة × 10000)/(التركيز من المنحني × الحجم للمحلول الكلي) .

3.2.16. حساب الربح المتحقق لنتائج المعاملات المطبقة حقليا على محصول الخيار المزروع في مساحة دونم واحد (2500م^2) :

عدد الخطوط في الدونم = طول الدونم / المسافة بين الخطوط

= 50 م / 1 م

= 50 خط

عدد النباتات بالخط الواحد = طول الدونم / المسافة بين النباتات

= 50 م / 0.4 م

= 125 نبات

عدد النباتات الكلي في الدونم = عدد الخطوط × عدد النباتات بالخط الواحد

= 50 × 125

= 6250 نبات.

3.2.16.1. حاصل غمر بذور الخيار بالماء فقط لمدة 30 دقيقة قبل الزراعة في مساحة دونم (المقارنة) :

حاصل المقارنة في الدونم = عدد النباتات الكلي في الدونم × وزن حاصل نبات واحد

= 6250 نبات × 0.251 كغم

= 1568.75 كغم

الربح المالي للمقارنة = الوزن الكلي للحاصل في الدونم × سعر الكيلوغرام الواحد

= 1568.75كغم × 1000 دينار عراقي

الربح الصافي للمقارنة = 1,568,750 دينار – 20000 دينار (سعر المبيد + البذور+ البتموس)

= 1548750 دينار عراقي والذي يساوي 1060.42دولار امريكي (حسب سعر صرف الدولار بتأريخ 20 /6 /2021)

3.2.16.2. حساب الربح المتحقق لمعاملة غمر بذور نبات الخيار بالتوليفة المزدوجة المتكونة من بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الميلاتونين :

حاصل افضل معاملة في الدونم = عدد النباتات الكلي في الدونم × وزن حاصل نبات واحد

= 6250 نبات × 0.408 كغم

= 2550كغم

الربح المالي = الوزن الكلي للحاصل في الدونم × سعر الكيلوغرام الواحد

= 2550كغم × 1000 دينار عراقي

= 2550000 دينار عراقي والذي يساوي 1745.98 دولار امريكي

الربح الصافي للمعاملة = 2550000 دينار عراقي – 31000 دينار عراقي

= 2519000 دينار عراقي والذي يساوي 1724.75 دولار امريكي

الربح المتحقق للمعاملة = الربح المالي للمعاملة – الربح المالي للمقارنة

= 1724.75 دولار امريكي - 1060.42دولار امريكي

= 664.33 دولار امريكي

% للأرباح = الربح المتحقق للمعاملة /الربح المالي للمقارنة × 100

= 62.6 %.

3.2.16.3. الربح المتحقق لمعاملة سقي نبات الخيار بالماء فقط (مقارنة) :

حاصل المقارنة في الدونم = عدد النباتات الكلي في الدونم × وزن حاصل نبات واحد

= 6250 نبات × 0.264 كغم

= 1650كغم

الربح المالي للمقارنة = الوزن الكلي للحاصل في الدونم × سعر الكيلوغرام الواحد

= 1650كغم × 1000 دينار عراقي

الربح الصافي للمقارنة = 1650000 دينار – 20000 دينار (سعر المبيد + البذور + البتموس)

= 1630.000 دينار عراقي والذي يساوي 1116.06دولار امريكي(حسب سعر صرف الدولار بتأريخ 20 /6 /2021)

3.2.16.4. الربح المتحقق لمعاملة سقي نبات الخيار بالتوليفة المزدوجة المتكونة من بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الميلاتونين :

حاصل افضل معاملة في الدونم = عدد النباتات الكلي في الدونم × وزن حاصل نبات واحد

= 6250 نبات × 0.41 كغم

= 2562.5كغم

الربح المالي = الوزن الكلي للحاصل في الدونم × سعر الكيلوغرام الواحد

= 2562.5كغم × 1000 دينار عراقي

= 2562500 دينار عراقي

الربح الصافي للمعاملة = 2562500 دينار عراقي – 31000 دينار عراقي (سعر المبيد + الميلاتونين و البكتريا)

= 2531500 دينار عراقي والذي يساوي 1733.31 دولار امريكي

الربح المتحقق للمعاملة = الربح المالي للمعاملة – الربح المالي للمقارنة

= 1733.31 دولار امريكي - 1116.06دولار امريكي

= 617.25 دولار امريكي.

% للأرباح = الربح المتحقق للمعاملة /الربح المالي للمقارنة × 100

% للارباح = 55.3 %.

3.2.16.5. حساب الربح المتحقق لمعاملة رش نبات الخيار بالماء فقط (مقارنة) :

حاصل المقارنة في الدونم = عدد النباتات الكلي في الدونم × وزن حاصل نبات واحد

= 6250 نبات × 0.282 كغم

= 1762.5كغم

الربح المالي للمقارنة = الوزن الكلي للحاصل في الدونم × سعر الكيلوغرام الواحد

= 1762.5كغم × 1000 دينار عراقي

الربح الصافي للمقارنة = 1762500 دينار – 20000 دينار (سعر المبيد + البذور + البتموس)

= 1742500 دينار عراقي والذي يساوي 1193.08دولار امريكي (حسب سعر صرف الدولار بتأريخ 20 /6 /2021)

3.2.16.6. حساب الربح المتحقق لمعاملة رش نبات الخيار بالتوليفة المزدوجة المتكونة من بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الكيتوسان :

حاصل افضل معاملة في الدونم = عدد النباتات الكلي في الدونم × وزن حاصل نبات واحد

= 6250 نبات × 0.392 كغم

= 2450كغم

الربح المالي = الوزن الكلي للحاصل في الدونم × سعر الكيلوغرام الواحد

= 2450كغم × 1000 دينار عراقي

= 2450000 دينار عراقي

الربح الصافي للمعاملة = 2450000 دينار عراقي – 40000 دينار عراقي (سعر المبيد + سعر الكيتوسان والبكتريا)

= 2410000 دينار عراقي والذي يساوي 1650.12 دولار امريكي (حسب سعر صرف الدولار بتأريخ 20 /6 /2021)

الربح المتحقق للمعاملة = الربح المالي للمعاملة – الربح المالي للمقارنة

= 1650.12 دولار امريكي - 1193.08دولار امريكي

= 459.04 دولار امريكي.

% للأرباح = الربح المتحقق للمعاملة /الربح المالي للمقارنة × 100

% للارباح = 38.4 % .

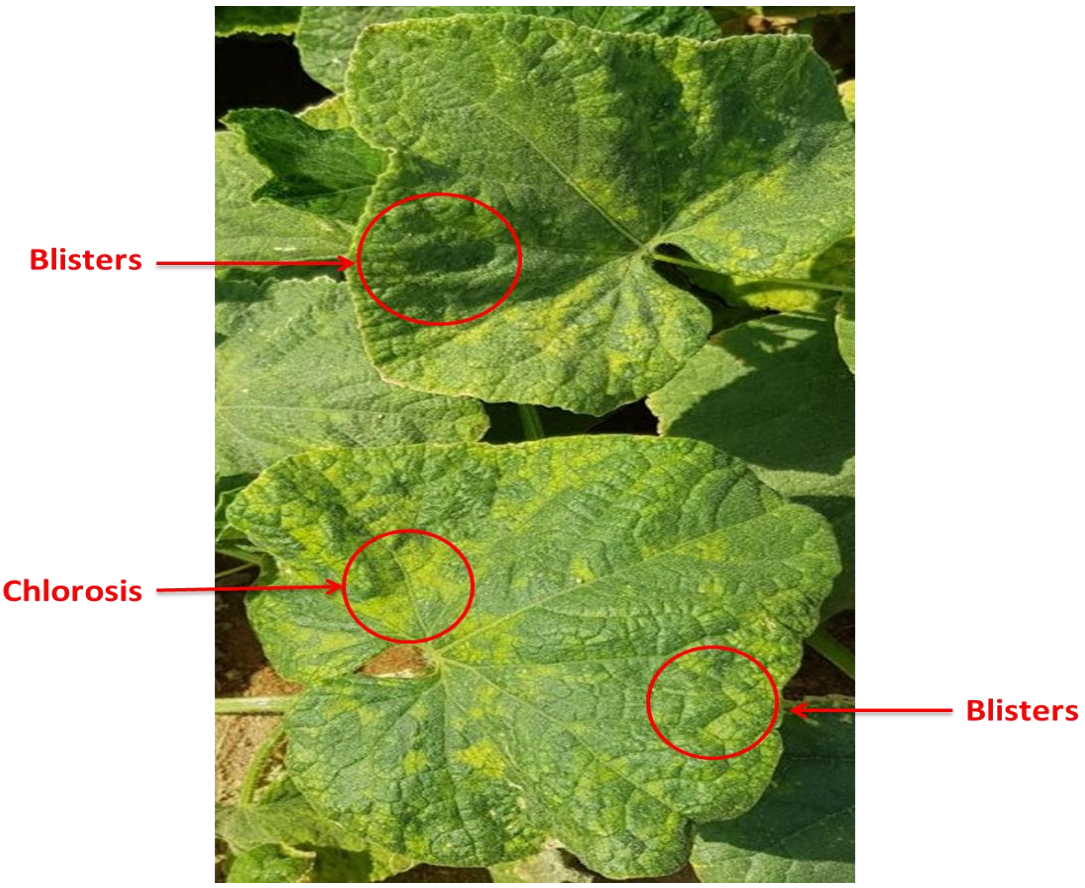
3.2.17. التحليل الاحصائي للبيانات:

حللت نتائج الدراسة للتجارب الحقلية على وفق تصميم القطاعات العشوائية الكاملة حيث كانت التجارب عاملية ذات عاملين ،عدد معاملات العامل الاول اثنين وعدد معاملات العامل الثاني سبعة ، وبثلاث مكررات ، كما حللت النتائج حسب اختبار اقل فرق معنوي LSD عند مستوى احتمال 0.05 لمقارنة النتائج (الراوي وخلف الله ، 2000). واستعمل البرنامج الاحصائي Genstat اصدار 12 والبرنامج Microsoft Excel في تحليل البيانات .

4. النتائج و المناقشة Results and Discussion

4.1. الأعراض المرضية على نبات الخيار المصاب بالفايروسات *Squash vein yellowing virus* isolate SVYV/Iraq و *Tomato leaf curl Palampur virus* isolate Babylon1 :

كانت الأعراض على نباتات الخيار الملقحة بالفايروس كما موضح في الشكل (4.1) أعراض جهازية بلغت بين موزائيك طفيف إلى موزائيك شديد على الأوراق وتجعدها ، وكذلك تقزم النبات وقصر السلاميات ،واعناق الأوراق ، وصغر حجم الأوراق ، وتشوهها وقلة عدد الثمار وصغر حجمها ، كما قللت الاصابة الفايروسية من نسب الكلوروفيل الكلي في الأوراق الملقحة بالفايروس ، وكذلك قللت مستويات عنصري النتروجين N والبوتاسيوم K ولم تؤثر على نسبة الفسفور P في الأوراق النباتية الجافة .



شكل (4.1) الأعراض المرضية على نباتات خيار مصاب باصابة مشتركة بين فايروسات *Squash vein yellowing* virus isolate SVYV/Iraq و *Tomato leaf curl Palampur virus* isolate Babylon1 حيث أن الدائرة تشير إلى أعراض الموزائيك والتجعد.

ترجع أعراض الموزائيك الظاهرة على الأوراق المصابة هو نتيجة الخفض الحاصل في نسب الكلوروفيل الكلي ، حيث أن التحلل الحاصل في صبغة الكلوروفيل بسبب الاصابة الفايروسية يؤثر على معدل البناء الضوئي للنباتات المصابة مما يؤدي إلى ظهور أعراض الأصفرار والموزائيك على الأوراق (شريف ، 2012 ؛ Bhattacharyya و Chakraborty ، 2018).

كما أن الاصابة الفايروسية تدمر صفائح الكرانا ومن ثمّ تؤدي إلى انخفاض مستويات صبغات البناء الضوئي ، وأيضاً انخفاض في سرعة التفاعل الكيموضوئي (الذي يشطر جزيئات الماء إلى اوكسجين حر) ، أويحدث انخفاض في كميات البروتينات المتخصصة ، التي ترتبط بجزيئات النظام الضوئي و من المعروف أن الإصابات الفايروسية تسبب العديد من التغييرات في البلاستيدات الخضراء لتسهيل تضاعف الفايروس وحركته ، فعادةً ما تؤدي العدوى الفايروسية ، التي تسبب الموزائيك ، أوالتبقع في الأوراق إلى زيادة مستويات ROS ، الذي عادة ما ينتج في البلاستيدات الخضراء (قاسم ،2011 و الربيعي ، 2021) .

قد يعود سبب النقص الحاصل في مستويات عنصري النتروجين Nوالبوتاسيوم K في الأوراق النباتية إلى الاصابة الفايروسية (El-Dougdoug واخرون، 2020) . وإن هذا النقص يؤدي إلى تثبيط نمو النبات ، وتقزمه ، وكذلك تحلل صبغة الكلوروفيل كما أنه يسبب زيادة في حساسية النبات تجاه الاصابة بالممرضات. أما سبب عدم تأثير الاصابة الفايروسية في عنصر الفسفور P في النبات رغم أنه مكون اساسي في كل الفايروسات يعود إلى أن الفايروسات تستعمل الفسفور غير الذائب كمكون لبناء نفسها وهذا ما اكدته دراسة بحصول زيادة في كمية الفسفور الفايروسي مع انخفاض في كمية الفسفور غير الذائب في الخلايا (قاسم ،2011) .

قد تكون زيادة الفسفور في الخلايا النباتية هو نتيجة للاصابة الفايروسية ، التي تؤدي إلى زيادة في نشاط انزيم 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGdH) وهو مسلك رئيسي للحصول على فوسفات السكر الخماسي (Ribose - Phosphate) وهو أحد مكونات الاحماض النووية والبروتينات النووية (Mofunanya واخرون ، 2021) . وهذه النتيجة تتفق مع ما ذكره (الفضل ، 1984) حيث وجد أن عنصر الفسفور حصلت فيه زيادة غير معنوية في أوراق النباتات الملقحة بالفايروس .

وقد تكون أعراض التقزّم ، وضعف النبات ، وصغر حجم الأوراق هو نتيجة للتغيرات الهرمونية الحاصلة بسبب الاصابة الفايروسية ، حيث تحصل تغيرات في مستويات الهرمونات النباتية ، ويتم تنسيق هذه التغيرات بإحكام مع الحركة الفيروسية وتضاعف الفايروس وتطور الأعراض ، وكذلك الاستجابات الدفاعية للنبات كما تؤثر الاصابة الفايروسية بشكل عام على أيض

النبات الاولي والثانوي مما يؤدي إلى ظهور الأعراض المرضية قد تصل إلى موت النبات أوأجزاء منه (شريف ،2011).

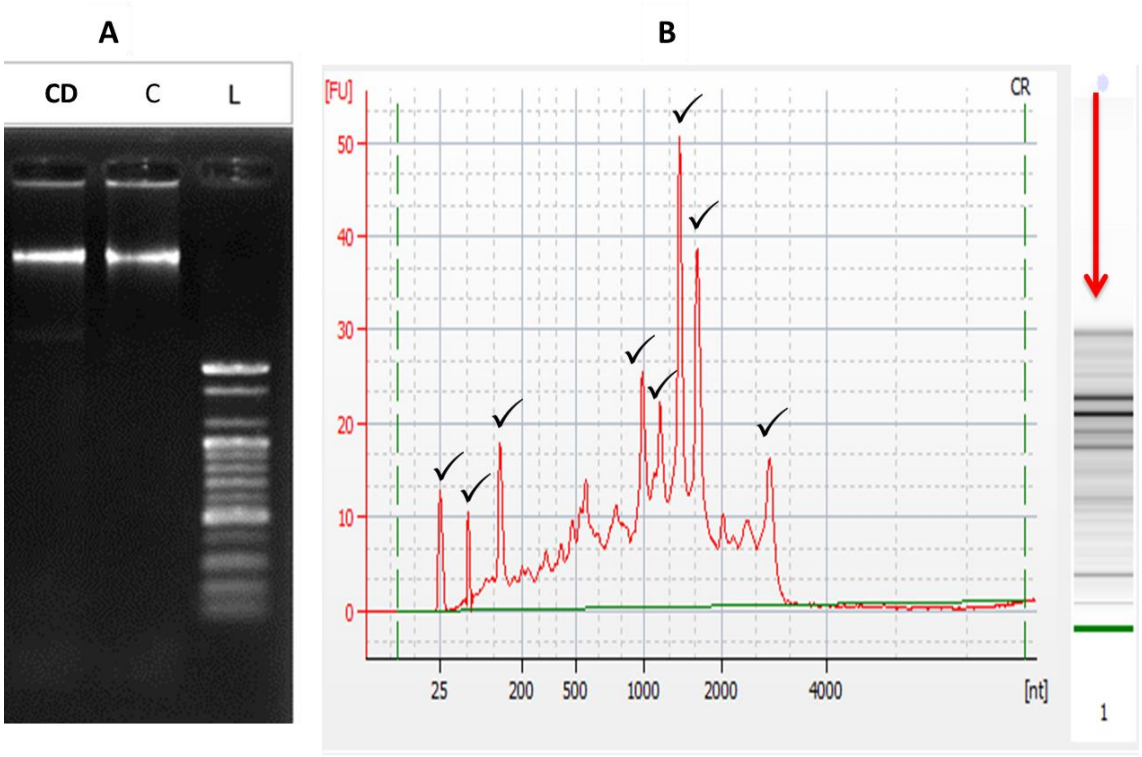
4.2. تقنية تسلسل الجيل القادم (NGS ، Next Generation Sequencing) للاحماض النووية DNA و RNA لنبات خيار مصاب بالفايروسات :

إن نتيجة استخلاص الحامض النووي DNA الكامل من نبات الخيار المصاب صنف Superina (Nickerson Zwaan Holland) كانت بنقاوة 1.88 وتركيز 378.0 نانوغرام / مايكروليتر، أما نتيجة استخلاص الحامض النووي RNA فكانت بنقاوة 2.11 و تركيز 335.4 نانوغرام / مايكروليتر وفي حين كانت سلامة الحامض النووي RNA هي 4.8 . كما موضح في جدول (4.1).

جدول (4.1) قراءة جهاز Nanodrop للأحماض النووية DNA و RNA لنبات الخيار المصاب بالفايروسات isolate SVYV/Iraq *Squash vein yellowing virus* و *Tomato leaf curl Palampur virus* isolate Babylon1.

رمز العينة	نوع الحامض النووي	التركيز نانوغرام / مايكروليتر	280/260	230/260	vol. مايكروليتر الحجم	RIN
CD	DNA	378.0	1.88	1.82	44	-
CR	RNA	335.4	2.1	2.17	32	4.8

حيث يجب أن تكون نسبة 280/260 ≤ 1.8 فهذه دليل على أن تركيز الحامض النووي أكبر من تركيز البروتينات والملوثات الأخرى ، أما 230/260 ≤ 1.5 وهذا دليل على أن كمية الأملاح في عينة الحامض النووي قليلة (زغير ،2021) . كما إن الترحيل الكهربائي للحامض النووي DNA للعينة المصابة أظهر حزمة في أعلى الهلام ، أما الترحيل الكهربائي للحامض النووي RNA في العينة المصابة فقد أظهرت 10 حزم في هلام الاكاروز ، التي تمثل المنحنيات العشرة في جهاز Bioanalyzer نفسها وهذه تشير إلى أنواع الحامض النووي RNA الموجودة في العينة المصابة ، ومدى تركيزها كما أظهر الجهاز نسبة سلامة الحامض النووي RNA RNA Integrity Number (RIN) ، التي كانت 4.8 هي جيدة لغرض استكمال قراءة التسلسل الكامل للحامض النوويRNA (Sequencing) كما موضح في الشكل (4.2)



شكل (4.2) A- الترحيل الكهربائي للحامض النووي DNA لنبات الخيار المصاب حيث ان:

L هو Ladder ، C هو Control (المقارنة القياسية للشركة الفاحصة) و DNA CD : نبات الخيار .

B- السهم يشير إلى حزم RNA لنبات الخيار المصاب بعد ترحيلهاعلى هلام الاكاروز أما علامة الصح فتشير إلى المنحنيات وعددها ثمانية ، التي تمثل انواع RNA ومدى تركيزها في العينة والممثلة لحزم الحامض النووي RNA في جهاز Bioanalyzer .

إن تحديد تركيز الحامض النووي ونقاوته أمرًا ضروريا لاستكمال قراءة تسلسلات الحامض النووي ، حيث يتم تحديد تركيز الحامض النووي عن طريق قياس امتصاص الأشعة فوق البنفسجية ، وهذا مشتق من قانون بير لامبرت Beer-Lambert ، وهو أن كمية الضوء الممتصة عند 260 نانومتر تتناسب مع تركيز الحامض النووي في المحلول (Koetsier واخرون ،2019) .

أن الأطوال الموجية A260 / A280 تعطي مؤشراً على نقاء الحامض الموجود (DNA أوRNA) حيث يمكن اكتشاف التلوث بالبروتين ،عندما تكون هذه النسبة قليلة ، أما زيادتها فهي دليل على التلوث بالحامض النووي RNA حيث بلغت نسب الأطوال الموجية A260 / A280 للحامض النووي عالي النقاء بين (1.8 – 2.0) بينما الاطوال الموجية A260 / A230 . تعد مؤشر حساس للملوثات التي تمتص عند 230 نانومتروهذه الملوثات أكثر عددًا من تلك التي تمتص عند 280 نانومتر ، وتشمل الأملاح ، منظفات غير أيونية ، الفينول و السكريات ، حيث يجب أن تكون نسبة A260 / 230 أعلى من 1.8 لتأكد من نقاء الحامض النووي (Ong واخرون .2019 ؛ Koetsier واخرون ،2019 ؛ Mubarik واخرون ،2022 ؛ الخفاجي ، 2022) .

إن سلامة الحامض النووي RNA تتمثل بقياس قيمة RIN في العادة بلغت قيمته بين (5-7) إلا أن القيمة 4.7 كانت أيضاً جيدة لاستكمال قراءة التسلسل Sequencing (-Acosta Maspons واخرون ،2019 ؛ الخفاجي ، 2022).

4.3. ربط قراءات التسلسلات الخام للاحماض النووية الكاملة DNA، RNA لعينات نبات الخيار المصاب في برنامج Geneious :

بعد عملية ربط القراءات الخام الأمامية ، والعكسية Pairing Reads في برنامج Geneious كان العدد الكلي للقراءات الخام للحامض النووي DNA هو 89,893,674 قراءة وبطول 151 زوج قاعدة لكل قراءة كما في ملحق (1) وبنسبة مئوية لقواعد الكوانين والسايتوسين GC 37.5 % وهذا يغطي الجينوم الكامل لنبات الخيار، حيث بلغت التغطية 36.99 ، أما العدد الكلي للقراءات الخام للحامض النووي RNA فقد بلغت 53,458,772 قراءة وبطول 101 زوج قاعدة لكل قراءة كما في ملحق (2) ونسبة GC 43.4 % وهذه القراءات تمثل جميع الأنواع الرئيسة للحامض النووي RNA في العينة المختبرة (mRNA ، rRNA و tRNA) .

عند ربط القراءات الأمامية ، والعكسية للقراءات الخام Raw reads تتراصف القراءات الأمامية مع القراءات العكسية المطابقة لها ، وتعد هذه العملية ضرورية لقراءة هذه التسلسلات وتحليلها (العابدي ، 2020؛ زغير، 2021 ؛الخفاجي ، 2022).

إن تقنية تسلسل الجيل التالي NGS والمعلوماتية الاحيائية تكشف عن مسببات الأمراض الفايروسية وتشخصها، فمن خلالها يتم الحصول على القراءات الخام Raw reads ، التي تحوي على كل المواد الوراثية الموجودة في العينة ، ومن ضمنها تسلسلات الفايروسات المرضية. (Massart واخرون ، 2014 ؛ الخفاجي ،2022) .

تمثل النسب المئوية لقواعد الكوانين والسايتوسين GC % الثبات العالي للحامض النووي بسبب الاواصر الهيدروجينية الثلاثية ، التي بلغت النسب الطبيعية لها في جينومات النباتات بين (34 -50) % حيث أنها تدل على استقرار الحامض النووي من التدهور نتيجة ظروف اجهاد مختلفة كدرجات الحرارة العالية وغيرها (Bowers واخرون ، 2022 ؛ الخفاجي ،2022) .

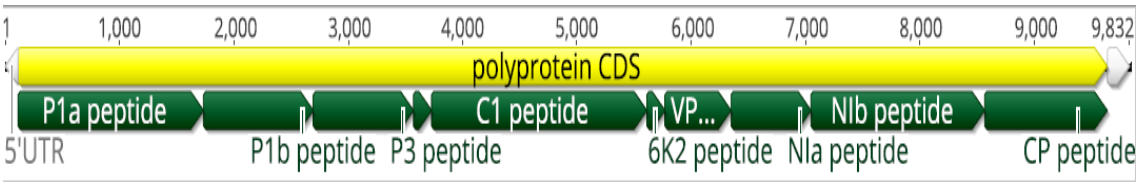
4.4. الكشف عن التسلسلات الكاملة للفايروسات المرضية الموجودة في الجينوم الكامل لنباتات الخيار (DNA، RNA) من خلال برامج المعلوماتية الحياتية :

بعد عملية ربط القراءات الخام بالتسلسل الطويل جدا بطول 13,582,228 bp وهو ناتج من عملية ربط جميع تسلسلات الفايروسات النباتية المسجلة في NCBI والبالغ عددها 5040 فايروس من خلال أداة Map To Reference ، الذي يعد ضروريا لايجاد وتحديد القراءات المطابقة للتسلسل المرجعي بين ملايين القراءات ، فقد كانت عدد القراءات المرتبطة بالقراءات الخام للحامض النووي DNA 1,959,460 قراءة ، أما عدد القراءات المرتبطة بالقراءات الخام للحامض النووي RNA فبلغت 432,666 قراءة ، وهذا يدل على وجود اصابة فايروسية في العينات النباتية المستخلص منها الاحماض النووية نتيجة عدد الارتباطات الكبيرة بين التسلسلات المرجعية والقراءات الخام .

إنّ Map to reference هي أداة تربط قراءات التسلسلات غير المعروفة وتطابقها مع قراءات التسلسلات المعروفة ، وبذلك يمكن معرفة اوجه التشابه بينها وبين التسلسل المرجعي والكشف عن الفايروسات النباتية في العينات المختبرة (العابدي واخرون ،2020 ؛ الخفاجي ، 2022). ومن خلال القراءات المرتبطة بعد فحصها في برنامج BLAST تم الكشف عن وجود مسببين للأعراض المرضية على الخيار وهما :

4.4.1. الكشف عن التسلسل الكامل لعزلة فايروس اصفرار العروق على القرع : *Squash vein yellowing virus isolate SVYV/Iraq*

بعد عملية ربط القراءات الخام Map To Reference للحامض النووي RNA مع التسلسل المرجعي لفايروس اصفرار عروق القرع ، حيث كانت عزلة الكيان الصهيوني (KT721735) هي الأقرب للعزلة المكتشفة وبنسبة تطابق 93.2 % وبذلك تم التأكد من وجود التسلسل الكامل لفايروس اصفرار عروق القرع *Squash vein yellowing virus* (SqVYV) هذا الفايروس يعود إلى عائلة *Potyviridae* جنس *Ipomovirus* وهو ذو نوع حامض نووي RNA ، يحتوي على منطقة مشفرة واحدة تشفر Polyprotein كما في الشكل (4.3) ، وقد سجل الفايروس المشخص في هذه الدراسة في NCBI تحت رقم ادخال (ON229619) كما في الملحق (3) . حيث كانت عدد القراءات الخام للحامض النووي RNA المرتبطة بالتسلسل المرجعي للعزلة الفايروسية هي 196675 قراءة وبطول 9832 زوج قاعدة ونسبة GC كانت 42.3 % وهذا دليل على الفايروس في عينة الخيار المصاب ، ولم يحصل أي ارتباط بين القراءات الخام للحامض النووي DNA والتسلسل المرجعي للعزلة الفايروسية لكون الحامض النووي للفايروس من نوع RNA مما يؤكد مدى دقة النتيجة .



شكل (4.3) الخريطة الوراثية لفايروس اصفرار عروق القرع العزلة العراقية *Squash Vein Yellowing Virus* isolate SVYV/Iraq

إن تقنية NGS التي تعتمد على استخلاص الجينوم الكامل لا تسمح بالتحيز والفرضيات. وهي قادرة على تشخيص العديد من الفايروسات المعروفة وغير المعروفة الموجودة في النباتات المصابة ، فربما تكون أعراض الأمراض غائبة ، أو غير محددة أو تسببها فايروسات متعددة ومن خلال هذه التقنية تم اكتشاف فايروسات جديدة لم تكن معروفة سابقا هي فايروسات *Cytorhabdovirus* (Jones واخرون ، 2017 و Pecman واخرون ، 2017 و Raza و Shahid، 2020) .

وجد أن عدد النيوكليوتيدات الكلي لفايروس SVYV يبلغ 9836 نيوكليوتيدة و يحتوي على اطار قراءة مفتوح واحد (Open Reading Frame ، ORF) يشفر بروتين متعدد polyprotein و الحامض النووي له من النوع RNA موجب مفرد الشريط $ssRNA^+$ والوزن الجزيئي لبروتين الغطاء البروتيني يتراوح بين 41–35 كيلو دالتون (Adkins واخرون ، 2007 ؛ Li واخرون ،2008 ؛ Inoue-Nagata و اخرون ،2022) .

يقتصر المدى العائلي لهذا الفايروس على عائلة القرعيات Cucurbitaceae (في القرع والبطيخ)، واستبعدت الأنواع في عائلات *Amaranthaceae* و *Apocynaceae* و *Asteraceae* و *Chenopodiaceae* و *Fabaceae* و *Malvaceae* و *Solanaceae* (Adkins واخرون ،2007) وأيضاً يصيب بعض الأدغال مثل *Momordica charantia* L. و*Cucumis melo var. dudaim* (L.) Naud (Shrestha واخرون ،2016) .

4.4.2. الكشف عن التسلسل الكامل لعزلة فايروس التفاف أوراق الطماطة البلمبوري *Tomato leaf curl Palampur virus* isolate Babylon1 : (TLCPV)

ومن خلال فحص القراءات المرتبطة تبين وجود فايروس التفاف أوراق الطماطة البلمبوري *Tomato leaf curl Palampur virus* (TLCPV) وهو فايروس يعود إلى عائلة *Geminiviridae* ، جنس*Begomoviruses* و هو ذو حامض نووي DNA مكون من قطعتين هما DNA -A و DNA-B كما في الشكل (4.4) وكانت العزلة الايرانية KC456161.1 هي الأقرب ؛ لذلك استعملت كتسلسل مرجعي ، وتم اختبارها مع القراءات الخام للحامض النوويDNA فكان عدد القراءات المرتبطة مع القطعة DNA-A للفايروس هو 1,055,827 قراءة وبطول 2756 زوج قاعدة ونسبة GC 43.4 % وبنسبة تطابق 99.1 % .

عند ربط القراءات بين القطعة DNA-A للتسلسل المرجعي و القراءات الخام للحامض النووي RNA لمعرفة التعبير الجيني لجينات الفايروس فكان عدد القراءات المرتبطة 183114قراءة ونسبة تطابق 99.1% ، وقد سجل في NCBI تحت رقم ادخال ON229618 كما في ملحق (4).

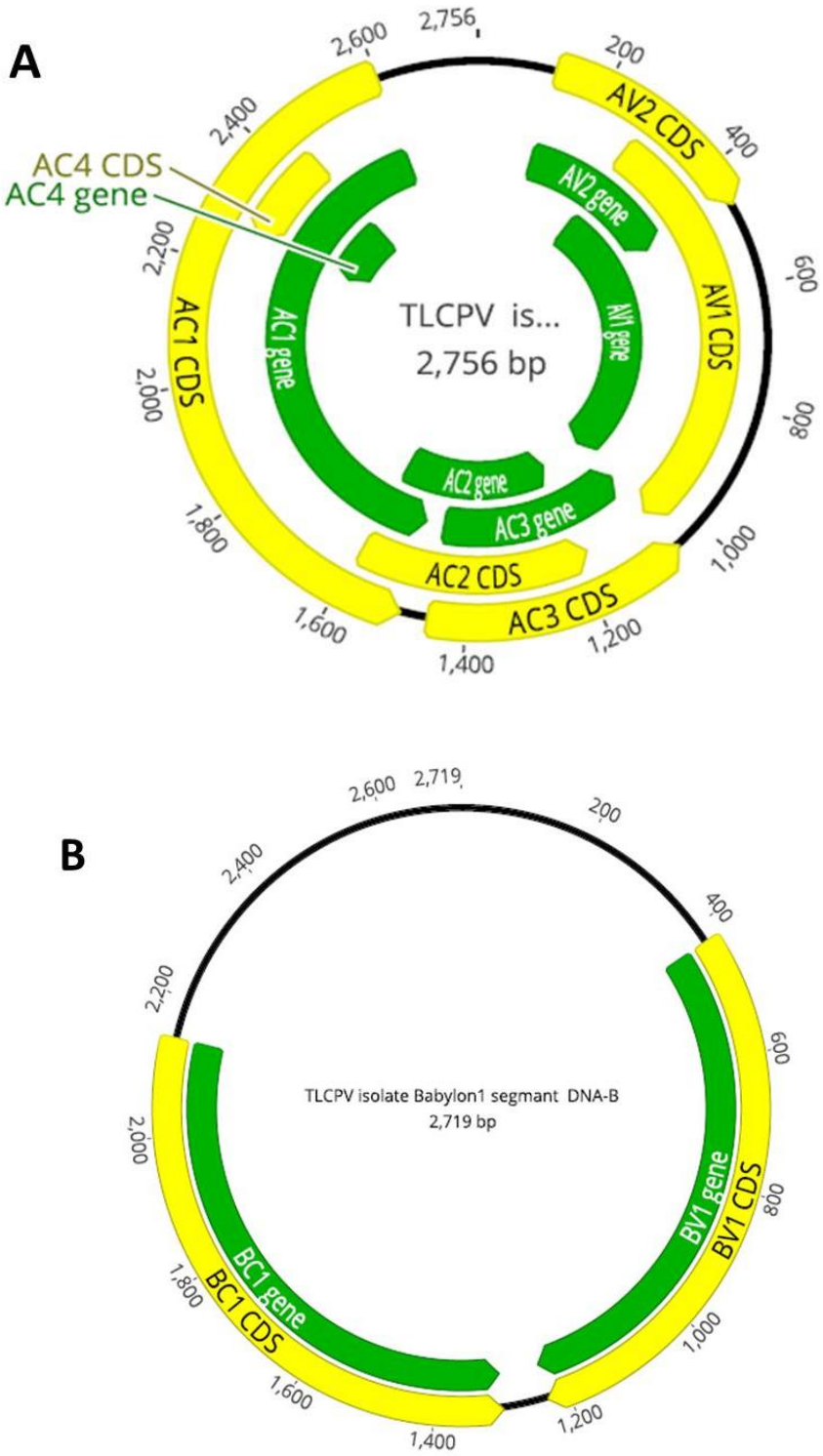
إن وجود هذا الكم من القراءات المرتبطة للحامض النووي RNA دليل على نشاط الفايروس ومشاركته مع فايروس SVYV في إحداث الاصابة وظهور الأعراض المرضية على نباتات الخيار المصابة ، حيث كانت المناطق التي حدث فيها تعبيرا جينيا هي المنطقة من 120 – 1375 بعد فحصها في برنامج BLAST وجد أنها تمثل الجينات AV2, AV1 وهما المسؤولان عن بداية إحداث الاصابة من خلال تفاعل البروتين المنتج لهذا الفايروس مع بروتين العائل النباتي وكذلك عن انتاج الغلاف البروتيني coat protein ، تليها المنطقة 1341 -2602 ، التي يوجد فيها أربع جينات AC1، AC2، AC3 ، AC4 وهذه الجينات مسؤولة عن تضاعف الفايروس واسكات جينات العائل وضراوة الفايروس وحركته الجهازية .

أما عدد القراءات المرتبطة بين القطعة DNA-B للتسلسل المرجعي والقراءات الخام للحامض النووي DNA فبلغت 1,347,785 قراءة وبطول 2719 و نسبة GC المئوية هي 39.5 % وبنسبة تطابق 88.6 % وقد سجلت في NCBI تحت رقم ادخالON229620 كما في ملحق (5).

أما عدد القراءات المرتبطة بين القطعة DNA-B للتسلسل المرجعي والقراءات الخام للحامض النووي RNA فقد بلغت 85,951 ونسبة تطابق 88.5% ووجد هناك تعبيرا جينيا في المنطقة بين 426 -1232 وبعد اختبارها في برنامج BLAST تبين وجود جين BV1 من ضمن هذه المنطقة وهذا الجين يكون مسؤولاً عن انتاج بروتين الضراوة للفايروس nuclear shuttle protein وكذلك المنطقة التي تقع بين 1298 – 2143 التي يقع من ضمنها جين BC1 ، الذي يكون مسؤولاً عن انتاج بروتين الحركة movement protein ، الذي يكون مسؤولا عن حركة الفايروس من خلية إلى اخرى . ربما يعود سبب وجود قراءات مرتبطة للقطعة DNA-A في الحامض النووي RNA أكثر من القطعة DNA-B إلى أن القطعة DNA-A تحتوي على جين التكرار Replication وبذلك تعتمد على نفسها في عملية التضاعف ، أما القطعة DNA-B تكون معتمدة على القطعة DNA-A في تضاعفها .

اثبتت الدراسات ان استخدام هذه التقنية هي دقيقة جدا في تشخيص الفايروسات المرضية بكل دقة ففي العراق مثلا استخدمت للكشف عن الجينوم الكامل لفايروسات تجعد واصفرار أوراق الطماطة TYLCV وفايروس موزائيك التين FMV وفايروس التبرقش المعتدل على الباذنجان (العابدي واخرون ، 2020 ؛ زغير واخرون ، 2021 ؛ الخفاجي واخرون ، 2022).

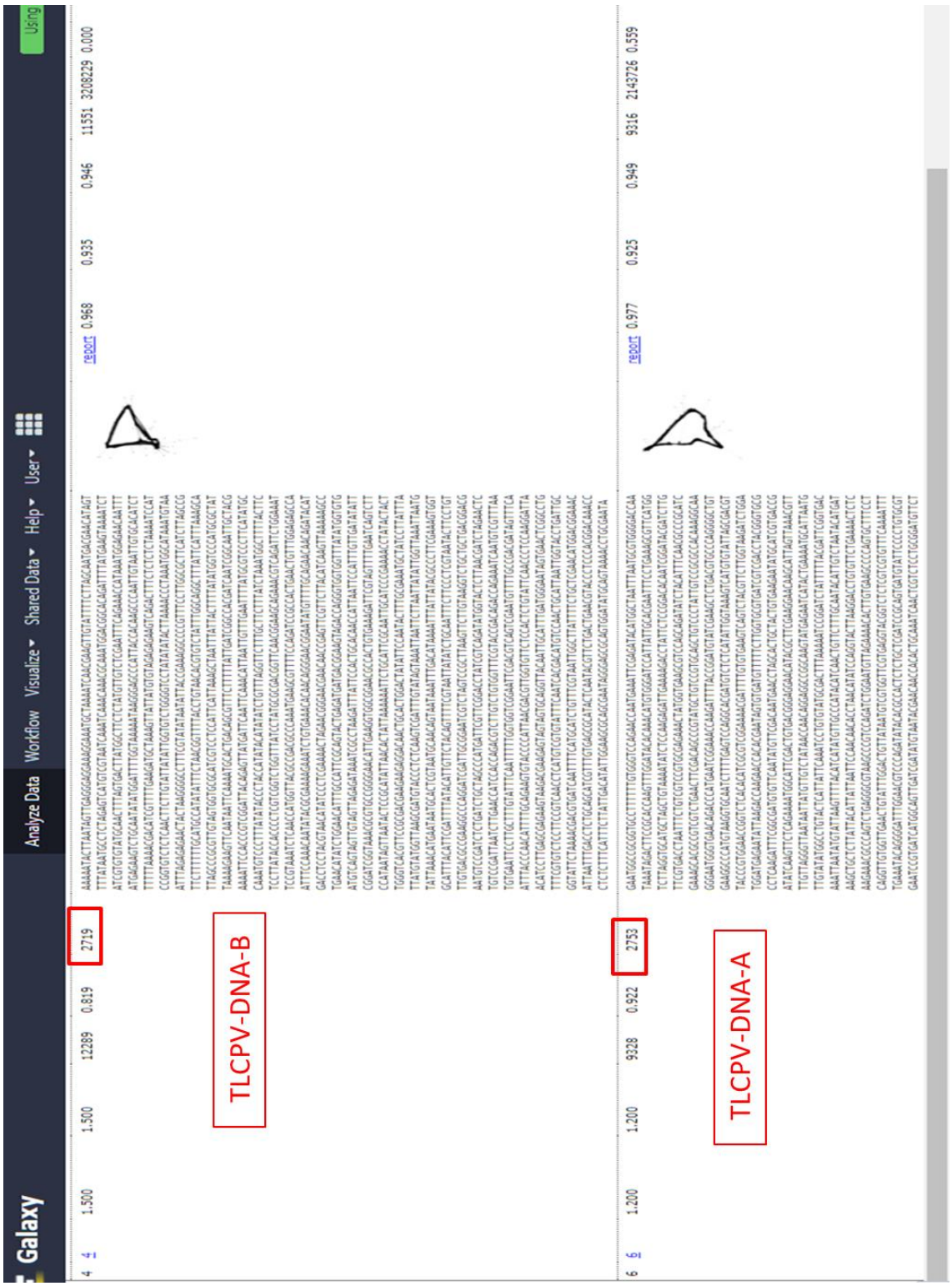
أن فايروس TLCPV ينقل أيضاً عن طريق حشرة الذبابة البيضاء *Bemisia tabaci* اما فايروس SqVYV ينقل ميكانيكيا ، وبالتطعيم ايضاً ، كما ينقل عن طريق حشرة الذبابة البيضاء *Bemisia tabaci* بالطريقة غير الباقية non-persistent manner (Inoue-Nagata و اخرون ، 2022 ؛ Abkhoo و Mehraban ، 2020) . كما وجد في بعض الابحاث ان الاصابة بفايروس SqVYV تؤثر على تفضيل ، و استقرار ، ووضع البيض لحشرة الذبابة البيضاء ، وقد عزيّ سبب ذلك إلى التغيير الحاصل في لون النباتات المصابة (Shrestha واخرون 2019) . وجد أيضاً أن التطور من البيضة إلى البالغة كان أقصر بمقدار ثلاثة أيام على نباتات القرع المصابة بالعدوى ، وعاشت الإناث أطول بنسبة 25٪ ولديهن خصوبة أعلى في نباتات القرع المصابة ومن ثمّ تنقل الحشرة فايروسات اخرى تشترك في المرض الفايروسي (Shrestha واخرون 2017). قد يرجع سبب هذا التفضيل إلى أن الاصابة الفايروسية تزيد من ارتفاع نسبة الاحماض الأمينية الحرة في العائل النباتي مما يجعل النباتات أكثر جاذبية لناقلات الفيروسات (الذبابة البضاء وحشرة المن) وتفضلها على غيرها (Guo واخرون ،2019) . ومما سبق يفسر سبب حدوث الاصابة المشتركة بين الفايروسين ، بسبب انجذاب حشرة الذبابة البيضاء للنباتات الملقحة بفايروس SqVYV .



