



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة كربلاء - كلية الزراعة
قسم وقاية النبات

التشخيص الجزيئي لبعض فايروسات النبات المنتشرة على عدد من
العوائل النباتية في العراق باستخدام تقانة تسلسل الجيل التالي NGS

رسالة مقدمة الى

مجلس كلية الزراعة - جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير

علوم في الزراعة - وقاية النبات

من قبل

محمد داود سلمان

بإشراف: أ.م. د. عدنان عبد الجليل لهوف

1442 هـ

2021 م

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿ يَرْفَعُ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ

وَاللَّهُ بِمَا تَعْمَلُونَ خَبِيرٌ ﴾

صَدَقَ اللَّهُ الْعَلِيِّ الْعَظِيمِ

سورة المجادلة آية 11

الاهداء

إلى.. مصابيح الهدى وسفن النجاة سيدنا محمد وآل بيته الاطهار "صلى الله

عليهم وسلم اجمعين"

إلى.. من بذل الغالي والنفيس لينير لي الطريق.. واحمل اسمه فخراً طيلة

حياتي والدي العزيز (حفظه الله تعالى لي ذخراً)

إلى.. نبع الحنان الذي لا ينضب

والدتي الغالية (حفظها الله تعالى لي ذخراً)

إلى.. سندي ومن اشدد بهم ازري وأشركهم في امري اخوتي الاعزاء

(حفظهم الله تعالى لي ذخراً)

إلى.. من ساندتني ووقفت بجانبي واظهرت

أجمل معاني الاخلاص والوفاء والدعم (زوجتي الغالية)

أهديكم لهم جهدي هذا

الشكر والتقدير

اللهم لك الحمد حمدا كثيرا طيباً مباركاً فيه، ملئ السموات والأرض، وملئ ما شئت من شيء بعد، أشكرك ربي على نعمك التي لا تعد ولا تحصى، أحمدك ربي وأشكرك على أن يسرت لي إتمام هذا الدراسة بالصورة التي أرجو أن ترضى بها عني.

ثم أتوجه بالشكر إلى من رعاني طالباً في دراسة الماجستير، أستاذي ومشرفي الفاضل الأستاذ المساعد الدكتور عدنان عبد الجليل لهوف ، الذي له الفضل- بعد الله تعالى- على البحث والباحث منذ كان الموضوع عنواناً وفكرة إلى أن صار رسالة فله مني الشكر كله والتقدير والعرفان الجميل. وأود ان استغل هذه الفرصة من اجل تقديم شكري وتقديري الى الدكتور Junmine Li من جامعة Ningbo University الصينية لما ساعدني به من التوجيه ودفع تكاليف اجراء تقانة الـNGS على العينات الحشرية واجراء بعض التحاليل المعلوماتية الحيوية. واقدم شكري وتقديري الى الأستاذ المساعد الدكتور علي عبد الحسين كريم لمساعدته لنا في تصنيف العينات الحشرية وكذلك الأستاذ المساعد الدكتور عقيل نزال بربر لما وفره لنا من بعض المتطلبات المختبرية وأتقدم بالشكر والتقدير الى رئيس قسم وقاية النبات/كلية الزراعة-جامعة كربلاء الأستاذ المساعد الدكتور ياسر ناصر حسين الحميري وكل أساتذتي في القسم لما قدموه من مساعده ولو بكلمه. ولا يفوتني الا ان اتقدم بالشكر الى جميع زملائي في دراسة الماجستير وبالخصوص السيد علاء نعيم عبد الواحد والسيد حسين خليل إبراهيم ولا يفوتني أن أقدم شكري وتقديري الى جميع أفراد عائلتي وكل من قدم العون ولو بكلمة.....

محمد

بسم الله الرحمن الرحيم

اقرار المشرف

أشهد ان اعداد الرسالة الموسومة (التشخيص الجزيئي لبعض فايروسات النبات المنتشرة على عدد من العوائل النباتية في العراق باستخدام تقانة تسلسل الجيل التالي NGS) تم تحت اشرافي في قسم وقاية النبات / كلية الزراعة / جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم في الزراعة / وقاية نبات.