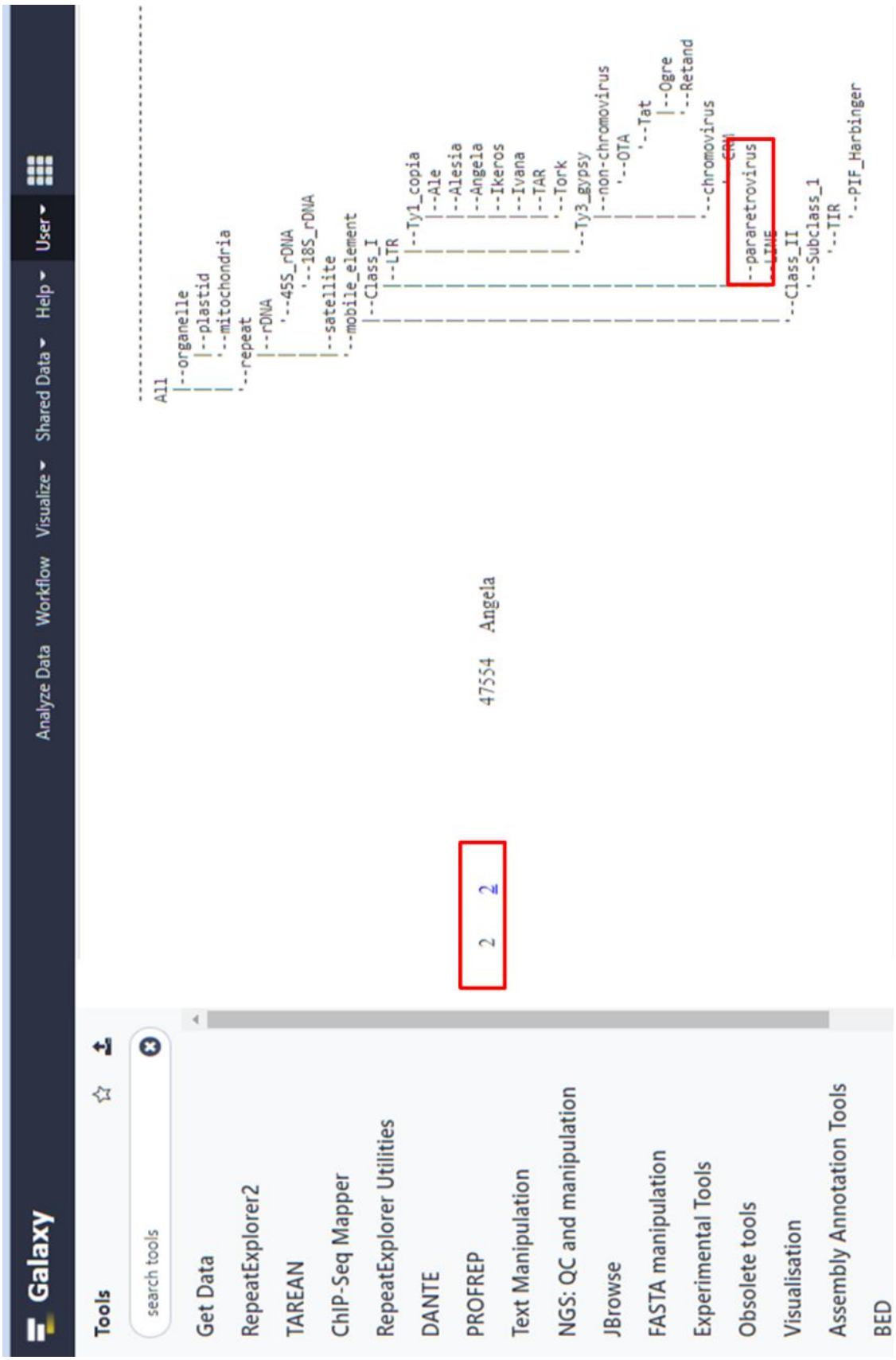
شكل (4.4) الخريطة الوراثية المرسومة في برنامج Geneious لفايروس تجعد أوراق الطماطة البلمبوري *Tomato leaf curl Palampur virus* isolate Babylon1 حيث أن A– تمثل قطعة DNA-A للفايروس ، التي تحتوي على ست جينات ، B- تمثل قطعة DNA-B للفايروس التي تحتوي على جينين .

4.5. الكشف عن الاحماض النووية المتكررة في برنامج Repeat Explorar :

بينت النتائج النهائية لتحليل الحامض النووي DNA وجود 138 تجمع ، بلغت نسبة الجزء المشفر للحامض النووي Coding region 64 % بينما الجزء غير المشفر non Coding region كانت نسبته 36 % من DNA الكلي للنبات وجد من خلال تقرير HTML report تسلسلات تمثل الفايروس المرضي TLCPV DNA-A ، الذي وجد في تجمع رقم 6 بطول 2753 زوج قاعدة و TLCPV DNA-B وجد في تجمع رقم 4 بطول 2719 زوج قاعدة كما في الشكل (4.5) كما تم الكشف عن وجود فايروسات داخلية في التجمع الثاني في جينوم نبات الخيار المصاب كما في الشكل (4.6)، و كذلك من خلال فحص هذه التسلسلات المتكررة في برنامج Repbase تم التأكد من وجودها.



شكل (4.5) تقرير HTML report الذي يظهر التسلسل الكامل لفايروس TLCPV بعد تحليل القراءات الخام للحامض النووي DNA في برنامج مستكشف التسلسلات المتكررة Repeat Explorar في تجمع رقم 6 و بطول 2753 زوج قاعدة الذي يمثل TLCPV DNA-A و تجمع 4 وبطول 2719 الذي يمثل TLCPV DNA-B .



الشكل (4.6) تقريرHTML report في برنامج المستكشفRepeat Explorer الذي يظهر وجود الفايروسات الداخلية في جينوم نبات الخيار.

يعد برنامج Repeat Explorer الذي يحوي مجموعة من الأدوات البرمجية للتحليل الخطي لمحتويات الحامض النووي المتكرر من ضمن بيانات تسلسل الجيل القادم ، فهو يكشف عن التكرارات الترادفية المرتبطة بالعناصر الوراثية المتكررة ، وأيضًا للكشف عن عائلات التكرارات الترادفية المشتتة ، التي يمكن الوصول إليها عبر واجهة الانترنيت web . ويتم فيه استعمال خوارزمية تجميع التسلسل المستند إلى الرسم البياني وان هذه الخوارزمية تسهل تحديد التكرار في أي جينوم باستعمال أعداد صغيرة نسبيًا من قراءات التسلسل القصير فهو مثالي لتحليل قراءات تسلسل الجيل القادم NGS (Novák واخرون ، 2013 ؛ Silva واخرون ،2019 ؛ Vitalesواخرون 2020 ؛ العابدي واخرون .2020) .

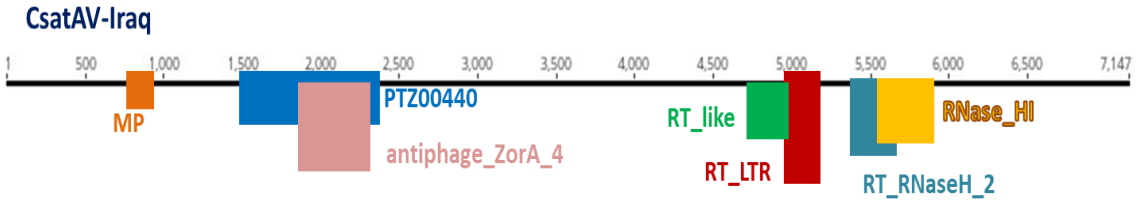
تتوفر في برنامج المستكشف أدوات إضافية للمساعدة في اجراء شرح توضيحي للعناصر الوراثية المتكررة و في تصنيف التكرارات المحددة ، وتحديد التكرارات الترادفية كما استعمل كمصدر معلومات لاستنتاج العلاقات التطورية بين الأصناف وإجراء تحليل مقارن للتكرارات للنوع الواحد وكذلك بين الأنواع المتعددة. يسمح الخادم بتحليل عدة ملايين من قراءات التسلسل ، مما يؤدي عادةً إلى تحديد معظم عمليات تكرار النسخ العالية والمتوسطة في جينومات النبات. كما أنه يكشف عن جميع Satellite DNA لنوع معين من الكائنات ، الذي يعد من بين أكثر DNA تكراراً الموجود في جينومات حقيقيات النوى ، حيث أنها تشارك في مجموعة متنوعة من الأدوار البايولوجية ، من كونها مكونات لبناء كروموسومات مهمة إلى تنظيم الجينات. (Novák واخرون، 2013 ؛ KtsSilva واخرون ،2019 ؛ Vitalesواخرون 2020؛ Novák واخرون ،2020) .

وأيضا يمكن أن يكشف عن تسلسلات الاحماض النووية الفايروسية الموجودة في قراءات تسلسلات النبات الكلية لنبات مصاب وكذلك يكشف عن الفايروسات الداخلية الموجودة في الجينوم النباتي (العابدي واخرون ،2020).

4.6. الفايروسات الداخلية العكسية الموجودة في جينوم نباتات الخيارمن خلال برنامج المعلوماتية الحياتية :

4.6.1. الفايروس الداخلي العكسي CsatAV- Iraq الموجودة في جينوم نباتات الخيارمن خلال برنامج Geneious :

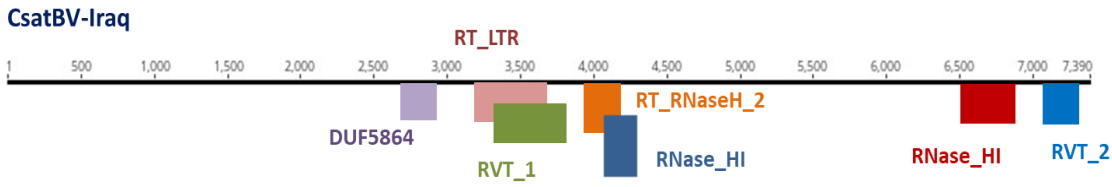
بعد ربط القراءات بين التسلسل المرجعي للفايروس الداخلي العكسي CsatAV والقراءات الخام للحامض النووي DNA وجد أن عدد القراءات المرتبطة 23,476 قراءة وبطول 7147 زوج قاعدة ونسبة GC هي 28.8% وبنسبة تطابق 97.1 % ، كما تم ربط القراءات لهذا الفايروس الداخلي بالقراءات الخام للحامض النووي RNA لمعرفة فاعليته ونشاطه في النبات المصاب تبين أن عدد القراءات المرتبطة هو قراءة واحدة وبطول 101 زوج قاعدة وبنسبة تطابق 85.3 % و نسبة GC 21.8 % وبعد اختبار المنطقة في برنامج BLAST وجد جين (Viral movement protein (MP وهذا مسؤول عن الحركة الفايروسية من خلية لأخرى وجين Like RT - (Reverse transcriptase - Like) ، RT-LTR ، Rnase-HI و RT-RnaseH-2 وهذه جميعها تكون مسؤولة عن النسخ العكسي كما يوجد جين RVT_1 (Reverse transcriptase (RNA-dependent DNA polymerase جين النسخ العكسي بالاضافة إلى بروتيني antiphage_ZorA_4 وPTZ00440 وهي بروتينات غير فايروسيه ولا يعرف لها وظيفه محددة في النبات كما في الشكل (4.7) وهذا الفايروس يعود إلى عائلة *Caulimoviridae* جنس *Florendovirus* وقد تم تسجيله لدى معهد الأبحاث والمعلومات الوراثية Genetic Information Research Institute (GIRI) في كاليفورنيا كما في ملحق (6).



شكل (4.7) الخريطة الوراثية للفايروس الداخلي في جينوم نبات الخيار CsatAV-Iraq .

4.6.2. الفايروس الداخلي العكسي CsatBV-Iraq الموجودة في جينوم نباتات الخيارمن خلال برنامج Geneious :

تبين من خلال النتائج التي تم الحصول عليها بعد ربط القراءات الخام للحامض النووي DNA بالتسلسل المرجعي للفايروس الداخلي العكسي CsatBV . إن عدد القراءات المرتبطة بلغ 77,938 قراءة وبطول 7390 زوج قاعدة ونسبة GC 38.9% ونسبة تطابق بلغت 97.3% في حين كان عدد القراءات المرتبطة بين التسلسل المرجعي ، والقراءات الخام للحامض النووي RNA هو 1,337 قراءة وبطول 5927 زوج قاعدة ونسبة GC 41 % وبنسبة تطابق مع التسلسل المرجعي بلغت 72 % ، حيث وجدت منطقتان هما الأكثر تغايرا ، وهذا يعني وجود تسلسلات منحلة Degenerated sequence فقد وجدت منطقتان كانتا الأكثر تعبيراً جينياً ، هما المنطقة (35 – 687) فكانت تتغاير بنسبة 78.6 % وبعد اختبار هذه المنطقة في برنامج BLAST تبين أنها البرروتين الانزيمي ، الذي يحتوي على عدة مناطق وكل واحدة لها وظيفة معينة ، حيث أن المنطقة هي بروتينات Reverse transcriptases (RTs) وهذه تعمل على تكرار الحامض النووي من قالب RNA وعادة يشير جين RT إلى عناصر متحركة مثل *Caulimoviruses* ، وأيضاً اثنين من جينات RNase-HI وهذه مساعدة لجين الاستنساخ العكسي في الفايروسات العكسية . أما المنطقة الاخرى (5368-5901) فتغايرت بنسبة 90.6 % وبعد اختبارها في برنامج BLAST وجدت بروتينات gag /pol protein وهذه تحتوي على منطقتين ، الاولى : تسمى جين الاستنساخ العكسي Reverse transcriptase (RNA-dependent DNA polymerase) (RVT-2) و (RVT-1) وهذا أيضاً يشير إلى عائلة *Caulimoviruses* حيث ينتج حامض نووي DNA من قالب RNA قد تكون نتيجة التغاير الحاصل هو بسبب التوارث عبر الأجيال أولأسباب أخرى وكذلك وجدت الجينات RT-RnaseH-2 و RT-LTR المسؤولة عن الاستنساخ العكسي والجين DUF5864 الذي يشفر بروتين غير معروف كما في الشكل (4.8) وهذا الفايروس يعود إلى عائلة *Caulimoviridae* جنس *Florendovirus* وقد تم تسجيله في معهد الابحاث والمعلومات الوراثية Genetic Information Research Institute (GIRI) في كليفورنيا كما في ملحق (7).



شكل (4.8) الخريطة الوراثية للفايروس الداخلي في جينوم نبات الخيار CsatBV-Iraq

كما تم الكشف عن وجود Reverse transcriptase (RNA-dependent DNA polymerase) انزيم الاستنساخ العكسي RNA المعتمد على DNA لكل من فايروس الباذنجان الداخلي *Caulimovirus-SMe* وبطول (742) زوج قاعدة والفايروس الداخلي *ToffiV* وبطول (569) زوج قاعدة .

و من خلال تقنية معرفة التسلسل النيوكليوتيدي الكامل للنبات العائلNGS تم الكشف عن الفايروسات الداخلية العكسية Endogenous pararetroviruses EPRVs في النباتات (Alisawi ، 2019) .

إن الفايروسات الداخلية العكسية (EPRVs) هي أحماض نووية مزدوجة الشريط تكون مدمجة داخل جينوم العائل النباتي تعود إلى عائلة فايروس موزائيك القرنابيط *Caulimoviridae* وهي من فايروسات الاستنساخ العكسي ، التي يفترض أنها نشأت منذ 1.6 مليار سنة (Schmidt واخرون ، 2021 وRichert-Pöggeler واخرون ،2021) . يعد *Florendovirus* الجنس هو الأكثر وجوداً في جينومات النباتات (Geering وHull ، 2012 ؛ Diop واخرون ، 2018).

معظم هذه الفايروسات غير معدية بسبب التجزئة واعادة الترتيب تفتقر إلى جين متكامل حيث يقوم الجينوم النباتي من خلال عامل اسكات الجين Gene silencing إلى السيطرة على بعض هذه الفايروسات وإبطال قدرتها على إحداث العدوى بحيث لا يستطيع التحرر من مواقعه ، ويبقى ساكنا كجزء طبيعي من جينوم العائل، وينقل عبر الاجيال وهذه تعرف بالوراثة اللاجينية ، تميل هذه الفايروسات إلى الاختباء في المناطق غير المتجانسة في جينوم العائل (المناطق غير المشفرة) (Schmidt واخرون 2021) .

اما بعضه الآخر فلا يخضع لهذا العامل نتيجة لارتباطه الضعيف بجينوم العائل ، وكونه غير مستقر Unstable وتقوم عوامل الاجهاد بكسر سكون هذه الفايروسات واعادة تنشيط هذه التسلسلات الفايروسية من خلال الاستنساخ العكسي Reverse transcription وتتحول من الDNA إلى mRNA ثم إلى DNA مرة أخرى ، وتقوم بتشكيل جسيمات فايروسيه كامله بعد تكوينها للغلاف البروتيني وإعادة التركيب ومن ثمّ تكوين فايروسات غالبا ما تكون مرتبطة بأمراض مدمرة (Geering واخرون ،2014 ؛ Alisawi ، 2019).

أما في العراق فقد كشف عن وجود بعض الفايروسات الداخلية العكسية في بعض النباتات حيث تم الكشف عن الفايروس الداخلي EPRVs *Lyc* من جنس *Caulimovirus* في جينوم نبات الطماطة والفايروس الداخلي *Fig badnavirus-1* في جينوم نبات التين وكذلك كشف عن وجود فايروسين داخليين يعودان إلى جنسي *Caulimovirus* و*Florendovirus* في جينوم نبات الطماطة (العابدي واخرون ، 2020 ؛ زغير واخرون ، 2021 ؛ الخفاجي واخرون ، 2022).

تحتوي الفايروسات الداخلية العكسية على مناطق بروتينية مشفرة من ضمنها منطقتين موجودة في كل الفايروسات الداخلية العكسية وهما RT و المسؤول عن عملية الاستنساخ العكسي و من خلال انزيم الاستنساخ العكسي Reverse Transeipase يستنسخ الحامض النووي الفايروسي من RNA إلى cDNA ، أما المنطقة البروتينية RnaseH فهي المسؤولة عن تكرار Replication الحامض النووي DNA للفايروس الداخلي ونسخه بأعداد كثيرة ومنع تكوين أشرطة RNA (زغير واخرون ، 2021 ؛ الخفاجي ،2022). نتيجة التداخل Integration الذي يحصل للفايروسات الداخلية في مناطق محددة بالجينوم النباتي قد يتموضع الفايروس بأماكن جينية نباتية (عباس 2023)، حيث يسبب هذا التداخل احيانا طفرات وراثية تغير من وظيفة الجينات النباتية الخاصة بالعائل كما حصل لدينا في حالة الفايروس *CsatAV* ونحتاج لتجارب اضافية وتحليلات متخصصة لمعرفة تأثير هذا التداخل.

4.7. عدد النسخ والنسب المئوية وعامل النسخ TPM Transcripts Per Kilobase Million (قياس التعبير الجيني) للفايروسات المرضية والفايروسات الداخلية العكسية الموجودة في جينوم نبات خيار مصاب :

بينت نتائج النسبة المئوية للفايروسات المرضية في الحامض النووي الكلي DNA أن النسبة المئوية لفايروس TLCPV DNA-A بلغت 116814894 وعدد النسخ 16215 ، أما في TLCPV DNA-B فبلغت النسبة المئوية 0.0149931 وعدد نسخ 7489 في حين كانت النسبة المئوية لفايروس SVYV في الحامض النووي RNA هي 0.36790033 وعدد نسخ 2020 .

لمعرفة نشاط هذه الفايروسات والتعبير الجيني لجيناتها تم حساب TPM ، حيث وجد أن أعلى قيمة للتعبير الجيني كانت لفايروس TLCPV DNA-A بلغت 10,000,292 ثم تليها القطعة TLCPV DNA-B لنفس الفايروس ، حيث بلغت 1,000,008 في حين كانت لفايروس SVYV 10,001,779. أن أهمية حساب عامل النسخ TPM هولمعرفة مقدار التعبير الجيني لكل فايروس .

كما أوضحت النتائج عدد النسخ ، والنسب المئوية ، وعامل قياس التعبير الجيني للفايروسات الداخلية العكسية فكانت النسبة المئوية للفايروس الداخلي CsatAV في الحامض النووي DNA هي 0.00026115 وعدد نسخ 495 نسخة في حين كانت النسبة المئوية للفايروس الداخلي CsatBV 0.000867 وعدد نسخ بلغ 1529 نسخة .

للكشف عن مدى فاعلية الفايروسات الداخلية ونشاطها في جينوم RNA من خلال عامل قياس التعبير الجيني TPM ، الذي كانت قيمته للفايروس الداخلي CsatAV هي 1,000,134 بينما ارتفعت هذه القيمة للفايروس الداخلي CsatBV إلى 1,005,166 وهذا مؤشر على بداية تحرر الفايروس من الجينوم النباتي في العينة المصابة و ربما له دورفي الأمراضية وقد يحدث تحرر هذا الفايروس اصابة مرضية قد تكون خطيرة كما في جدول (4.2) .

جدول (4.2) عدد النسخ والنسب المئوية وعامل النسخ (قياس التعبير الجيني) للفايروسات المرضية والفايروسات الداخلية العكسية :

الفايروسات	النسبة المئوية للحامض النووي	عدد النسخ Copy number	TPM
SVYV	0.36790033	2020	10,001,779
TLCPV DNA-A	1.16814894	16215	10,000,292
TLCPV DNA-B	0.0149931	7489	1,000,008
CsatAV	0.00026115	495	1,000,134
CsatBV	0.000867	1529	1,005,166

إن عدد النسخ والنسب المئوية للاحماض النووية الفايروسية اعلاه ما هي الا دليلا على وجود هذه الفايروسات في خلايا عينة الخيار المصاب المختبرة اما قيم TPM فهي دليل على عمل جينات الفايروسات المذكورة والمشخصة للقيام بوظائفها المختلفة .

بسبب التجزئة واعادة الترتيب للفايروسات الداخلية تكون غير معدية ، لافتقارها إلى جين متكامل ، قد يحدث هذا التكامل من خلال انزيمات اعادة تركيب والية إصلاح الحامض النووي كما أن نسخ قليلة من الجينومات الفايروسية تحوي اطارات قراءة مفتوحة سليمة نسبيا Open reading frames (ORFs) ، التي من المحتمل أن تكون قادرة على اعادة التركيب مما يؤدي إلى تجديد فايروس قادرعلى احداث الاصابة (Schmidt واخرون 2021) .

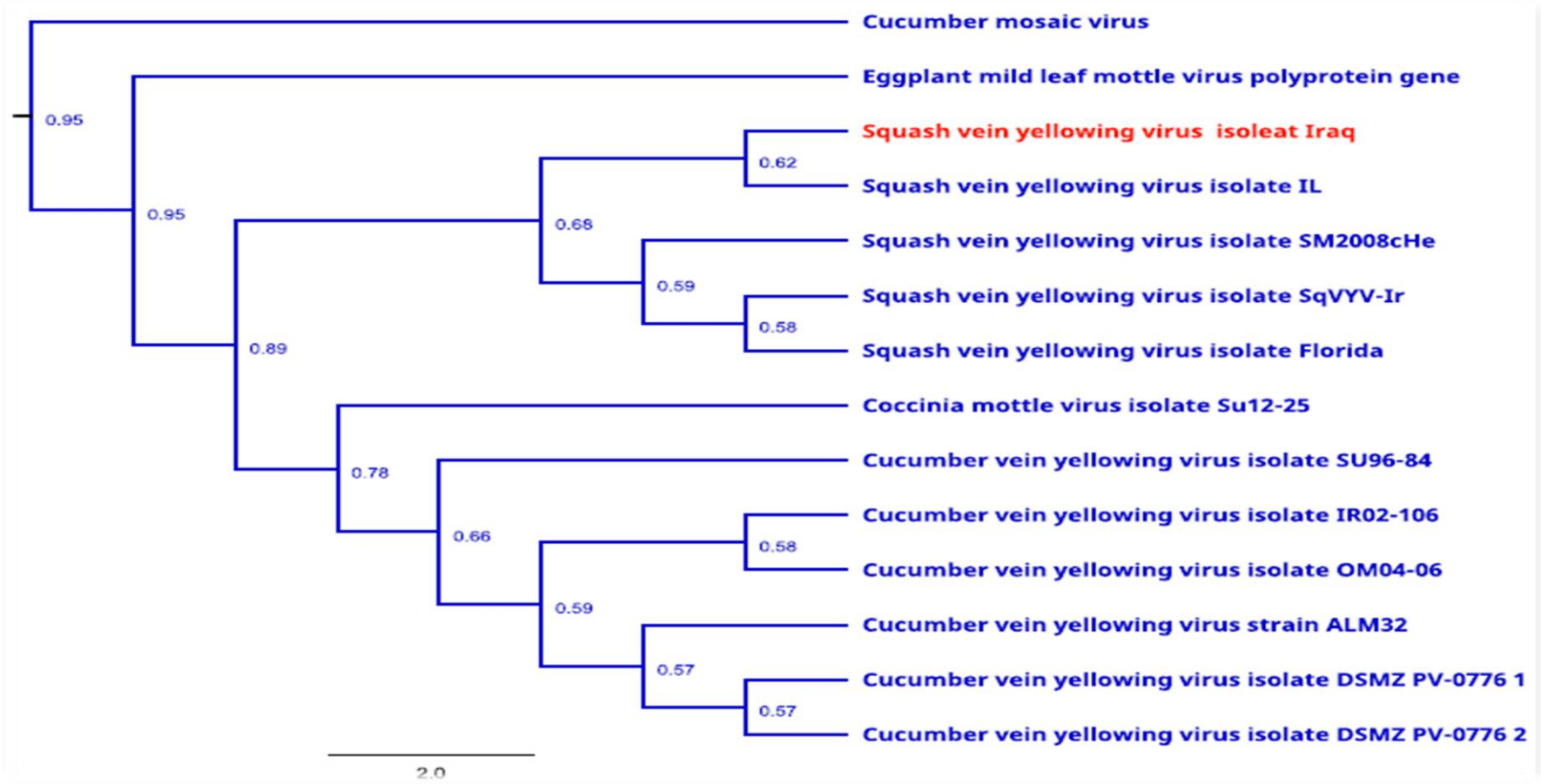
إن عدد النسخ والنسب المئوية العالية للأحماض النووية هي دليل على وجود الفايروسات في العينة النباتية المصابة ، و أيضاً تشير إلى نشاط هذه الفايروسات من خلال وجودها بنسب مئوية

في الحامض النووي RNA دليل على التعبير الجيني لجميع جينات الفايروسات المرضية ، وهي تؤكد دقة وصحة النتيجة أن عدد النسخ في RNA تشير إلى التعبير الجيني المتوازن للبروتينات الموجودة (زغير ،2021 ؛ الخفاجي ،2022 ؛ Forsythe واخرون ،2022).

وجود الحامض النووي الفايروسي أو الفايروس الكامل في النبات وحتى بتراكيز عالية لا يعد سبباً كافياً لظهور الأعراض المرضية، حيث أن بعض الفايروسات قد توجد في النباتات بتراكيز عالية تعطي أعراضاً مرضية أقل حدة من أخرى موجودة في النباتات بتراكيز قليلة (قاسم ، 2011 ؛ شريف ، 2011 ؛ الفضل ،2021). يمكن أن يكون تحليل بيانات التعبير الجيني أمرًا ضروريا لتوضيح العلاقات الاحيائية للعائل والمسبب المرضي. ومع ذلك ، فإن التحديد الكمي الدقيق للتعبير الجيني يعتمد بشكل مباشر على دقة الجينوم المرجعي أو النسخة ، التي يتم تعيين بيانات التعبير لها. يمكن أن تؤدي الأخطاء في شرح الجينات إلى أخطاء في القياس الكمي للتعبير الجيني وللتخلص من التحيز في قياس التعبير الجيني في الجينوم RNA يتم قياس TPM للجينات المراد قياس التعبير الجيني لها ، حيث يتم مراعات طول الجينات و التعبير النسبي من خلال حساب TPM (Huang واخرون ،2022 ؛ In و Pincket ، 2022) .

4.8. دراسة العلاقة التطورية والاشجار الوراثية Phylogenetic trees للفايروسات المرضية المشخصة في نبات الخيار :

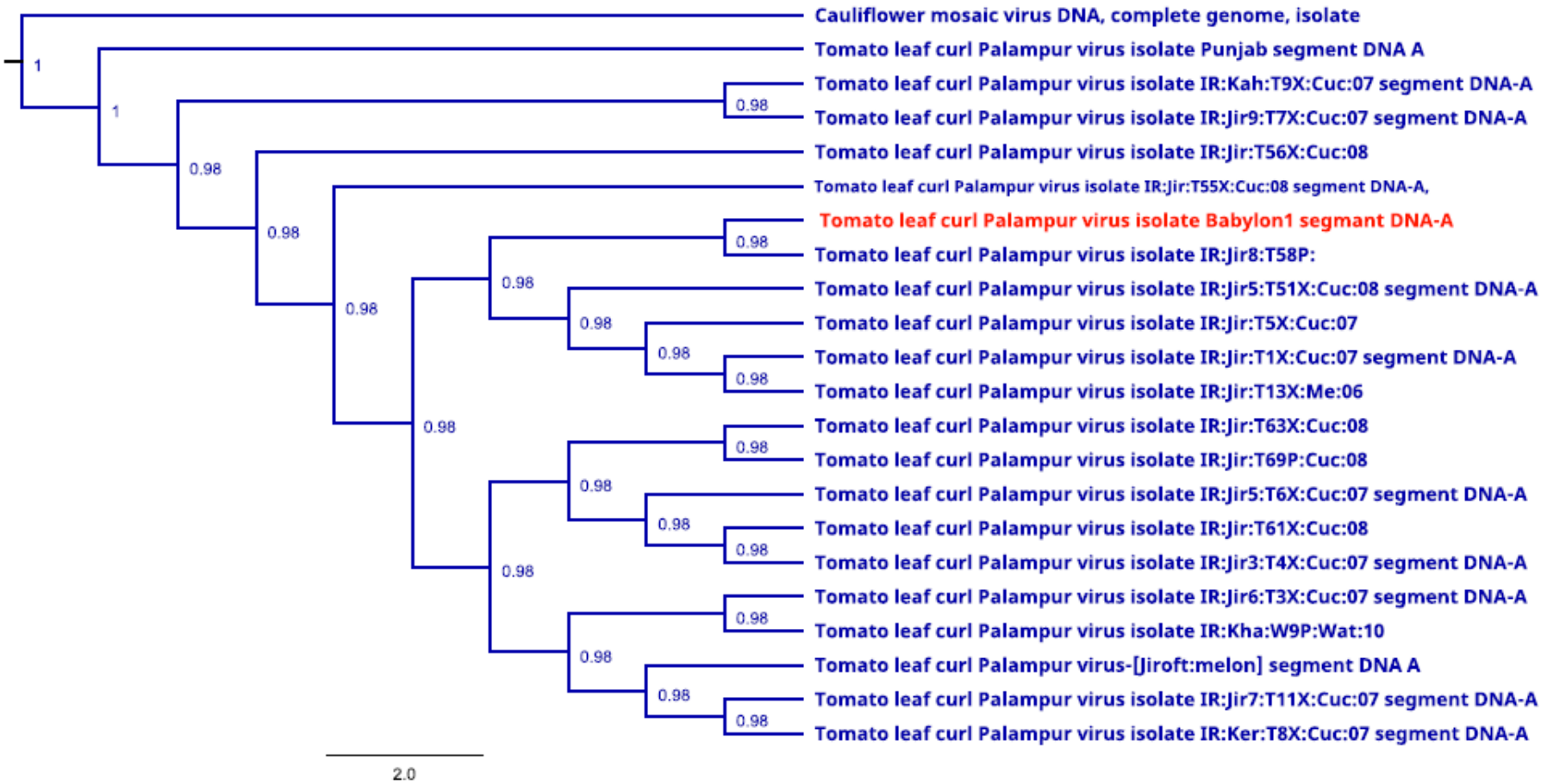
لإثبات التقارب الوراثي ونشوء أصل عزلات العراق و العزلات القريبة منها اتضح من خلال الشجرة الوراثية ، أن عزلة العراق التي تم الحصول عليها للفايروس *Squash vein yellowing virus* isolate SVYV/Iraq والمسجلة في المركز الوطني لمعلومات التقانة الاحيائية NCBI تحت رقم ادخال ON229619 كانت الأقرب وراثيا لعزلة الأرض المحتلة IL *Squash vein yellowing virus* بنسبة 0.62 وهما يعودان إلى أصل مشترك واحد كما في الشكل (4.9)



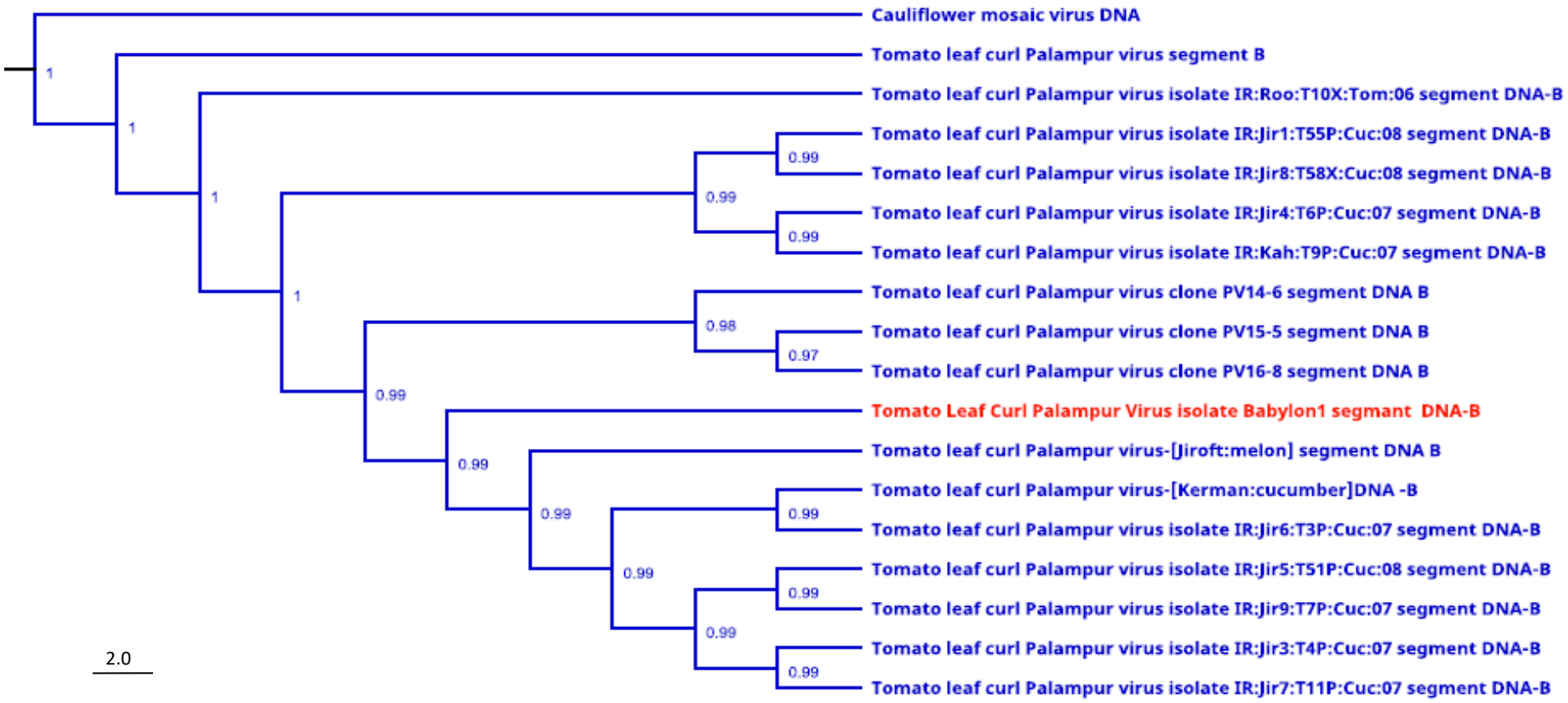
شكل (4.9) الشجرة الوراثية لعزلة فايروس اصفرار عروق القرع *Squash vein yellowing virus* isolate SVYV/Iraq مع 14 عزلة فايروسية حيث تمثل الارقام الموجودة درجة التقارب بين هذه العزلات

خـلال مطابقـة الجينـوم الكامـل للقطعـة A لفـايروس تجعـد أوراق الطماطـة البلمبـوري *Tomato leaf curl Palampur virus* isolate Babylon1 segment DNA-A التي تم الحصـول عليهـا وقـد سـجلت تحـت رقـم ادخـال ON229618 هـي الأقـرب وراثيـا إلـى العزلـة الايرانية Tomato leaf curl Palampur virus isolate IR:Jir8 وبنسبة تقارب عالية بلغت 0.98 حيث انهما يعودان لأصل مشترك واحد كما في الشكل (4.10) .

في حين تبين أن القطعـة B العائدة لفايروس تجعد أوراق الطماطـة البلمبـوري *Tomato leaf curl Palampur virus* isolate Babylon1 segment DNA-B ، التـي تـم الحصـول عليها والمسجلة في بنك الجينات تحت رقم الادخـال ON229620 هـي الأقـرب وراثيـا إلـى العزلـة الايرانيـة *Tomato leaf curl Palampur virus*-[Jiroft:melon] وبنسبة تقـارب 0.99 كمـا في الشكل (4.11) .



شكل (4.10) الشجرة الوراثية لعزلة تجعد أوراق الطماطة البالمبوي (*Tomato leaf curl Palampur virus* isolate Babylon1 segment DNA-A باللون الاحمر) مع 20 عزلة فايروسية حيث تمثل الارقام الموجودة درجة التقارب بين هذه العزلات والعزلة خارج المجموعة متمثلة بالفايروس Caulifower Mosaic Virus .



شكل (4.11) الشجرة الوراثية لعزلة تجعد أوراق الطماطة البالمبوي *Tomato leaf curl Palampur virus* isolate Babylon1 segment DNA-B (باللون الاحمر) مع 16عزلة فايروسية حيث تمثل الارقام الموجودة درجة التقارب بين هذه العزلات والعزلة خارج المجموعة متمثلة بالفايروس Caulifower Mosaic Virus

ومما سبق اتضح أن الفايروسات المرضية كان لها أصل مشترك وقرابة مع عزلات من الدول المجاورة . إن الفايروس SVYV/Iraq ، الذي كان الأقرب إلى عزلة الارض المحتلة من الممكن أنه دخل العراق قبل عام 2003 عندما كان التبادل التجاري للمحاصيل الزراعية والبضائع مع البلد المجاور الأردن ، أما الفايروس TLCPV فمن الممكن أن يكون قد دخل العراق بعد عام 2003 حيث كان الأقرب إلى العزلات الايرانية ، وهذا يعزى إلى نشاط التبادل التجاري والاستيراد مع البلد المجاور ايران. وفي الحالتين يعزى دخول هذه المسببات المرضية الخطيرة إلى سوء الرقابة وعدم الاهتمام بالحجر الزراعي وقلة الامكانيات للكشف عن المسببات المرضية .

إن شجرة النشوء والتطور Phylogenetic Tree تبين التغيرات الرئيسة في التطور حيث أن معرفة العلاقات الجينية بين الأنواع أمرًا أساسيًا للعديد من الدراسات في علم الأحياء ، وهي مفتاح لاستنتاج أصل الجينات الجديدة ، واكتشاف التكيف الجزيئي ، وفهم التطور المورفولجي وإعادة بناء التغيرات الديموغرافية (Kapli واخرون ،2020) .

يعود الظهور المتكرر لأمراض فيروسية جديدة بشكل رئيسي إلى التجارة الدولية ، وتغير المناخ ، وقدرة الفيروسات على التطور السريع مما يؤدي إلى حدوث تغاير وراثي وتنوع جيني وتطور فيروسات النبات حيث يتم الكشف عنه من خلال اشجار النشوء والتطور (Rubio واخرون ،2020) . مما يؤكد دخول فايروسات جديدة للعراق من بلدان الجوار نتيجة التبادل التجاري هو وجود دراسات حديثة كشفت عن دخول فايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطة TYLCV وفايروس موزائيك التين FMV حيث وجد أن العزلات العراقية المشخصة كانت قريبة من العزلات الايرانية وفايروس تبرقش الورقة المعتدل على الباذنجان EMLMV الذي كان الأقرب إلى عزلة الكيان الصهيوني وبسبب ضعف الامكانات للكشف عن الفايروسات في البضائع الزراعية المستوردة للعراق حيث أدّى ذلك إلى دخولها واحداثها إلى أمراض مهمة في العراق (العابدي ،2020 ؛ زغير ، 2021 ؛ الخفاجي ،2022).

إن الفايروس SVYV ذو مدى عائلي يقتصر على القرعيات إلا أنه يسبب أعراضا شديدة قد تؤدي إلى موت النبات ، كما أن الاصابة بهذا الفايروس تؤدي إلى حصول تدهور في قشرة البطيخ ، وتعفن داخلها ، مما يؤدي إلى ثمار غير قابلة للتسويق (Webster واخرون ،2010؛ Reingold واخرون، 2016 ؛ Shrestha واخرون ،2016) .اما فايروس TLCPV فيسبب وباءا مدمرا على محاصيل الخيار والبطيخ وقرع الكوسا ، يحدث المرض في البيوت البلاستيكية والأنفاق البلاستيكية و المزارع المفتوحة. وإن انتشاره السريع أدّى إلى ظهور تهديد جديد خطير للإنتاج الزراعي في جميع أنحاء الشرق الأوسط.(Heydarnejad واخرون ، 2013) .

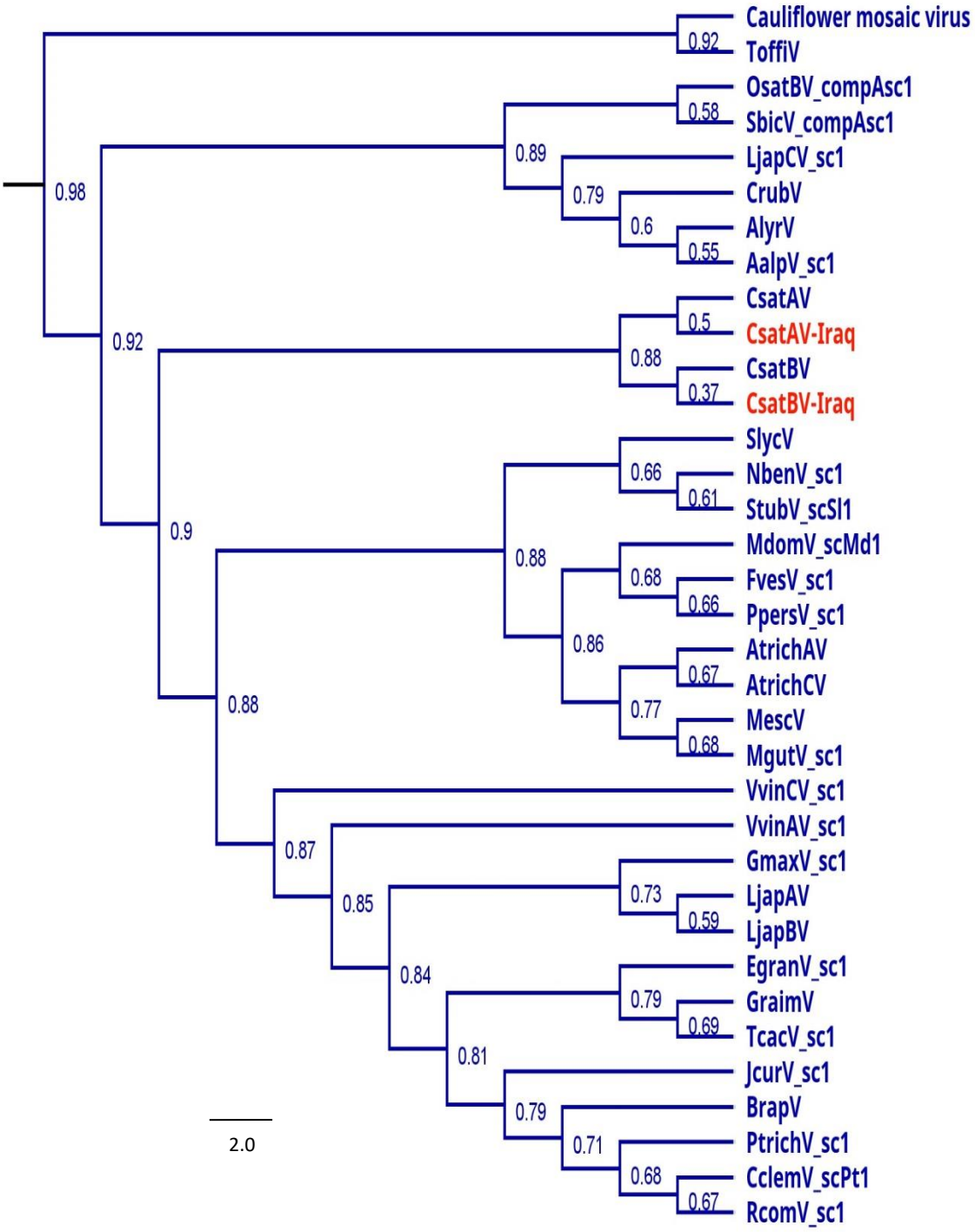
4.9. دراسة العلاقة التطورية والاشجار الوراثية Phylogenetic trees للفايروسات الداخلية المشخصة في نبات الخيار:

بعد تشخيص فايروسات الخيار الداخلية في نبات الخيار اتضح أنها تعود إلى عائلة *Caulimoviridae* و إلى جنس *Florendovirus* وان الفايروس الداخلي CsatAV Iraq عالي القرابة من الفايروس الداخلي CsatAV المشخص في نبات الخيارفي بولندا حيث انهما يعودان لأصل وراثي مشترك ، في حين كان الفايروس الداخلي CsatBV Iraq ذا قرابة عالية مع CsatBV المشخص ، أيضاً في نبات الخيار في بولندا ويعودان لأصل مشترك واحد كما في الشكل (4.12)

تميل الفايروسات الداخلية العكسية إلى الاختباء في المناطق غير المشفرة في جينوم العائل ، التي ربما تعمل على استقرارها من خلال عامل اسكات الجين Gene silencing ، ومن ثمّ الحد من شدة الضرر ، والسماح بالاحتفاظ بها على المدى الطويل في الجينوم (Schmidt واخرون 2021) .

تعود الفايروسات الداخلية العكسية (EPRVs) إلى عائلة فايروس موزائيك القرنابيط *Caulimoviridae* وهي من فايروسات الاستنساخ العكسي تكون مدمجة داخل جينوم العائل النباتي (Schmidt واخرون ، 2021 وRichert-Pöggeler واخرون ،2021) .

إن الجنس *Florendovirus* هوالأكثر وجوداً في المملكة النباتية (Geering و Hull ، 2012 ؛ Diop واخرون ، 2018).



شكل (4.12) الشجرة الوراثية للفايروسين الداخليين CsatAV-Iraq و (CsatBV-Iraq باللون الاحمر) مع 32 فايروس داخلي من جنس *Florendovirus* حيث تمثل الارقام الموجودة درجة التقارب بين هذه الفايروسات والفايروس خارج المجموعة *Caulifower Mosaic Virus* .

4.10. التغاير الوراثي الحاصل في الجينوم الكامل DNA للبلاستيدات الخضراء في خلية نبات خيار مصابة بالفايروسات *Squash vein yellowing virus* isolate SVYV/Iraq و *Tomato leaf curl Palampur virus* isolate :Babylon1

أظهرت نتائج ربط التسلسل المرجعي بالقراءات الخام للحامض النووي بعملية Map to reference عند استعمال التسلسل المرجعي للبلاستيدات الخضراء (NC-007144) ضد القراءات الخام للحامض النووي DNA لنبات خيار مصاب بوجود 5694092 قراءة مرتبطة مع تغطية كاملة لكل التسلسل المرجعي المستخدم (Coverage) حددت ب11875 ، يحتوي جينوم البلاستيدات الخضراء على 130 جينا منها 84 جينا يشفر إلى بروتينات كما يحتوي على 37 حامض نووي رايبي الناقل tRNA و 8 من الحامض النووي رايبوسومي rRNA و 1 من Precursor-RNA كما في الشكل (4.13) وقد سجل الجينوم الكامل للبلاستيدات في بنك الجينات GenBank تحت رقم ادخال (OP651766) كما في ملحق (8) .

وجدت ثلاث مناطق متغايرة ، ومنطقة مفقودة وقد تم تحديد مواقع هذه المناطق كما في الجدول (4.3) وتسميتها كما في الجدول (4.4) . إن أول هذه المناطق كانت المنطقة الجينية Iraq rps16 gene ، التي شهدت تغايرا شديدا وصل إلى نسبة تطابق مع التسلسلات المرجعية Pairwise Identity تراوح بين (45.6-52.9) % ، التي تقع من ضمن الجين rps16 وهو مسؤول عن انتاج البروتين الرايبوسومي ribosomal protein S16 كما في الشكل (4.14)

أما المنطقة الجينية الثانية هي Ycf2 gene Iraqالواقعة من ضمن الجين Ycf2 وهو مسؤول عن مجموعة من الانزيمات المسؤولة عن اطلاق الطاقة وصلت نسبة التطابق فيها إلى 49 % كما في الشكل (4.15) .

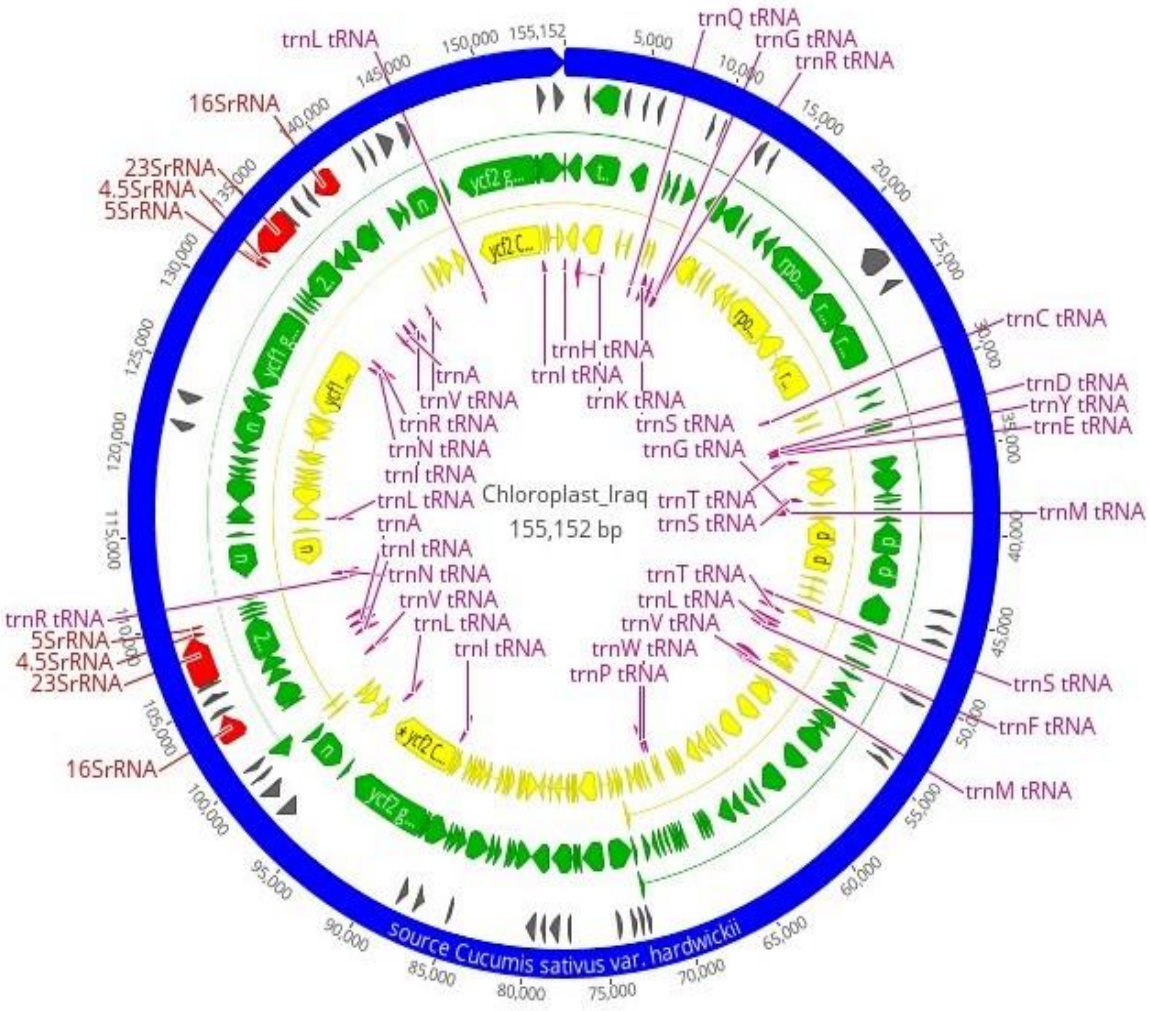
في حين كانت المنطقة الجينية الثالثة 23SrRNA gene Iraq واقعة من ضمن الجين 23SrRNA gene حيث وصلت نسبة التطابق فيه ما بين (50 - 52.9)%، تليها مباشرة المنطقة الجينية Iraq gene rRNA 23S مفقودة و هذه تقع من ضمن الجين 23 rrRNA والمنتج للحامض النووي الرايبي الرايبوسومي 23S ribosomal RNA كما في الشكل (4.16) .

جدول (4.3) مواقع التغاير والحذف في اربع أصناف واثنين من الهجن لنبات خيار سليم مقارنة بنبات خيار مصاب بالفايروسات *Tomato leaf curl Palampur virus* isolate Babylon1 و*Squash vein yellowing virus* isolate SVYV/Iraq

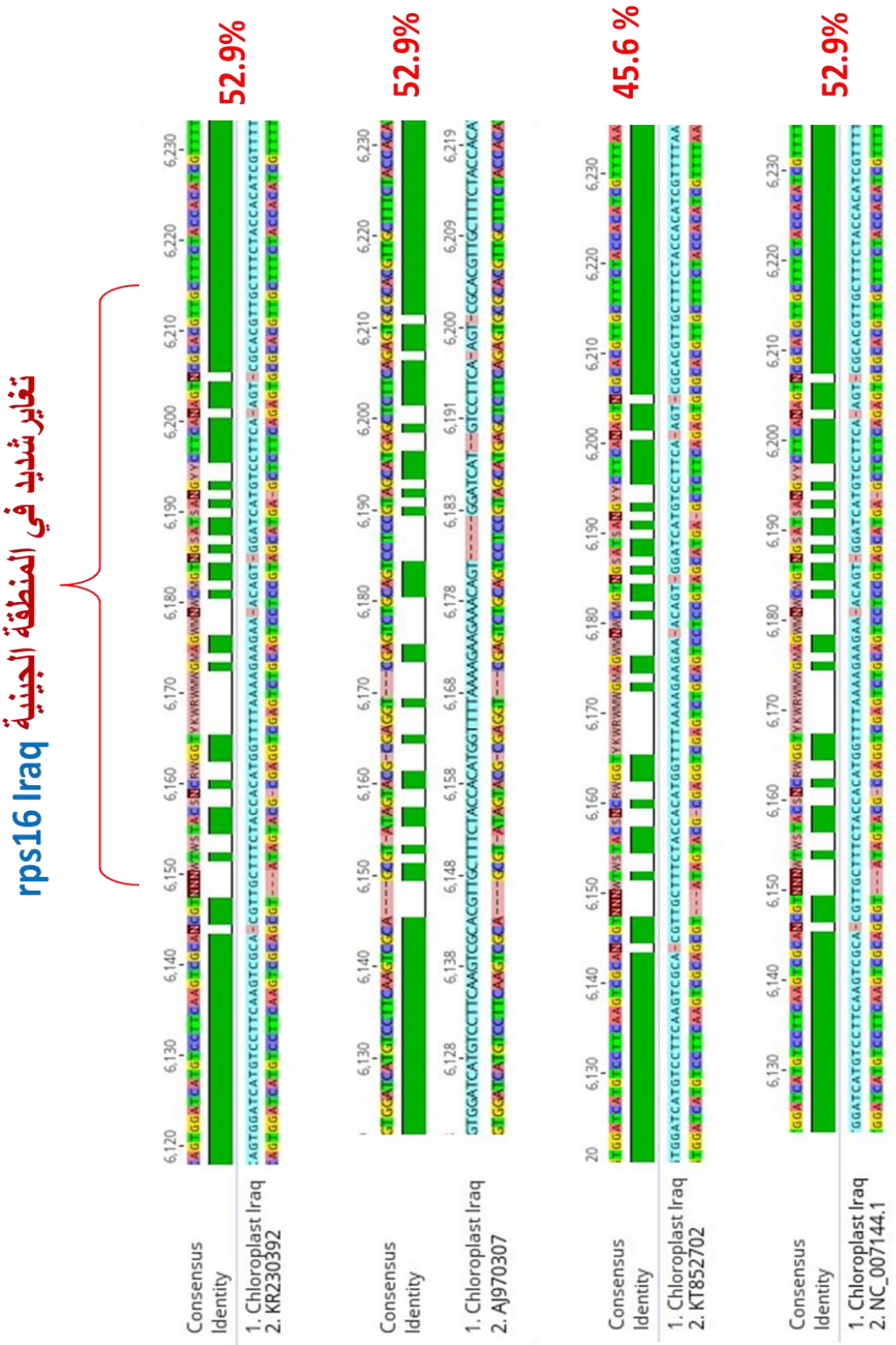
الصنف / اسم المنطقة	AJ970307	NC-007144	KT852702	KR230392	MT721154	MF095790
rps16 Iraq	(6211-6146)	-6142) (6207	-6140) (6205	-6140) (6205	غير موجودة	غير موجودة
Ycf2 Iraq	-94499) (94559	-94495) (94554	-94415) (94474	-94415) (94474	غير موجودة	غير موجودة
23SrRNA Iraq	– 135593) (135621	– 135589) (135617	–135502) (135530	–135502) (135530	- 135826 (135854	- 135826 (135854
Ycf2 Iraq	غير موجودة	غير موجودة	غير موجودة	غير موجودة	– 94706) (94756	– 94706) (94756
23S RNA Iraq	-135622) (135732	– 135619 (135729	–135532) (135642	–135532) (135642	غير موجودة	غير موجودة
rrn23 Iraq	غير موجودة	غير موجودة	غير موجودة	غير موجودة	-135856) (135966	-135856) (135966

جدول (4.4) التسلسلات المتغايرة والمحذوفة في جينات اربع أصناف واثنين من هجن نبات خيار سليم مقارنة بنبات خيار مصاب بالفايروسات *Tomato leaf curl Palampur virus* isolate Babylon1 و*Squash vein yellowing virus* isolate SVYV/Iraq

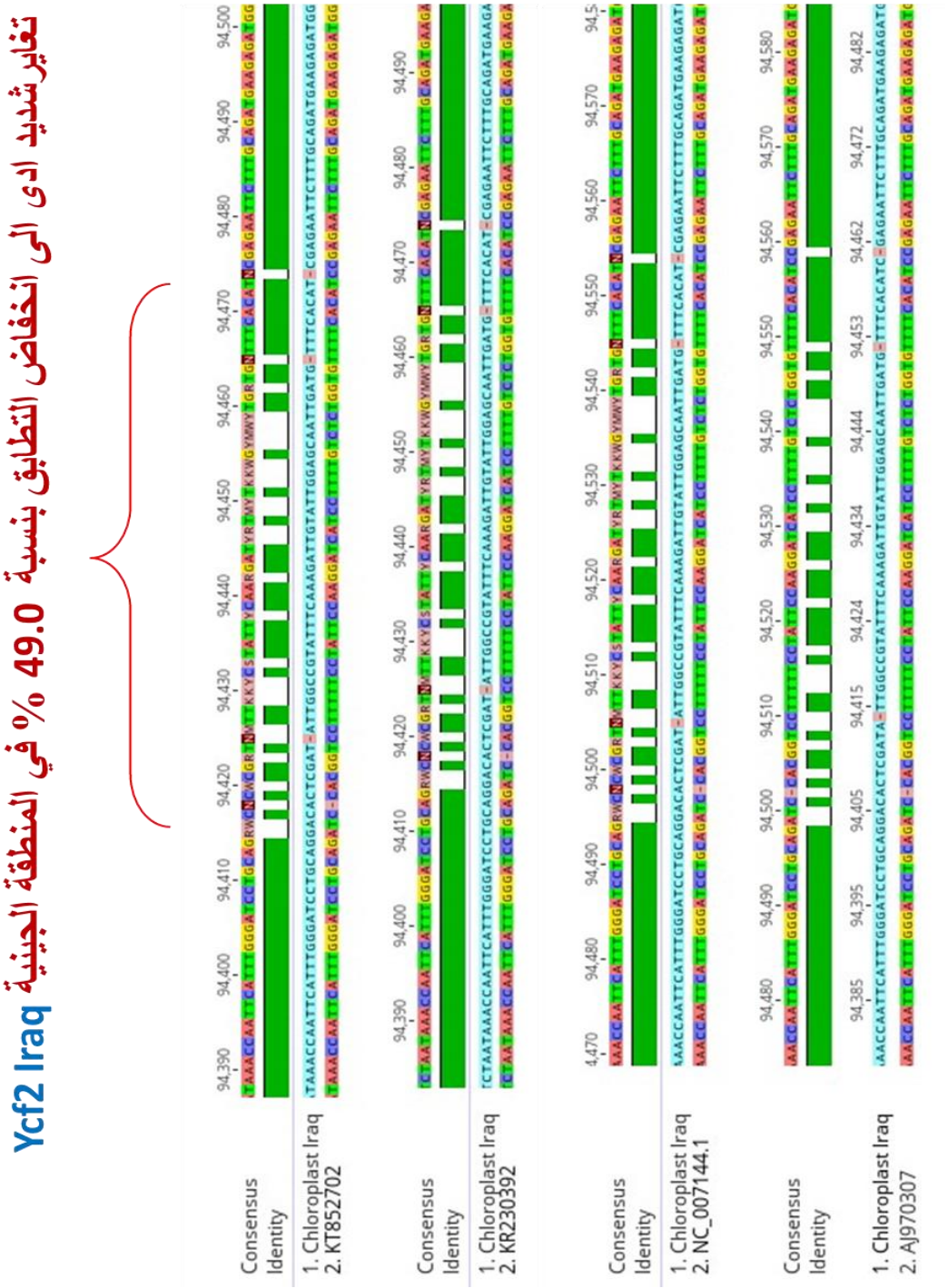
ت	اسم المنطقة المتضررة	عدد القواعد النتروجينية	التسلسل
1	rps16 Iraq	57bp	CGTTGCTTTCTACCACATGGTTTTAAAAGAAGAAACAGTGGATCATGTCCTTCAAGT
2	Ycf2 Iraq	60bp	GACACTCGATATTGGCCGTATTTCAAAGATTGTATTGGAGCAATTGATG
3	23SrRNA Iraq	26bp	CTGATTCACACGGGATTCCACGTGCC
4	Ycf2 Iraq	48 bp	AGATCCACTCTTTTTCCTATTCCAAGATCATCCTTTTGTCTCTGTGTT
5	23S RNA Iraq	109bp	CCATGCTACTCGGGTCAGGGGCGTAAGCTAGTGATGCTTTCGGCTACTGGACTCTCGCCATCTAGGGTGCAACACTCCACTGCTTCGCCTAGCAGCACGACGCTTGTAT
6	rrn23 Iraq	107 bp	CCATGCTACTCGGGTCAGAGCGTAAGCTAGTGATGCTTTCGGCTACTGGACTCTCGCCATCTAGGGTGCAACACTCCACTGCTTCGCCTAGCAGCACGACGCTTGTA



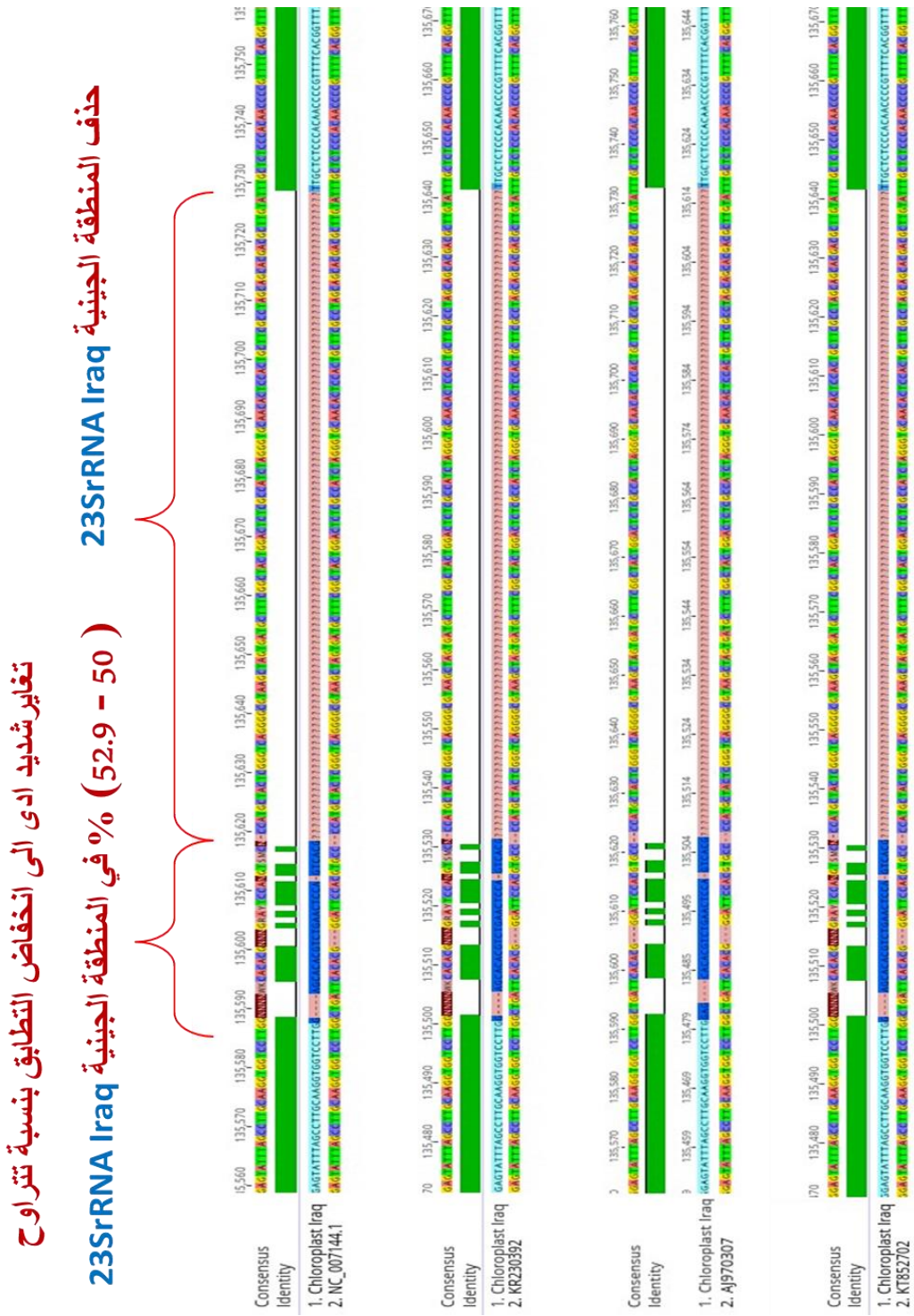
شكل (4.13) الخريطة الوراثية لجينوم بلاستيدة نبات خيار *Cucumis sativus* var. sativus صنف (Nickerson Zwaan Holland) Superina **مصاب بالفايروسات *Squash vein yellowing virus* isolate SVYV/Iraq و *Tomato leaf curl Palampur virus* isolate Babylon1 .**



شكل (4.14) التطابق Pairwise Identity بين جينومات بلاستيدات التسلسلات المرجعية لبعض أصناف الخيار السليم مع تسلسل جينوم بلاستيدات نبات مصاب بالفايروسات *Squash Vein Yellowing Virus* و *Tomato leaf curl Palampur virus* حيث أن منطقة rps16 Iraq هي منطقة التغاير الاولى الواقعة من ضمن الجينrps16 ، علما أن (1) يمثل جينوم البلاستيدات الخضراء لصنف خيار المصاب ، أما (2) فتمثل جينومات البلاستيدات الخضراء لبعض أصناف الخيار .

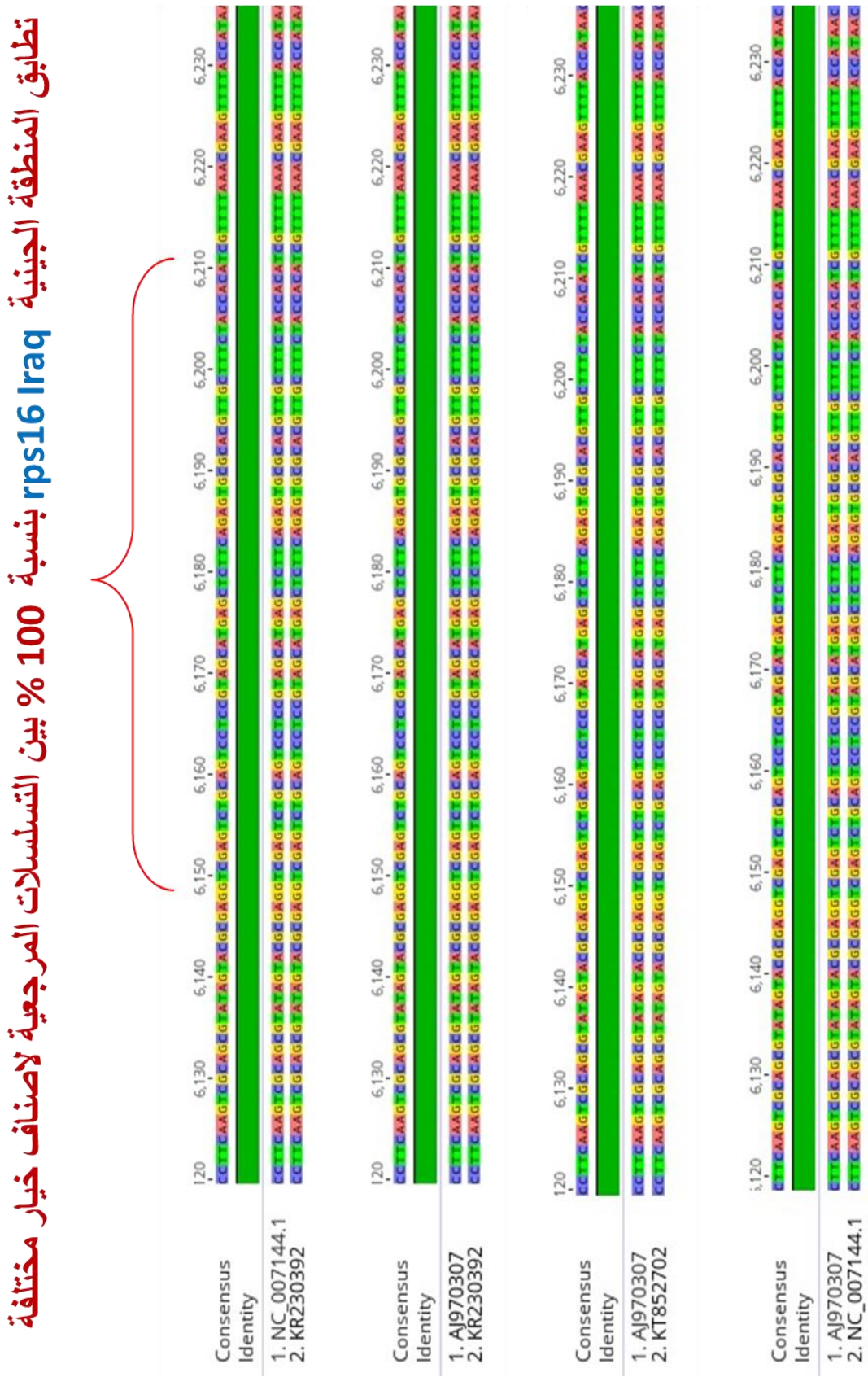


شكل (4.15) التطابق Pairwise Identity بين جينومات بلاستيدات التسلسلات المرجعية لبعض أصناف الخيار السليم مع تسلسل جينوم بلاستيدات نبات مصاب بالفايروسات *Squash Vein Yellowing Virus* و *Tomato leaf curl Palampur virus* حيث أن منطقة Ycf2 gene Iraq هي منطقة التغاير الثانية الواقعة من ضمن الجين Ycf2 gene ، علما أن (1) يمثل جينوم البلاستيدات الخضراء لصنف خيار المصاب ، و (2) فتمثل جينومات البلاستيدات .

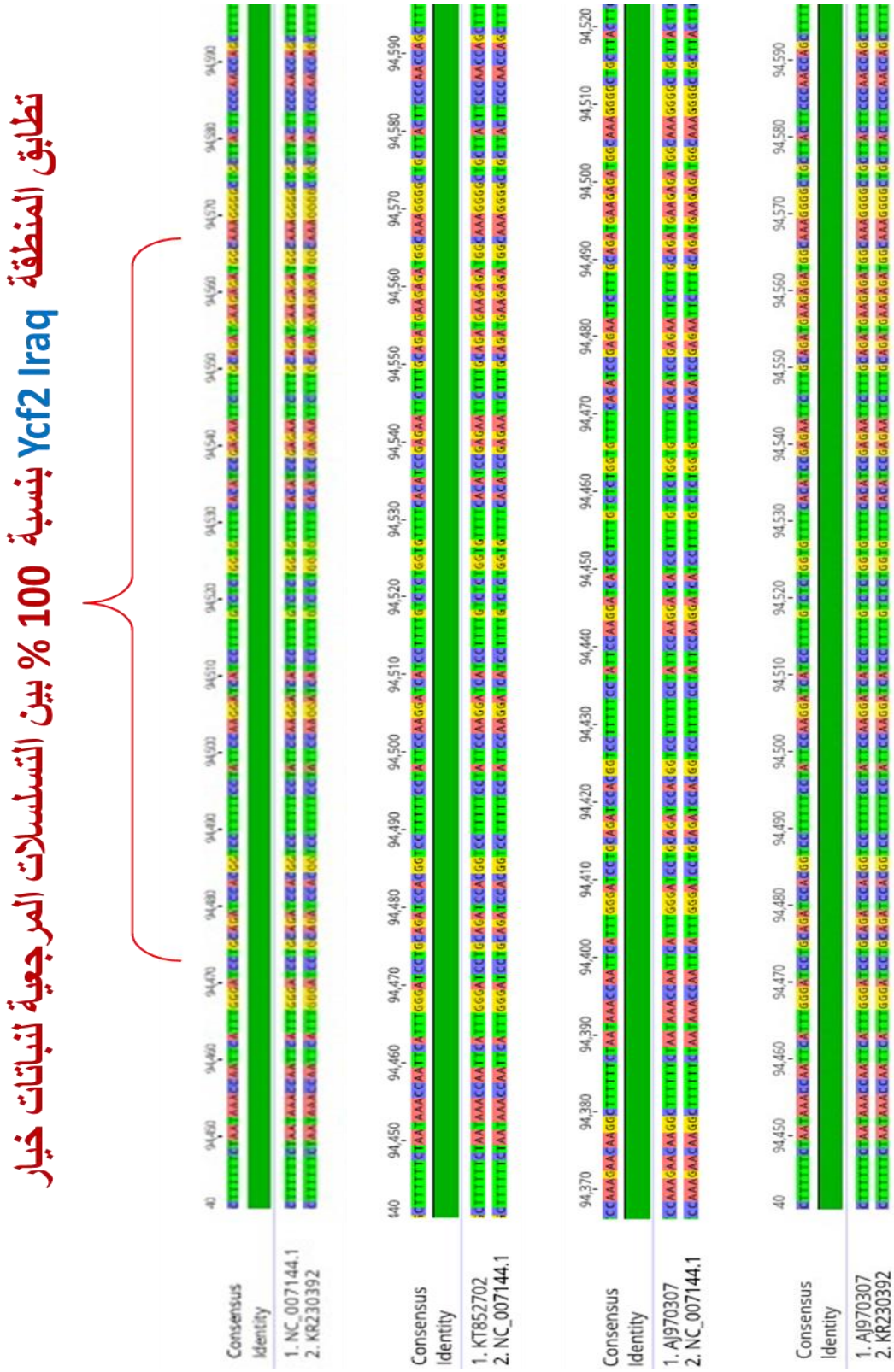


شكل (4.16) التطابق Pairwise Identity بين جينومات بلاستيدات التسلسلات المرجعية لبعض أصناف الخيار السليم مع تسلسل جينوم بلاستيدات نبات مصاب بالفايروسات *Squash Vein Yellowing Virus* و *Tomato leaf curl Palampur virus* حيث أن منطقة 23SrRNA gene Iraq هي منطقة التغاير الثالثة الواقعة من ضمن الجين23SrRNA والمنطقة الجينية المحذوفة 23 SrRNA gene Iraq علما أن (1) يمثل جينوم البلاستيدات الخضراء لصنف خيار المصاب ، (2) فتمثل جينومات البلاستيدات الخضراء لبعض أصناف الخيار .