التوقيع:

اسم المشرف: عدنان عبد الجليل لهوف

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: كلية الزراعة - جامعة كربلاء

التاريخ: / / 2021

توصية رئيس قسم وقاية النبات

بناء على التوصيات اشرح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع:

الاسم: د. ياسر ناصر حسين

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: كلية الزراعة / جامعة كربلاء

التاريخ: / / 2021

إقرار لجنة المناقشة

نشهد بأننا أعضاء لجنة المناقشة اطلعنا على الرسالة الموسومة بـ (التشخيص الجزيئي لبعض فيروسات النبات المنتشرة على عدد من العوائل النباتية في العراق باستخدام تقنية تسلسل الجيل التالي NGS). التي قدمها الطالب (محمد داود سلمان) في قسم وقاية النبات، وقد ناقشنا الطالب في محتوياتها و فيما له علاقة بها و وجدناها جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير في علوم الزراعة – وقاية النبات.

رئيس اللجنة

أ.د. معاذ عبد الوهاب عبد العالي
جامعة تكريت – كلية الزراعة

عضواً

أ.م.د. عقيل نزال بربير
جامعة كربلاء – كلية الزراعة

عضواً

أ.م.د. علي عبد الحسين كريم
جامعة كربلاء – كلية الزراعة

عضواً (المشرف)

أ.م.د. عدنان عبد الجليل لهوف
جامعة كربلاء – كلية الزراعة

صدقت الرسالة من قبل مجلس كلية الزراعة – جامعة كربلاء

الدكتور

أ.د. ثامر كريم خضير

عميد كلية الزراعة/ جامعة كربلاء

الخلاصة

هدفت هذه الدراسة الى تشخيص الجزيئي للفيروسات النباتية المرافقة للبعض النواقل الحشرية المنتشرة على عوائل نباتية مختلفة في محافظة كربلاء والديوانية وبابل والنجف وبغداد وامكانية تشخيص الانواع الحشرية الناقلة لها وذلك باستعمال بعض التقنيات الجزيئية.

جمعت عينات النواقل الحشرية (الذبابة البيضاء و قافزة الاوراق) المنتشرة في المنطقة، استخلصت الاحماض النووية الـ DNA و RNA الذي تم تحويله الى cDNA من هذه الحشرات، طبقت تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR) باستعمال بادئات تستهدف تشخيص أنواع مختلفة من ابرز الاجناس الفايروسية (*Torradovirus* ، *Potyvirus* ، *Carlavirus* ، *Begomovirus*) التي تنقل بواسطة هذه الحشرات. استعملت أيضا التقانة الجيل التالي لتحديد التسلسل Next Generation sequencing (NGS) تحديداً طريقة النسخ (Transcriptome/ RNA-seq) في تشخيص الفايروسات النباتية ونواقلها الحشرية.

أظهرت النتائج تفوق تقانة الـ NGS على تقانة الـ PCR في تشخيص العديد من الفايروسات النباتية في عينات حشرة الذبابة البيضاء والتي شملت الفايروسات *Broad bean wilt* ، *Alfalfa mosaic virus* ، *Grapevine virus* ، *Zantedeschia mild mosaic virus* ، *Pittosporum cryptic virus-1* ، *Tomato spotted wilt orthotospovirus* ، *leafroll-associated virus* و *Tomato spotted wilt virus* ومن جانب اخر شخص الفايروسين *Pittosporum cryptic virus-1* و *Grapevine leafroll-associated virus* فقط في حشرة قافزة الأوراق. كما وجد ان الغالبية العظمى من السلالات الفايروسية المشخصة كانت ذات تباين وراثي كبير مع العديد من السلالات العالمية وهذا ربما يكون السبب وراء عدم نجاح تقانة الـ PCR في تشخيص هذه الفايروسات.

كما تم الحصول على مسودة الجينوم الأولية لمأيتوكوندريا حشرة الذبابة البيضاء المدروسة باستعمال التقانة الـ NGS وذلك عن طريق تحديد وجود تسلسل 8 جينات مشفرة للبروتينات Protein-coding genes (PCGs) و جينين للحامض النووي الرايبوسومي Ribosomal RNA genes و جينين من الحامض النووي الناقل Transfer RNA. وأكدت هذه النتيجة ان نوع حشرة الذبابة البيضاء المنتشرة في البيئة العراقية هو *B. tabaci MEAM1* بالإضافة الى التشخيص الجزيئي لحشرة قافزة او نطاط الأوراق باستعمال تقانة الـ NGS ايضاً من خلال تحديد الجينوم الكامل تقريباً لمأيتوكوندريا هذه الحشرة الذي يحتوي على جميع الجينات الثلاثة عشر المشفرة للبروتينات و جينين للحامض النووي الرايبوسومي وثلاثة عشر

جين من الحامض النووي الناقل والتي اثبتت ان نوع حشرة قافزة او نطاط الأوراق الناقل للفايروسات هو *Maiestas dorsalis* ويعد هذا التشخيص هو الأول لهذه الحشرة في العراق.