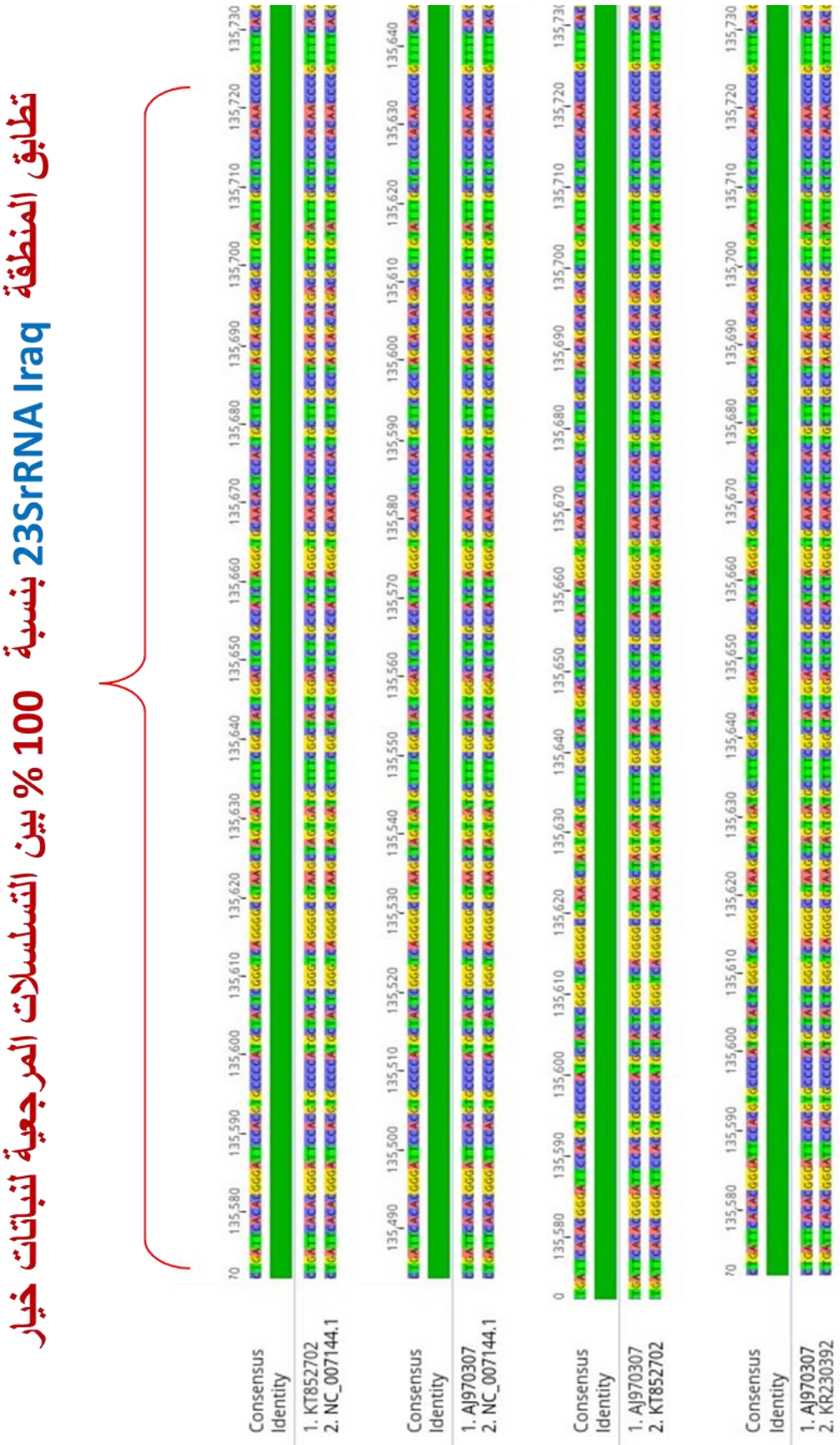
للتأكد من أن التغاير والفقدان الحاصل في القطع الجينية المذكوره أعلاه ناتج عن الاصابة الفايروسية وليس تغاير وراثي بين الأصناف والهجن ، فقد تم عمل مطابقة بين تسلسلات الاحماض النووية الكاملة للبلاستيدات الخضراء (Pairwise alignments) العائدة لأربعة أصناف مختلفة (NC-007144 ، KT852702 ، KR230392 ، AJ970307) وهجينين (MT721154 ، MF095790) كل نباتين على حدة ، وجد أن المناطق الجينية (rps16 gene Iraq ، Ycf2 gene Iraq، 23 SrRNA gene Iraq و 23SRNA gene Iraq) موجودة في جميع الأصناف الأربعة و بنسبة تطابق 100% كما في شكل (4.17) و(4.18) و(4.19) وغير موجودة في الهجينين (MT721154 ، MF095790) عدا المنطقة الجينية 23SrRNA Iraq موجودة في الأصناف والهجن وبنسبة تطابق 100% .



شكل (4.17) نسبة تطابق Pairwise Identity جينومات بلاستيدات التسلسلات المرجعية لبعض أصناف الخيار السليم مع بعضها في برنامج Geneious للمنطقةالجينية rps16 Iraq الواقعة ضمن الجينrps16 .



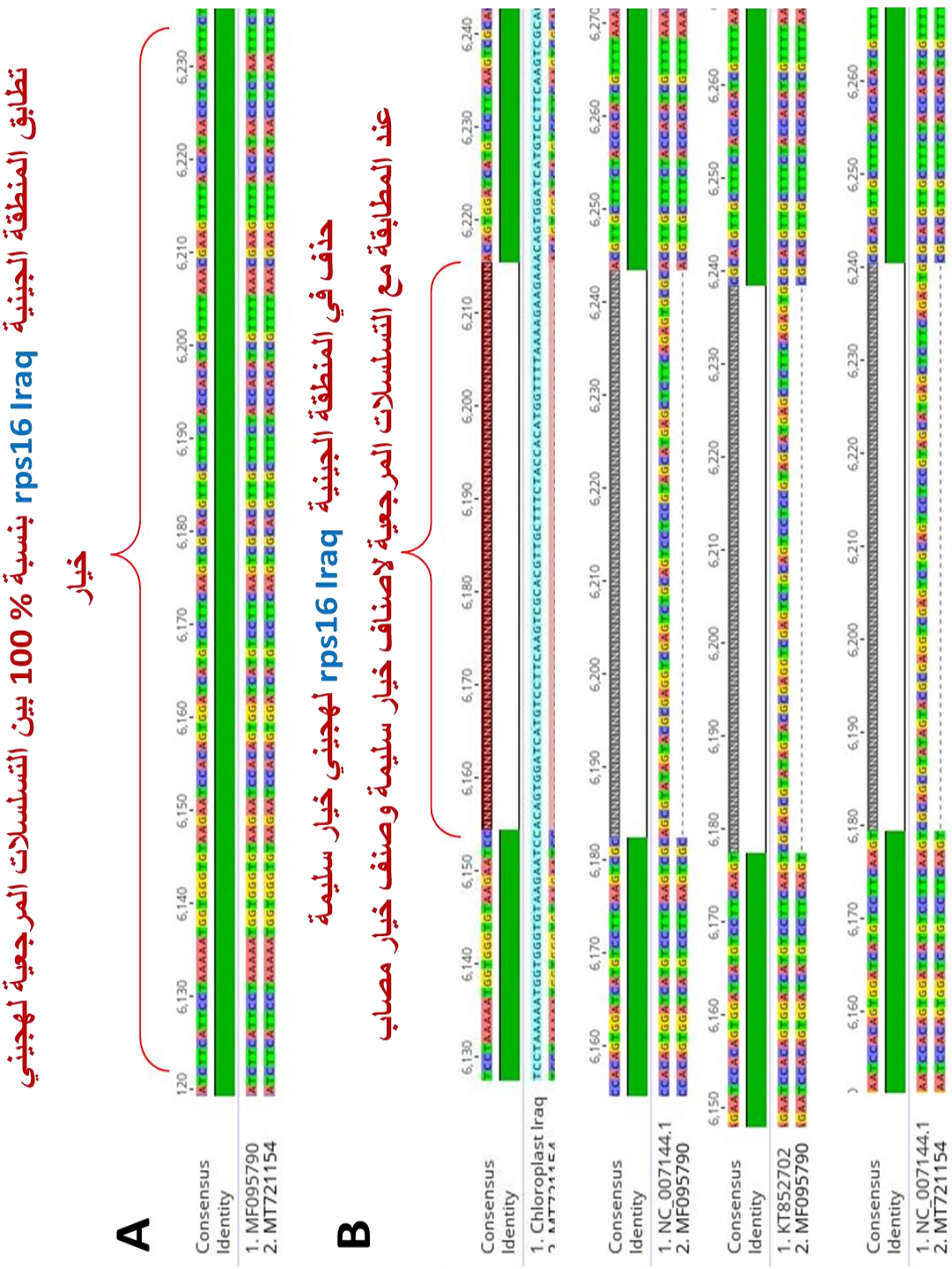
شكل (4.18) نسبة تطابق Pairwise Identity جينومات بلاستيدات التسلسلات المرجعية لبعض أصناف الخيار السليم مع بعضها في برنامج Geneious للمنطقةالجينية Ycf2 gene الواقعة ضمن الجين Ycf2 gene Iraq .



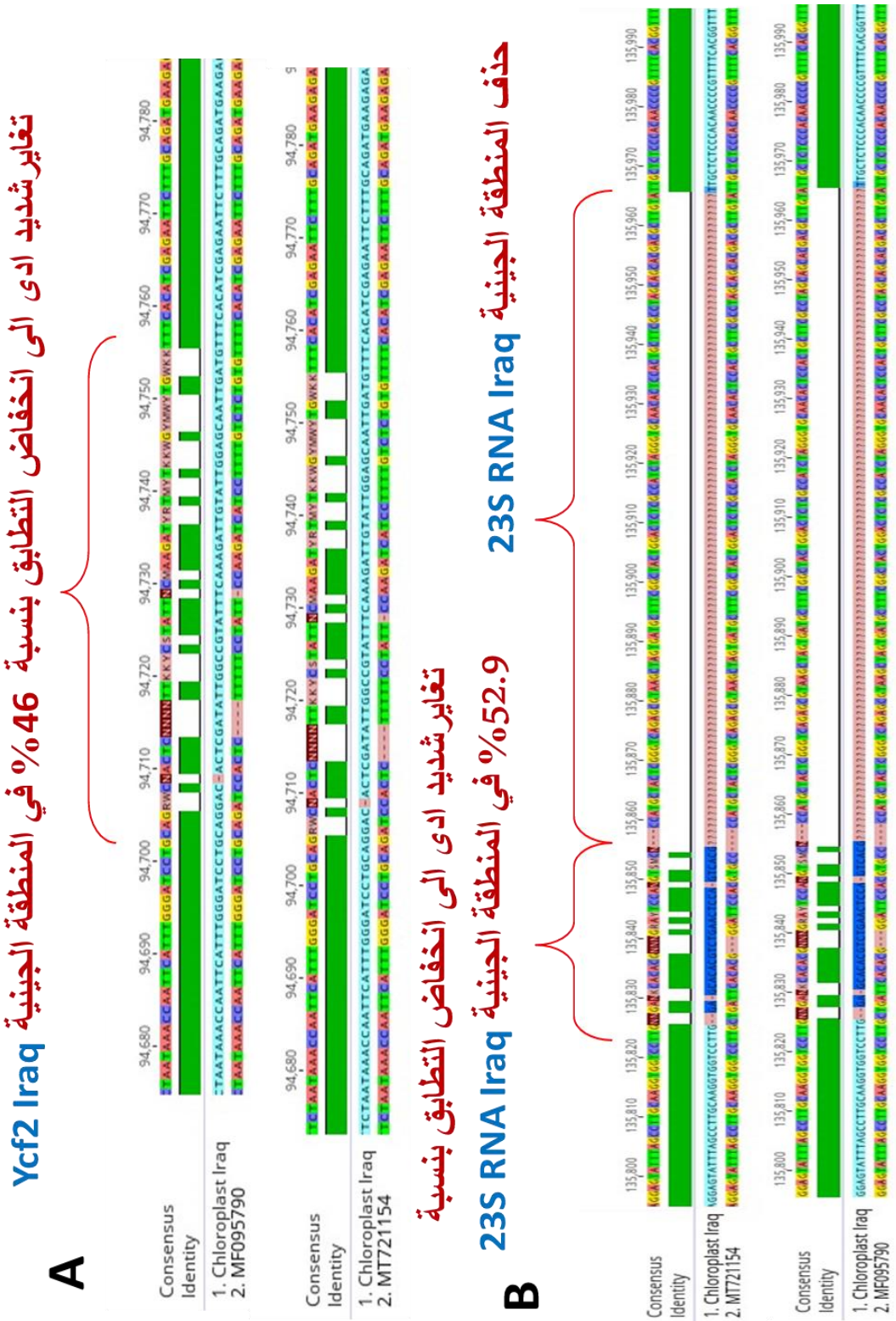
شكل (4.19) نسبة تطابق Pairwise Identity جينومات بلاستيدات التسلسلات المرجعية لبعض أصناف الخيار السليم مع بعضها في برنامج Geneious للمنطقةالجينية 23SrRNA gene Iraq الواقعة ضمن الجين 23SrRNA gene .

كما وجد في الهجينيين منطقتين (Ycf2 gene Iraq ، rrn23 gene Iraq) وغير موجودة في الأصناف عند مطابقة الهجينين مع بعضهما ، وجد أن هذه المناطق تتطابق بنسبة 100 % ولكن عند اجراء المطابقة بين جينومات البلاستيدات الخضراء للأصناف ، والهجن المذكورة أعلاه ، وبين جينوم بلاستيدات خضراء لنبات مصاب تبين أن المناطق (rps16 gene Iraq ، Ycf2 gene Iraq و23 SrRNA gene Iraq) متغايرة بدرجة شديدة و أن المنطقة الجينية (23SRNA gene Iraq) مفقودة أما التطابق بين جينومات بلاستيدات الخضراء لهجينيين وجينوم بلاستيدات نبات مصاب اتضح وجود تغاير شديد في منطقتين الجينيتين (Ycf2 gene Iraq ، 23SrRNA gene Iraq) ومنطقة محذوفة (23 rrna gene Iraq) كما في الشكل (4.20) (4.21) .

مما سبق ربما يعود وجود هذا التغاير الشديد في بعض جينات البلاستيدة الخضراء لنبات سليم وآخر مصاب إلى تأثير الاصابة الفايروسية على الحامض النووي DNA لجينات البلاستيدات الخضراء في النبات المصاب بالفايروسات *Squash vein yellowing virus* isolate SVYV/Iraq و *Tomato leaf curl Palampur virus* isolate Babylon1 .



شكل (4.20) نسب تطابق Pairwise Identity ومناطق الحذف بين جينومات بلاستيدات التسلسلات المرجعية لهجن خيار سليم مع تسلسل جينوم بلاستيدات نبات مصاب بالفايروسات *Squash Vein Yellowing Virus* و *Tomato leaf curl Palampur virus* وجينومات بلاستيدات بعض أصناف خيار سليم حيث أن : A) التطابق في المنطقة الجينة rps16 Iraq بين هجينين خيار سلم . B) التطابق في المنطقة الجينة 23SrRNA . علما أن 1) تمثل جينوم صنف الخيار المصاب . 2) تمثل هجن الخيار السليم.



شكل (4.21) نسب تطابق Pairwise Identity ومناطق الحذف بين جينومات بلاستيدات التسلسلات المرجعية لهجن خيار سليم مع تسلسل جينوم بلاستيدات نبات مصاب بالفايروسات *Squash Vein Yellowing Virus* و *Tomato leaf curl Palampur virus* حيث أن :

A) التطابق في المنطقة الجينة Ycf2 Iraq. B) التطابق في المنطقة الجينة 23SrRNA .

علما أن 1) تمثل جينوم صنف الخيار المصاب 2) تمثل هجن الخيار السليم.

تعد البلاستيدات الخضراء واحدة من أكثر العضيات المهمة في الخلية النباتية حيث أنها تقوم بعملية التمثيل الضوئي ، وتجمع الهرمونات النباتية الرئيسة ، وتلعب دورًا فاعلا في الاستجابة الدفاعية ضد العدوى الفايروسية (Bhattacharyya و Chakraborty ، 2018 ؛ Zhai واخرون ، 2021) . أن جينومات البلاستيدات الخضراء والميتوكوندريا تحتوي جينات بلغت ما بين (100 - 200) جين تشفر البروتينات المشاركة في التعبير الجيني للعضيات Organellar Gene Expression (OGE) ، والتمثيل الضوئي ، وسلسلة نقل الإلكترون (Robles و Quesada ، 2019).

تعد البلاستيدات الخضراء هدفا رئيسا للفيروسات ، لذا تسبب أضراراً تركيبية ووظيفية فيها ، في أثناء العدوى الفيروسية كما ترتبط نسب كبيرة من منتجات الجينات في نبات مصاب بالفايروس ارتباطًا وثيقًا ، وأيضاً البلاستيدات الخضراء وعملية التمثيل الضوئي. على الرغم من أن البلاستيدات الخضراء تعاني من نقص في آلية إسكات الجينات ، إلا أنها تثير الاستجابة المناعية التي يثيرها المستجيب ضد مسببات الأمراض الفيروسية (Bhattacharyya و Chakraborty ، 2018 ؛ Zhai واخرون ، 2021 ؛ Kaur واخرون ، 2022) .

تشترك البلاستيدات الخضراء في تنظيم تفاعل الفايروس مع النبات ، لذا عادةً ما تؤدي العدوى الفيروسية إلى زيادة مستويات انواع الأوكسجين الفاعلية Reactive Oxygen Species (ROS) ومع ذلك ، فإن كيفية مساهمة (ROS) في ظهور الأعراض لم يتم توثيقها جيدًا ، (Bhattacharyya و Chakraborty ، 2018 ؛ الربيعي ، 2021 ؛ Lin واخرون 2022) .

عند تعرض الجينوم النباتي لاجهاد احيائي أوغير احيائي فأنه ينتج ROS الذي يسبب تلف في الاحماض النووية ومن ثمّ ينتج عنه تأثيرات فسلجية مختلفة مثل انخفاض في تخليق البروتين ، ضعف الخلية و تلف البروتينات واحداث الطفرات مما يؤدي إلى التأثير على تطور ونمو الكائن الحي بأكمله ، يمكن أن يؤثر على توقيف أو تحفيز النسخ ، و مسارات تحويل الاشارة (الربيعي ، 2021).

من المعروف أن الإصابات الفايروسية تسبب العديد من التغييرات في البلاستيدات الخضراء لتسهيل تضاعف الفايروس وحركته ، فعادةً ما تؤدي العدوى الفايروسية ، التي تسبب الموزائيك أو التبقع في الأوراق إلى زيادة مستويات ROS ، الذي عادة ما ينتج في البلاستيدات الخضراء وكذلك Peroxisomes ، الذي هو نوع من الأجسام الدقيقة موجود في سايتوبلازم الخلايا حقيقية النواة) والمايتوكوندريا لذلك يكون DNA لهذه العضيات أكثر حساسية للتلف ، حيث يكمن الخطر في اكسدة السكر الموجود وحصول تغيير في القواعد النتروجينية (حذف أو إضافة)

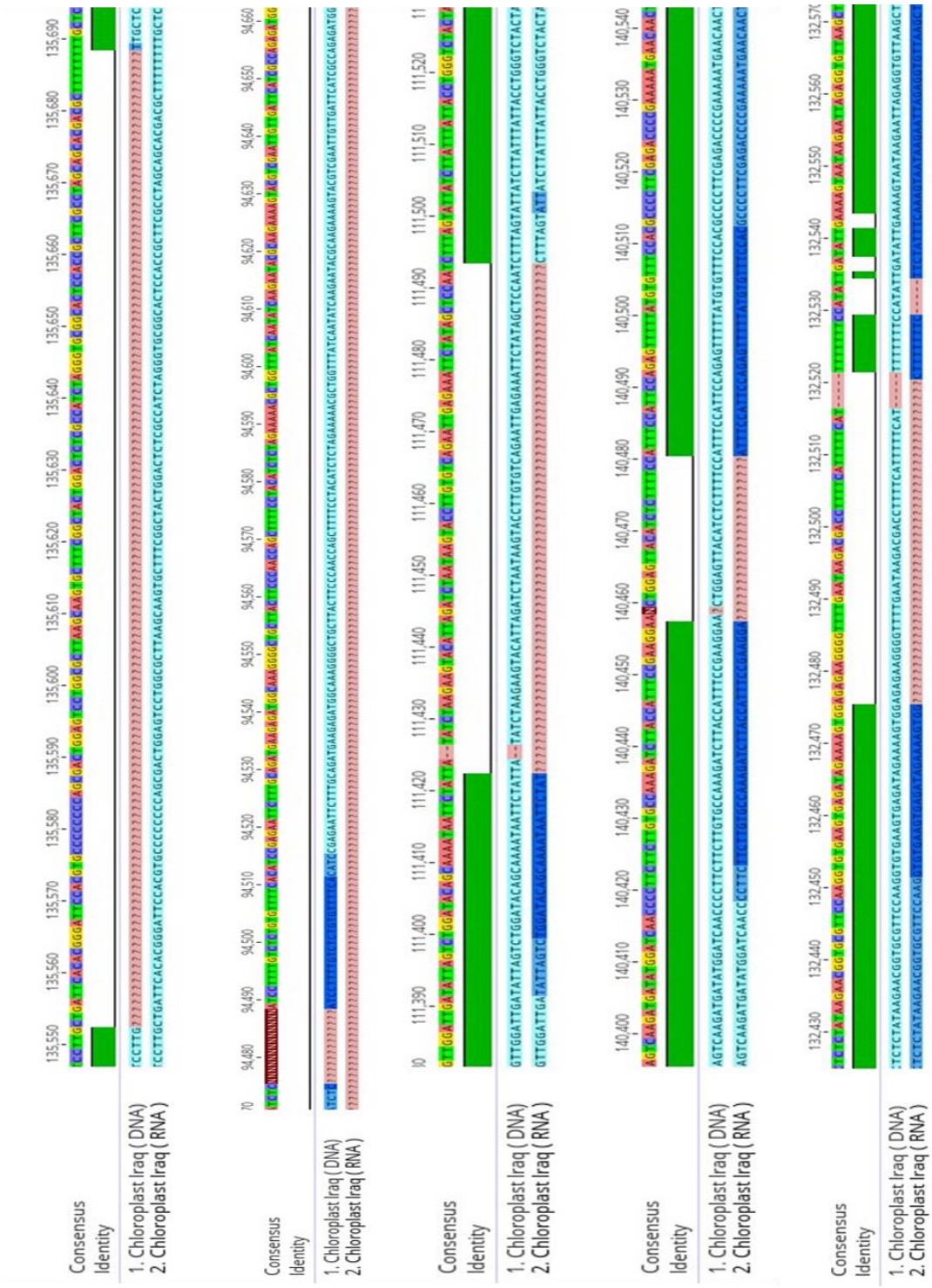
وكذلك قد يحدث كسر أوتشوهات في شريط DNA . كما يعد جذر الهيدروكسيل •OH هو الجذر الأكثر ضرراً للحامض النووي DNA من خلال قدرته على التفاعل مع القواعد النتروجينية ومع السكردايوكسي رايبوزوأيضاً يكسر الآصرة المزدوجة للقواعد النتروجينية (الربيعي ، 2021 ؛ Lin واخرون 2022 ؛ Kaur واخرون 2022) . وهذا يفسر وجود مناطق الحذف في التسلسل الموجود.

4.11. التعبير الجيني لجميع جينات البلاستيدات الخضراء في خلية نبات خيار مصابة بالفايروسات *Squash vein yellowing virus* isolate SVYV/Iraq و *Tomato leaf curl Palampur virus* isolate Babylon1:

أظهرت نتائج ربط التسلسل المرجعي للبلاستيدات الخضراء بالقراءات الخام للحامض النووي RNA بوجود 57124531 قراءة مرتبطة غطت Coverage كامل التسلسل المرجعي إلا أن المناطق الأكثر تغطية كانت بين تسلسلي (287 -3355) زوج قاعدة وهذه تمثل الجين psbA الذي ينتج بروتين النظام الضوئي الثاني photosystem II protein D1 وهو بروتين متعدد الوحدات موجود في أغشية التمثيل الضوئي للنباتات يستعمل في نقل الإلكترون الناجم عن الضوء وتفاعلات انقسام الماء لإنتاج البروتونات والإلكترونات والأوكسجين الجزيئي، علما أن البروتونات المتكونة لها دور فعال في تكوين ATP . يتم إصدار ثنائي الأوكسجين الجزيئي كمنتج ثانوي . تليها المنطقة (67357 – 70529) زوج قاعدة تمثل جين rbcL والمسؤول عن انتاج ribulose-1,5-bisphosphatecarboxylase/oxygenase large subunit ثم المناطق (39813- 40131) زوج قاعدة و (40171- 40787) زوج قاعدة التي تقع من ضمن الجين psbD والمسؤول عن انتاج بروتين البناء الضوئي الثاني photosystem II protein D2 وهذا له الوظيفة نفسها photosystem II protein D1 والمنطقة (41351- 42070) زوج قاعدة التي تقع من ضمن الجين psbD وينتج بروتين Putative Photosystem Antenna Protein أما المنطقة (42324-43666) زوج قاعدة فتقع من ضمن الجين psbC الذي ينتج البروتين البناء الضوئي الثاني CP43 و بروتين الكلوروفيل photosystem II CP43 chlorophyll apoprotein والمنطقة (45872 – 46220) زوج قاعدة ، التي تقع من ضمن الجين rps14 ، الذي ينتج البروتين الرايبوسومي ribosomal protein S14 والمنطقة (46613-46758) زوج قاعدة التي تنتج البروتين الافتراضي hypothetical protein GIB67_017525 وهذه جميعها بروتينات البناء الضوئي .وعند اجراء تطابق Pairwise Identity بين RNA و DNA المنطقة (94431 - 94670) زوج قاعدة المتغايرة تغايرا شديدا في DNA والواقعة من ضمن الجين Ycf2 سببت عدم التعبير لجزء من هذا الجين المحدد بين التسلسلين (94431 - 94670) زوج

قاعدة ضمن RNA ، التي ربما أدّت إلى خلل في عمل الجين من خلال تأثيرها على عملية انتاج الانزيمات المسؤولة عن اطلاق الطاقة . أما المنطقة المتغايرة (6162 – 6210) الواقعة من ضمن جين rps16 حذف في بعض قواعد RNA إلا أن هذا لم يغير نوع البروتين المنتج من قبل الجين .

إن الفقد الحاصل في DNA في المنطقة (135552- 135662) زوج قاعدة ، الذي يكون من ضمن الجين 23SrRNA لم يؤثر على وظيفته في انتاج 23S ribosomal RNA فقد تم التعبيرعن الجين بشكل كامل كما في الشكل (4.22) وقد يعزى سبب ذلك الى احتمال وجود هذا الجين في النواة ايضاً وبالتالي تعبيره الجيني واستنساخ قطع mRNA عملت على تغطية هذا الفقد في عملية المحاذاة Alignment.



شكل (4.22) مقدار الضرر الحاصل على اجزاء من الجينوم الكامل DNA البلاستيدة الخضراء في نبات خيار نتيجة الاصابة بالفايروسات *Squash vein yellowing virus* isolate SVYV/Iraq و *Tomato leaf curl Palampur virus* isolate Babylon1 وتأثيره على التعبير الجيني من خلال التطابق Pairwise alignment في برنامج Genious علما أن (1) جينوم الحامض النووي DNA للبلاستيدات الخضراء لصنف خيار المصاب ، (2) جينوم الحامض النووي RNA للبلاستيدات الخضراء لصنف خيار مصاب .

تحتوي كل خلية في النبات على نفس المعلومات الجينية ونفس مجموعة الجينات ، لذلك تحتاج إلى مجموعات من الجينات المطلوبة لأداء وظائف متعددة في الخلايا أو الأنسجة المختلفة ، وكذلك لاستجابات النبات للإشارات أو الضغوط البيئية .يتم تحقيق ذلك من خلال تنظيم نشاط الجينات على وفق المتطلبات الفسيولوجية لنوع معين من الخلايا ، أومرحلة النمو أوالحالة البيئية يُعرف تنظيم النشاط هذا بالتعبير الجيني يتضمن التعبير الجيني النسخ Transcription لإنتاج mRNAs والترجمة Translation لانتاج البروتينات (Buccitelli و Selbach ، 2020 ؛ Suza واخرون ،2021).

فهم التعبير الجيني يتطلب فحص عمليتين ، تنشيط التعبير الجيني لتكوين رسالة ، وقراءة هذه الرسالة لبناء بروتين معين، ولكن عندما لا تتفاعل الخلايا بشكل صحيح ، أو تفتح تشفير الرسائل الجزيئية بشكل غير صحيح ، فأن المرض قد يستتبع ذلك ، ففي الحالة الطبيعية يتطلب التعبير عن الجينات في خلايا ، وأنسجة ، وأعضاء نباتية معينة ، وتوقيت هذا التعبير مستوى دقيقًا من التنظيم أو الوظيفة الجينية ، الا أنه عند حدوث العدوى الفايروسية تؤثر على مستويات التعبير عن الجينات المرتبطة بالبلاستيدات الخضراء ، حيث يحدث انخفاض في كميات البروتينات المتخصصة ، التي ترتبط بجزيئات النظام الضوئي ، لذا ممكن أن تعزى الأعراض المرضية الفايروسية على النبات إلى تأثير الفايروس على أيض العائل من خلال تحفيز الفايروس للعائل على تخليق بروتينات جديدة تكون بعضها مواد فعالة بايولوجياً (أنزيمات ، هرمونات ... الخ) يمكن أن تتعارض مع الأيض الطبيعي للعائل كما قد تكون بعض الجينات هدفا شائعا للفايروسات (قاسم ،2011؛ شريف ، 2011 ؛ Chaturvedi واخرون ،2016 ؛ Armingol واخرون 2021 ؛ وZhai واخرون ،2021 ؛ Suza و اخرون ، 2021 ؛ Biju واخرون 2022) .

ان الخلل الحاصل في التعبير الجيني لبعض جينات البلاستيدات الخضراء المختبرة ممكن أن يعزى إلى تأثير الاصابة الفايروسية على الاحماض النووية الخلوية والرايبوسومات من خلال تأثيرها على تخليق rRNA لخلايا العائل وهذا التأثير يتباين باختلاف الفايروس وسلالاته ووقت الاصابة ونوع العائل ونوع النسيج المصاب كما وجد أن كمية RNA للفايروس المخلقة تساوي كمية RNA للخلية المدمر بسبب الاصابة كما أنها تؤثر على الاحماض الامينية من خلال زيادة في بعضها مثل الجلوتامين Glutamine والاسبارجين Asparagine وظهور حامض البيبيكولك Pipecolic ومن ثمّ تغير نوع البروتينات وتراكيزها في النبات المصاب (قاسم ،2011 ؛ Guo واخرون ،2019) .

إن المعلومات الجينية مخزنة في ثلاثة توائم نيوكليوتيدات يشار إليها باسم الكودونات Codons ، العديد من الأحماض الأمينية يتم تحديدها بأكثر من كودون واحد من

ضمنها ثلاثة كودونات توقف هي UAA، UAG و UGA حيث تحدد هذه الكودونات إنهاء تخليق سلسلة الببتيد في أثناء الترجمة. وكودون البدءAUG الذي يمثل الحامض الأميني الميثيونين Methionine لبدء تخليق متعدد الببتيد ، عند اختلاف تسلسل الكودونات عن الأصل ، يتغير تسلسل الأحماض الأمينية بالكامل ويحدث هذا تأثيراً عند حصول عمليات الحذف أوالاضافة حيث يمكن للحذف أوالإضافة تغيير إطار القراءة للتسلسل التالي بأكمله ، و يظهر هذا التأثير عندما لا يكون عدد قواعد النوكليوتيدات التي تم إدخالها أوحذفها من مضاعفات 3 ، وعادة ما يؤدي ذلك إلى فقدان وظيفة البروتين كما قد تنشأ طفرة غير منطقية عندما يتم تغيير كودون وظيفي إلى كودون توقف .قد تتسبب الطفرات غير المنطقية في الإنهاء المبكر للترجمة (Suza و اخرون ، 2021) .

وجد في بعض الحالات أن الاصابة الفايروسية تؤدي إلى اسكات التعبير عن بروتينات البناء الضوئي وزيادة في التعبير عن بروتين العائل ، الذي يتفاعل مع بروتين غلاف الفايروس فمثلا ادت اصابة نبات *Nicotiana benthamiana* بفايروس *Tomato mosaic virus* إلى اسكات التعبير عن البروتينات المرتبطة بالتمثيل الضوئي *PsbO* و *PsaD* و *PsaF* و*PetE* وزيادة في التعبيرعن بروتينات تفاعل العائل مع بروتينات غلاف الفايروس ما أدّى إلى تقليل محتوى الكلوروفيل بشكل كبير وظهور أعراض الموزائيك (Liu واخرون ،2021)

انخفض التعبير عن 119 جينًا بشكل ملحوظ بمقدار 1.5 ضعف أوأكثر استجابةً لعدوى الفايروس *Tomato chlorosis virus* ToCV حيث تم قمع تعبيرات العديد من الجينات المشاركة في النسخ ، والاستجابة الدفاعية ، والتمثيل الغذائي ، والبناء الضوئي والإشارات عند الإصابة بهذا الفايروس (Çevik واخرون ،2021).

كما وجد أن بروتين الحركة لفايروس *Rice Stripe Virus* (RSV) يحتل البلاستيدات الخضراء للعائل ، ويسبب خفض التعبير الجيني عن بروتينات الدفاع في النبات (Li واخرون ، 2021).

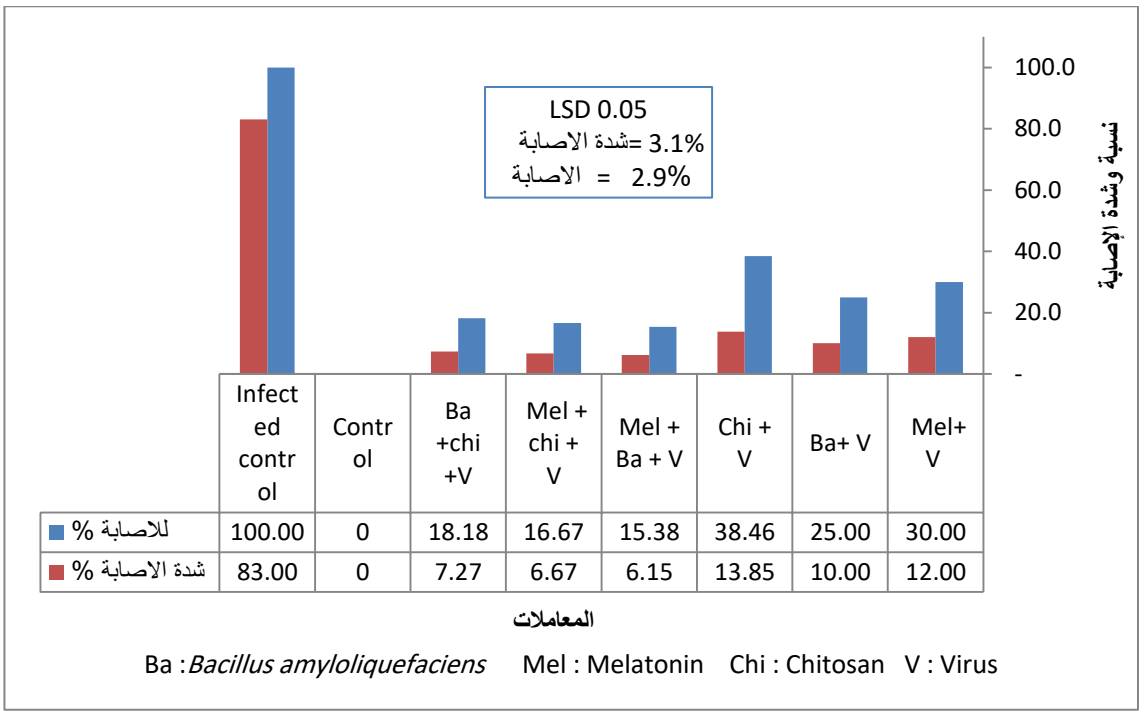
4.12. فاعليـة غمـر بـذور نبـات الخيـار ببكتريـا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة ضد الاصابة الفايروسية :

4.12.1. التغيرات الظاهرية :

4.12.1.1. فاعليـة غمـر بـذور نبـات الخيـار ببكتريـا *B. amyloliquefaciens* ومحلـولي الميلاتـونين والكيتوسـان وتوليفاتهمـا المزدوجـة فـي خفـض نسـبة وشـدة الاصابة الفايروسية :

أظهـرت النتـائج أن معـاملات غمـر البـذور ببكتريـا *B. amyloliquefaciens* ومحلـولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة خفضا معنويا في نسبة وشدة الاصابة الفايروسية فقد اتضح من النتائج أن غمر البذور بالتوليفات المزدوجة (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الميلاتـونين ، بكتريـا *B. amyloliquefaciens* ومحلـول الكيتوسـان ، محلـولي الميلاتـونين والكيتوسان) الملقحة بالفايروس أعطت اقل نسبة وشدة اصابة من استخدام المعاملات المذكورة منفردة فقد تفوقت التوليفة (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الميلاتونين) في خفض نسبة الاصابة وشدتها ، حيث بلغت 15.38 % و 6.15 % على التوالي ثم تأتي التوليفة (خليط من محلولي الميلاتونين والكيتوسان) حيث بلغت نسبة وشدة الاصابة فيها 16.67% و 6.67 % على التوالي أما التوليفة (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الكيتوسان) فقد أعطت نسبة وشدة اصابة 18.8 % و 7.27 % على التوالي.

بينما كانت نتائج غمر البذور بالمعاملات بكتريا *B. amyloliquefaciens* ، محلول الميلاتونين ، محلول الكيتوسان منفردة على خفض نسبة الاصابة وشدتها معنوية حيث بلغت معدلات نسبة الاصابة 25.00 % ، 30% و 38.46% على التوالي بينما كانت معدلات شدة الاصابة 10 % ، 12% و 13.85 % على التوالي مقارنة بمعاملة المقارنة الملقحة بالفايروس Infected control التي بلغت نسبة الاصابة فيها 100% وشدة اصابة 83.00 % كما في الشكل (4.23) .



شكل (4.23) فاعلية غمر بذور نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة في خفض نسبة وشدة الاصابة الفايروسية .

ومن النتائج أعلاه تبين أن استخدام العوامل آنفة الذكر بشكل مفرد ، أوتوليفات مزدوجة حفزت المقاومة المستحثة الجهازية في نباتات الخيار ضد الاصابة الفايروسية من خلال تقليل ضراوة الممرض، حيث خفض من شدة ونسبة الأعراض المرضية على النباتات المعاملة .

كما أن الخفض الحاصل في نسبة الاصابة و شدتها في التوليفات المزدوجة للعوامل أكثر من معاملات العوامل مفردة قد يعود إلى الفعل التآزري لهذه العوامل في تحفيزو تحسين مقاومة النبات ضد الاصابة الفايروسية وخفض ضراوة الفايروسات المرضية ، ولا توجد دراسات سابقة على استعمال هذه التوليفات المذكورة آنفا .

4.12.1.2. فاعلية غمر بذور نبات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على معايير النمو الجذري والخضري :

حققت معاملات غمر بذور الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة زيادة معنويا على معايير النمو الجذري ، والخضري والمتمثلة بأطوال المجموعين الجذري ،والخضري وأوزانهما الطرية ، والجافة والمساحة السطحية للأوراق في جدول (4.5) ، فقد تفوقت معاملات التوليفات المزدوجة (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الميلاتونين ، بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الكيتوسان ، محلولي الميلاتونين والكيتوسان) ، وغير الملقحة بالفايروس على بقية المعاملات فقد تراوحت معدلات اطوال المجاميع الخضرية بين (77- 82.7) سم ، ومعدلات اطوال المجاميع الجذرية بين (79-73.5) سم ، أما معدلات الأوزان الطرية للمجاميع الخضرية فكانت بين (56.8 – 60.8) غم ، ومعدلات الأوزان الطرية للمجاميع الجذرية فتراوحت بين (38.0 – 40.57) غم ، فيما تراوحت معدلات الأوزان الجافة للمجاميع الخضرية بين (18.7- 21.0) غم ، ومعدلات الأوزان الجافة للمجاميع الجذرية بين (15.9 – 16.3) غم ، أما معدلات المساحة السطحية للأوراق فكانت بلغت ما بين (77.0 – 80.1) سم^2. في حين تشابهت معاملات التوليفات المزدوجة (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الميلاتونين ، بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الكيتوسان ، محلولي الميلاتونين والكيتوسان) والملقحة بالفايروس معنويا مع التوليفات المزدوجة غير الملقحة ، وكذلك مع معاملة المقارنة ، أما نتائج معاملات غمر البذور ب (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ، محلول الميلاتونين ، محلول الكيتوسان) منفردة وغير الملقحة ، التي كانت معدلات اطوال مجاميعها الخضرية بلغت بين (61.0 – 66.3) سم ، ومعدلات اطوال مجاميعها الجذرية بلغت بين (68.0 – 72.3) سم ، و معدلات الأوزان الطرية لمجاميعها الخضرية بلغت بين (43.8 – 49.7) غم ، وكانت معدلات الأوزان الطرية للمجاميع الجذرية بلغت بين (31.8 – 36.2) غم ، و معدلات أوزانها الجافة لمجاميعها الخضرية كانت بلغت بين (12.8 – 16.0) غم ، فيما كانت معدلات الأوزان الجافة لمجاميعها الجذرية فكانت بين (12.4 -12.7) غم ، في حين كانت معدلات المساحة السطحية لأوراقها بلغت بين (57.9 -59.3) سم^2 ، ولم تظهر أية فروق معنوية بينها وبين معاملات غمر البذور بكتريا *B. amyloliquefaciens* ، محلول الميلاتونين ، محلول الكيتوسان منفردة و الملقحة بالفايروس ، التي كانت معدلات اطوال مجاميعها الخضرية بلغت بين (56.7 – 59.7) سم ، ومعدلات اطوال مجاميعها الجذرية بلغت بين (66.0 – 69.7) سم و معدلات الأوزان

الطرية لمجاميعها الخضرية بلغت بين (37.6 – 41.1) غم ، و كانت معدلات الأوزان الطرية للمجاميع الجذرية بلغت بين (26.4 – 31.7) غم ، و معدلات أوزانها الجافة لمجاميعها الخضرية كانت بلغت بين (12.4 – 13.4) غم ، فيما كانت معدلات الأوزان الجافة لمجاميعها الجذرية فكانت بين (10.8 - 11.4) غم ، في حين كانت معدلات المساحة السطحية لأوراقها بلغت بين (52.8 -55.7) سم^2 ، و أن جميع المعاملات تفوقت معنويا على معاملتي المقارنة والمقارنة الملقحة بالفايروس فكانت نتائج معايير النمو لمعاملة المقارنة والمتمثلة بمعدل طول مجموعها الخضري47.7 سم ، معدل طول مجموعها الجذري 57.0 سم ،الوزن الطري لمجموعها الخضري 35.2 غم ، الوزن الطري لمجموعها الجذري 25.0 غم ،الوزن الجاف لمجموعها الخضري 9.6 غم ، الوزن الجاف لمجموعها الجذري 6.9 غم والمساحة السطحية لأوراقها 42.8 سم^2 ، بينما اختلفت جميع المعاملات المذكورة أعلاه اختلافا معنويا عن معاملة المقارنة الملقحة بالفايروس فقط Infected control ، التي كان معدل طول مجموعها الخضري27.7 سم ، معدل طول مجموعها الجذري 34.3 سم ،الوزن الطري لمجموعها الخضري 16.4 غم ، الوزن الطري لمجموعها الجذري 11.7 غم ،الوزن الجاف لمجموعها الخضري 4.3 غم ، الوزن الجاف لمجموعها الجذري 3.0 غم والمساحة السطحية لأوراقها 16.1 سم^2 .