لقد أوضحت هذه الدراسة أهمية تطبيق التقنيات الحديثة المتمثلة بالتقانة الـNGS في التشخيص الجزيئي للفيروسات النباتية ونواقلها الحشرية باعتبارها أسرع وأكثر دقة من الطرق الجزيئية التقليدية ولكن تبقى مسألة الكلفة العالية نسبياً وأيضاً الحاجة الى اكتساب الخبرة في تحليل المعلوماتية الحيوية للبيانات التي يتم الحصول عليها من هذه التقانة هي اهم المعوقات التي تحول دون تطبيقها على نطاق واسع جداً.

قائمة المحتويات

الصفحة	العنوان
أ - ب	الخلاصة
ت - خ	قائمة المحتويات
ث	قائمة الجداول
ج - خ	قائمة الاشكال

الصفحة	العنوان	التسلسل
1	المقدمة Introduction	1
3	استعراض المراجع Literature review	2
3	النواقل الحشرية لفايروسات النبات	1-2
5	أنواع العلاقات بين فيروسات النبات ونواقلها الحشرية	1-1-2
11	حشرة الذبابة البيضاء <i>Bemisia tabaci</i>	2-1-2
16	حشرة قافزة او نطاط الاوراق <i>Maiestas dorsalis</i>	3-1-2
18	تشخيص الفايروسات النباتية	2-2
19	الطرق التشخيصية التي تعتمد على الخصائص الحيوية والمظهرية للفايروسات النباتية	1-2-2
20	الطرق التشخيصية التي تعتمد الخصائص البروتينية للفايروسات النباتية	2-2-2
21	الطرق التشخيصية التي تعتمد خصائص الاحماض النووية للفايروسات النباتية	3-2-2
28	التشخيص الجزيئي للحشرات باستعمال جينوم المايكوبلازما	3-2
29	المواد وطرائق العمل Materials and methods	3
29	المواد Materials	1-3
29	الأجهزة والمعدات المستعملة في هذه الدراسة	1-1-3
31	طرائق العمل Methods	2-3
31	جمع عينات الحشرات	1-2-3
32	استخلاص الحامض النووي الـDNA من عينات الحشرات	2-2-3
33	استخلاص الحامض النووي الـRNA من عينات الحشرات	3-2-3
34	ترسيب الاحماض النووية (RNA+DNA)	4-2-3
35	تحضير الحامض النووي المتمم cDNA	5-2-3
35	التشخيص الجزيئي لفايروسات النبات المرافقة للحشرات الناقلة	6-2-3
41	التشخيص الجزيئي لحشرة الذبابة البيضاء التي جمعت في هذه الدراسة	7-2-3
41	التشخيص الجزيئي لحشرة قفازات الاوراق التي جمعت في هذه الدراسة	8-2-3
42	النتائج والمناقشة Results and Discussion	4

42	التشخيص الجزيئي لفايروسات النبات المرافقة للحشرات الناقلة المختارة باستعمال التقنية تفاعل البلمرة المتسلسل الـPCR	1-4
42	التشخيص الجزيئي لفايروسات النبات والحشرات الناقلة لها باستعمال التقنية الجيل التالي لتحديد التسلسل (NGS)	2-4
42	التشخيص الجزيئي لفايروسات النبات المرافقة لحشرة الذبابة البيضاء	1-2-4
65	التشخيص الجزيئي لحشرة الذبابة البيضاء <i>Bemisia tabaci</i>	2-2-4
69	التشخيص الجزيئي لفايروسات النبات المرافقة لحشرة قافزة او نطاط الأوراق	3-2-4
77	حشرة قافزة او نطاط الأوراق <i>Maiestas dorsalis</i>	4-2-4
84	الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations	5
84	الاستنتاجات Conclusions	1-5
85	التوصيات Recommendations	2-5
86	المصادر References	6

قائمة الجداول

رقم الجدول	عنوان الجدول	الصفحة
1	بعض أنواع حشرة الذبابة البيضاء المعروفة كناقل لفايروسات النبات	15
2	الأجهزة والمعدات المستعملة	29
3	المواد الكيميائية المستعملة	30
4	العدد المستعملة في الدراسة	30
5	البودئ المستخدمة في اختبارات تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction الـPCR	36
6	ظروف الدورات في اختبارات تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction الـPCR	37
7	مقارنة مسودة جينوم حشرة الذبابة البيضاء المدروسة مع السلالات العالمية لنفس الحشرة	68
8	مقارنة مسودة جينوم لحشرة قافزة الاوراق <i>M. dorsalis</i> المدروسة مع السلالات العالمية لنفس الحشرة وحشرات اخرى	80