جدول (4.5) فاعلية غمر بذور نبات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على معايير النموالخضري والجذري.

ت	معايير النمو	طوا المجموع الخضري (سم)		تأثير المعاملة	طول المجموع الجذري (سم)		تأثير المعاملة	الوزن الطري للمجموع الخضري (غم)		تأثير المعاملة	الوزن الطري للمجموع الجذري (غم)		تأثير المعاملة	الوزن الجاف للمجموع خضري (غم)		تأثير المعاملة	الوزن الجاف للمجموع الجذري (غم)		تأثير المعاملة	مساحة الورقة ($سم^2$)		تأثير المعاملة
	المعاملة	سليم	مصاب		سليم	مصاب		سليم	مصاب		سليم	مصاب		سليم	مصاب		سليم	مصاب		سليم	مصاب	
1	Control	47.7	27.7	37.7	57.0	34.3	45.7	35.2	16.4	25.8	25.03	11.7	18.4	9.6	4.3	7.0	6.9	3.0	5.0	42.8	16.1	29.5
2	mel	66.3	59.7	63.0	72.3	69.7	71.0	49.7	41.1	45.4	36.17	30.6	33.4	16.0	12.7	14.4	12.6	10.8	11.7	59.3	52.8	56.1
3	Ba	61.0	57.3	59.2	68.0	68.3	68.2	43.8	37.6	40.7	32.3	31.7	32.0	12.8	12.4	12.6	12.4	11.1	11.8	59.0	54.4	56.7
4	chi	65.7	56.7	61.2	69.7	66.0	67.9	48.3	40.7	44.5	31.8	26.4	29.1	15.0	13.4	14.2	12.7	11.4	12.1	57.9	55.7	56.8
5	Mel + Ba	79.7	65.3	72.5	81.7	72.0	76.9	57.6	48.2	52.9	40.57	37.37	39.0	21.0	18.6	19.8	16.3	16.0	16.2	79.5	76.0	77.8
6	Mel + chi	70.0	58.3	64.2	77.0	72.0	74.5	56.8	45.1	51.0	38.03	37.43	37.7	18.7	20.1	19.4	16.1	15.9	16.0	80.1	72.0	76.1
7	Ba +chi	70.3	67.0	68.7	82.7	70.7	76.7	60.8	58.6	59.7	39	39.77	39.4	19.7	17.9	18.8	15.9	15.6	15.8	77.0	71.6	74.3
	تأثير الاصابة	65.81	56.00		72.6	64.7		50.3	41.1		34.7	30.71		16.1	14.2		13.3	12.0		65.1	56.9	
	LSD 0.05 للاصابة	6.9			7.5			14.03			7.50			3.44			1.61			1.11			10.01
	LSD 0.05 للمعاملات	12.9			14.06			19.84			14.03			6.44			3.02			2.08			18.74
	LSD 0.05 للتداخل	18.3			19.8			19.84			14.03			9.11			4.27			2.94			26.50

•**Ba :** ***Bacillus amyloliquefaciens*** **, Mel : Melatonin , Chi : Chitosan (كل رقم يمثل معدل ثلاث مكررات)**

4.12.1.3. فاعلية غمر بذور نبات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على أعداد ووزن الثمار الكلي لمعدل ثلاث جنيات :

أظهرت النتائج غمر بذور نبات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على أعداد و وزن ثمار الخيار الموضحة في الجدول (4.6) أن أعلى عدد ثمار و وزن حاصل كان في معاملات التوليفات المزدوجة (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الميلاتونين ، بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الكيتوسان ، محلولي الميلاتونين والكيتوسان) غير الملقحة حيث كان معدل أعداد الثمار لثلاث جنيات يتراوح بين (4.0 -4.33) ثمرة ومعدل أوزانها يتراوح بين (0.401 – 0.408) كغم في حين كان معدل أعداد الثمار لمعاملات التوليفات المزدوجة (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الميلاتونين ، بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الكيتوسان ، محلولي الميلاتونين والكيتوسان) و الملقحة بالفايروس يتراوح بين (3.33 -4.0) ثمرة ومعدل أوزانها يتراوح بين (0.338-0.348) كغم .

بينما كان معدل أعداد ثمار المعاملات بكتريا *B. amyloliquefaciens* ، محلول الميلاتونين ، محلول الكيتوسان غير الملقحة بالفايروس يتراوح بين (3.33- 3.00) ثمرة ومعدل أوزانها يتراوح بين (0.293- 0.319) كغم في حين كان معدل أعداد ثمار المعاملات (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ، محلول الميلاتونين ، محلول الكيتوسان) الملقحة بالفايروس بلغت بين (2.67- 3.0) ثمرة ومعدل أوزانها يتراوح بين (0.251 - 0.288) كغم .بينما كان معدل أعداد ثمار الخيار في معاملة المقارنة هو 2.67 ثمرة ومعدل أوزان ثمارها هي 0.251 كغم ، أما معاملة المقارنة الملقحة بالفايروس Infected control فاعطت اقل عدد ، و وزن ثمار ، حيث كان معدل عدد ثمارها 1.33 و معدل أوزانها 0.135 كغم .

جدول (4.6) فاعلية غمر بذور نبات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على عدد ووزن الثمار الكلي لثلاث جنيات .

ت	الصفة المقاسة	عدد الثمار/ نبات			وزن الثمار (كغم)		
	المعاملة	سليم	مصاب	تأثير المعاملة	سليم	مصاب	تأثير المعاملة
1	Control	2.67	1.33	2.00	0.753	0.406	0.580
2	Mel	3.33	2.67	3.00	0.957	0.754	0.856
3	Ba	3.00	2.67	2.84	0.890	0.864	0.877
4	Chi	3.00	3.00	3.00	0.878	0.862	0.870
5	Mel + Ba	4.33	4.00	4.17	1.225	1.024	1.125
6	Mel + Chi	4.00	3.33	3.67	1.204	1.015	1.110
7	Chi +Ba	4.33	3.67	4.00	1.217	1.045	1.131
	تأثير الاصابة	3.52	2.95		1.018	0.853	
	$LSD_{0.05}$ للاصابة	0.728			0.017		
	$LSD_{0.05}$ للمعاملة	1.362			0.032		
	$LSD_{0.05}$ للتداخل	1.926			0.045		

Ba : *Bacillus amyloliquefaciens*, Mel : Melatonin , Chi : Chitosan (كل رقم يمثل معدل ثلاث مكررات)

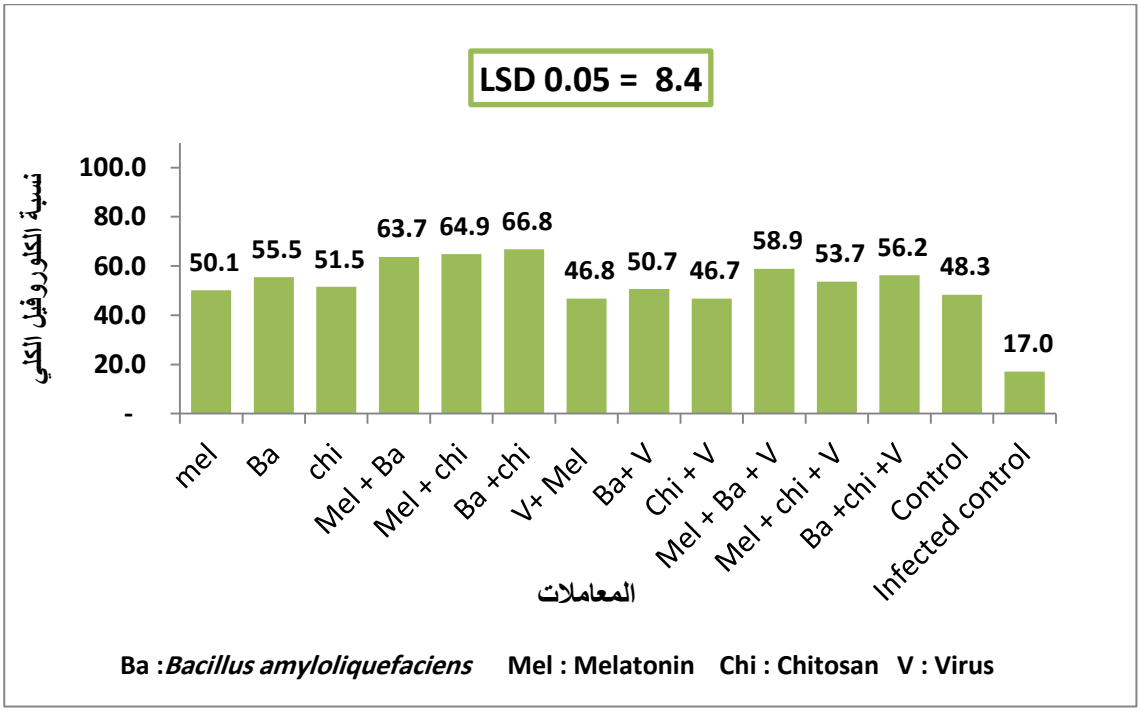
4.12.2. التغيرات الفسلجية :

4.12.2.1. فاعلية غمر بذور نبات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على نسبة الكلوروفيل الكلي :

بينت نتائج فاعلية غمر بذور نبات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على نسبة الكلوروفيل الكلي في الأوراق حيث أظهرت النتائج أن أعلى نسبة للكلوروفيل الكلي في أوراق نباتات الخيار المعاملة بالتوليفة المزدوجة (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الكيتوسان) ، وغير الملقحة بالفايروس بلغت 66.8 ملغم . 100غم $^{-1}$ وقد تشابهت معها معنويا معاملات التوليفات المزدوجة غير الملقحة بالفايروس (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الميلاتونين ، محلولي الميلاتونين

والكيتوسان) ، حيث بلغت نسبة الكلوروفيل الكلي فيها (63.7 ، 64.9) ملغم . 100غم $^{-1}$ على التوالي . كما أن معاملات هذه التوليفات لم تظهر اختلافا معنويا مع معاملات التوليفات المزدوجة (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الميلاتونين ، بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الكيتوسان) والملقحة بالفايروس ، حيث بلغت نسب الكلوروفيل الكلي في أوراقها (58.9 ، 56.2) ملغم . 100غم $^{-1}$ على التوالي ، عدا معاملة التوليفة المزدوجة من محلولي الميلاتونين والكيتوسان والملقحة بالفايروس ، التي اختلفت معنويا عن معاملات التوليفات المزدوجة (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الميلاتونين ، محلولي الميلاتونين والكيتوسان) غير الملقحة بالفايروس ، ولم تختلف معنويا عن معاملات التوليفات المزدوجة (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الميلاتونين ، بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الكيتوسان) الملقحة بالفايروس حيث بلغت نسبة الكلوروفيل الكلي فيها 53.7 ملغم . 100غم $^{-1}$ ، كما أن التوليفة (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الميلاتونين) تفوقت على معاملة المقارنة التي بلغت نسبة الكلوروفيل فيها 48.3 ملغم . 100غم $^{-1}$ بينما لم تختلف معنويا عن معاملات التوليفتين (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الكيتوسان ، محلولي الميلاتونين والكيتوسان) .

لقد كان لمعاملات التوليفات المزدوجة (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الميلاتونين ، بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الكيتوسان ، محلولي الميلاتونين والكيتوسان) والملقحة بالفايروس تأثيرا معنويا أكثر من معاملات (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ، محلول الميلاتونين ، محلول الكيتوسان) المنفردة والملقحة بالفايروس حيث بلغت نسب الكلوروفيل في الأخيرة (50.7 ، 46.8 ،46.7) ملغم . 100غم $^{-1}$ ، لم يكن هناك فروق معنوية بين المعاملات (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ، محلول الميلاتونين، محلول الكيتوسان) المنفردة وغير الملقحة بالفايروس ، التي كانت نسب الكلوروفيل فيها (55.5 ، 49.1 ، 61.8) ملغم . 100غم $^{-1}$ على التوالي. اختلفت جميع المعاملات الآنفة الذكر مع معاملة المقارنة الملقحة بالفايروس Infected control معنويا ، حيث بلغت نسبة الكلوروفيل الكلي فيها 17.0 ملغم . 100غم $^{-1}$ كما في الشكل (4.24).



شكل (4.24) فاعلية غمر بذور نبات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على نسبة الكلوروفيل الكلي (ملغم .100غم $^{-1}$)

4.12.2.2. فاعلية غمر بذور نبات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على نسب العناصر الكبرى NPK في الأوراق :

اتضح أن تأثير غمر بذور نبات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على نسب العناصر الكبرى NPK في الأوراق فقد تبين أن أعلى نسب للعناصر الكبرى NPK كان في معاملات التوليفات المزدوجة (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الميلاتونين ، بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الكيتوسان ، محلولي الميلاتونين والكيتوسان) وغير الملقحة بالفايروس ، حيث كانت معدلات نسب النتروجين Nitrogen المئوية بلغت بين (3.2 % - 3.5 %) ومعدلات نسب الفسفور Phosphorous المئوية بلغت بين (0.51 % – 0.57 %) أما معدلات نسب البوتاسيوم Potassium المئوية فكانت بلغت (2.99% - 3.96%) ولم تختلف عنها معنويا معاملات التوليفات المزدوجة نفسها والملقحة بالفايروس ، حيث كانت معدلات النسب المئوية للنتروجين بلغت بين (2.7% - 2.9 %) ومعدلات النسب المئوية للفسفور بلغت بين (0.45 % - 0.55 %) ، أما معدلات النسب المئوية للبوتاسيوم فكانت بلغت بين (2.69% -3.11%) .

أما نتائج المعاملات (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ، محلول الميلاتونين ، محلول الكيتوسان) منفردة وغير الملقحة بالفايروس فكانت معدلات النسب المئوية للنتروجين N بلغت بين (2.1% - 3.1 %) ومعدلات النسب المئوية للفسفور P بلغت بين (0.47 % - 0.53 %) ومعدلات النسب المئوية للبوتاسيوم K بلغت بين (2.11 % - 2.31 %) لم تختلف معنويا عن المعاملات (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ، محلول الميلاتونين ، محلول الكيتوسان) منفردة والملقحة بالفايروس، حيث كانت معدلات النسب المئوية للنتروجين N بلغت بين (2.0% - 2.6 %) ومعدلات النسب المئوية للفسفور P بلغت بين (0.45 % - 0.55 %) ومعدلات النسب المئوية للبوتاسيوم K بلغت بين (2.20 % - 2.39 %) وقد تشابهت معاملة المقارنة مع بقية المعاملات ، و كان معدل النسبة المئوية للنتروجين N 2.4 % ومعدل النسبة المئوية للفسفور P 0.54 % ومعدل النسبة المئوية للبوتاسيوم K 2.15%.في حين لم تختلف معاملة المقارنة الملقحة بالفايروس Infected control عن معاملة المقارنة ، حيث بلغ معدل ومعدل النسبة المئوية للفسفور P 0.54 % الا أنها اختلفت معنويا مع المعاملات جميعها في النسب المئوية لعنصري النتروجين والبوتاسيوم حيث بلغت 1.6 % ، 0.87 % على التوالي كما في الجدول (4.7).

جدول (4.7) فاعلية غمر بذور نبات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على نسب العناصر الكبرى NPK في الأوراق.

ت	العناصر	%								
		N			P			K		
	المعاملة	سليم	مصاب	تأثير المعاملة	سليم	مصاب	تأثير المعاملة	سليم	مصاب	تأثير المعاملة
1	Control	2.4	1.6	2.0	0.54	0.54	0.54	2.15	0.87	1.51
2	Mel	2.1	2.0	2.1	0.53	0.55	0.54	2.31	2.26	2.29
3	Ba	3.1	2.6	2.9	0.51	0.45	0.48	2.23	2.20	2.22
4	Chi	3.1	2.6	2.9	0.47	0.54	0.51	2.11	2.39	2.25
5	Mel + Ba	3.2	2.9	3.1	0.57	0.55	0.56	3.96	3.02	3.49
6	Mel + Chi	3.5	2.7	3.1	0.51	0.47	0.49	2.99	2.69	2.84
7	Chi +Ba	3.3	2.7	3.0	0.53	0.45	0.49	3.43	3.11	3.27
تأثير الاصابة		3.0	2.4		0.52	0.51		2.74	2.36	
للاصابة $LSD_{0.05}$		0.3			0.03			0.5		
للمعاملة $LSD_{0.05}$		0.5			0.06			1.1		
للتداخل $LSD_{0.05}$		0.7			0.08			1.5		

Ba : *Bacillus amyloliquefaciens* , Mel : Melatonin , Chi : Chitosan , N :Nitrogen , P: Phosphorous , K: Potassium (كل رقم يمثل معدل ثلاث مكررات).

قد يعود سبب الخفض في ضراوة الممرض إلى أن العوامل المستخدمة في هذه الدراسة قد أثرت على استجابات دفاع النبات ، حيث غير الميلاتونين استجابات دفاع النبات عن طريق إطلاق العديد من المسارات الأيضية المفيدة (Chakraborty واخرون ، 2020) كما أن استعماله على النبات يزيد من المقاومة النباتية للاصابة الفايروسية ، حيث يؤدي إلى زيادة معنوية في إنزيمات مضادات الأكسدة ، والتعبير الجيني لبعض الإنزيمات مقارنة مع النباتات الملقحة بالفايروس كما يقلل الميلاتونين من الضرر التأكسدي الناجم عن *Alfalfa mosaic virus* (AMV) لزيادة مقاومة الباذنجان من خلال تقليل بيروكسيد الهيدروجين وأنيونات الاوكسيد الفائق وجذور الهيدروكسيل وMalondialdehyde (Sofy واخرون ،2021).

قد يؤثر الميلاتونين على زيادة أعداد وأوزان الثمار ومن ثمّ زيادة الانتاج ، وذلك لأن تأثيره أقرب إلى عملAuxin على صفات الثمار (Abd El-Naby واخرون ،2019 ؛ SKM واخرون ،2020) حيث أنه يشارك في الازهار ويحسن من غلة المحاصيل وأيضاً تحسين جودة

الثمار مثل حجم الثمرة (القطر والوزن) ، واللون ، وإجمالي المواد الصلبة الذائبة ، و الحموضة الكلية بالاضافة إلى زيادة في محتوى السكريات الرئيسة (الجلوكوز والفركتوز) والأحماض العضوية (malic acid ، succinc acid وascorbic acid) تشير الابحاث إلى أن المعاملة بالميلاتونين قبل الحصاد يحافظ على الثمار في أثناء التخزين بسبب تأثيره على تقليل عملية النضج بعد الحصاد. (Wang واخرون ، 2020 ؛ Medina-Santamarina واخرون ، 2021) ، أما خفض الضراوة الفايروسية الناتج عن البكتريا *B. amyloliquefaciens* التي تعد أحد أنواع البكتريا المعززة لنمو النبات (PGPB) قد يكون بسبب قدرتها على انتاج مركبات عضوية متطايرة وكذلك انتاجها حامض الحديديك والهرمونات النباتية مثل الجبرلينات وحامض السالسالك salicylic acid وحامض الإبسيسيك Abscisic acide وحامض الجاسمونك jasmonic acid، وكذلك المركبات المضادة للمسببات المرضية . علاوة على ذلك ، تنتج مجموعة من الإنزيمات المختلفة مثل α-amylase، protease، lipase، cellulase، xylanase، pectinase، aminotransferase، barnase، peroxidase و laccase. وأيضاً تنتج السكريات (مثل الجلوكوز والسكروز واللاكتوز والمانيتول) وهذه المنتجات لها أدوارٌ مهمة في عملية استحثاث المقاومة النباتية ضد الممرضات وتعزيز نمو النبات (Kim واخرون ، 2017 ؛ Wu واخرون 2019 ؛ Qian واخرون 2020 ؛ Ngalimat واخرون 2021) . كما أنها تزيد من محتوى السكر الكلي الذائب وجاهزية المغذيات للنبات مثل انتاجها الحديد وتساعد على تحسين أيض الكاربوهيدرات ومن ثمّ زيادة في كمية الانتاج ونوعيته (El-Dougdoug Bisht واخرون ، 2020 ؛ Ngalimat واخرون 2021).

في حين تحفز معاملة النبات بالكيتوسان معدل التمثيل الضوئي ومحتوى الكلوروفيل ، وإغلاق الثغور كما أنه يعزز الإنزيمات المضادة للأكسدة ويحث على إنتاج الأحماض العضوية والسكريات والأحماض الأمينية (Hidangmayum واخرون ، 2019 ؛ Kocięcka و Liberacki ، 2021 ؛ Subhan واخرون ، 2021) .كما لوحظ انخفاض كبير في تراكم موزائيك الخيار في النباتات المعاملة به كما له تأثير ايجابي على ديناميكيات تبادل الغازات وأيضاً من خلال تحليل التعبير الجيني وجد أنه يحدث استجابات مرتبطة بالمقاومة الجهازية المرتبطة بإعادة تعديل حالة الأكسدة في النبات. بالإضافة إلى ذلك ، عند تطبيقه بشكل وقائي ، قادر على إثارة استجابات دفاعية في الطماطم للسيطرة على عدوى فايروس موزائيك الخيار، كما سبب انخفاض كبير في تراكم الفايروس في النباتات المعامله به (Rendina واخرون ، 2019 ؛ Sofy واخرون ، 2020). وكذلك يعمل كمنظم نمو، له القدرة على تحفيز انتاجية النبات (Reyes-Pérez واخرون ،2020 ؛ Malerba و Cerana ، 2020) ، كما أنه يزيد من عدد الازهار وأوزان الثمار حيث يحسن الصفات المورفولوجية والفسلجية ، مما يؤدي إلى زيادة في

عـدد الازهـار، ومـن ثـمّ زيـادة فـي الحاصـل حيـث أنهـا تعمـل كمـنظم نمـو (Salachna وZawadzińska ، 2014 ؛ Reyes-Pérez واخرون ،2020) .

سبب الزيادة في معايير النمو يرجع إلى استعمال العوامل الثلاثة المذكورة بشكل مفرد والفعل المشترك للتوليفات المزدوجة ،حيث أن استعمال الميلاتونين يؤدي إلى زيادة معنوية في المعايير المورفولوجية (الفروع ، طول الجذر، عدد الأوراق ، مساحة الأوراق ، والكتلة الاحيائية للأوراق) (Sofy واخرون ، 2021). كما أنه يحفز النمو في السيقان ، وكذلك يحفز تكوين الجذوروكذلك انبات البذور كما له القدرة على تأخير الشيخوخة ، وايضا يتصرف الميلاتونين بطريقة مشابهة لهرمون الأوكسين ، حيث تربط الاستجابات الفسيولوجية التي ينتجها الميلاتونين مع عمل الأوكسين ، مثل تعزيز نشاط النمو و التجذير. (Arnao و Hernández-Ruiz ، 2015 ؛ Arnao و Hernández-Ruiz ، 2019). كما يساهم الكيتوسان في تحسين معايير نمو النبات المذكورة آنفا، بالإضافة إلى ذلك ، فهو يؤدي إلى مقاومة ممتازة للجفاف والملوحة ودرجات الحرارة المنخفضة (Kocięcka و Liberacki، 2021 ؛ Subhan واخرون ، 2021) .

ان استعمال الميلاتونين والكيتوسان ، وكذلك البكتريا يزيد من معدل التمثيل الضوئي ومن ثمّ زيادة في محتوى الكلوروفيل والكاروتينويد مقارنة بالنباتات الملقحة بالفايروس ، كما يمكن أن يرجع التاثير إلى التقليل من الضرر التأكسدي الناجم عن الاصابة الفايروسية من خلال تقليل بيروكسيد الهيدروجين كما أن البكتريا تزيد من الكلوروفيل من خلال الزيادة في ثلاثة بروتينات في مسار التمثيل الضوئي (Sofy واخرون ، 2021 ؛ Subhan واخرون ، 2021 ؛ Nan واخرون ، 2021) .

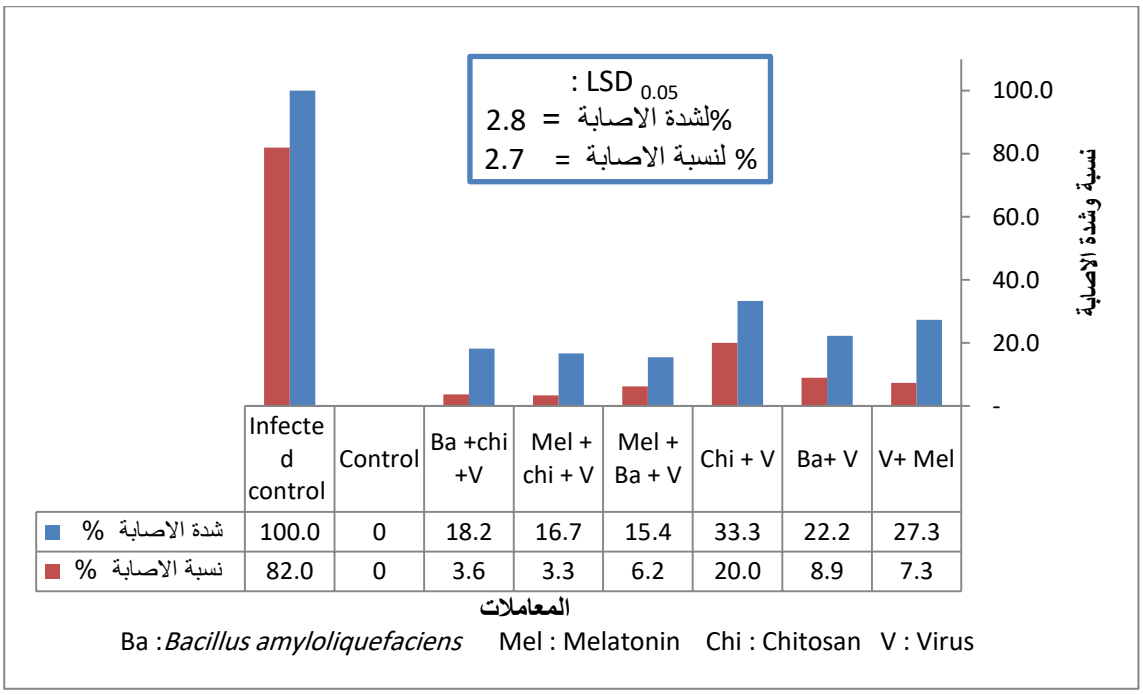
قد يكون السبب وراء الزيادة الحاصلة للعناصر الغذائية في المعاملات هو أنها تجهز النباتات بالعناصر الكبرى ، والصغرى من خلال تحسينها لصفات الجذور ومن ثمّ تسهيل عملية امتصاص المغذيات من قبل النباتات ، حيث أنها لها القدرة على اذابة الفوسفات وجاهزية عنصر النتروجين ، وقد تنتج أيضاً الحديد بالاضافة إلى تحسين خصائص التربة الجذرية (إنتاج Indole Acetic Acid (IAA) ، التنفس الميكروبي ، الكتلة الاحيائية الميكروبية) ، ومحتوى المغذيات (البوتاسيوم ، الفوسفور ، الحديد ، المنغنيز). كما أنها تحسن الإطلاق البطيء للمغذيات (Shahrajabian واخرون ، 2021 ؛ Ngalimat واخرون 2021) .

4.13. فاعلية سقي نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة ضد الاصابة الفايروسية :

4.13.1. التغيرات الظاهرية :

4.13.1.1. فاعلية سقي نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة في خفض نسبة وشدة الاصابة الفايروسية :

أظهرت النتائج أن معاملات سقي نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة خفضا معنويا في نسبة الاصابة الفايروسية وشدتها ، فقد اتضح من النتائج أن سقي النباتات بالتوليفات المزدوجة (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الميلاتونين ، بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الكيتوسان ، محلولي الميلاتونين والكيتوسان) الملقحة بالفايروس اعطت اقل نسبة وشدة اصابة من استخدام المعاملات المذكورة منفردة فقد تفوقت التوليفة (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الميلاتونين) في خفض نسبة الاصابة وشدتها ، فقد تراوحت معدلات نسبة الاصابة بين (15.38 % - 18.18 %) وشدة الاصابة تراوحت بين (3.3 % - 6.2 %) ، بينما كانت نتائج السقي بالمعاملات (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ، محلول الميلاتونين ، محلول الكيتوسان) منفردة على نسبة الاصابة وشدتها منخفضة معنويا حيث تراوح معدل نسبة الاصابة ما بين (22.2% – 33.3 %) بينما تراوح معدل شدة الاصابة بين (7.3 %- 20.0%) مقارنة بمعاملة المقارنة الملقحة بالفايروس Infected control ، التي بلغت نسبة الاصابة فيها 100% وشدة اصابة 83.00 % . كما في شكل (4.25)



شكل (4.25) فاعلية سقي نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة في خفض نسبة وشدة الاصابة الفايروسية.

4.13.1.2. فاعلية سقي نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على معايير النمو الجذري والخضري :

حققت معاملات سقي نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة معايير النمو الجذري ، والخضري والمتمثلة بأطوال المجموعين الجذري ، والخضري ، وأوزانهما الطرية ، والجافة ، والمساحة السطحية للأوراق زيادة معنوية كما موضح في جدول (4.8) ، فقد تفوقت معاملات التوليفات المزدوجة (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الميلاتونين ، بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الكيتوسان ، محلولي الميلاتونين والكيتوسان) وغير الملقحة بالفايروس على بقية المعاملات ، التي تراوحت معدلات أطوال المجاميع الخضرية فيها بين (87.0 -103.3) سم ومعدلات أطوال المجاميع الجذرية بين (87.3 –97.3) سم أما معدلات الأوزان الطرية للمجاميع الخضرية فكانت بين (53.5 – 67.67) غم ومعدلات الأوزان الطرية للمجاميع الجذرية فتراوحت بين (56.1 – 70.0) غم ، فيما تراوحت معدلات الأوزان الجافة للمجاميع الخضرية بين (19.4 -22.7) غم ومعدلات الأوزان الجافة للمجاميع الجذرية بين (15.4 – 18.0) غم ، أما معدلات المساحة السطحية للأوراق فقد تراوحت بين (85.0 – 95.9) سم^2.

في حين تشابهت معاملات التوليفات المزدوجة (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الميلاتونين ، بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الكيتوسان ، محلولي

الميلاتونين والكيتوسان) والملقحة بالفايروس معنويا مع التوليفات المزدوجة غير الملقحة ، حيث كانت معدلات أطوال مجاميعها الخضرية بلغت بين (80.3 – 93.0) سم ، وأطوال مجاميعها الجذرية بلغت بين (82.7 – 94.0) سم ، ومعدلات الأوزان الطرية لمجاميعها الخضرية بين (47.7 – 56.9) غم و تراوحت معدلات الأوزان الطرية للمجاميع الجذرية بلغت بين (44.2 – 58.1) غم ، ومعدلات أوزانها الجافة لمجاميعها الخضرية كانت بلغت بين (17.8 – 18.3) غم فيما كانت معدلات الأوزان الجافة لمجاميعها الجذرية بين (14.1 - 17.3) غم في حين كانت معدلات المساحة السطحية لأوراقها بلغت بين (74.7 -81.3) سم^2 .

أما نتائج معاملات السقي (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ، محلول الميلاتونين ، محلول الكيتوسان) منفردة وغير الملقحة ، التي كانت معدلات أطوال مجاميعها الخضرية بلغت بين (72.7.0 – 74.3) سم ، ومعدلات أطوال مجاميعها الجذرية بلغت بين (73.3 – 78.7) سم ، ومعدلات الأوزان الطرية لمجاميعها الخضرية بلغت بين (45.4– 47.9) غم ، و كانت معدلات الأوزان الطرية للمجاميع الجذرية بلغت بين (37.3 – 39.6) غم و معدلات أوزانها الجافة لمجاميعها الخضرية تراوحت بين (16.9 – 18.0) غم بينما كانت معدلات الأوزان الجافة لمجاميعها الجذرية ما بين (11.8 -12.6) غم في حين كانت معدلات المساحة السطحية لأوراقها بلغت بين (64.6 -76.2) سم^2 ، ولم تظهر أي فروق معنوية بينها وبين معاملات السقي (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ، محلول الميلاتونين ، محلول الكيتوسان) منفردة والملقحة بالفايروس ، التي كانت معدلات أطوال مجاميعها الخضرية بلغت بين (67.7 – 76.0) سم ، ومعدلات أطوال مجاميعها الجذرية بلغت بين (69.7 – 75.0) سم ، و معدلات الأوزان الطرية لمجاميعها الخضرية بلغت بين (40.2 – 42.3) غم ، و كانت معدلات الأوزان الطرية للمجاميع الجذرية بلغت بين (35.5 – 36.8) غم و معدلات أوزانها الجافة لمجاميعها الخضرية تراوحت بين (13.5 – 16.0) غم فيما كانت معدلات الأوزان الجافة لمجاميعها الجذرية بين (10.8 - 11.4) غم في حين كانت معدلات المساحة السطحية لأوراقها بلغت بين (60.8 - 70.8) سم^2 . إن جميع المعاملات تفوقت معنويا على معاملتي المقارنة ، والمقارنة الملقحة بالفايروس Infected control فكانت نتائج معايير النمو لمعاملة المقارنة ، والمتمثلة بمعدل طول مجموعها الخضري 52.3 سم ، و معدل طول مجموعها الجذري 64.7 سم ،الوزن الطري لمجموعها الخضري 35.5 غم ، الوزن الطري لمجموعها الجذري 34.4غم ،الوزن الجاف لمجموعها الخضري 11.7غم ، الوزن الجاف لمجموعها الجذري 8.9 غم والمساحة السطحية لأوراقها 64.9 سم^2

واختلفت جميع المعاملات المذكورة أعلاه اختلافا معنويا عن معاملة المقارنة الملقحة بالفايروس فقط Infected control ، التي كان معدل طول مجموعها الخضري27.7 سم ، معدل طول مجموعها الجذري 34.3 سم ،الوزن الطري لمجموعها الخضري 16.4 غم ، الوزن الطري لمجموعها الجذري 11.7 غم ،الوزن الجاف لمجموعها الخضري 4.3 غم ، الوزن الجاف لمجموعها الجذري 3.0 غم والمساحة السطحية لأوراقها 16.1 سم^2 .

جدول (4.8) فاعلية سقي نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة معايير النمو الجذري والخضري.

ت	معايير النمو	طوا المجموع الخضري (سم)		تأثير المعاملة	طول المجموع الجذري (سم)		تأثير المعاملة	الوزن الطري للمجموع الخضري (غم)		تأثير المعاملة	الوزن الطري للمجموع الجذري (غم)		تأثير المعاملة	الوزن الجاف للمجموع خضري (غم)		تأثير المعاملة	الوزن الجاف للمجموع الجذري (غم)		تأثير المعاملة	مساحة الورقة (سم2)		تأثير المعاملة
	المعاملة	سليم	مصاب		سليم	مصاب		سليم	مصاب		سليم	مصاب		سليم	مصاب		سليم	مصاب		سليم	مصاب	
1	Control	52.3	27.7	40	64.7	39.3	52.0	35.5	13.4	24.5	34.4	8.7	21.6	11.7	4.3	8.0	8.9	3.0	6.0	64.9	16.1	40.5
2	mel	72.7	69.3	71	78.7	75.0	76.9	45.77	40.2	43.0	39.6	36.5	38.1	17.2	16.0	16.6	12.6	11.2	11.9	76.2	70.8	73.5
3	Ba	74.3	67.7	71	77.7	73.7	75.7	47.87	42.3	45.1	37.3	36.8	37.1	16.9	14.3	15.6	12.3	11.4	11.9	71.0	68.6	69.8
4	chi	73.0	76.0	74.5	73.3	69.7	71.5	45.43	41.6	43.5	38.3	35.5	36.9	18.0	13.5	15.8	11.8	10.8	11.3	64.6	60.8	66.1
5	Mel + Ba	103.3	93.0	98.15	97.3	94.0	95.7	67.67	56.9	62.3	70.0	58.1	64.1	22.7	18.3	20.5	17.9	16.6	17.3	95.9	74.7	62.4
6	Mel + chi	87.0	83.7	85.35	87.3	82.7	85.0	65.23	49.0	57.1	60.8	52.4	56.6	20.3	18.0	19.2	18.0	17.3	17.7	88.9	75.6	58.7
7	Ba +chi	88.0	80.3	84.15	92.7	86.3	89.5	53.53	47.7	50.6	56.1	44.2	50.2	19.4	17.8	18.6	15.4	14.1	14.8	85.0	81.3	55.0
	تأثير الاصابة	78.7	71.1		81.7	74.4		51.6	41.6		48.1	38.9		18.0	14.6		13.8	12.1		63.4	58.3	
	LSD 0.05 للاصابة	9.14			7.76			8.33			7.47			1.8			2.6			17.1		
	LSD 0.05 للمعاملات	17.09			14.53			15.59			13.98			3.4			1.8			32.0		
	LSD 0.05 للتداخل	24.17			20.54			22.04			19.76			4.8			2.6			45.2		

•Ba : *Bacillus amyloliquefaciens* , Mel : Melatonin , Chi : Chitosan .(كل رقم يمثل معدل ثلاث مكررات)

4.13.1.3. فاعليـة سـقي نباتـات الخيـار ببكتريـا *B. amyloliquefaciens* ومحلـولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على أعداد ووزن الثمار الكلي :

أظهـرت النتـائج أن سـقي نباتـات الخيـار ببكتريـا *B. amyloliquefaciens* ومحلـولي الميلاتـونين والكيتوسـان وتوليفاتهمـا المزدوجـة علـى أعـداد ووزن الثمـار الكلـي لنبـات الخيـار الموضحة في الجدول (4.9) ، إن أعلى عدد ثمار ، ووزن حاصل كان في معاملات التوليفات المزدوجـة (بكتريـا *B. amyloliquefaciens* ومحلـول الميلاتـونين ، بكتريـا *B. amyloliquefaciens* ومحلـول الكيتوسـان ، محلـولي الميلاتـونين والكيتوسـان) غيـر الملقحـة بالفايروس حيث كان معدل أعداد الثمارلثلاث جنيات يتراوح بين (4.00 -4.67) ومعدل أوزانها يتـراوح بـين (0.342 – 0.410) كغم فـي حـين كـان معـدل أعـداد الثمـار لمعـاملات التوليفـات المزدوجـة (بكتريـا *B. amyloliquefaciens* ومحلـول الميلاتـونين ، بكتريـا *B. amyloliquefaciens* ومحلـول الكيتوسـان ، محلـولي الميلاتـونين والكيتوسـان) و الملقحـة بالفايروس يتراوح بين (4.00 -4.33) ومعدل أوزانها يتراوح بين (0.382 – 0.392) كغم .
بينما كان معدل أعداد ثمار المعاملات (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ، محلول الميلاتونين ، محلـول الكيتوسـان) المفـردة وغيرالملقحـة بالفـايروس يتـراوح بـين (2.67 -3.00) ومعـدل أوزانها يتراوح بين (0.265 – 0.298) كغم في حين كان معدل أعداد ثمار المعاملات (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ، محلول الميلاتونين ، محلول الكيتوسان) الملقحة بالفايروس بلغت بين (3.00- 3.33) ومعدل أوزانها يتراوح بين (0.280 - 0.300) كغم .بينما كان معدل أعداد ثمار الخيار في معاملة المقارنة هو 2.67 ومعدل أوزان ثمارها هي 0.264 كغم ، أما معاملة المقارنة الملقحة بالفايروس Infected control فاعطت اقل عدد و وزن ثمار حيث كان معدل عدد ثمارها 1.33 و مجموع أوزانها 0.135 كغم .

جدول (4.9) فاعلية سقي نبات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على عدد ووزن الثمار الكلي لثلاث جنيات .

ت	الصفة المقاسة	عدد الثمار/ نبات			وزن الثمار (كغم)		
	المعاملة	سليم	مصاب	تأثير المعاملة	سليم	مصاب	تأثير المعاملة
1	Control	8	4	6	0.791	0.406	0.599
2	Mel	9	9	9	0.879	0.840	0.860
3	Ba	9	10	10	0.893	0.899	0.896
4	Chi	8	9	9	0.795	0.897	0.846
5	Mel + Ba	14	13	14	1.230	1.176	1.203
6	Mel + Chi	12	12	12	1.143	1.155	1.149
7	Chi +Ba	13	12	13	1.026	1.145	1.086
	تأثير الاصابة	10	10		0.965	0.931	
	للاصابة $LSD_{0.05}$	1.4			0.03		
	للمعاملة $LSD_{0.05}$	2.6			0.05		
	للتداخل $LSD_{0.05}$	3.7			0.08		

Ba : *Bacillus amyloliquefaciens* , Mel : Melatonin , Chi : Chitosan , N : Nitrogen , P: Phosphorous , K: Potassium . (كل رقم يمثل معدل ثلاث مكررات)

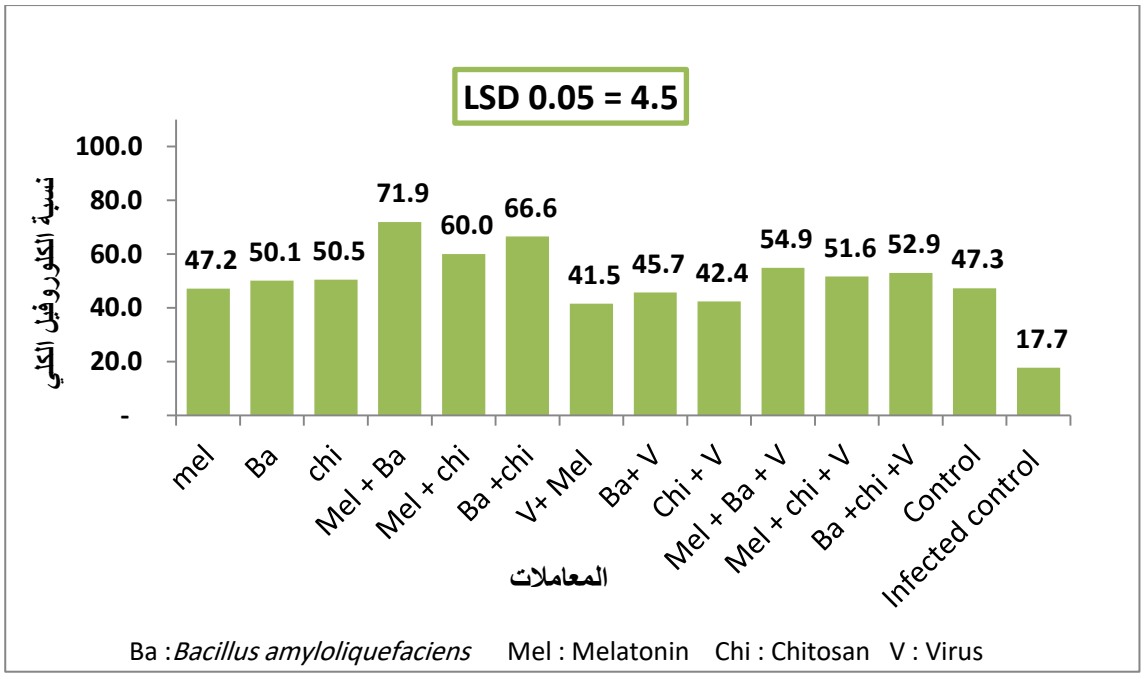
4.13.2. التغيرات الفسلجية :

4.13.2.1. فاعلية سقي نباتات الخيار باستعمال بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على نسبة الكلوروفيل الكلي :

بينت نتائج فاعلية سقي نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على نسبة الكلوروفيل الكلي في الأوراق ، حيث أظهرت النتائج أن أعلى نسبة للكلوروفيل الكلي في أوراق نباتات الخيار المعاملة بالتوليفات المزدوجة (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الميلاتونين ، بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الكيتوسان ، محلولي الميلاتونين والكيتوسان) حيث بلغت معدلات نسب الكلوروفيل الكلي فيها (71.9 ، 66.6 ، 60.0) ملغم . 100غم $^{-1}$ على التوالي

تلتها معاملات التوليفات المزدوجة والمعاملة (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الميلاتونين ، بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الكيتوسان ، محلولي الميلاتونين والكيتوسان) والملقحة بالفايروس ، التي بلغت نسب الكلوروفيل الكلي في أوراقها (54.9 ، 52.9 ، 51.6) ملغم . 100غم $^{-1}$ على التوالي .

بينما كانت نسب الكلوروفيل معاملات (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ، محلول الميلاتونين ، محلول الكيتوسان) منفردة وغير الملقحة باللقاح الفايروسي (50.1 ، 47.2 ، 50.5) ملغم . 100غم $^{-1}$ ، لم يكن هناك فروق معنوية بين المعاملات (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ، محلول الميلاتونين، محلول الكيتوسان) منفردة وغير الملقحة بالفايروس و معاملات (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ، محلول الميلاتونين، محلول الكيتوسان) منفردة والملقحة بالفايروس التي كانت نسب الكلوروفيل فيها (45.7 ، 41.5 ، 42.4) ملغم . 100غم $^{-1}$ على التوالي .في حين بلغت نسبة الكلوروفيل في معاملة المقارنة 47.3 ملغم . 100غم $^{-1}$ اختلفت جميع المعاملات الانفة الذكر مع معاملة المقارنة الملقحة بالفايروس Infected control معنويا حيث بلغت نسبة الكلوروفيل الكلي فيها 17.7 ملغم . 100غم $^{-1}$ كما في الشكل (4.26) .



شكل (4.26) فاعلية سقي نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على نسبة الكلوروفيل الكلي في الأوراق .

4.13.2.2. فاعليـة سـقي نباتـات الخيـار ببكتريـا *B. amyloliquefaciens* ومحلـولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على نسب العناصرالكبرى NPK في الأوراق :

اتضـح مـن نتـائج فـي جـدول (4.10) إن سـقي نباتـات الخيـار ببكتريـا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة لنسب العناصر الكبرى NPK في الأوراق فقد تبين أن أعلى نسب مؤية للعناصر الكبرى NPK كان في معاملات التوليفات المزدوجة (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الميلاتونين ، بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الكيتوسان ، محلولي الميلاتونين والكيتوسان) وغير الملقحة بالفايروس ، حيث كانت معدلات نسب النتروجين Nitrogen المئوية بلغت بين (3.13 % - 3.23 %) ومعدلات نسب الفسفور Phosphorous المئوية بلغت بين (0.42% – 0.56%) أما معدلات نسب البوتاسيوم Potassium المئوية فكانت بلغت (2.64 % - 3.07.%) ولم تختلف عنها معنويا معاملات التوليفات المزدوجة نفسها ، والملقحة بالفايروس ، حيث كانت معدلات النسب المئوية للنتروجين بلغت بين (2.0% - 3.32 %) ومعدلات النسب المئوية للفسفور بلغت بين (0.41% - 0.51%) أما معدلات النسب المئوية للبوتاسيوم فكانت بلغت بين (2.28 % -3.0%) .

أما نتائج المعاملات (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ، محلول الميلاتونين ، محلول الكيتوسان) منفردة وغير ملقحة فكانت معدلات النسب المئوية للنتروجين N بلغت بين (2.43% - 3.20 %) ، ومعدلات النسب المئوية للفسفور P بلغت بين (0.38 % - 0.40 %) ومعدلات النسب المئوية للبوتاسيوم K بلغت بين (2.31 % - 2.01 %) لم تختلف معنويا عن المعاملات (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ، محلول الميلاتونين ، محلول الكيتوسان) منفردة والملقحة بالفايروس ، حيث كانت معدلات النسب المئوية للنتروجين N بلغت بين (2.07% - 3.11 %) ومعدلات النسب المئوية للفسفور P بلغت بين (0.36 % - 0.37 %) ومعدلات بين (2.02 % - 2.14 %) أما معاملة المقارنة مع بقية المعاملات كانت معدل النسبة المئوية لعنصر النتروجين N 2.30 % ، ومعدل النسبة المئوية لعنصرالفسفور P 0.47 % ومعدل النسبة المئوية لعنصرالبوتاسيوم K 2.01 % . في حين اختلفت معاملة المقارنة الملقحة بالفايروس Infected control عن جميع المعاملات معنويا ، حيث انخفضت فيها معدل النسبة المئوية N 1.6 % ومعدل النسبة المئوية لعنصر البوتاسيوم K 0.87 % عدا عنصر الفسفور P الذي لم يختلف معنويا عن معاملة المقارنة ، حيث بلغ معدل النسبة المئوية له 0.54 % كما في الجدول (4.10).

جدول (4.10) فاعلية سقي نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على نسب العناصر الكبرى NPK في الأوراق.

ت	العناصر	%								
		N			P			K		
	المعاملة	سليم	مصاب	تأثير المعاملة	سليم	مصاب	تأثير المعاملة	سليم	مصاب	تأثير المعاملة
1	Control	2.30	1.6	1.95	0.47	0.54	0.51	2.01	0.87	1.44
2	Mel	3.20	2.07	2.07	0.40	0.37	0.39	2.31	2.02	2.17
3	Ba	2.43	3.11	3.11	0.38	0.37	0.38	2.12	2.14	2.13
4	Chi	3.17	2.13	2.13	0.40	0.36	0.38	2.01	2.10	2.06
5	Mel + Ba	3.13	2.00	2.00	0.46	0.43	0.45	3.07	3.00	3.04
6	Mel + Chi	3.17	3.26	3.26	0.56	0.51	0.54	2.68	2.45	2.57
7	Chi +Ba	3.23	2.53	2.53	0.42	0.41	0.42	2.64	2.28	2.46
	تأثير الاصابة	2.49	2.39		0.44	0.43		2.41	2.12	
	للاصابة $LSD_{0.05}$	1.0			0.03			0.6		
	للمعاملة $LSD_{0.05}$	1.9			0.05			1.1		
	للتداخل $LSD_{0.05}$	2.6			0.08			1.5		

Ba : *Bacillus amyloliquefaciens* , Mel : Melatonin , Chi : Chitosan , N : Nitrogen , P: Phosphorous , K: Potassium . . (كل رقم يمثل معدل ثلاث مكررات)

يستنتج مما سبق إن استعمال الميلاتونين والكيتوسان والبكتريا *Bacillus amyloliquefaciens* خفض من نسبة الاصابة الفايروسية وشدتها كما حسن من معايير النمو المقاسة (الأطوال والأوزان للمجموعين الجذري والخضري الجافة والطرية و مساحة الورقة السطحية) كما أنه زاد محتوى الكلوروفيل والعناصر الغذائية و عدد الثمار ووزنها .

قد يرجع السبب لذلك إلى أن البكتريا لها القدرة على تحسين دفاعات النبات ضد الضغوط الاحيائية من مسببات الأمراض من خلال المنافسة على المغذيات ، وإنتاج مواد مثل الببتيدات الدهنية الحلقية و Polyketides والمركبات العضوية المتطايرة لمقاومة مسببات الأمراض مباشرة ، وتحفيز المقاومة الجهازية في النباتات (Luo واخرون 2022) .

إن البكتريا المستعملة لها القدرة على التحليل المائي للمركبات المعقدة بما في ذلك البروتينات غير القابلة للذوبان ، والكربوهيدرات ، والألياف (WoldemariamYohannes واخرون ،2020 ؛ Ngalimat واخرون ، 2021).

في حين أن الميلاتونين لعب دورا مهما في تحفيز أنظمة دفاع النبات ضد هجوم العوامل الممرضة منها الفايروسات كما تسهل امتصاص المغذيات من قبل النباتات ، والتحكم في تجهيز العناصر الكبرى والصغرى ، وتحسين مقاومة النباتات للضغوط اللاأحيائية والأحيائية كما أنه يقلل من عملية النتح من خلال التحكم في فتح وغلق الثغوركما يعمل على تحسين الاستجابات الضوئية ، و توصيل الاشارات ، والهرمونات النباتية (Yuواخرون ، 2021 ؛ Shahrajabian واخرون ، 2021 ؛ Murch و Erland ، 2021 ؛ Subhan واخرون ، 2021). قد يكون تأثير الميلاتونين أقرب إلى تأثيرهرمون (جبريلينات) على خصائص الأوراق المساحة ، ومحتوى الكلوروفيل الكلي (Abd El-Naby واخرون ، 2019).

يعد الكيتوسان ثاني بوليمر حيوي وفير موجود على الأرض بعد السليلوز له خصائص غير السامة يوفر نشاط مضاد ضد طيف واسع من المسببات المرضية ، حيث يظهر على النباتات المعاملة مستويات تعبير متزايدة لبعض جينات الدفاع الجهازية في تخفيف عدوى الفايروس. (Negm واخرون ،2020؛ Ke واخرون ،2021 وSofy واخرون ، 2021).

كما يشجع على زيادة معدل انبات البذور ويسهل امتصاص المغذيات و التنظيم الجيني ، كما يفعل مسارات أنظمة مضادات الاكسدة لزيادة مقاومة النبات وله تأثيرات فسلجية مهمة في تحسين نمو النبات ، حيث يزيد من محتوى الكلوروفيل وينشط عملية البناء الضوئي، كما أنه يخفض معدل النتح ، و يزيد من محتوى الكلوروفيل والكاربوهيدرات والنتروجين والبوتاسيوم و يحسن من مقاومة البلاستيدات للاجهادات ، ومن ثمّ يحسن من البناء الحيوي للكلوروفيل . (الربيعي ، 2021)

وقد حسن الكيتوسان من مؤشرات النمو ، محتوى كلوروفيل الأوراق ، الهرمونات النباتية (مثل حامض الأسيتيك الإندول ، حامض الجبريليك ، حامض الساليسيليك وحامض الجاسمونك) ، ومضادات الأكسدة غير الأنزيمية ومضادات الأكسدة الأنزيمية مقارنة بالنباتات الملقحة بالفايروس . كما أظهرت جميع النباتات المعاملة مستويات تعبير متزايدة لبعض جينات الدفاع الجهازية في تخفيف عدوى الفايروس. (Sofy واخرون ، 2021).

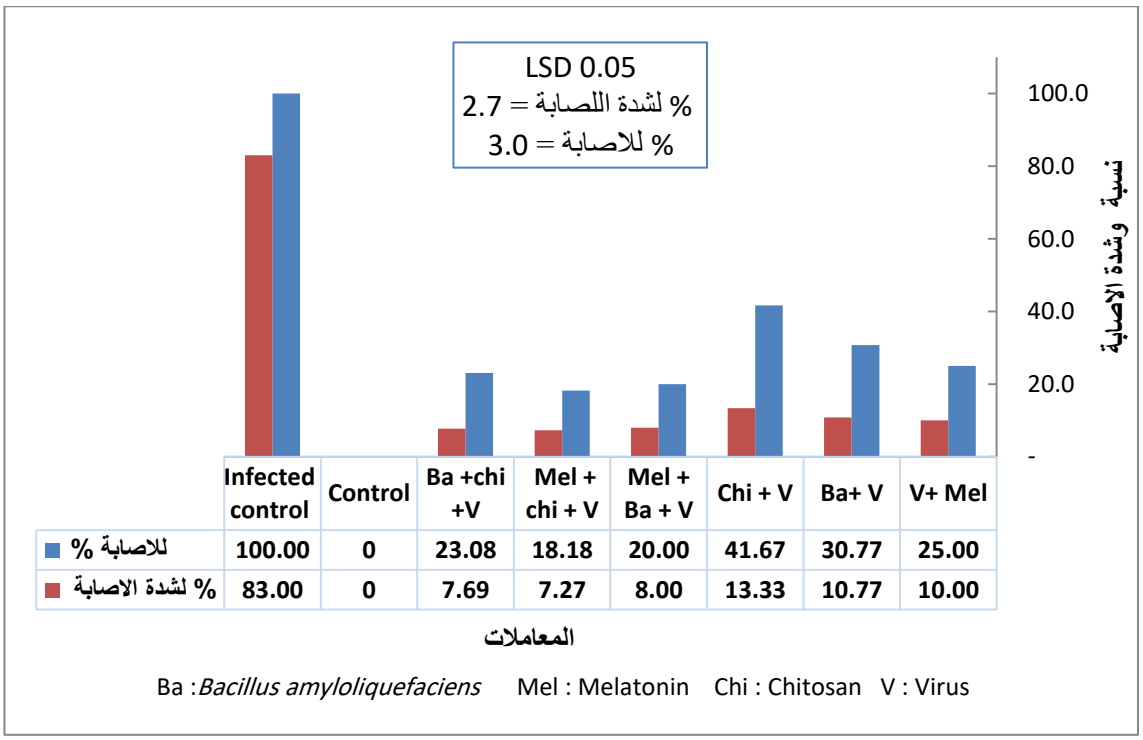
إن المحفزات التي تمنع نمو مسببات الأمراض النباتية ، وتغيير استجابات دفاع النبات عن طريق إطلاق العديد من المسارات الأيضية المفيدة تؤدي إلى زيادة الانتاج وتحسين نوعيته (Chakraborty واخرون ، 2020).

4.14. اختبار فاعلية رش نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة ضد الاصابة الفايروسية :

4.14.1. التغيرات الظاهرية :

4.14.1.1. فاعلية رش نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة في خفض نسبة وشدة الاصابة الفايروسية :

أظهرت النتائج أن معاملات رش نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة خفضا معنويا في نسبة الاصابة الفايروسية وشدتها ، فقد اتضح من النتائج أن رش النباتات بالتوليفات المزدوجة (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الميلاتونين ، بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الكيتوسان ، محلولي الميلاتونين والكيتوسان) المصابة بالفايروس أعطت اقل نسبة وشدة اصابة من استخدام المعاملات المذكورة منفردة فقد تفوقت التوليفة (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الميلاتونين) في خفض نسبة الاصابة وشدتها ، فقد تراوحت معدلات نسبة بين (18.18 % - 23.08 %) و وشدة الاصابة تراوحت بين (7.27% - 7.69%) ، بينما كانت نتائج الرش بالمعاملات (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ، محلول الميلاتونين ، محلول الكيتوسان) منفردة على نسبة وشدة الاصابة منخفضة معنويا ، حيث تراوح معدل نسبة الاصابة ما بين (25.0% – 41.67 %) في حين بلغ معدل شدة الاصابة ما بين (10.0 % - 13.33%) مقارنة بمعاملة المقارنة المصابة Infected control التي بلغت نسبة الاصابة فيها 100% وشدة اصابة 83.00 % كما في الشكل (4.27) .



شكل (4.27) فاعلية رش نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* و محلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة في خفض نسبة وشدة الاصابة الفايروسية .

4.14.1.2. فاعلية رش نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على معاييير النمو الجذري والخضري :

حققت معاملات رش نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة زيادة معنوية في معايير النمو الجذري ، والخضري والمتمثلة بأطوال المجموعين الجذري ، والخضري وأوزانهما الطرية والجافة ، والمساحة السطحية للأوراق كما موضح في جدول (4.11) ، حيث تفوقت معاملات التوليفات المزدوجة (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الميلاتونين ، بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الكيتوسان ، محلولي الميلاتونين والكيتوسان) وغير الملقحة بالفايروس على بقية المعاملات فقد تراوحت معدلات أطوال المجاميع الخضرية بين (77.3 - 92.0) سم ، ومعدلات أطوال المجاميع الجذرية بين (95.0 - 97.7) سم ، أما معدلات الأوزان الطرية للمجاميع الخضرية فكانت بين (52.6 – 77.7) غم ، ومعدلات الأوزان الطرية للمجاميع الجذرية فتراوحت بين (50.87 – 66.3) غم ، فيما تراوحت معدلات الأوزان الجافة للمجاميع الخضرية بين (17.1 -22.1) غم، ومعدلات الأوزان الجافة للمجاميع الجذرية بين (15.3 – 17.9) غم أما معدلات المساحة السطحية للأوراق فكانت بلغت ما بين (87.6 – 105.7)

سم^2. في حين تشابهت معاملات التوليفات المزدوجة (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الميلاتونين ، بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الكيتوسان ، محلولي الميلاتونين والكيتوسان) والملقحة بالفايروس معنويا مع التوليفات المزدوجة غيرالملقحة حيث كانت معدلات أطوال مجاميعها الخضرية بلغت بين (69.7 – 73.3) سم ، وأطوال مجاميعها الجذرية بلغت بين (88.7 – 89.3) سم ، و معدلات الأوزان الطرية لمجاميعها الخضرية بلغت بين (48.9 – 57.3) غم و كانت معدلات الأوزان الطرية للمجاميع الجذرية بلغت بين (38.6 – 43.93) غم ، و معدلات أوزانها الجافة لمجاميعها الخضرية كانت بلغت بين (16.3 – 18.9) غم ، فيما كانت معدلات الأوزان الجافة لمجاميعها الجذرية فكانت بين (13.4 – 15.2) غم ، في حين كانت معدلات المساحة السطحية لأوراقها بلغت بين (77.8 - 96.0) سم^2 .

أما نتائج معاملات الرش (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ، محلول الميلاتونين ، محلول الكيتوسان) منفردة وغير الملقحة بالفايروس ، التي كانت معدلات أطوال مجاميعها الخضرية بلغت بين (71.0 – 72.7) سم ، ومعدلات أطوال مجاميعها الجذرية بلغت بين (78.3 – 85.7) سم ، و معدلات الأوزان الطرية لمجاميعها الخضرية بلغت بين (46.4 - 50.5) غم و كانت معدلات الأوزان الطرية للمجاميع الجذرية بلغت بين (33.1 – 39.3) غم ، و معدلات أوزانها الجافة لمجاميعها الخضرية كانت بلغت بين (14.3 – 15.1) غم بينما كانت معدلات الأوزان الجافة لمجاميعها الجذرية فكانت بين (10.5 – 11.8) غم ، في حين كانت معدلات المساحة السطحية لأوراقها بلغت بين (73.7 – 85.0) سم^2 .

ولم تظهر أي فروق معنوية بينها وبين معاملات الرش (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ، محلول الميلاتونين ، محلول الكيتوسان) منفردة والملقحة بالفايروس ، التي كانت معدلات أطوال مجاميعها الخضرية بلغت بين (61.3 – 70.7) سم ، ومعدلات أطوال مجاميعها الجذرية بلغت بين (73.7 – 76.7) سم ، و معدلات الأوزان الطرية لمجاميعها الخضرية بلغت بين (34.2 – 48.8) غم ، و كانت معدلات الأوزان الطرية للمجاميع الجذرية بلغت بين (29.47 – 32.5) غم ، و معدلات أوزانها الجافة لمجاميعها الخضرية كانت بلغت بين (13.6 – 14.4) غم ، فيما كانت معدلات الأوزان الجافة لمجاميعها الجذرية فكانت بين (9.9 – 10.5) غم في حين كانت معدلات المساحة السطحية لأوراقها بلغت بين (64.6 - 77.8) سم^2 .

إن جميع المعاملات تفوقت معنويا على معاملتي المقارنة ، والمقارنة الملقحة بالفايروس Infected control فكانت نتائج معايير النمو لمعاملة المقارنة ، والمتمثلة بمعدل طول مجموعها الخضري 45.3 سم ، معدل طول مجموعها الجذري 56.3 سم ،الوزن الطري لمجموعها

الخضري 38.2 غم ، الوزن الطري لمجموعها الجذري 23.27غم ،الوزن الجاف لمجموعها الخضري 11.4غم ، الوزن الجاف لمجموعها الجذري 9.2 غم والمساحة السطحية لأوراقها 47.8 سم^2 ، بينما اختلفت جميع المعاملات المذكورة أعلاه اختلافا معنويا عن معاملة المقارنةالملقحة بالفايروس فقط Infected control ، التي كان معدل طول مجموعها الخضري27.7 سم ، معدل طول مجموعها الجذري 34.3 سم ،الوزن الطري لمجموعها الخضري 16.4 غم ، الوزن الطري لمجموعها الجذري 11.7 غم ،الوزن الجاف لمجموعها الخضري 4.3 غم ، الوزن الجاف لمجموعها الجذري 3.0 غم والمساحة السطحية لأوراقها 16.1 سم^2 .

جدول (4.11) فاعلية رش نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على معايير النموالجذري و الخضري .

ت	معايير النمو	طوا المجموع الخضري (سم)		تأثير المعاملة	طول المجموع الجذري (سم)		تأثير المعاملة	الوزن الطري للمجموع الخضري (غم)		تأثير المعاملة	الوزن الطري للمجموع الجذري (غم)		تأثير المعاملة	الوزن الجاف للمجموع خضري (غم)		تأثير المعاملة	الوزن الجاف للمجموع الجذري (غم)		تأثير المعاملة	مساحة الورقة (سم2)		تأثير المعاملة
	المعاملة	سليم	مصاب		سليم	مصاب		سليم	مصاب		سليم	مصاب		سليم	مصاب		سليم	مصاب		سليم	مصاب	
1	Control	45.3	27.7	36.5	56.3	26.0	41.2	38.2	11.4	24.8	23.3	8.7	16.0	11.4	4.3	7.9	9.2	3.0	6.1	47.8	16.1	32.0
2	mel	71.0	70.7	70.9	85.7	76.7	81.2	50.5	48.8	49.7	39.3	32.5	35.9	15.1	14.4	14.8	11.8	10.5	11.2	85.0	77.8	81.4
3	Ba	72.7	67.0	69.9	78.3	75.7	77.0	46.4	43.9	45.2	35.3	29.5	32.4	14.4	13.7	14.1	10.5	9.9	10.2	79.6	70.0	74.8
4	chi	71.7	61.3	66.5	81.7	73.7	77.7	47.8	34.2	41.0	33.1	30.9	32.0	14.3	13.6	14.0	11.1	10.2	10.7	73.7	64.6	69.2
5	Mel + Ba	92.0	73.3	82.7	97.7	89.3	93.5	77.7	57.3	67.5	66.3	43.9	55.1	21.3	17.1	19.2	17.9	13.4	15.7	87.6	77.8	82.7
6	Mel + chi	80.0	69.7	74.9	95.0	89.7	92.4	52.7	48.9	50.8	50.9	38.6	44.8	22.1	18.9	20.5	15.3	15.2	15.3	105.7	96.0	100.9
7	Ba +chi	77.3	73.3	75.3	95.7	88.7	92.2	52.6	50.9	51.8	63.4	41.4	52.4	17.1	16.3	16.7	17.3	13.8	15.6	94.7	83.2	89.0
	تأثير الاصابة	72.9	63.3		84.3	74.3		52.3	42.2		44.5	32.2		16.5	14.0		13.3	10.9		82.0	69.4	
	LSD 0.05 للاصابة	9.6			6.9			10.3			6.3			2.1			1.0			15.4		
	LSD 0.05 للمعاملات	17.9			12.9			19.2			11.9			3.9			1.9			28.9		
	LSD 0.05 للتداخل	25.4			18.3			27.2			16.8			5.5			2.7			40.8		

•**Ba : *Bacillus amyloliquefaciens* , Mel : Melatonin , Chi : Chitosan (كل رقم يمثل معدل ثلاث مكررات .)**

4.14.1.3. فاعليــة رش نباتــات الخيــار ببكتريــا *B. amyloliquefaciens* ومحلــولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على أعداد ووزن الثمار :

أظهـرت النتـائج أن رش نباتـات الخيـار ببكتريـا *B. amyloliquefaciens* ومحلـولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على أعداد الثمار الكلي للخيار ووزنه الموضحة في الجدول (4.12) أن أعلـى عدد ثمـار و وزن حاصـل ، كـان فـي معـاملات التوليفـات المزدوجـة (بكتريـا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الميلاتـونين ، بكتريـا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الكيتوسـان ، محلـولي الميلاتـونين والكيتوسـان) غير الملقحـة بالفـايروس ، حيث وصـل معـدل أعـداد الثمـار لـثلاث جنيـات بـين (4.0 -4.3) ثمـرة ومعـدل أوزانهـا مـا بـين (0.386 – 0.392) كغم ، فـي حـين كـان معـدل أعـداد الثمـار لمعـاملات التوليفـات المزدوجـة (بكتريـا *B. amyloliquefaciens* ومحلـول الميلاتـونين ، بكتريـا *B. amyloliquefaciens* ومحلـول الكيتوسـان ، محلـولي الميلاتـونين والكيتوسـان) و الملقحـة بلغـت بـين (3.3 -3.7) ثمـرة ومعـدل أوزانها يتراوح بين (0.343- 0.377) كغم .

بينمـا كـان معـدل أعـداد ثمـار المعـاملات (بكتريـا *B. amyloliquefaciens* ، محلـول الميلاتونين ، محلول الكيتوسان) غير الملقحة بالفايروس يتراوح بين (2.7 – 3.0) ثمرة ومعدل أوزانها يتراوح بين (0.277 – 0.289) كغم في حين كان معدل أعداد ثمار المعاملات (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ، محلول الميلاتونين ، محلول الكيتوسان) الملقحـة بالفـايروس بلغـت بين (2.3 – 2.7) ومعدل أوزانها يتراوح بين (0.263 - 0.289) كغم .بينمـا كـان معـدل أعـداد ثمـار الخيـار فـي معاملـة المقارنـة غيـر الملقحـة بالفـايروس هـو 3.0 ومعـدل أوزان ثمارهـا هـي 0.282 كغم ، أما معاملـة المقارنـة الملقحـة بالفـايروس Infected control فأعطـت أقل عدد و وزن ثمار حيث كان معدل عدد ثمارها 1.3 و مجموع أوزانها 0.135 كغم .

جـدول (4.12) فاعليــة رش نباتــات الخيــار ببكتريــا *B. amyloliquefaciens* ومحلــولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على أعداد ووزن الثمار.

ت	الصفة المقاسة	عدد الثمار/ نبات			وزن الثمار (كغم)		
	المعاملة	سليم	مصاب	تأثير المعاملة	سليم	مصاب	تأثير المعاملة
1	Control	9	4	6.5	0.845	0.406	0.626
2	Mel	8	8	8.0	0.878	0.788	0.833
3	Ba	9	8	8.5	0.894	0.822	0.858
4	Chi	8	7	7.5	0.830	0.867	0.849
5	Mel + Ba	12	11	11.5	1.163	1.093	1.128
6	Mel + Chi	12	10	11.0	1.157	1.130	1.144
7	Chi +Ba	13	11	12.0	1.175	1.036	1.106
	تأثير الاصابة	10.1	8.4		0.992	0.877	
	للاصابة $LSD_{0.05}$	1.7			0.09		
	للمعاملة $LSD_{0.05}$	3.3			0.1		
	للتداخل $LSD_{0.05}$	4.6			0.2		

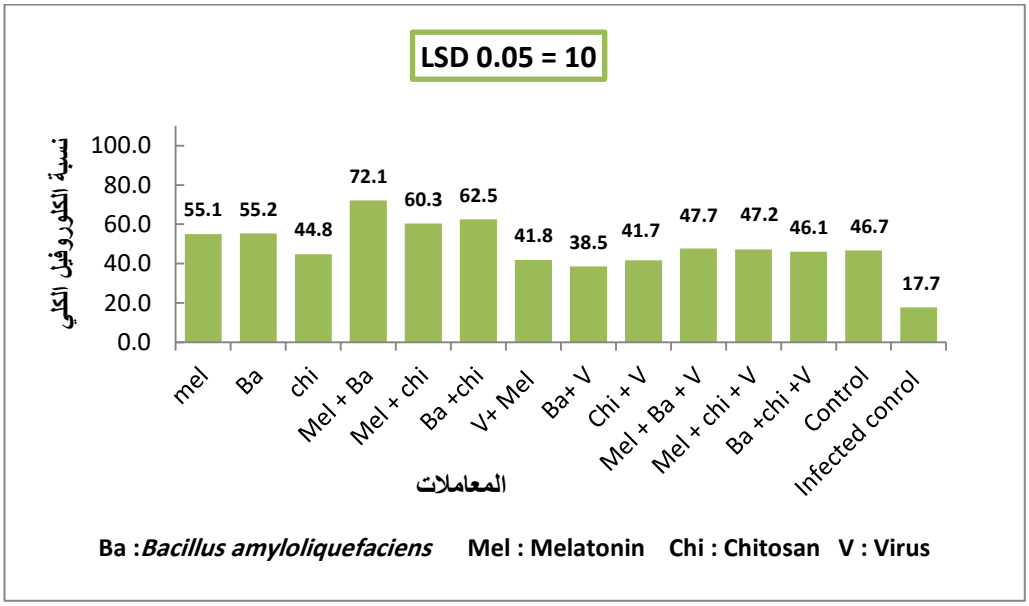
Ba : *Bacillus amyloliquefaciens* , Mel : Melatonin , Chi : Chitosan . (كل رقم يمثل معدل ثلاث مكررات)

4.14.2. التغيرات الفسلجية :

4.14.2.1. فاعليــة رش نباتــات الخيــار ببكتريــا *B. amyloliquefaciens* ومحلـولي الميلاتـونين والكيتوسـان وتوليفاتهمـا المزدوجـة علـى نسـبة الكلوروفيـل الكلي :

بينـت نتـائج فاعليـة رش نباتـات الخيـار ببكتريـا *B. amyloliquefaciens* ومحلـولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على نسبة الكلوروفيل الكلي في الأوراق ، حيث أظهرت النتـائج أن أعلـى نسبة للكلوروفيل الكلي فـي أوراق نباتـات الخيـار المعاملـة بالتوليفـات المزدوجــة (بكتريــا *B. amyloliquefaciens* ومحلــول الميلاتــونين ، بكتريــا *B. amyloliquefaciens* ومحلـول الكيتوسـان ، محلـولي الميلاتـونين والكيتوسـان) ، حيـث بلغـت معدلات نسب الكلوروفيل الكلي فيها (72.1 ، 62.5 ، 60.3) ملغم . 100غم $^{-1}$ علـى التـوالي .

بينما كانت نسب الكلوروفيل لمعاملات التوليفات المزدوجة والمعاملة (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الميلاتونين ، بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الكيتوسان ، محلولي الميلاتونين والكيتوسان) والملقحة بالفايروس هي (47.7 ، 46.1 ، 47.2) ملغم . 100غم $^{-1}$ على التوالي ، في حين بلغت نسب الكلوروفيل معاملات (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ، محلول الميلاتونين ، محلول الكيتوسان) منفردة وغير الملقحة بالفايروس (55.2، 55.1 ، 44.8) ملغم . 100غم $^{-1}$ ، لم يكن هناك فروق معنوية بين المعاملات (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ، محلول الميلاتونين، محلول الكيتوسان) منفردة وغير الملقحة بالفايروس و معاملات (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ، محلول الميلاتونين، محلول الكيتوسان) منفردة والملقحة بالفايروس ، التي كانت نسب الكلوروفيل فيها (38.5، 41.8 ، 41.7) ملغم . 100غم $^{-1}$ على التوالي .في حين بلغت نسبة الكلوروفيل في معاملة المقارنة 46.7 ملغم . 100غم $^{-1}$ اختلفت جميع المعاملات الانفة الذكر مع معاملة المقارنة الملقحة بالفايروس Infected control معنويا ، حيث بلغت نسبة الكلوروفيل الكلي فيها 17.7 ملغم . 100غم -1 كما في الشكل (4.28) .



شكل (4.28) فاعلية رش نباتات الخيار ببكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على نسبة الكلوروفيل الكلي.

4.14.2.2. فاعليــة رش نباتــات الخيــار ببكتريــا *B. amyloliquefaciens* ومحلــولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على نسب العناصر الكبرى NPK في الأوراق :

اتضـح مـن النتـائج أن رش نباتـات الخيـار ببكتريـا *B. amyloliquefaciens* ومحلـولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجـة علـى نسـب العناصـر الكبـرى NPK فـي الأوراق كانت النسب الأعلى في معاملات الرش بالتوليفات المزدوجة (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلـول الميلاتـونين ، بكتريـا *B. amyloliquefaciens* ومحلـول الكيتوسـان ، محلـولي الميلاتـونين والكيتوسـان) وغيـر الملقحـة بالفـايروس ، حيـث كانـت معـدلات نسـب النتـروجين Nitrogen المئويـــة بلغـــت بـــين (2.67 % - 3.37 %) ، ومعـــدلات نســـب الفســـفور Phosphorous المئويـة بلغـت بـين (0.53 % – 0.54 %) ، أمـا معـدلات نسـب البوتاسـيوم Potassium المئوية فكانت بلغت (2.20 % - 3.11 %)، ولم تختلف عنها معنويا معـاملات التوليفات المزدوجة نفسها ، والملقحة بالفايروس ، حيث كانت معدلات النسب المئويـة للنتروجين بلغت بـين (3.12 % - 2.63 %) ومعدلات النسب المئويـة للفسفور بلغت بـين (0.43 % - 0.50 %) أما معدلات النسب المئوية للبوتاسيوم فكانت بلغت بين (2.19 % - 2.28 %) .

أما نتائج المعاملات (بكتريـا *B. amyloliquefaciens* ، محلـول الميلاتـونين ، محلـول الكيتوسـان) منفـردة وغيـر ملقحـة ، فكانـت معـدلات النسـب المئويـة للنتـروجين N بلغـت بـين (2.16 % - 2.60 %) ومعدلات النسب المئوية للفسفور P بلغت بين (0.43 % - 0.47 %) ومعدلات النسب المئوية للبوتاسيوم K بلغت بين (2.09 % - 2.13 %) لم تختلف معنويا عن المعـاملات (بكتريـا *B. amyloliquefaciens* ، محلـول الميلاتـونين ، محلـول الكيتوسـان) منفـردة والملقحـة بالفـايروس ، حيـث كانـت معـدلات النسـب المئويـة للنتـروجين N بلغـت بـين (1.70 % - 2.47 %) ، ومعدلات النسب المئوية للفسفور P بلغت بين (0.42 % - 0.47 %) ومعـدلات النسـب المئويـة للبوتاسـيوم K بلغـت بـين (2.03 % - 2.06 %) ، وقـد تشـابهت معاملة المقارنـة مـع بقيـة المعـاملات، كانـت معـدل النسـبة المئويـة للنتـروجين N 2.0 % ومعـدل النسبة المئوية للفسفورP 0.51 % ومعدل النسبة المئوية للبوتاسيوم K 2.01%.في حين اختلفت معاملـة المقارنـة الملقحـة بالفـايروس Infected control عـن معاملـة المقارنـة غيـر الملقحـة بالفايروس معنويا حيث معدل النسبة المئوية للبوتاسيوم K 0.87 % أما عنصري النتروجين ، و الفسفور فلم تختلف معنويا عن معاملة المقارنة ، حيث كان معدل النسبة المئوية للنتروجينN 1.6 % ومعدل النسبة المئوية للفسفور P 0.54 % كما في جدول (4.13) .

جـدول (4.13) فاعليــة رش نباتــات الخيــار ببكتريــا *B. amyloliquefaciens* ومحلــولي الميلاتونين والكيتوسان وتوليفاتهما المزدوجة على نسب العناصر الكبرى NPK في الأوراق .

ت	العناصر	%								
		N			P			K		
	المعاملة	سليم	مصاب	تأثير المعاملة	سليم	مصاب	تأثير المعاملة	سليم	مصاب	تأثير المعاملة
1	Control	2.00	1.60	1.80	0.51	0.54	0.53	2.01	0.87	1.44
2	Mel	2.27	2.20	2.24	0.43	0.47	0.45	2.13	2.03	2.08
3	Ba	2.60	2.47	2.54	0.45	0.42	0.44	2.10	2.06	2.08
4	Chi	2.16	1.70	1.93	0.47	0.43	0.45	2.09	2.05	2.07
5	Mel + Ba	3.37	2.84	3.11	0.54	0.49	0.52	2.20	2.19	2.20
6	Mel + Chi	2.67	2.63	2.65	0.53	0.50	0.52	2.27	2.25	2.26
7	Chi +Ba	3.43	3.12	3.28	0.54	0.43	0.49	3.11	2.28	2.70
تأثير الاصابة		2.64	2.37		0.50	0.47		2.27	1.96	
للاصابة $LSD_{0.05}$		0.4			0.07			0.3		
للمعاملة $LSD_{0.05}$		0.8			0.14			0.6		
للتداخل $LSD_{0.05}$		1.2			0.20			0.9		

Ba : *Bacillus amyloliquefaciens* , Mel : Melatonin , Chi : Chitosan . (كل رقم يمثل معدل ثلاث مكررات) .

تعد البكتريا *Bacillus amyloliquefaciens* واحدة من البكتيريا التي تستحث المقاومة الجهازية و تحسن من نمو النبات من دون آثار جانبية ضارة ، كعامل ممتاز للأسمدة الاحيائية والمكافحة الاحيائية في الزراعة ، حيث أنها تحسن من توافر مغذيات التربة ، بما في ذلك النيتروجين ، وإذابة الفوسفات والبوتاسيوم ، وإنتاج الحديد ثانيًا ، ويمكن أن تغير المجتمع الميكروبي في التربة ، وتحسن ظروف نمو النبات ، إضافة إلى أنها تفرز الهرمونات ، والمركبات العضوية المتطايرة المرتبطة بنمو الخلايا النباتية ، وتطور الجذور ، وزيادة تحسين امتصاص العناصر الغذائية من قبل النباتات ، و تعزيز مقاومة النبات من خلال إحداث تغييرات جينية وكيميائية وفيزيائية في النبات العائل ، حيث تحسن من التعبير عن الجينات المشاركة في التخليق الاحيائي للدهون والبروتين ، (Sheteiwy واخرون 2021 ؛ Luo،2022)

عند المعاملة بالبكتريا لوحظ أن هناك زيادة في محتوى ATP والأنشطة المائية لغشاء البلازما و زيادة محتوى الكلوروفيل فيها ، والتقليل من انتاج ROS من خلال تشجيع مضادات الاكسدة (Sheteiwy واخرون 2021 ؛ الربيعي ، 2021).