قائمة الاشكال

رقم الشكل	عنوان الشكل	الصفحة
1	نموذج تخطيطي يصف الاستراتيجيات المختلفة للتفاعل بين بروتينات الفايروس وبروتينات بعض النواقل الحشرية	5
2	مخطط أساليب نقل فايروسات النبات بواسطة الحشرات.	10
3	الحشرة البالغة للذبابة البيضاء. ♀ الانثى ♂ الذكر	12
4	مراحل دورة حياة حشرة الذبابة البيضاء <i>B. tabaci</i> . البيض، 1 st instar الطور الحوري الأول، 2 nd instar الطور الحوري الثاني، 3 rd instar الطور الحوري الثالث، Pupa العذراء و Adult البالغة	13
5	الصفات المظهرية المميزة لحشرة قافزة الأوراق <i>M. dorsalis</i>	17
6	مخطط توضيحي لطريقة Sanger Sequencing	25
7	مخطط توضيحي لطريقة تحديد التسلسل بالتوليف او التجميع Sequencing-by-Synthesis	27
8	خارطة جمهورية العراق. المناطق المُعلّمة بالنقاط السوداء تمثل مناطق جمع الحشرات في هذه الدراسة.	31
9	آلة جمع الحشرات المحورة. مكنسة شفط صغيرة تعمل بالشحن و تم ربط أنبوب بلاستيكي لها واغلاق الفوهة باحكام باستعمال الشريط اللاصق.	32
10	جودة المقروءات بحسب مقياس Phred quality score	43
11	المنطقة المغطاة بالمتجاورات المتداخلة لفايروس AMV المرافق لحشرة الذبابة البيضاء	45
12	الارتباط الوراثي بين تسلسل فايروس AMV المجمع المرافق لحشرة الذبابة البيضاء (المشار إليه بنقطة سوداء) والسلالات العالمية الأخرى التابعة لنفس الفايروس.	45
13	التباين الوراثي بين تسلسلات القواعد النايتروجينية للسلالة المحلية المرافق لحشرة الذبابة البيضاء والسلالات العالمية لفايروس AMV.	46
14	المنطقة المغطاة بالمتجاورات المتداخلة لفايروس BBWV المرافق لحشرة الذبابة البيضاء	48
15	العلاقة الوراثية بين سلالة فايروس BBWV المحلية المرافقة لحشرة الذبابة البيضاء (المشار إليه بنقطة سوداء) والسلالات العالمية الأخرى التابعة لنفس الفايروس.	49
16	التباين الوراثي بين تسلسلات القواعد النايتروجينية للسلالة المحلية لفايروس BBWV المرافقة لحشرة الذبابة البيضاء والسلالات العالمية.	50
17	المنطقة المغطاة بالمتجاورات المتداخلة لفايروس ZaMMV المرافق لحشرة الذبابة البيضاء.	52
18	القرابة الوراثية بين سلالة فايروس ZaMMV المرافقة لحشرة الذبابة البيضاء (مؤشرة بنقطة سوداء) والسلالات العالمية الأخرى	52