أشارت العديد من الدراسات إلى أن الميلاتونين هو جزيئة حيوية محفزة للمحافظة على انتاج المحاصيل من دون أي تأثيرات سلبية على النبات ، حيث يرتبط بإنبات البذور ، ونضج الثمار ، والبناء الضوئي وسلامة الأغشية الخلوية ، وشبكة تفاعلات الأكسدة ، والاختزال وتطور الجذور، والتنظيم الازموزي وشيخوخة الورقة ، ويساعد على كبح ROS من خلال منظومة مضادات الاكسدة .

كما يلعب دوراً في المساهمة في المقاومة الجهازية المستحثة في النبات ، والمحافظة على سلامة الاغشية الخلوية وتقليل نفاذيتها ، وله دوره التنظيمي في تعديل الهرمونات النباتية (Mukherjee، 2018 ؛ الربيعي ، 2021).

تسبب الرش الورقي باستعمال الميلاتونين في زيادة معنوية في المعايير الظاهرية (الفروع ، طول الجذر ، عدد الأوراق ، مساحة الأوراق ، والكتلة الاحيائية للأوراق) ، محتوى الكلوروفيل ، إنزيمات مضادات الأكسدة ، والتعبير الجيني لبعض الإنزيمات مقارنة بالنباتات الملقحة ، قلل العلاج باستعماله من الضرر التأكسدي الناجم عن *Alfala mosaic virus* من خلال تقليل بيروكسيد الهيدروجين وأنيونات الاوكسيد الفائق وجذور الهيدروكسيل وMalondialdehyde (Sofy واخرون ،2021) .

يخفف معاملة النبات بالميلاتونين من جينات البروتينات المرتبطة بالأمراض والإنزيمات المضادة للأكسدة تحت الضغط الاحيائي ، واللاأحيائي (Li واخرون ، 2017 ؛ Sharif واخرون ،2018). كما أنه ينظم العديد من العمليات الاحيائية المهمة للنباتات ، بما في ذلك التخليق الاحيائي للرايبوسومات ، والتمثيل الغذائي للدهون ، والتمثيل الغذائي للكربوهيدرات ، وتخزين البروتين مثل البروتينات ، التي تتحمل الإجهاد ، و أيضاً البروتينات التي تنتج ATP كجزء من تحلل السكر ودورة حامض الستريك يتم تنظيمها بواسطته ، كما أن الميلاتونين يخفف التأثيرات المثبطة لضغط كلوريد الصوديوم على إنبات البذور من خلال تعزيز إنتاج الطاقة كما له دور في إنبات بذور الخيار في ظل ظروف الإجهاد، كما يشجع على زيادة معدل انبات البذور ويسهل امتصاص المغذيات ، والتنظيم الجيني ، ويفعل مسارات انظمة مضادات الاكسدة لزيادة مقاومة النبات (Ding واخرون ، 2018 ؛ الربيعي ، 2021).

الرش الورقي للكيتوسان له تأثيرات فسلجية مهمة حيث يحسن من نمو النبات و يزيد من محتوى الكلوروفيل وينتظم عملية البناء الضوئي، مع تخفيض معدل النتح ، و يزيد من محتوى

الكلوروفيل والكاربوهيدرات والنتروجين والبوتاسيوم ، كما أنه يحسن من مقاومة البلاستيدات للاجهادات ، ومن ثمّ يحسن من البناء الحيوي للكلوروفيل و يستحث مقاومة النبات ضد المسببات المرضية . وهذا يعتمد على خصائصه الفيزيائية ، والكيميائية ويعتمد على نوع الكائنات الدقيقة (Ke واخرون ،2021 ؛ الربيعي ، 2021).

4.15. الخسائر الاقتصادية لمحصول الخيار المصاب بالفايروس *Squash vein yellowing virus* isolate SVYV/Iraq في الزراعة المكشوفة لمساحة دونم واحد:

بينت النتائج أن الخسائر المالية الناتجة عن الاصابة بالفايروس *Squash vein yellowing virus* isolate SVYV/Iraq في نباتات الخيار بلغت ما بين (46.8 – 52.7) % والمحسوبة لمساحة دونم واحد . حيث كان انتاج النباتات الملقحة تقريبا 843.75 كغم / دونم وبخسائر مالية تراوحت بين (496.4 - 629.06) دولار أمريكي .في حين تراوح انتاج معاملات المقارنة بين (1568.75 - 1762.5) كغم / دونم كما في جدول (4.14).

جدول (4.14) الخسائر الاقتصادية الناتجة عن الاصابة بالفايروسات *Squash vein yellowing virus* isolate SVYV/Iraq لمحصول الخيار لمساحة دونم واحد .

طريقة تطبيق المعاملة	المعاملة	الوزن كغم / الدونم	سعر / د.ع	سعر/دولار امريكي	الخسائر / دولار امريكي	% للخسائر
غمر بذور	Control	1568.75	1548750	1060.42	0	0
	Infected control	843.75	823750	564.02	496.4	46.8
سقي	Control	1650	1630.000	1116.06	0	0
	Infected control	843.75	823750	564.02	552.04	49.5
رش	Control	1762.5	1742500	1193.08	0	0
	Infected control	843.75	823750	564.02	629.06	52.7

Ba : *Bacillus amyloliquefaciens* , Mel : Melatonin , Chi : Chitosan

4.16. الربح الصافي المتحقق من استعمال افضل المعاملات على محصول الخيار المصاب بالفايروس ***Squash vein yellowing virus*** **isolate SVYV/Iraq في الزراعة المكشوفة لمساحة دونم واحد:**

اتضح من النتائج أن الربح الصافي المتحقق من استعمال أفضل المعاملات خليط من البكتريا *B. amyloliquefaciens* وmelatonin في الزراعة المكشوفة لمساحة دونم واحد ، حيث كانت النسب المئوية للربح الصافٍ لمساحة دونم بلغت ما بين (62.6 – 38.4) % . حيث كانت أفضل معاملة لغمر البذور ، وسقي النباتات هي خليط من البكتريا *Bacillus amyloliquefaciens* وMelatonin أما معاملة الرش فكان الخليط من *Bacillus amyloliquefaciens* و Chitosan هو الافضل .حيث كان انتاج النباتات المعاملة يتراوح بين (2450 - 2562.5) كغم / دونم ، وبربح صافٍ تراوح ما بين (459.04 - 664.33) دولار أمريكي .في حين تراوح انتاج معاملات المقارنة بين (1568.75 - 1762.5) كغم / دونم كما في جدول (4.15).

جدول (4.15) الربح الصافي المتحقق من استعمال افضل المعاملات خليط من البكتريا *B. amyloliquefaciens* وmelatonin في الزراعة المكشوفة لمساحة دونم واحد.

طريقة تطبيق المعاملة	المعاملة	الوزن كغم / الدونم	سعر / د.ع	سعر/دولار امريكي	الربح الصافي / دولار امريكي	% للربح
غمر بذور	Control	1568.75	1548750	1060.42	0	0
	B.a + mel	2550	2519000	1724.75	664.33	62.6
سقي	Control	1650	1630.000	1116.06	0	0
	B.a + mel	2562.5	2531500	1733.31	617.25	55.3
رش	Control	1762.5	1742500	1193.08	0	0
	B.a + chi	2450	2410000	1650.12	459.04	38.4

Ba : *Bacillus amyloliquefaciens* , Mel : Melatonin , Chi : Chitosan

4.17. تأثير طريقة إضافة المعاملات في أوزان ثمار الخيار لنباتات سليمة وأخرى مصابة بالفايروس ***Squash vein yellowing virus*** **isolate SVYV/Iraq :**

بينت النتائج إن أفضل طريقة لتطبيق المعاملات والتي أدّت الى زيادة معنوية في أوزان ثمار الخيار هي طريقة غمر البذور في حين لم تكن هناك فروق معنوية في أوزان الثمار بين طريقة المعاملة بالسقي أوالرش كما في الجدول (4.16) .

جدول (4.16) تأثيرنوع المعاملات على أوزان ثمار الخيار لنباتات سليمة وأخرى مصابة بالفايروس *Squash vein yellowing virus* isolate SVYV/Iraq.

ت	طريقة التطبيق	نباتات سليمة	نباتات مصابة	معدل طريقة التطبيق
1	غمر	7.1	6.0	6.6
2	سقي	6.8	6.0	6.4
3	رش	6.9	6.1	6.5
	معدل الاصابة	6.9	6.0	
	للإصابة $LSD_{0.05}$	0.1		
	لطريقة التطبيق $LSD_{0.05}$	0.1		
	للتداخل $LSD_{0.05}$	0.2		

يسبب فايروس SVYV ذبولاً جهازي و اصفرار اً للأوراق مع نخر على الأوراق والسيقان ، في بعض الحالات الشديدة تؤدي إلى موت النبات ، وكذلك يحصل تدهور قشرة البطيخ ، وتعفن داخلها ، مما يؤدي إلى ثمار غير قابلة للتسويق (Webster واخرون ،2010 ؛ Reingold واخرون،2016) .

تعتمد الممارسات الحالية لحماية النباتات ، وتحسين إنتاجية المحاصيل على المعالجات الكيميائية ، التي تشكل خطورة على البيئة ، وتسبب آثارًا ضارة على صحة الإنسان والبيئة ، لذا فأن استعمال عوامل آمنة للإنسان والحيوان والبيئة ضروريا.

5. الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations

5.1. الاستنتاجات Conclusions :

1. بينت الدراسة أن أعراض الموزائيك الشديد على نباتات الخيار في حقول الحيدرية ناتجة عن اصابة مشتركة بين فايروسي *Tomato leaf curl palmpur virus* و *Squash vein yellowing virus* .
2. اتضح من خلال استخدام تقنية NGS ، واستعمال برامج المعلوماتية الحياتية Bioinformatics وجود فايروسين كاملين متداخلين في جينوم نبات خيار مصاب هما *CsatAV* و *CsatBV* كما تم تأكيد وجود قطعتي RT من فايروسات *ToffiV* و *Caulimovirus-sme*.
3. تبين من وجود تغاير بين DNA الكلي لنبات خيار مصاب ، وآخر سليم من خلال فقد في المنطقة الجينية للجين 23SrRNA اطلق عليها تسمية 23SrRNA Iraq. وكذلك وجدت مناطق تغاير شديد في المناطق الجينية rpS16 وYcf2 والتي اطلق عليها تسمية rpS16 Iraq وYcf2 Iraq .
4. اتضح أن الاصابة الفايروسية أثرت على التعبير الجيني للجين Ycf2 إلا أنها لم تؤثر على الجينين rpS16 و23SrRNA .
5. من خلال رسم الخرائط الوراثية اتضح أن فايروس SVYV يشفر بروتين متعدد Polyprotein وكان الأقرب إلى عزلة الأراضي الفلسطينية المحتلة، بينما DNA-A TLCPV يشفر 6 بروتينات هي (AC1، AC2، AC3 ، AC4، AV1 و AV2) في حين كان TLCPV DNA-B يشفر بروتينين هما (BC1 وBV1) وقد كان الأقرب للعزلات الايرانية.
6. وجد من خلال رسم الخريطة الوراثية لجينوم البلاستيدة الخضراء لنبات الخيار *Cucumis sativus* var. sativus انه يتحوي على130 جينا منها 84 جينا يشفر إلى بروتينات كما يحتوي على 37 حامض نووي رايبي الناقل tRNA و 8 من الحامض النووي رايبوسومي rRNA و1 من Precursor-RNA .
7. أكدت الدراسة أن المرض الفايروسي المسبب لأعراض الموزائيك ، و تجعد الاوراق ، والتقزم أعطى نسبة اصابة 100% وشدة اصابة 82 % للخيار ، وكذلك أدّت إلى خفض في الصفات المدروسة .
8. بينت الدراسة أن غمر البذور ، أو سقي النباتات ، أو رشها بالبكتريا *Bacillus amyloliquefaciens*، الميلاتونين ، الكيتوسان منفردة التوليفات المزدوجة بهذه العوامل ،

امكانية استحثاث المقاومة الجهازية لنبات الخيار ضد الاصابة الفايروسية بجعله متحمل للاصابة ، كما أنها أدت إلى تحسين الصفات الظاهرية المقاسة ، و المتمثلة والصفات الفسلجية كما أنها أدت إلى زيادة في اعداد ثمار نباتات الخيارو أوزانها .

8. وجد أن الخسائر الاقتصادية الناتجة عن الاصابة بالفايروسSVYV ولمساحة دونم واحد وصلت إلى (47.27 – 53.2) %.
9. اتضح من النتائج أن استعمال أفضل المعاملات (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الميلاتونين ، بكتريا *B. amyloliquefaciens* ومحلول الكيتوسان ، محلولي الميلاتونين والكيتوسان) بشكل توليفات مزدوجة حققت ربح مالي تراوحت نسبه بين (38.3 - 62.6) % لمساحة دونم واحد .

5.2. التوصيات Recommendations :

1. استعمال التقنيات الحديثة مثل تقينة NGS للكشف عن مسببات الامراض النباتية وخصوصا الفايروسية منها لدقة النتائج التي تعطيها .
2. دراسة الفايروسات الداخلية ومعرفة علاقتها مع الممرضات وإحداث المرض ومدى فاعليتها في النبات .
3. اجراء المزيد من الدراسات لمعرفة تأثير الاصابة الفايروسية على جينومات البلاستيدات الخضراء والمايتوكوندريا ، والتعبير الجيني لجينات هذه العضيات من خلال استعمال التقنيات الحديثة مثل تقينة NGS .
4. استخدام عوامل آمنة للانسان والبيئة (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ، محلول الميلاتونين ، الكيتوسان) في حماية محصول الخيار من الاصابة الفايروسية بدلا من استخدام عوامل ضارة بالانسان وملوثة للبيئة لوقاية محصول الخيار من الاصابة الفايروسية وتحسين نمو النبات وزيادة الانتاج.
5. انتاج توليفات مزدوجة لعوامل (بكتريا *B. amyloliquefaciens* ، محلول الميلاتونين ، الكيتوسان) تجاريا للاستفادة منها في برامج الادارة المتكاملة للآفات IPM استخدام لنتائج افضل .
6. استخراج الميلاتونين والكيتوسان من مصادرها الطبيعية وانتاجها بشكل كمي محليا .

6. المصادر References

المصادرالعربية:

الجهاز المركزي الاحصائي، وزارة التخطيط مديرية الاحصاء الزراعي . (2019) . انتاج المحاصيل والخضروات ، تقرير المحاصيل والخضراوات التجميعي لسنة 2019.

الخفاجي ، بهاء جودة كاظم جابر .(2022) . تشخيص فايروس التبرقش المعتدل على نبات الباذنجان باستخدام تقانة تسلسل الجيل القادم , (رسالة ماجستير - كلية الزراعة / جامعة الكوفة) .

الراوي، خاشع محمود و خلف الله ، عبد العزيز محمد.(2000) . تصميم وتحليل التجارب الزراعية. كلية الزراعة. الطبعة الثانية. جامعة الموصل. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جمهورية العراق.

الربيعي ، باقر جلاب هادي . (2021) . اسئلة واجوبة في فسلجة الاجهاد . جامعة المثنى – كلية الزراعة.

الزغبي ، محمد منهل و الحصني ، انيس مصطفى ودرغام ،حسان .(2013) .طرائق تحليل التربة والنبات و المياه والاسمدة . الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية- وزارة الزراعة والاصلاح الزراعي .الجمهورية العربية السورية .

زغير ، شروق ساني سوادي .(2021) . تحديد التسلسل النيوكليوتيدي الكامل لفايروس موزائيك التين *Fig Mosaic Emaravirus* وتقويم كفاءة بعض العوامل الاحيائية والنانوية في مقاومته , (اطروحة دكتوراه - كلية الزراعة / جامعة الكوفة).

شريف ، فياض محمد . (2011). الامراض الفايروسية والفايرودية . دار الذاكرة للنشر والتوزيع .الطبعة الاولى .جمهورية العراق . 632 صفحة.

شريف ، فياض محمد. (2012).علم امراض النبات والاسس الجزيئية للإصابة والمقاومة.دار الذاكرة للنشر والتوزيع .الطبعة الاولى . جمهورية العراق .

صادق ، نورس عبد الاله و كريم ، طارق عبد السادة و جبير ، حلا كاظم و نجم، حنان وليد . (2021) . افات القرعيات. الطبعة الاولى . بغداد – العراق . شركة زوايا للدعاية والاعلان.

العابدي ، علي حسين عطية .(2021). تحديد الجينوم الكامل لفايروس تجعد و اصفرار الطماطة- السلالة المعتدلة TYLCV-Mild والفايروسات الداخلية المرافقة لنبات الطماطة في العراق باستعمال تقانة الجيل الجديد , (رسالة ماجستير - كلية الزراعة / جامعة الكوفة) .

عباس، احمد كريم . (2023) . التوصيف الجزيئي لفايروس التبرقش المعتدل على اللوبياء CPMMV بأستعمال تقنية تسلسل الجيل القادم NGS واستخدام البكتريا لاستحثاث مقاومتها , (رسالة ماجستير - كلية الزراعة / جامعة الكوفة).

الفضل ، فضل عبد الحسين . (2021) . فايروسات النبات المتقدم . محاضرات الدكتوراه . وزارة التعليم العالي - كلية الزراعة / جامعة الكوفة .

الفضل ، فضل عبد الحسين خليل (1984) . تشخيص وانتشار مرض موزائيك الفاصوليا الاعتيادي في العراق , (رسالة ماجستير - كلية الزراعة / جامعة بغداد) .

الفضل، فضل عبد الحسين الفضل وسوداي، شروق ساني .(2017). تشخيص فايروس موزائيك الخيار (CMV) على نبات الباذنجان Solanum melongena L. باستخدام بعض النباتات الكاشفة والاشرطة المناعية وتقنية تفاعل البلمرة التسلسلي العكسي (RT-PCR) .مجلة الكوفة للعلوم الزراعية ، 9 (4).

قاسم ، نبيل عزيز .(2011) . فايروسات النبات Plant Virulogy . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي / جامعة الموصل . العلا للطباعة والنشر – الموصل .

المساري ، دعاء عبد العزيز محمد والكويتي ، نورس عبد الاله صادق. (2020) . التحري الجزيئي عن مجموعة فايروس الموزائيك الذهبي على الفاصوليا Begomoviruses التي تصيب نبات القرع .Cucurbita pepo L ومحاولة تمنيعه ضد الإصابة بها , (رسالة ماجستير– كلية الهندسة والعلوم الزراعية / جامعة بغداد) .

مكوك ، خالد محي الدين و فجلة ، جابر ابراهيم وقمري ،صفاء غسان. (2008). الامراض الفايروسية للمحاصيل الزراعية المهمة في المنطقة العربية . الطبعة الاولى .بيروت – لبنان .دار النهضة العربية .

الياسري ، حوراء اسماعيل عباس ، الفضل ،فضل عبد الحسين ، وعبد الله ، عبيس الحاتمي . (2016). استحثاث المقاومة للجهاز في نبات الخيار (Cucumis sativusL.) ضد فايروس موزائيك الخيار CMV باستخدام بعض أنواع العوامل الحيوية البكتيرية. مجلة الكوفة للعلوم الزراعية ، 8 (4).

References:

Abass ,M. O., & Lahuf , A. A. (2023). search Paper (Molecular Studies: Viruses High-Throughput Sequencing and Bioinformatic Analysis Reveal Presence of the Endogenous Pararetrovirus Tobacco vein clearing virus Genome in the Tomato (Solanum lycopersicum) Host Genome. *Arab Society for Plant Protection*,41(1),77-84.

Abd El-Naby, S.K.M , Abdelkhalek, A. M. A., El-Naggar, Y.I.M. (2019). Effect of melatonin, GA3 and NAA Hortorum Cultus, on vegetative growth, yield and quality of 'Canino' apricot fruits. *Acta Sc i. Pol.* 18(3), 167–174. DOI: 10.24326/asphc.2019.3.16.

Abdelkhalek ،A., & Al-Askar, A. A. (2020). Green synthesized ZnO nanoparticles mediated by Mentha spicata extract induce plant systemic resistance against Tobacco mosaic virus. *Applied Sciences*, 10(15).

Abkhoo, J., & Mehraban, A. (2020). Genetic diversity of Tomato leaf curl Palampur virus and its whitefly vector, Bemisia tabaci, in the Sistan region. *Journal of Microbial World*, 13(3), 290-299.

Acosta-Maspons, A., González-Lemes, I., & Covarrubias, A. A. (2019). Improved protocol for isolation of high-quality total RNA from different organs of Phaseolus vulgaris L. *Biotechniques*, *66*(2), 96-98.

Adkins, S., Webb, S. E., Achor, D., Roberts, P. D., & Baker, C. A. (2007). Identification and characterization of a novel whitefly-transmitted member of the family Potyviridae isolated from cucurbits in Florida. *Phytopathology*, *97*(2), 145-154.

Alisawi, O. N. (2019). *Virus integration and tandem repeats in the genomes of Petunia* (Doctoral dissertation, University of Leicester).

ALKahtani, M. D., Attia, K. A., Hafez, Y. M., Khan, N., Eid, A. M., Ali, M. A., & Abdelaal, K. A. (2020). Chlorophyll fluorescence parameters and antioxidant defense system can display salt tolerance of salt acclimated sweet pepper plants treated with chitosan and plant growth promoting rhizobacteria. *Agronomy*, 10(8), 1180

Ando, S., Miyashita, S., & Takahashi, H. (2019). Plant defense systems against Cucumber mosaic virus: lessons learned from CMV–Arabidopsis interactions . *Journal of General Plant Pathology*, 85(3), 174-181.

Armingol, E., Officer, A., Harismendy, O., & Lewis, N. E. (2021). Deciphering cell–cell interactions and communication from gene expression. *Nature Reviews Genetics*, 22(2), 71-88

Arnao, M. B., & Hernández-Ruiz, J. (2015). Functions of melatonin in plants: a review. *Journal of pineal research*, 59(2), 133-150.

Arnao, M. B., & Hernández-Ruiz, J. (2019). Melatonin: a new plant hormone and/or a plant master regulator?. *Trends in Plant Science*, 24(1), 38-48.

Arnao, M. B., & Hernández-Ruiz, J. (2021). Melatonin as a regulatory hub of plant hormone levels and action in stress situations. *Plant Biology*, 23, 7-19.

Authority, E. F. S., Anastassiadou, M., Arena, M., Auteri, D., Brancato, A., Bura, L., & Villamar-Bouza, L. (2021). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance Bacillus amyloliquefaciens strain QST 713 (formerly Bacillus subtilis strain QST 713). *EFSA Journal*, *19*(1).

Back, K., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2016). Melatonin biosynthesis in plants: multiple pathways catalyze tryptophan to melatonin in the cytoplasm or chloroplasts. *Journal of Pineal Research*, 61(4), 426-437.

Basu, A., Prasad, P., Das, S. N., Kalam, S., Sayyed, R. Z., Reddy, M. S., & El Enshasy, H. (2021). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: recent developments, constraints, and prospects. *Sustainability*, 13(3), 1140.

Beris, D., Theologidis, I., Skandalis, N., & Vassilakos, N. (2018). *Bacillus amyloliquefaciens* strain MBI600 induces salicylic acid dependent resistance in tomato plants against Tomato spotted wilt virus and Potato virus Y. *Scientific reports*, 8(1), 1-11.

Bhattacharyya, D., & Chakraborty, S. (2018). Chloroplast: the Trojan horse in plant–virus interaction. *Molecular Plant Pathology*, 19(2), 504-518.

Biju, C. N., Krishnamurthy, K. S., & Bhat, A. I. (2022). Physiological and biochemical response of ginger varieties to virus infection. *Plant Physiology Reports*, *27*(1), 171-179.

Bowers, J. E., Tang, H., Burke, J. M., & Paterson, A. H. (2022). GC content of plant genes is linked to past gene duplications. *Plos one*, *17*(1), e0261748.

Buccitelli, C., & Selbach, M. (2020). mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. *Nature Reviews Genetics*, 21(10), 630-644.

Çevik, B., Sönmez, E., & Şahin-Çevik, M. (2021). Tomato chlorosis virus infection represses chloroplast related genes in tomato. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *116*, 101722.

Chakraborty, M., Hasanuzzaman, M., Rahman, M., Khan, M., Rahman, A., Bhowmik, P., & Islam, T. (2020). Mechanism of plant growth promotion and disease suppression by chitosan biopolymer. *Agriculture*, 10(12), 624.

Chaturvedi, S., Seo, J. K., & Rao, A. L. N. (2016). Functionality of host proteins in Cucumber mosaic virus replication: GAPDH is obligatory to promote interaction between replication-associated proteins. *Virology*, 494, 47-55

Chowdhury, S. P., Hartmann, A., Gao, X., & Borriss, R. (2015). Biocontrol mechanism by root-associated Bacillus amyloliquefaciens FZB42–a review. *Frontiers in microbiology*, 6, 780.

Cosmulescu, S., Scrieciu, F., & Manda, M. (2020). Determination of leaf characteristics in different medlar genotypes using the ImageJ program. *Horticultural Science*, 47(2), 117-121.

Dhkal, M., Sharma S. P. (2022) (b). Identification of resistance sources and monogenic dominant nature of resistance to tomato leaf curl Palampur virus in melons. *Phytoparasitica*, 1-11.

Dhkal, M., Sharma, A., & Kaur, G. (2020) (a). First report of tomato leaf curl Palampur virus infecting muskmelon in India. *Journal of Plant Pathology*, 102(4), 1367-1367.

Ding, F., Wang, G., Wang, M., & Zhang, S. (2018). Exogenous melatonin improves tolerance to water deficit by promoting cuticle formation in tomato plants. *Molecules*, 23(7), 1605.

Diop S.I., Geering A.D., Alfama-Depauw F., Loaec M., Teycheney P.-Y. & Maumus F. (2018) . Tracheophyte genomes keep track of the deep evolution of the *Caulimoviridae*. *Scientific reports* 8, 572.

El-Dougdoug Bisht, N., Mishra, S. K., & Chauhan, P. S. (2020). *Bacillus amyloliquefaciens* inoculation alters physiology of rice (Oryza sativa L. var. IR-36) through modulating carbohydrate metabolism to mitigate stress induced by nutrient starvation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 143, 937-951.

Ertunç, F. (2020). Physiology of virus-infected plants. In *Applied Plant Virology* (pp. 199-205). Academic Press.

European Food Safety Authority (EFSA), Alvarez, F., Anastassiadou , M., Arena, M., Auteri, D., Brancato, A., ... & Villamar-Bouza, L. (2021). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance Bacillus amyloliquefaciens strain IT-45. *EFSA Journal*, 19(5), e06594.

Fiallo-Olivé, E., Lett, J. M., Martin, D. P., Roumagnac, P., Varsani, A., Zerbini, F. M., ... & Consortium, I. R. (2021). ICTV virus taxonomy profile: Geminiviridae 2021. *The Journal of General Virology*, 102(12).

Forsythe, E. S., Grover, C. E., Miller, E. R., Conover, J. L., Arick, M. A., Chavarro, M. C. F., & Sloan, D. B. (2022). Organellar transcripts dominate the cellular mRNA pool across plants of varying ploidy levels. *bioRxiv*.

Geering, A. D. W., & Hull, R. (2012). Family caulimoviridae. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, 424-443.

Geering, A. D., Maumus, F., Copetti, D., Choisne, N., Zwickl, D. J., Zytnicki, M., ... & Teycheney, P. Y. (2014). Endogenous florendoviruses are major components of plant genomes and hallmarks of virus evolution. *Nature Communications*, *5*(1), 1-11.

Gu, Q., Yang, Y., Yuan, Q., Shi, G., Wu, L., Lou, Z., ... & Gao, X. (2017). Bacillomycin D produced by Bacillus amyloliquefaciens is involved in the antagonistic interaction with the plant-pathogenic fungus Fusarium graminearum . *Applied and environmental microbiology*, *83*(19), e01075-17

Guo, L., Su, Q., Yin, J., Yang, Z., Xie, W., Wang, S., ... & Zhang, Y. (2019). Amino acid utilization may explain why Bemisia tabaci Q and B differ in their performance on plants infected by the Tomato yellow leaf curl virus. *Frontiers in physiology*, *10*, 489.

Guo, Y., Dong, Y., Xu, C., Xie, Q., Xie, Y., Xia, Z., ... & Wu, Y. (2020). Novel combined biological antiviral agents Cytosinpeptidemycin and Chitosan oligosaccharide induced host resistance and changed movement protein subcellular localization of tobacco mosaic virus. *Pesticide biochemistry and physiology*, 164, 40-46.

Hanamasagar, Y., Naganur, P., Shankarappa, K. S., Venkataravanappa, V., & Lakshminarayana Reddy, C. N. (2021). Characterization of *Tomato leaf curl Palampur virus* associated with leaf curl and yellowing disease of watermelon from India. *Indian Phytopathology*, 74(4), 1075-1088.

Hanley-Bowdoin, L., Bejarano, E. R., Robertson, D., & Mansoor, S. (2013). Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 777-788.

Hassan, O., & Chang, T. (2017). Chitosan for eco-friendly control of plant disease. *Asian J. Plant Pathol*, 11, 53-70.

Ha-Tran, D. M., Nguyen, T. T. M., Hung, S. H., Huang, E., & Huang, C. C. (2021). Roles of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) in Stimulating Salinity Stress Defense in Plants: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3154.

Hernandez, R. N., Isakeit, T., Al Rwahnih, M., Hernandez, R., & Alabi, O. J. (2021). First report of squash vein yellowing virus naturally infecting butternut squash (Cucurbita moschata) in Texas. *Plant Disease*, *105*(9), 2738.

Heydarnejad, J., Hesari, M., Massumi, H., & Varsani, A. (2013). Incidence and natural hosts of Tomato leaf curl Palampur virus in Iran . *Australasian Plant Pathology*, 42(2), 195-203.

Hidangmayum, A., Dwivedi, P., Katiyar, D., & Hemantaranjan, A. (2019). Application of chitosan on plant responses with special reference to abiotic stress. *Physiology and molecular biology of plants*, 25(2), 313-326.

Huang, P., Davis, E., Cao, X., & Cameron, H. J. (2022). riboCleaner: a pipeline to identify and quantify rRNA read contamination from RNA-seq data in plants. *Bioinformatics*, *38*(15), 3840-3843.

In, H. L. Y., & Pincket, R. (2022). Transcripts Per Million Ratio: a novel batch and sample control method over an established paradigm. *arXiv preprint arXiv:2205.02844*.

Inoue-Nagata, A. K., Jordan, R., Kreuze, J., Li, F., López-Moya, J. J., Mäkinen, K., ... & Wylie, S. J. (2022). ICTV Virus Taxonomy

Profile: Potyviridae 2022. *Journal of General Virology*, 103(5), 001738.

Jailani, A. A. K., Iriarte, F., Hochmuth, R., Willis, S. M., Warren, M. W., Dey, K. K., ... & Paret, M. L. (2021). First Report of Cucurbit Chlorotic Yellows Virus affecting Watermelon in USA. *Plant Disease*.

Jones, S., Baizan-Edge, A., MacFarlane, S., & Torrance, L. (2017). Viral diagnostics in plants using next generation sequencing: computational analysis in practice. *Frontiers in plant science*, 8, 1770.

Kaldis, A., Berbati, M., Melita, O., Reppa, C., Holeva, M., Otten, P., & Voloudakis, A. (2018). Exogenously applied dsRNA molecules deriving from the Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) genome move systemically and protect cucurbits against ZYMV. *Molecular plant pathology*, *19*(4), 883-895.

Kapli, P., Yang, Z., & Telford, M. J. (2020). Phylogenetic tree building in the genomic age. *Nature Reviews Genetics*, 21(7), 428-444.

Kaur, P., Kaila, T., Dhkal, M., & Gaikwad, K. (2022). Chloroplast genome and plant–virus interaction. *In Bioinformatics in Agriculture* (pp. 419-436). Academic Press.

Ke, C. L., Deng, F. S., Chuang, C. Y., & Lin, C. H. (2021). Antimicrobial actions and applications of chitosan . *Polymers*, *13*(6), 904.

Khaffajah, B., Alisawi, O., & Al Fadhl, F. (2022). Genome sequencing of eggplant reveals *Eggplant mild* leaf *mottle virus* existence with associated two endogenous viruses in diseased eggplant in

Iraq. *Archives of Phytopathology and Plant Protection, 55*(16), 1930-1943.

Kim, M. J., Radhakrishnan, R., Kang, S. M., You, Y. H., Jeong, E. J., Kim, J. G., & Lee, I. J. (2017). Plant growth promoting effect of Bacillus amyloliquefaciens H-2-5 on crop plants and influence on physiological changes in soybean under soil salinity. *Physiology and molecular biology of plants*, 23(3), 571-580.

Kocięcka, J., & Liberacki, D. (2021). The Potential of Using Chitosan on Cereal Crops in the Face of Climate Change. *Plants*, 10(6), 1160.

Koetsier, G., & Cantor, E. (2019). A practical guide to analyzing nucleic acid concentration and purity with microvolume spectrophotometers. *New England Biolabs Inc*, 1-8.

Kruse, C. P., Basu, P., Luesse, D. R., & Wyatt, S. E. (2017). Transcriptome and proteome responses in RNAlater preserved tissue of Arabidopsis thaliana. *PloS one*, 12(4), e017594.

KtsSilva, B. S., Heringer, P., Dias, G. B., Svartman, M., & Kuhn, G. C. (2019). De novo identification of satellite DNAs in the sequenced genomes of Drosophila virilis and D. americana using the RepeatExplorer and TAREAN pipelines. *PloS one*, 14(12), e0223466.

Kulshreshtha, A., Kumar, Y., Roshan, P., Bhattacharjee, B., Mukherjee, S. K., & Hallan, V. (2019). AC4 protein of tomato leaf curl Palampur virus is an RNA silencing suppressor and a pathogenicity determinant. *Microbial Pathogenesis*, 135, 103636.

Kumari, N., Jat, H. K., & Deora, A. (2020) . Chitosan And Its Role In Plant Disease Management. *Krishi SCIENCE – eMagazine for Agricultural Sciences* .1(6),1-26.

Kumari, S., Krishnan, N., & Pandey, K. K. (2022). Emergence of begomoviruses in cucurbits as a menace for its cultivation. In Geminivirus: Detection, *Diagnosis and Management* (pp. 107-124).

Lecoq, H., & Katis, N. (2014). Control of cucurbit viruses. *Advances in virus research*, 90, 255-296.

Li, C., Ma, X., Deng, J., Li, J., Liu, Y., Zhu, X., ... & Liu, J. (2021). Machine learning-based automated yeast cell counting under a complicated background with ilastik and ImageJ. Authorea Preprints.

Li, W., Hilf, M. E., Webb, S. E., Baker, C. A., & Adkins, S. (2008). Presence of P1b and absence of HC-Pro in Squash vein yellowing virus suggests a general feature of the genus Ipomovirus in the family Potyviridae. *Virus research*, *135*(2), 213-219.

Li, Z., Li, C., Fu, S., Liu, Y., Xu, Y., Wu, J., ... & Zhou, X. (2021) . NSvc4 Encoded by Rice Stripe Virus Targets Host Chloroplasts to Suppress Chloroplast-Mediated Defense. *Viruses* , *14* (1), 36.

Li, H., Chang, J., Chen, H., Wang, Z., Gu, X., Wei, C., ... & Zhang, X. (2017). Exogenous melatonin confers salt stress tolerance to watermelon by improving photosynthesis and redox homeostasis. *Frontiers in plant science*, 8, 295.

Lin, K. Y., Wu, S. Y., Hsu, Y. H., & Lin, N. S. (2022). MiR398-regulated antioxidants contribute to Bamboo mosaic virus accumulation and symptom manifestation. *Plant physiology*, 188(1), 593-607.

Liu, C., Pu, Y., Peng, H., Lv, X., Tian, S., Wei, X., ... & Sun, X. (2021). Transcriptome sequencing reveals that photoinduced gene IP-L affects the expression of PsbO to response to virus infection in

Nicotiana benthamiana . *Physiological and Molecular Plant Pathology* , 114, 101613.

Lopez, L., & Liburd, O. E. (2022). Can the introduction of companion plants increase biological control services of key pests in organic squash?. *Entomologia Experimentalis et Applicata*.

Luo, L., Zhao, C., Wang, E., Raza, A., & Yin, C. (2022). Bacillus amyloliquefaciens as an excellent agent for biofertilizer and biocontrol in agriculture: An overview for its mechanisms. *Microbiological Research*, 127016.

Malerba, M., & Cerana, R. (2020). Chitin-and chitosan-based derivatives in plant protection against biotic and abiotic stresses and in recovery of contaminated soil and water. *Polysaccharides*, 1(1), 21-30.

Massart, S., Olmos, A., Jijakli, H., & Candresse, T. (2014). Current impact and future directions of high throughput sequencing in plant virus diagnostics. *Virus research*, 188, 90-96.

Materatski, P., Jones, S., Patanita, M., Campos, M. D., Dias, A. B., Félix, M. D. R., & Varanda, C. M. (2021). A bipartite geminivirus with a highly divergent genomic organization identified in olive trees may represent a novel evolutionary direction in the family Geminiviridae. *Viruses*, *13*(10), 2035.

Medina-Santamarina, J., Serrano, M., Lorente-Mento, J. M., García-Pastor, M. E., Zapata, P. J., Valero, D., & Guillén, F. (2021). Melatonin treatment of pomegranate trees increases crop yield and quality parameters at harvest and during storage. *Agronomy*, *11*(5), 861.

Mofunanya, A. A. J., Omara-Achong, T. E., Akomaye, F. A., Ogar, V. B., & Oni, J. O. (2021). Physiological Alterations in Sphenostylis stenocarpa due to Telfairia mosaic virus. *Russian Journal of Plant Physiology*, *68*(4), 728-734.

Moustafa-Farag, M., Almoneafy, A., Mahmoud, A., Elkelish, A., Arnao, M. B., Li, L., & Ai, S. (2020). Melatonin and its protective role against biotic stress impacts on plants. *Biomolecules*, 10(1), 54.

Mubarik, N. R., Rusmana, I., Suhartono, M. T., Sipriyadi, S., & Masrukhin, M.(2022). Analysis of Soil Bacterial Diversity from Tropical Rainforest and Oil Palm Plantation In Jambi, Indonesia by 16S rRNA-DGGE Profiles. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, 7(2), 68820.

Mukherjee, S. (2018). Novel perspectives on the molecular crosstalk mechanisms of serotonin and melatonin in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 132, 33-45.

Mukta, J. A., Rahman, M., Sabir, A. A., Gupta, D. R., Surovy, M. Z., Rahman, M., & Islam, M. T. (2017). Chitosan and plant probiotics application enhance growth and yield of strawberry. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 11, 9-18.

Müllender, M., Varrelmann, M., Savenkov, E. I., & Liebe, S. (2021). Manipulation of auxin signalling by plant viruses. *Molecular Plant Pathology*, *22*(11), 1449-1458.

Murch, S. J., & Erland, L. A. (2021). A systematic review of melatonin in plants: an example of evolution of literature. *Frontiers in plant science*, *12*, 1060.

Nan, Y., Luo, W., Guan, Q., Guo, X., Pan, M., Lai, Z., & Lin, Y. (2021). Effects of Different Vase Solutions on Fresh-keepin Effects of Fresh-cut Rose. *Plant Diseases & Pests*, *12*.

Navarro, J. A., Sanchez-Navarro, J. A., & Pallas, V. (2019). Key checkpoints in the movement of plant viruses through the host. *Advances in virus research*, *104*, 1-64.

Negm, N. A., Hefni, H. H., Abd-Elaal, A. A., Badr, E. A., & Abou Kana, M. T. (2020). Advancement on modification of chitosan biopolymer and its potential applications. *International journal of biological macromolecules*, *152*, 681-702.

Ngalimat, M. S., Yahaya, R. S. R., Baharudin, M. M. A. A., Yaminudin, S. M., Karim, M., Ahmad, S. A., & Sabri, S. (2021). A review on the biotechnological applications of the operational group *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microorganisms*, 9(3), 614.

Novák, P., Neumann, P., & Macas, J. (2020). Global analysis of repetitive DNA from unassembled sequence reads using RepeatExplorer2. *Nature protocols*, 15(11), 3745-3776.

Novák, P., Neumann, P., Pech, J., Steinhaisl, J., & Macas, J. (2013). RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. *Bioinformatics*, 29(6), 792-793.

Ong, P. W., Chan, P. L., Ooi, L. C. L., & Singh, R. (2019). Isolation of high quality total RNA from various tissues of oil palm (Elaeis guineensis) for reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR). *J. Oil Palm Res*, 31, 195-203.

Patel, N., Huang, X. P., Grandner, J. M., Johansson, L. C., Stauch, B., McCorvy, J. D., ... & Katritch, V. (2020). Structure-based discovery of potent and selective melatonin receptor agonists. *Elife*, 9, e53779 .

Pecman, A., Kutnjak, D., Gutiérrez-Aguirre, I., Adams, I., Fox, A., Boonham, N., & Ravnikar, M. (2017). Next generation sequencing for detection and discovery of plant viruses and viroids: comparison of two approaches. *Frontiers in microbiology*, 8, 1998.