	التابعة لنفس الفايروس.	
53	التباين الوراثي بين تسلسلات القواعد النايتروجينية للسلالة المحلية لفايروس ZaMMV المرافقة لحشرة الذبابة البيضاء مع السلالات العالمية.	19
55	المنطقة المغطاة بالمتجاورات المتداخلة لفايروس PicV1 المرافق لحشرة الذبابة البيضاء	20
55	القراية الوراثية بين سلالة لفايروس PicV1 المحلية المرافقة لحشرة الذبابة البيضاء (مؤشرة بنقطة سوداء) والسلالات العالمية الأخرى التابعة لنفس الفايروس.	21
56	: التباين الوراثي بين تسلسلات القواعد النايتروجينية للسلالة المحلية PicV1 المرافقة لحشرة الذبابة البيضاء مع السلالات العالمية.	22
5	المنطقة المغطاة بالمتجاورات المتداخلة لفايروس GLRaV المرافق لحشرة الذبابة البيضاء.	23
58	العلاقة الوراثية بين سلالة فايروس GLRaV المحلية المرافقة لحشرة الذبابة البيضاء (المشار إليه بنقطة سوداء) والسلالات العالمية الأخرى التابعة لنفس الفايروس.	24
59	التباين الوراثي بين تسلسلات القواعد النايتروجينية للسلالة المحلية لفايروس GLRaV المرافق لحشرة الذبابة البيضاء مع السلالات العالمية.	25
60	المنطقة المغطاة بالمتجاورات المتداخلة لفايروس TSWOV المرافق لحشرة الذبابة البيضاء	26
61	العلاقة الوراثية بين سلالة فايروس TSWOV المحلية المرافقة لحشرة الذبابة البيضاء (المشار إليه بنقطة سوداء) والسلالات العالمية الأخرى التابعة لنفس الفايروس.	27
62	التشابه والتباين الوراثي بين تسلسلات القواعد النايتروجينية للسلالة المحلية لفايروس TSWOV المرافقة لحشرة الذبابة البيضاء مع السلالات العالمية.	28
63	المنطقة المغطاة بالمتجاورات المتداخلة لفايروس TSWV المرافق لحشرة الذبابة البيضاء	29
63	العلاقة الوراثية بين سلالة فايروس TSWV المحلية المرافقة لحشرة الذبابة البيضاء (المشار إليه بنقطة سوداء) والسلالات العالمية الأخرى التابعة لنفس الفايروس.	30
64	التشابه والتباين الوراثي بين تسلسلات القواعد النايتروجينية للسلالة المحلية لفايروس TSWV المرافقة لحشرة الذبابة البيضاء مع السلالات العالمية.	31
66	المسودة الأولية لجينوم الميتوكوندريا لحشرة الذبابة البيضاء <i>B.tabaci</i> المدروسة.	32
69	العلاقة الوراثية بين حشرة الذبابة البيضاء <i>B.tabaci</i> المحلية (المشار إليه بنقطة زرقاء) والسلالات العالمية الأخرى التابعة لنفس الحشرة.	33

71	المنطقة المغطاة بالمتجاورات المتداخلة لفايروس PiCV1 المرافق لحشرة قافزة الأوراق.	34
72	القرابة الوراثية بين سلالة لفايروس PiCV1 المحلية المرافقة لحشرة قافزة الأوراق (مؤشرة بنقطة سوداء) والسلالات العالمية الأخرى التابعة لنفس الفايروس.	35
73	التباين الوراثي بين تسلسلات القواعد النايتروجينية للسلالة المحلية PiCV1 المرافقة لحشرة قافزة الأوراق مع السلالات العالمية.	36
74	المنطقة المغطاة بالمتجاورات المتداخلة لفايروس GLRaV المرافقة لحشرة قافزة الأوراق.	37
75	العلاقة الوراثية بين سلالة فايروس GLRaV المحلية المرافقة لحشرة قافزة الأوراق (المشار إليه بنقطة سوداء) والسلالات العالمية الأخرى التابعة لنفس الفايروس.	38
76	التباين الوراثي بين تسلسلات القواعد النايتروجينية للسلالة المحلية لفايروس GLRaV المرافقة لحشرة قافزة الأوراق مع السلالات العالمية.	39
78	المسودة الأولية لجينوم الميتوكوندريا لحشرة قافزة الاوراق <i>M. dorsalis</i> المدرسة	40
79	جينوم مايتوكوندريا حشرة قافزة الأوراق المغطى بالمتجاورات المتداخلة	41
80	العلاقة الوراثية بين حشرة قافزة الاوراق <i>M. dorsalis</i> المحلية (المحددة بنقطة سوداء) والسلالات العالمية الأخرى التابعة لنفس الحشرة.	42

1: المقدمة

Introduction

ان غالبية الفايروسات النباتية التي تسبب أمراضاً مختلفة للمحاصيل الزراعية تعتمد على نواقل حيوية من اجل البقاء والانتقال بين عوائلها (Whitfield وآخرون، 2015). تشمل هذه النواقل العديد من الانواع التابعة للفطريات والحلم والديدان الثعبانية والحشرات التي تعتبر أكبر وأهم مجموعة في نقل الفايروسات النباتية. ان افضل النواقل الحشرية لفايروسات النبات هي المن aphide والذبابة البيضاء whitefly والقافزات leafhopper (Bragard وآخرون، 2013)، اذ تنقل هذه الحشرات الفايروسات الى مدى واسع من العوائل النباتية وبثلاثة أنماط مختلفة تشمل النمط الغير مستديمة وشبه المستديمة والمستديمة او الثابت مسببةً خسائر اقتصادية كبير (Hogenhout وآخرون، 2008).

بشكل عام ان عملية اكتشاف وتشخيص الفايروسات ومن ضمنها الفايروسات المنقولة بواسطة الحشرات تتم بواسطة العديد من الاساليب والتقنيات مثل المجهر الالكتروني والاساليب المعتمدة على الخصائص المصلية (السيرولوجية) للفايروسات مثل Direct Enzyme-linked immunosorbent assay و Sandwich Enzyme-linked immunosorbent assay بالإضافة الى الاساليب المعتمدة على تسلسل القواعد النايتروجينية للاحماض النووية الخاصة بالفايروسات والتي تشمل blot Southern و blot Northern و PCR و Reverse transcription polymerase chain reaction و Real-time PCR و Microarrays (Mokili وآخرون، 2012). ولكن معظم هذه التقنيات لها قيودها او محدداتها الخاصة فمثلا الطرق التي تعتمد الامصال والاحماض النووية تتطلب معرفة مسبقة بطبيعة الفايروسات المراد تشخيصها (Kapoor و Lipkin، 2001). ولكن الآن وبعد مرور أكثر من قرن وعقدين على صياغة كلمة "فيروس" لأول مرة في العام 1898 من قبل العالم Willem Beijerinck (Wilkinson، 2001)، الكثير من الفايروسات قد اكتشفت بوتيرة غير متوقعة من خلال استعمال التقنية Next-generation sequencing (NGS). أن هذه التقنية تغلبت على بعض المحددات او المعوقات التي واجهت الطرق السابقة وفتحت الفرص لاجراء المسح والكشف عن الفايروسات الجديدة او الفايروسات المشخصة مسبقاً بشكل غير متحيز ورخيص نسبياً من العديد من العوائل في بيئات مختلفة وكذلك من العوائل التي لا تظهر عليها اعراض الاصابة (Lipkin و Firth، 2013). وتعرف التقنية الـ NGS بأنها إحدى تقنيات تحديد تسلسل القواعد النايتروجينية التي تستعمل تحديد التسلسل المتوازي لقطع صغيرة متعددة من الـ DNA (Rizzo و Buck، 2012). علماً انها تختلف عن سابقتها بكونها اسرع وارخص واكثر انتاجاً لبيانات تسلسل الحمض النووي لذلك تعتبر تقنية عالية الإنتاجية (Voelkerding وآخرون، 2009). إن المادة الأولية التي توفر قالب يستعمل في هذه التقنية هو الـ DNA النووي مزدوج

الشرائط الذي يتم استخلاصه من مختلف الخلايا الحية كذلك بالامكان استعمال mRNA ذو الشريط المفرد الخاص بالجينات وتحويله الى مزدوج الشرائط باستعمال طريقة الحمض النووي المتمم Complementary DNA (cDNA) وبذلك يتم الحصول على الحمض النووي الخاص بالمناطق المشفرة (الجينات) وتجنب المناطق غير مشفرة في جينوم الكائنات الحية (Venter وآخرون، 2001 ؛ Mardis، 2008). لقد استعملت طريقة NGS وبنجاح في تشخيص فايروسات النبات المشخصة مسبقاً وكذلك اكتشاف العديد من الفايروسات النباتية لأول مرة (Adams و Fox، 2016؛ Barba ؛ وآخرون، 2013 ؛ Pecman وآخرون، 2017؛ Wright وآخرون، 2020) بالإضافة الى الفايروسات المرافقة للحشرات (Lu وآخرون، 2020).

وبالرغم من أن الحشرات تعتبر من اكثر المجاميع الحيوانية انتشاراً على سطح المعمورة وذات اهمية طبية وبيئية وزراعية الا أن معرفتنا بالفايروسات المرافقة لها محدودة في العالم بشكل عام وفي العراق بشكل خاص. لذلك فان التعرف على الفايروسات التي تنقلها والمدى العائلي والتوزيع الجغرافي لها يمكن ان يزودنا برؤى جديدة حول تنوع هذه الفايروسات والعلاقة الوراثية بينها وبين فايروسات نباتية اخرى من اجل اختيار الاسلوب الافضل في مكافحتها. لهذه الاسباب هدفت هذه الدراسة الى تحديد الفايروسات النباتية المرافقة للنواقل الحشرية المنتشرة على عوائل نباتية مختلفة في محافظة كربلاء والديوانية وبابل والنجف وبغداد مع امكانية التشخيص الجزيئي لانواع الحشرات الناقلة وذلك باستعمال بعض التقنيات الجزيئية.