Popletaeva, S. B., & Arslanova, L. R. (2021). Use of chitosan nanoparticles loaded with biologically active substances for pre-harvest plant protection from pathogens (a review). In Journal of Physics: *Conference Series* (Vol. 1942, No. 1, p. 012077). IOP Publishing

Qian, J., Zhang, T., Tang, S., Zhou, L., Li, K., Fu, X., & Yu, S. (2020). Biocontrol of citrus canker with endophyte Bacillus amyloliquefaciens QC-Y. *Plant Protection Science*, 57(1), 1-13.

Qiu, Y., Zhang, Y., Wang, C., Lei, R., Wu, Y., Li, X., & Zhu, S. (2018). Cucumber mosaic virus coat protein induces the development of chlorotic symptoms through interacting with the chloroplast ferredoxin I protein. *Scientific reports*, 8(1), 1-11.

Ramazani, M. A., Ayazpour, K., Niazmand, A. R., & Najafipour, G. (2022). Detection of begomoviruses of Solanaceae crops in southern Iran . *Indian Phytopathology*, 1-6.

Raza, A., & Shahid, M. S. (2020). Next-generation sequencing technologies and plant molecular virology: a practical perspective. *In Applied Plant Virology* (pp. 131-140). Academic Press.

Rehman, F., Kalsoom, M., Nasir, T. A., Adnan, M., Anwar, S., & Zahra, A. (2020). Chemistry of plant–microbe interactions in rhizosphere and rhizoplane. Ind. *J. Pure App. Biosci*, 8(5), 11-19.

Reingold, V., Lachman, O., Sela, N., Luria, N., & Dombrovsky, A. (2016). Watermelon fruit rot disease in Israel is caused by a distinct Squash vein yellowing virus (SqVYV) strain. *Plant Disease*, *100*(6), 1176-1183.

Rendina, N., Nuzzaci, M., Scopa, A., Cuypers, A., & Sofo, A. (2019). Chitosan-elicited defense responses in Cucumber mosaic virus (CMV)-infected tomato plants. *Journal of plant physiology*, 234, 9-17.

Reyes-Pérez, J. J., Rivero-Herrada, M., García-Bustamante, E. L., Beltran-Morales, F. A., & Ruiz-Espinoza, F. H. (2020). Chitosan application increases the emergence, growth and yield of tomato crop (*Solanum lycopersicum* L.) under greenhouse conditions. *Biotecnia*, *22*(3), 156-163.

Richert-Pöggeler, K. R., Vijverberg, K., Alisawi, O., Chofong, G. N., Schwarzacher, T., & Heslop-Harrison, J. S. (2021). Participation of multifunctional RNA in replication, recombination and regulation of endogenous plant pararetroviruses (EPRVs). *Frontiers in Plant Science*, 12, 1148.

Ripma, L. A., Simpson, M. G., & Hasenstab-Lehman, K. (2014). Geneious! Simplified genome skimming methods for phylogenetic systematic studies: A case study in Oreocarya (Boraginaceae). *Applications in Plant Sciences*, 2(12), 1400062.

Robles, P., & Quesada, V. (2019). Transcriptional and post-transcriptional regulation of organellar gene expression (OGE) and

its roles in plant salt tolerance. *International journal of molecular sciences*, 20(5), 1056.

Romera, F. J., García, M. J., Lucena, C., Martínez-Medina, A., Aparicio, M. A., Ramos, J., ... & Pérez-Vicente, R. (2019). Induced systemic resistance (ISR) and Fe deficiency responses in dicot plants. *Frontiers in Plant Science*, 10, 287.

Roshan, P., Kulshreshtha, A., Purohit, R., & Hallan, V. (2020). AV2 protein of tomato leaf curl Palampur virus interacts with F-box Kelch protein of tomato and enhances phenylalanine ammonia-lyase activity during virus infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 110, 101479.

Rubio, L., Galipienso, L., & Ferriol, I. (2020). Detection of plant viruses and disease management: Relevance of genetic diversity and evolution. *Frontiers in plant science*, *11*, 1092.

Sabouri, M., & Heydar Nezhad, J. (2013). Evaluation of the reaction of greenhouse cucumber cultivars inoculated by the infectious clone of Tomato leaf curl Palampur virus. *Agricultural Biotechnology Journal*, 5(1), 83-96.

Sahu, P. K., Sao, R., Mondal, S., Vishwakarma, G., Gupta, S. K., Kumar, V., ... & Das, B. K. (2020). Next generation sequencing based forward genetic approaches for identification and mapping of causal mutations in crop plants: A comprehensive review. *Plants*، 9(10)، 1355.

Salachna, P., & Zawadzińska, A. (2014). Effect of chitosan on plant growth, flowering and corms yield of potted freesia. *Journal of Ecological Engineering*, *15*(3).

Samal, K. C., Sahoo, J. P., Behera, L., & Dash, T. (2021). Understanding the BLAST (Basic local alignment search tool) Program and a step-by-step guide for its use in life science research. Quarterly Research *Journal of Plant & Animal Sciences/Bhartiya Krishi Anusandhan Patrika*, 36(1).

Sayers, E. W., Beck, J., Bolton, E. E., Bourexis, D., Brister, J. R., Canese, K., ... & Sherry, S. T. (2021). Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic acids research*, 49(D1), D10

Schmidt N, Seibt KM, Weber B, Schwarzacher T, Schmidt T and Heitkam T. (2021). Broken, silent and in hiding: tamed endogenous pararetroviruses escape elimination from the genome of sugar beet (Beta *vulgaris*). *Annals of Botany* XXX: XXX–XXX.

Shafi, J., Tian, H., & Ji, M. (2017). Bacillus species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31(3), 446-459.

Shafiq, M., Ahmad, M., Nisar, A., Manzoor, M. T., Abid, A., Mushtaq, S., ... & Mubin, M. (2019). Molecular characterization and phylogenetic analysis of tomato leaf curl Palampur virus, a bipartite begomovirus, associated with Cucumis sativus L. in Pakistan. *3 Biotech*, *9*(6), 1-9

Shahrajabian, M. H., Chaski, C., Polyzos, N., Tzortzakis, N., & Petropoulos, S. A. (2021). Sustainable agriculture systems in vegetable production using chitin and chitosan as plant biostimulants. *Biomolecules*, 11(6), 819.

Sharif, R., Xie, C., Zhang, H., Arnao, M. B., Ali, M., Ali, Q., ... & Li, Y. (2018). Melatonin and its effects on plant systems. *Molecules*, 23(9), 2352.

Sharma, S. K., Ramesh, A., & Johri, B. N. (2013). Isolation and characterization of plant growth promoting *Bacillus amyloliquefaciens* strain sks_bnj_1 and its influence on rhizosphere soil properties and nutrition of soybean (Glycine max L. Merrill). *J Virol Microbiol*, 2013(2013), 1-19.

Sheteiwy, M. S., Abd Elgawad, H., Xiong, Y. C., Macovei, A., Brestic, M., Skalicky, M., ... & El-Sawah, A. M. (2021). Inoculation with Bacillus amyloliquefaciens and mycorrhiza confers tolerance to drought stress and improve seed yield and quality of soybean plant. *Physiologia Plantarum*, *172*(4), 2153-2169.

Shrestha, D., McAuslane, H. J., Adkins, S. T., Smith, H. A., Dufault, N., Colee, J., & Webb, S. E. (2017). Host-mediated effects of semipersistently transmitted Squash Vein Yellowing Virus on Sweetpotato Whitefly (Hemiptera: Aleyrodidae) behavior and fitness. *Journal of economic entomology*, *110*(4), 1433-1441.

Shrestha, D., McAuslane, H. J., Adkins, S. T., Smith, H. A., Dufault, N., & Webb, S. E. (2016). Transmission of Squash vein yellowing virus to and from cucurbit weeds and effects on sweetpotato whitefly (Hemiptera: Aleyrodidae) behavior. *Environmental entomology* , *45*(4), 967-973.

Shrestha, D., McAuslane, H. J., Ebert, T. A., Cervantes, F. A., Adkins, S. T., Smith, H. A., ... & Webb, S. E. (2019). Assessing the temporal effects of Squash vein yellowing virus infection on settling and feeding behavior of Bemisia tabaci (MEAM1)(Hemiptera: Aleyrodidae). *Journal of Insect Science*, 19(3), 5.

Silva, B. S., Heringer, P., Dias, G. B., Svartman, M., & Kuhn, G. C. (2019). De novo identification of satellite DNAs in the sequenced genomes of Drosophila virilis and D. americana using the RepeatExplorer and TAREAN pipelines. *PloS one*, 14(12), e0223466.

SKM, A. E. N., Abdelkhalek, A., Baiea, M., & Amin, O. (2020). Mitigation of heat stress effects on Washington navel orange by using melatonin, gibberellin and salicylic treatments. *Plant Arch*, *20*, 3523-3534.

Sofy, A. R., Hmed, A. A., Abd EL-Aleem, M. A., Dawoud, R. A., Elshaarawy, R. F., & Sofy, M. R.((2020). Mitigating effects of Bean yellow mosaic virus infection in faba bean using new carboxymethyl chitosan - titania nano biocomposites. International . *Journal of Biological Macromolecules*, 163, 1261-1275.

Sofy, A. R., Sofy, M. R., Hmed, A. A., Dawoud, R. A., Refaey, E. E., Mohamed, H. I., & El-Dougdoug, N. K. (2021). Molecular characterization of the Alfalfa mosaic virus infecting Solanum melongena in Egypt and the control of its deleterious effects with melatonin and salicylic acid. *Plants*, 10(3), 459

Song , X. S., Wang, Y. J., Mao, W. H., Shi, K., Zhou, Y. H., Nogués‹ S.‹ & Yu‹ J. Q. (2009). Effects of cucumber mosaic virus infection on electron transport and antioxidant system in chloroplasts and mitochondria of cucumber and tomato leaves. *Physiologia Plantarum*‹ 135(3)‹ 246-257.

Souza, P. F., Garcia-Ruiz, H., & Carvalho, F. E. (2019). What proteomics can reveal about plant–virus interactions? Photosynthesis-related proteins on the spotlight. *Theoretical and experimental plant physiology*, *31*(1), 227-248.

Subhan, F., Hussain, Z., Tauseef, I., Shehzad, A., & Wahid, F. (2021). A review on recent advances and applications of fish collagen. *Critical reviews in food science and nutrition*, 61(6), 1027-1037.

Sutyak, K. E., Wirawan, R. E., Aroutcheva, A. A., & Chikindas, M. L. (2008). Isolation of the Bacillus subtilis antimicrobial peptide subtilosin from the dairy product-derived Bacillus amyloliquefaciens. *Journal of applied microbiology*, 104(4), 1067-1074.

Suza, W., Lee, D., Becraft, P., & Hanneman, M. (2021). DNA Mutations . Genetics , *Agriculture, and Biotechnology* . https://iastate.pressbooks.pub/genagbiotech/chapter/dna-mutations/

Timmermann, T., González, B., & Ruz, G. A. (2020). Reconstruction of a gene regulatory network of the induced systemic resistance defense response in Arabidopsis using boolean networks. *BMC bioinformatics*, 21(1), 1-16.

Venkataravanappa, V., Prasanna, H. C., Reddy, C. N., Chauhan, N., Shankarappa, K. S., & Reddy, M. K. (2021). Molecular characterization of recombinant Bipartite begomovirus associated with mosaic and leaf curl disease of Cucumber and Muskmelon. *Indian Phytopathology*, *74*(3), 775-785

Vitales, D., Garcia, S., & Dodsworth, S. (2020). Reconstructing phylogenetic relationships based on repeat sequence similarities. *Molecular phylogenetics and evolution*, 147, 106766.

Vlot, A. C., Sales, J. H., Lenk, M., Bauer, K., Brambilla, A., Sommer, A., ... & Nayem, S. (2021). Systemic propagation of immunity in plants. *New Phytologist*, 229(3), 1234-1250

Wang, X., Jiang, Z., Yue, N., Jin, X., Zhang, X., Li, Z., ... & Li, D. (2021). Barley stripe mosaic virus γb protein disrupts chloroplast antioxidant defenses to optimize viral replication. *The EMBO Journal*, e107660.

Webster, C. G., Turechek, W. W., Kousik, C. S., Roberts, P. D., Webb, S. E., & Adkins, S. (2010). Response of various vining cucurbits to Squash vein yellowing virus infection. *Proc. of Cucurbitaceae*, 214-215.

Wei, J., Li, D. X., Zhang, J. R., Shan, C., Rengel, Z., Song, Z. B., & Chen, Q. (2018). Phytomelatonin receptor PMTR 1-mediated signaling regulates stomatal closure in Arabidopsis thaliana. *Journal of pineal research*, 65(2), e12500.

Whattam, M., Dinsdale, A., & Elliott, C. E. (2021). Evolution of Plant Virus Diagnostics Used in Australian Post Entry Quarantine. *Plants*, 10(7), 1430.

WoldemariamYohannes, K., Wan, Z., Yu, Q., Li, H., Wei, X., Liu, Y., ... & Sun, B. (2020). Prebiotic, probiotic, antimicrobial, and functional food applications of Bacillus amyloliquefaciens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(50), 14709-14727.

Wu, Y., Zhou, J., Li, C., & Ma, Y. (2019). Antifungal and plant growth promotion activity of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* . *Microbiology Open*, *8*(8), e00813.

Yohe, S., & Thyagarajan, B. (2017). Review of clinical next-generation sequencing. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 141(11), 1544-1557.

Yu, J., Wang, D., Geetha, N., Khawar, K. M., Jogaiah, S., & Mujtaba, M. (2021). Current trends and challenges in the synthesis

and applications of chitosan-based nanocomposites for plants: A review. *Carbohydrate Polymers*, 117904.

Zaccardelli, M., Sorrentino, R., Caputo, M., Scotti, R., De Falco, E., & Pane, C. (2020). Stepwise-selected *Bacillus amyloliquefaciens* and *B. subtilis* strains from composted aromatic plant waste able to control soil-borne diseases. *Agriculture*, 10(2), 30

Zagier, S., Al Fadhal, F., & Alisawi, O. (2021). Control Fig Mosaic Virus By plant extracts with salicylic acid. In IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science* (Vol. 790, No. 1, p. 012058). IOP Publishing.

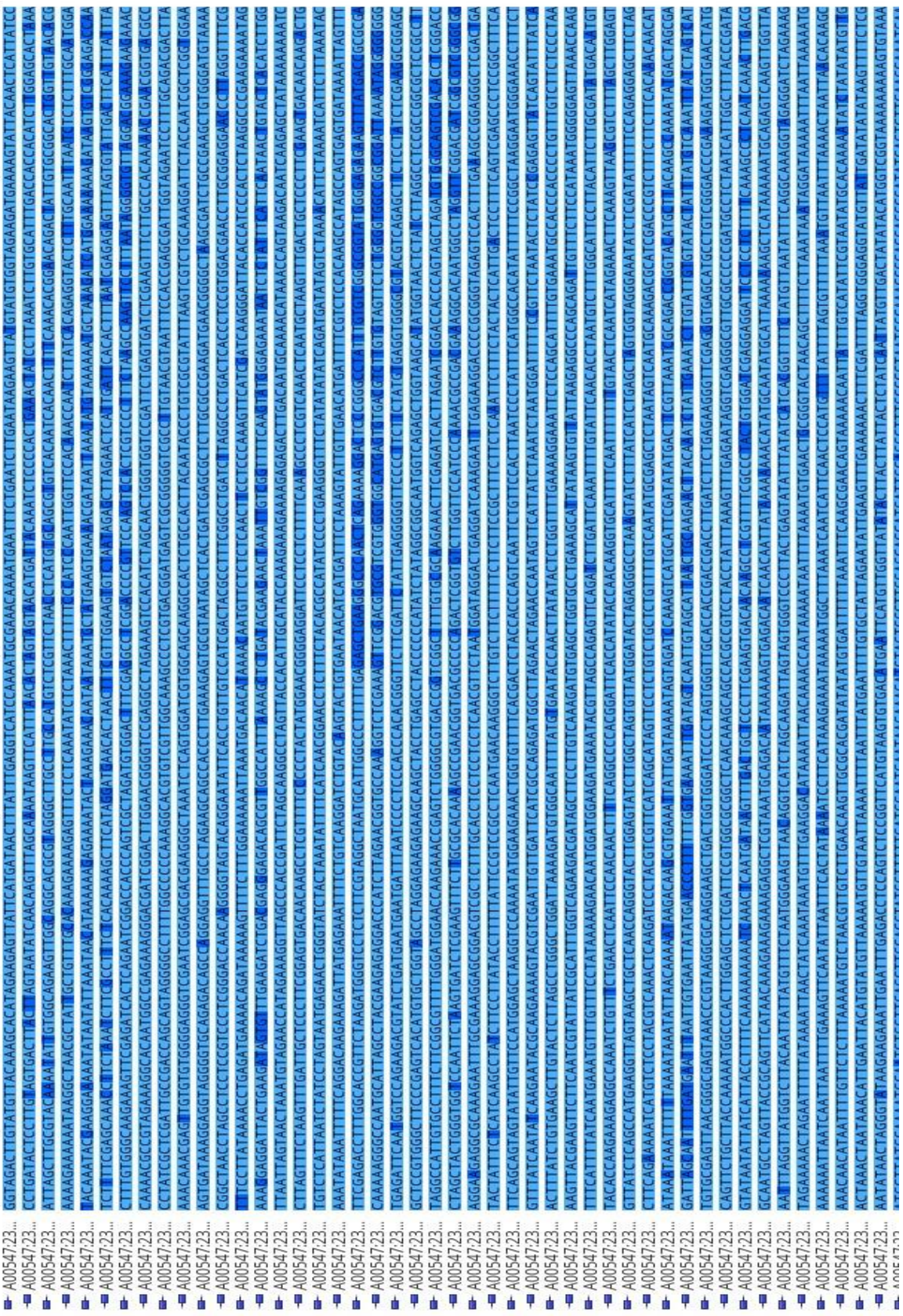
Zhai, Y., Yuan, Q., Qiu, S., Li, S., Li, M., Zheng, H., ... & Yan, F. (2021). Turnip mosaic virus impairs perinuclear chloroplast clustering to facilitate viral infection. *Plant, Cell & Environment*, 44(11), 3681-3699.

Zhao J, Zhang X, Hong Y and Liu Y. (2016) . Chloroplast in Plant-Virus Interaction. *Front. Microbiol*. 7:1565. doi: 10.3389/fmicb.2016.01565.

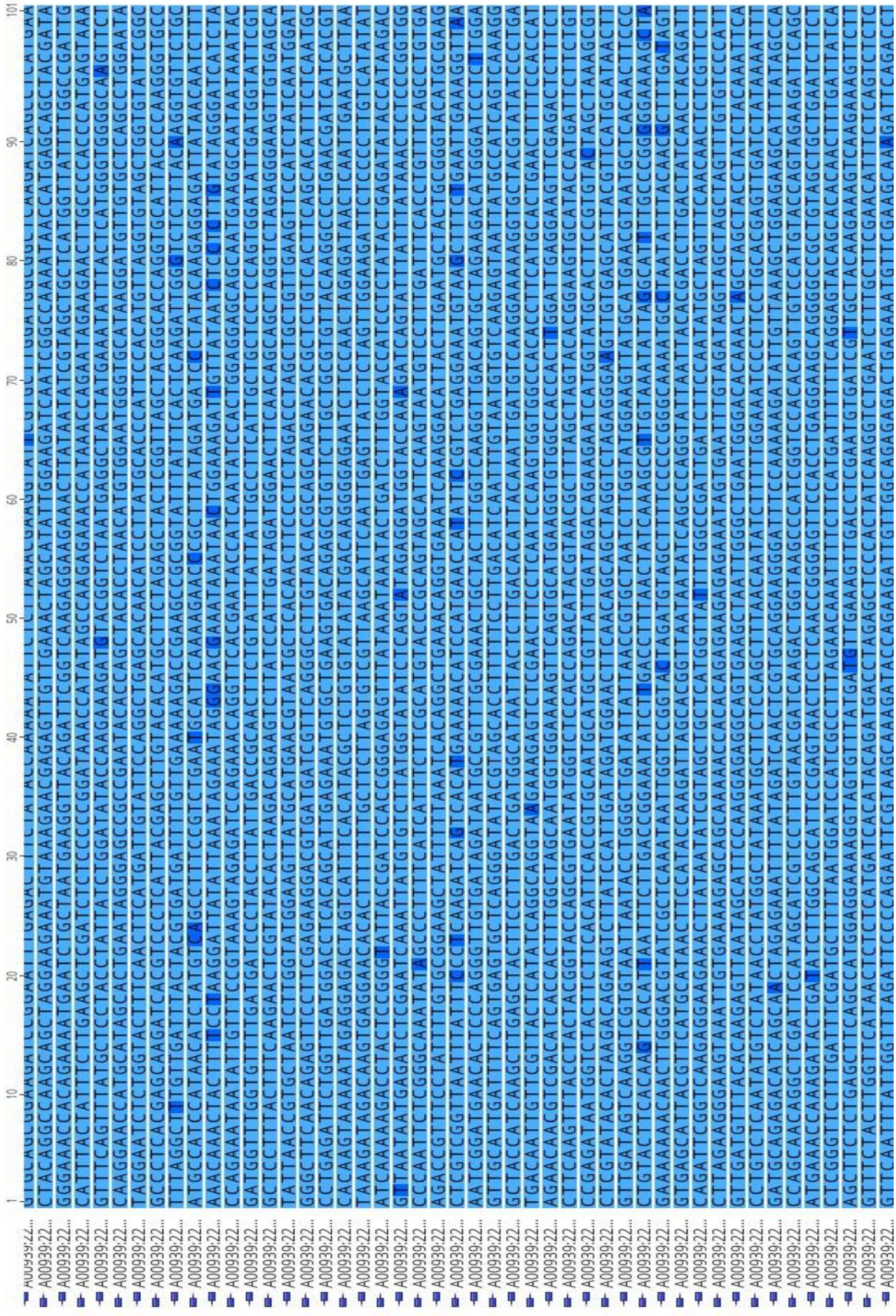
Zhao, L., Chen, L., Gu, P., Zhan, X., Zhang, Y., Hou, C., ... & Wang, Q. C. (2019). Exogenous application of melatonin improves plant resistance to virus infection. *Plant Pathology*, *68*(7), 1287-1295.

8. الملاحق

ملحق (1) القراءات الخام للحامض النووي DNA بعد ربط القراءات الأمامية بالقراءات العكسية وطول القراءة هو 151 زوج قاعدة .



ملحق(2) القراءات الخام للحامض النووي RNA بعد ربط القراءات الأمامية بالقراءات العكسية وطول القراءة هو 101 زوج قاعدة .



ملحق (3) تسجيل فايروس *Squash vein yellowing virus* isolate SVYV/Iraq في المركز الوطني لمعلومات التقانة الاحيائية NCBI .

Squash vein yellowing virus isolate SVYV/Iraq, complete genome

GenBank: ON229619.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       ON229619               9832 bp    RNA     linear   VRL 25-MAY-2022
DEFINITION  Squash vein yellowing virus isolate SVYV/Iraq, complete genome.
ACCESSION   ON229619
VERSION     ON229619.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Squash vein yellowing virus
  ORGANISM  Squash vein yellowing virus
            Viruses; Riboviria; Orthornavirae; Pisuviricota; Stelpaviricetes;
            Patatavirales; Potyviridae; Ipomovirus.
REFERENCE   1  (bases 1 to 9832)
  AUTHORS   Abbas,H.I., Alisawi,O.N. and Alfadhal,F.A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (28-MAR-2022) Plant Protection, University of Kufa,
            Najaf-Kufa Street, Najaf 00964, Iraq
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..9832
                     /organism="Squash vein yellowing virus"
                     /mol_type="genomic RNA"
                     /isolate="SVYV/Iraq"
                     /host="cucumber"
                     /db_xref="taxon:397544"
                     /country="Iraq"
                     /collection_date="22-Oct-2021"
     CDS             114..9638
                     /codon_start=1
                     /product="polyprotein"
                     /protein_id="UQW19707.1"
                     /translation="MAQVYDFRATTKFEKYLVRRHGMQAFQQYRDYVPPSQARSKFAS
                     FTVPEGVLYAYVAAYATEEDVRDVLKLTPGALKNYLVEARRSISSNCDMDFGDGKTYC
                     ECGAELRPAKRKTCEDCGFVYKNSEGELARRIYNISSIHECSVADLEYFSRNTLVDMI
                     KEADELAAREKLAAGLTLKQEEDQPDLSKIPAEPMVAVIEPVEINDEPSGKKKVKINT
                     EKEIPTINIGKITVPLLPISEIPIFRKEGTKLQSVGFSIESEEKEIKELQTEQAVVIA
                     LEVGNQIAEVCKMDSIKCESGRLNLMKANFRHRLHALEMRKEVHEKVERNKAIFRDLE
                     SRLNLRERRKNQVIKKDSRGTLRWRRRETLSKKRVQIPENIITEIANDHQESRIEECV
                     LVPGIKCATSKKMPKKRLLQQFLKGSVDELILQIIQLCKQNSKTLEVIGKRKININCG
                     LNSTVELNHMKGKMTKRDIPHDEFIDFFFSKFIKKLARARTEWKIGSGDSGSIVQIGG
                     KFGIVRGRLDGYLVDAREFLSLRELLDIDEYSSTGMRCIKDQGSNDDFSSFNDDSRTQ
                     VWVKGNSIFAKDEMAAENFLSKTTWGGIFRNQSGSYKNPAIMLKRAARYGLAFDCALE
                     AYECPMCGMQCTYLESFYFDCDFCEYTYKVQPSDDGLPSTVPIEPIDHMVSLSIKELM
                     KEAWIIGESEEVIIEKDFRTPTRVVRTEKFGLRSQNFKFNLLEDTSNQWLINAMIAVD
```

ملحق (4) تسجيل فايروس *Tomato leaf curl Palampur virus* isolate Babylon1 segment DNA-A في المركز الوطني لمعلومات التقانة الاحيائية NCBI

Tomato leaf curl Palampur virus isolate Babylon1 segment DNA-A, complete sequence

GenBank: ON229618.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       ON229618                2756 bp    DNA     linear   VRL 25-MAY-2022
DEFINITION  Tomato leaf curl Palampur virus isolate Babylon1 segment DNA-A,
            complete sequence.
ACCESSION   ON229618
VERSION     ON229618.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Tomato leaf curl Palampur virus
  ORGANISM  Tomato leaf curl Palampur virus
            Viruses; Monodnaviria; Shotokuvirae; Cressdnaviricota;
            Repensiviricetes; Geplafuvirales; Geminiviridae; Begomovirus.
REFERENCE   1  (bases 1 to 2756)
  AUTHORS   Abbas,H.I., Alisawi,O.N. and Alfadhal,F.A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (29-MAR-2022) Plant Protection, University of Kufa,
            Najaf-Kufa Street, Najaf 00964, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Assembly Method       :: Geneious map to reference v. 2022
            Assembly Name         :: Whole DNA sequence mapped to Tomato leaf
                                     curl palampur virus DNA-A
            Coverage              :: 1,055,827
            Sequencing Technology :: Illumina
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..2756
                     /organism="Tomato leaf curl Palampur virus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="Babylon1"
                     /host="cucumber"
                     /db_xref="taxon:526476"
                     /segment="DNA-A"
                     /country="Iraq"
                     /collection_date="22-Oct-2021"
     gene            120..467
                     /gene="AV2"
     CDS             120..467
                     /gene="AV2"
                     /note="precoat protein"
                     /codon_start=1
                     /product="AV2"
                     /protein_id="UQW19708.1"
                     /translation="MWDPLLHEFPESVHGLRCMLAVKYLQEIEKTYSPDTIGYDLVRD
                     LISVVRARNYGEASSRYLHFNARIESTPSSELRQPVCCPCSCPYCPRHKGKGMGEQTH
                     ESETKILPDVSKL"
     gene            280..1050
                     /gene="AV1"
     CDS             280..1050
                     /gene="AV1"
                     /note="coat protein"
                     /codon_start=1
                     /product="AV1"
                     /protein_id="UQW19709.1"
                     /translation="MVKRPADIYISTPASKARRRLNFDSPYAVRAAVPIVRATKAREW
                     VNRPMNRKPRFYRMYRSSDVPRGCEGPCKVQSFESRHDVSHIGKVMCISDVTRGTGLT
                     HRVGKRFCVKSVYVLGKIWMDENIKTKNHTNSVMFFLVRDRRPTGAPQDFGDVFNMFD
```

ملحق (5) تسجيل فايروس *Tomato leaf curl Palampur virus* isolate Babylon1 segment DNA-B في المركز الوطني لمعلومات التقانة الاحيائية NCBI

Tomato leaf curl Palampur virus isolate Babylon1 segment DNA-B, complete sequence

GenBank: ON229620.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       ON229620               2719 bp    DNA     linear   VRL 25-MAY-2022
DEFINITION  Tomato leaf curl Palampur virus isolate Babylon1 segment DNA-B,
            complete sequence.
ACCESSION   ON229620
VERSION     ON229620.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Tomato leaf curl Palampur virus
  ORGANISM  Tomato leaf curl Palampur virus
            Viruses; Monodnaviria; Shotokuvirae; Cressdnaviricota;
            Repensiviricetes; Geplafuvirales; Geminiviridae; Begomovirus.
REFERENCE   1  (bases 1 to 2719)
  AUTHORS   Abbas,H.I., Alisawi,O.N. and Alfadhal,F.A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (31-MAR-2022) Plant Protection, University of Kufa,
            Najaf-Kufa Street, Najaf 00964, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Assembly Method       :: Geneious map to reference v. 2022
            Assembly Name         :: Whole DNA sequence mapped to Tomato leaf
                                     curl palampur virus DNA-B
            Coverage              :: 1,347,785
            Sequencing Technology :: Illumina
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..2719
                     /organism="Tomato leaf curl Palampur virus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="Babylon1"
                     /host="cucumber"
                     /db_xref="taxon:526476"
                     /segment="DNA-B"
                     /country="Iraq"
                     /collection_date="22-Oct-2021"
     gene            426..1232
                     /gene="BV1"
     CDS             426..1232
                     /gene="BV1"
                     /note="nuclear shuttle protein"
                     /codon_start=1
                     /product="BV1"
                     /protein_id="UQW19714.1"
                     /translation="MAFTSPYTTPRRSGLSYARRFNGSRNVRFWKFRKSQPWLRRRPN
                     EAFSRSATELFGEPISKQYTRKEICETQQGTEYVLQNNRYMTSYVTYPSKTRTGTNNR
                     VRSYIKLKSLNISGTFAIRSTEMMTEVDQGGGLYGVMSVVVVRDKSPKIYSTAQPLIP
                     FVDIFGSVNACRGTLKVAERHCERFVVLNQSSIIVNTPHINTIKKFCIRNCIPKTYTT
                     WVTFRDEEEDNCTGLYSNTLRNAILIYYVWLSDVPSQVDLYSKLILNYIG"
     gene            complement(1298..2143)
                     /gene="BC1"
     CDS             complement(1298..2143)
                     /gene="BC1"
                     /note="movement protein"
```

ملحق (6) تسجيل الفايروس الداخلي العكسي CsatAV- Iraq في معهد الابحاث والمعلومات الوراثية Genetic Information Research Institute (GIRI)

Repbase Reports

2022, Volume 22, Issue 4
April 27, 2022
Copyright © 2001-2022 - Genetic Information Research Institute, California
ISSN# 1534-830X

CsatAV-Iraq

Integrated florendovirus within cucumber genome in Iraq.

Submitted: 19-Apr-2022	**Accepted:** 27-Apr-2022

Key Words: Caulimoviridae; Integrated Virus; CsatAV-Iraq

Source: Cucumis sativus	**Organism:** Cucumis sativus	**Taxonomy:** Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; Gunneridae; Pentapetalae; rosids; fabids; Cucurbitales; Cucurbitaceae; Benincaseae; Cucumis

[]	**Authors:** Abbas,H., Alisawi,O. and Alfadhal,F.
	Title: Integrated florendovirus within cucumber genome in Iraq.
	Journal: *Repbase Reports 22(4), 2119-2119 (2022)*

Abstract:
Integrated florendovirus within cucumber genome in Iraq.

Derived:
[1] (Consensus)

Download Sequence - Format:
IG, EMBL, FASTA

References:

© 2001-2022 - Genetic Information Research Institute

ملحق (7) تسجيل الفايروس الداخلي العكسي CsatBV-Iraq في معهد الابحاث والمعلومات الوراثية Genetic Information Research Institute (GIRI)

Repbase Reports

2022, Volume 22, Issue 4
April 27, 2022
Copyright © 2001-2022 - Genetic Information Research Institute, California
ISSN# 1534-830X

CsatBV-Iraq

Integrated florendovirus within cucumber genome in Iraq.

Submitted: 19-Apr-2022	**Accepted:** 27-Apr-2022

Key Words:
Caulimoviridae; Integrated Virus; CsatBV-Iraq

Source: Cucumis sativus	**Organism:** Cucumis sativus	**Taxonomy:** Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; Gunneridae; Pentapetalae; rosids; fabids; Cucurbitales; Cucurbitaceae; Benincaseae; Cucumis

[]	**Authors:** Abbas,H., Alisawi,O. and Alfadhal,F.
	Title: Integrated florendovirus within cucumber genome in Iraq.
	Journal: *Repbase Reports 22(4), 2118-2118 (2022)*

Abstract:
Integrated florendovirus within cucumber genome in Iraq.

Derived:
[1] (Consensus)

Download Sequence - Format:
IG, EMBL, FASTA

References:

© 2001-2022 - Genetic Information Research Institute

ملحق (8) تسجيل جينوم البلاستيدة الخضراء الكامل لنبات الخيار *Cucumis sativus* var. sativus في المركز الوطني لمعلومات التقانة الاحيائية NCBI.

GenBank ▾ Se

Cucumis sativus var. sativus chloroplast, complete genome

GenBank: OP651766.1

FASTA Graphics

```
LOCUS       OP651766              155152 bp    DNA     circular PLN 12-DEC-2022
DEFINITION  Cucumis sativus var. sativus chloroplast, complete genome.
ACCESSION   OP651766
VERSION     OP651766.1
KEYWORDS    .
SOURCE      chloroplast Cucumis sativus var. sativus
  ORGANISM  Cucumis sativus var. sativus
            Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
            Spermatophyta; Magnoliopsida; eudicotyledons; Gunneridae;
            Pentapetalae; rosids; fabids; Cucurbitales; Cucurbitaceae;
            Benincaseae; Cucumis.
REFERENCE   1  (bases 1 to 155152)
  AUTHORS   Abbas,H.I., Alisawi,O.N. and Alfadhl,F.A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (16-OCT-2022) Plant protection, University of Kufa,
            Najaf-Kufa street, najaf 00964, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Assembly Method       :: Geneious map to reference v. 2022
            Assembly Name         :: Whole DNA sequence mapped to cucumber
                                     chloroplast
            Coverage              :: 5717433
            Sequencing Technology :: Illumina
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..155152
                     /organism="Cucumis sativus var. sativus"
                     /organelle="plastid:chloroplast"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /variety="sativus"
                     /db_xref="taxon:869827"
                     /country="Iraq: Baghdad"
                     /collection_date="28-Jul-2022"
     gene            complement(join(99465..100262,72172..72285))
                     /gene="rps12"
                     /trans_splicing
     CDS             complement(join(99465..99490,100031..100262,72172..72285))
                     /gene="rps12"
                     /trans_splicing
                     /codon_start=1
                     /transl_table=11
                     /product="ribosomal protein S12"
                     /protein_id="WAJ61365.1"
                     /translation="MPTIKQLIRNTRQPIRNVTKSPALRGCPQRRGTCTRVYTITPKK
                     PNSALRKVARVRLTSGFEITAYIPGIGHNLQEHSVVLVRGGRVKDLPGVRYHIVRGTL
                     DAVGVKDRQQGRSKYGVKKPK"
     gene            complement(230..1291)
                     /gene="psbA"
     CDS             complement(230..1291)
                     /gene="psbA"
                     /codon_start=1
                     /transl_table=11
                     /product="PsbA"
                     /protein_id="WAJ61321.1"
                     /translation="MTAILERRESESLWGRFCNWITSTENRLYIGWFGVLMIPTLLTA
                     TSVFIIAFIAAPPVDIDGIREPVSGSLLYGNNIISGAIIPTSAAIGLHFYPIWEAASV
                     DEWLYNGGPYELIVLHFLLGVACYMGREWELSFRLGMRPWIAVAYSAPVAAATAVFLI
                     YPIGQGSFSDGMPLGISGTFNFMIVFQAEHNILMHPFHMLGVAGVFGGSLFSAMHGSL
                     VTSSLIRETTENESANEGYRFGQEEETYNIVAAHGYFGRLIFQYASFNNSRSLHFFLA
                     AWPVVGIWFTALGISTMAFNLNGFNFNQSVVDSQGRVINTWADIINRANLGMEVMHER
                     NAHNFPLDLAAVEVPSING"
     gene            complement(1873..3387)
                     /gene="matK"
     CDS             complement(1873..3387)
                     /gene="matK"
                     /codon_start=1
                     /transl_table=11
```

Abstract

In this study, cucumber plants in the Al-Haydariyya region of Najaf governorate were infected with viruses that were diagnosed and molecularly characterized, as well as determining the endogenous pararetroviruses found within infected cucumbers, their activity, and the impact of biotic and non-biotic factors in induced systemic resistance to pathogenic viruses. Next generation sequencing (NGS) technology and bioinformatics programs were used to determine the casual agents of such symptoms in diseased cucumbers. The results revealed that symptoms caused by a joint infection of *Tomato leaf curl* Palampur *virus* and *Squash vein yellowing virus*. The viruses were registered in GenBank (NCBI), *Squash vein clearing virus* (SqVYV) under accession number (ON229619), *Tomato leaf curl* Palampur *virus* isolate Babylon1segment DNA-A under accession number ON229618, and *Tomato leaf curl* Palampur *virus* isolate Babylon1segment DNA-B under accession number ON229620. Based on phylogeny analysis, TLCPV was closest to the Iranian isolates, while SqVYV was linked with isolates from Israel. SVYV encodes polyproteins, TLCPV DNA-A encodes six proteins (AC1, AC2, AC3, AC4, AV1 and AV2), and TLCPV DNA-B encodes two proteins (BC1 and BV1).Two reconstructed viruses were found in the genome of cucumber, *CsatAV* has 7 protein domains encode MP, PTZ00440, antiphase-ZorA-4, RT-like, RT-LTR, RT-RNase-H-2, RNase-HI and *CsatBV* encodes 8 protein domains DUF5864, RT-LTR, RVT-1, RT-RnaseH-2, RNase-HI, RNase-HI, RVT-2, and two RTs that related to EPRVs of eggplant genome (*ToffiV* and *Caulimovirus-SMe*). Chloroplast analysis of the infected DNA sample showed missing region of 23SrRNA gene, which was called 23SrRNA Iraq, and also regions with high variation in rpS16 and Ycf2 domains that called rpS16 Iraq and Ycf2 Iraq. Moreover, the virus infection affected the gene expression of the Ycf2 gene, however, the other genes,

rpS16 and 23SrRNA, showed normal expression activity. The study confirmed that the virus causes mosaic symptoms, leaf curl, and dwarfism. It gave an infection rate of 100% and an infection severity of 82% for cucumbers. It also led to a reduction in the measured growth parameters (the lengths of the root and vegetative groups and their dry weights in addition to the surface area of the leaf) as well as a severe reduction in the percentage of total and elemental chlorophyll. Nitrogen and potassium did not affect phosphorus, and it reduced the number and weight of cucumber fruits. The percentage of economic losses resulting from this viral infection was 47.27 - 53.2% / dunum. It was also shown that immersing the seeds, watering the plants, or spraying them with *Bacillus amyloliquefaciens*, melatonin, chitosan alone or the dual combinations of these factors have the ability to induce systemic resistance of cucumber plants against viral infection by making them tolerant to infection, and they subsequently led to the improvement of the measured phenotypic traits, which are represented by: (the lengths of the root and vegetative groups and their dry weights, in addition to the surface area of the leaf) and the physiological characteristics represented by the percentage of total chlorophyll, and the macronutrients NPK. It also led to an increase in cucumber plants' number and weight. It turned out that the dual combinations (*B. amyloliquefaciens* and melatonin solution, *B. amyloliquefaciens* and chitosan solution, melatonin and chitosan solutions) gave the most effective results in inducing systemic resistance. It also gave the most promising results in improving the phenotypic and physiological characteristics. It also led to an increase in cucumber plant numbers and weights. The use of the above combinations in an area of one dunum achieved a financial benefit between (38.4 - 62.6)%.

Ministry of Higher Education and Scientific Research

University of Kufa

Faculty of Agriculture

Diagnosis and complete characterization of some pathogenic and endogenous viruses of cucumber plants and their control using some biotic and non-biotic factors

A Thesis Submitted to the Council of the Faculty of Agriculture - University of Kufa in partial Fulfillment of the Requirements for PhD Degree in Agricultural - Plant Protection

(Plant Pathology/ Virology)

By:-

Hawraa Ismail Abbas Al-Yaseeri

Supervised by:-

Prof. Dr. Fadhal Al- Fadhal

4/2023

2023 AD. **1444 AH.**