محاوور الءراساة

- 1) ءمع عىنات النواقل الءشرىة واستءلاص الاءماض النووىة (DNA و RNA) منها.
- 2) ءءضىر مكءبات الـ cDNA وأءراء عملىةى ءءضىم باسءعمال ءءقانة الـ PCR وءءءىء ءسلسل القواعد الناىءروءىنىة DNA sequencing المسءءلصة من الءشرات الناقلة وكءلك اسءعمال ءءقانة الءىل ءءالى ءءءىء ءءسلسل Next Generation sequencing .
- 3) ءءلىل المءلوماىة الءىوىة (Bioinformatics Analysis) لىبىانات ءسلسلات القواعد الناىءروءىنىة ءى ىءم الءصول علىها من اءل أءءشاف وءءشىص الفاءىروساء المرافقة للءشرات.
- 4) أءراء ءءلىل ءءقارب الوراثى (Phylogenetic Analyses) للفاءىروساء المكءشفة والمشءصة فى هءة الءراساة.
- 5) ءراساة امكانىة ءءءىء وءفسىر الءىنوم الكامل (Full genome annotation) للفاءىروساء المشءصة وماىءوكونءرىا الءشرات الناقلة لها.

2: استعراض المراجع Literature review

1-2: النواقل الحشرية لفايروسات النبات

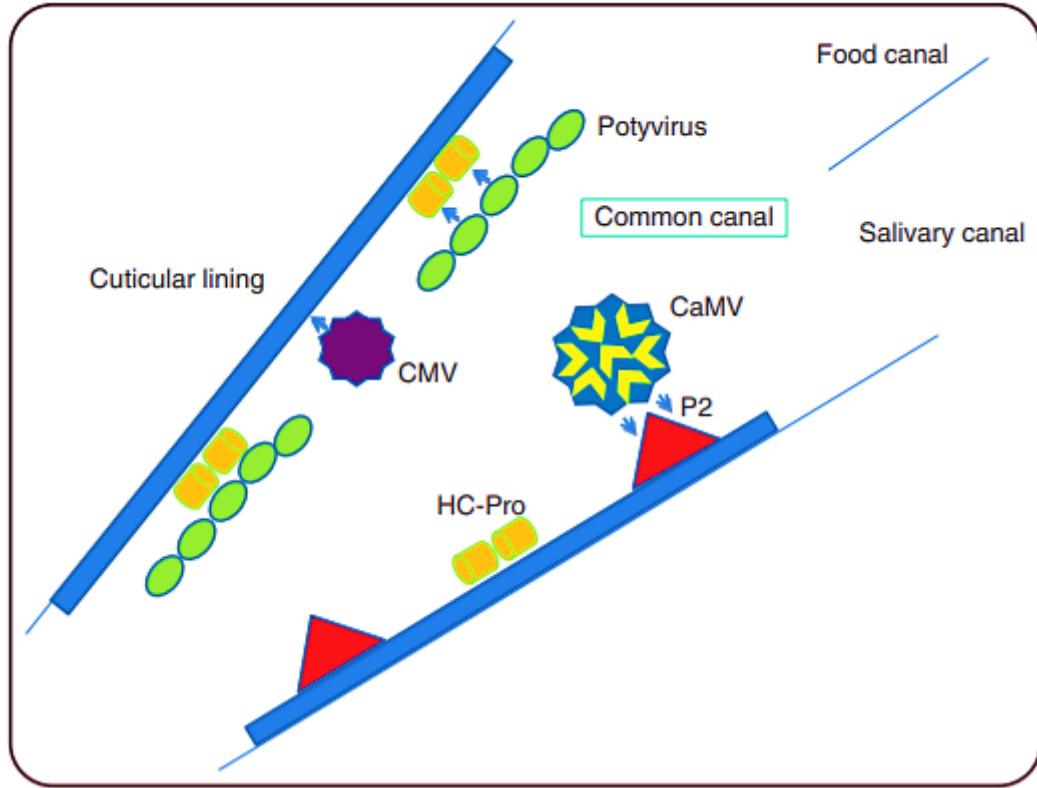
تعتمد غالبية فايروسات النبات التي تسبب امراضاً مختلفة في المحاصيل الزراعية على ناقلات حيوية لانتقالها والبقاء على قيد الحياة (Whitfield وآخرون، 2015). وذلك بسبب وجود بشرة غير منفذة تغلف النباتات وتمنع دخول جسيمات الفايروس الممرضة كما أنّ النباتات المصابة تكون متجذرة وتفتقر إلى الحركة المستقلة وبالتالي لا تنتقل الإصابة إلا عن طريق الاتصال أو الاحتكاك المباشر أو التكاثر الخضري (Feres و Raccah، 2015). وتشمل النواقل الحشرية الحلم والديدان الخيطية والفطريات والنباتات المتطفلة بالإضافة إلى الحشرات التي تعتبر أكبر وافضل فئة من ناقلات الفايروسات النباتية (Bragard وآخرون، 2013).

تعود انواع الحشرات الناقلة للفايروسات الى سبع رتب حشرية وان غالبيتها وجد ضمن رتبتي الحشرات ذات أجزاء الفم الثاقبة ماصة (Piercing-sucking mouthparts) التي شملت رتبة Hemiptera التي تضم 300 نوعٍ مسؤول عن نقل 70% من الفايروسات النباتية كذلك رتبة Thysanoptera التي تشمل ستة أنواع كما تم العثور على أنواع ناقلات أخرى تعود الى خمس رتب من الحشرات القارضة (Chewing insects) التي تشمل Coleoptera (30 نوع) ، Orthoptera (10 انواع)، Lepidoptera (4 انواع) ، Diptera (نوعان) و Dermoptera (نوع واحد) (Whitfield وآخرون، 2015). جدير بالذكر انه يوجد بعض فايروسات النبات التي يمكنها ان تنتقل بواسطة أنواع مختلفة من الحشرات مثل فايروسات *Potyvirus* و *Cucumber mosaic virus* (CMV) التي يمكنها ان تنتقل بواسطة عدة أنواع من حشرة المن، ولكن وجد أنّ هنالك فايروسات أخرى تظهر تخصصية عالية بنوع ناقلها، بحيث لا يمكن أن تنتقل إلا عن طريق نوع واحد من الناقلات الحشرية كما يتضح في فايروسات *Rhabdovirus* (Whitfield وآخرون، 2015).

إنّ الدراسات الاحيائية الأولية (Takami، 1901؛ Ando، 1910) وما اعقبها من دراسات حول انتقال فايروسات النبات بواسطة الحشرات أدت إلى ظهور مصطلحات تصف علاقات الانتقال على أساس عتبات الاكتساب والتلقيح (Acquisition and Inoculation thresholds)، وكذلك مدة الاحتفاظ بالفايروس بواسطة ناقله (Retention Period) وكذلك اشارت وبوضوح الى ضرورة وجود بعض الجزئيات او البروتينات الخاصة بالناقل (الحشرة) والمنقول (الفايروس) والتي تلعب دوراً مهماً في تحديد العلاقة التخصصية بينما و تؤدي بطبيعة الحال الى إنجاح عملية النقل (Pirone، 1964؛ Rochow،

Hogehout 1970 واخرون،2008). ويوضح الشكل (1) بعض من هذه البروتينات والعلاقة بينهما حيث قسمت على نوعين اعتماداً على استراتيجية او طريقة عملها وهما استراتيجية الغلاف او الغطاء (Capsid strategy) وفيها يقوم جزء من الغلاف البروتيني (Coat protein) للفايروس يسمى motif بالارتباط بشكل مباشر بالمستقبلات البروتينية الخاصة بالناقل بحيث ترتبط بالغلاف البروتيني لنوع الفايروس المنقول دون غيره من الفايروسات ولتاكيد هذا الحقيقة أجريت تجارب حول سلالتين من فايروس CMV تنتقلان بواسطة حشرة المن ولكن احدها تنتقل بكفاءة عالية بينما الأخرى ذات كفاءة نقل منخفضة حيث تم تبديل الغلاف البروتيني بينهما مما أدى الى تحول كفاءة النقل بينهما وهذه التجربة اثبتت وبشكل واضح ان كفاءة النقل هاتين السلالتين مرتبطة ارتباطاً مباشراً بنوع الغلاف البروتيني وليس بجينوم الفايروس المنقول (Pirone،1991).

اما الطريقة الاخرى فتسمى بالاستراتيجية المساعدة (Helper strategy) حيث يتكون بروتين خاص يسمى بالعوامل او البروتينات المساعدة Helper component proteins (HC-Pro) يعمل كجسر رابط بين سطح جسيمة الفايروس والسطح الداخلي المبطن لغم الحشرة الناقلة اثناء تغذيتها على النباتات المصابة، حيث يعتبر هو المكان المحدد لبقاء هذه الفايروسات الى حين تغذية الحشرة على نبات اخر فتقلها بعد ان يفك الارتباط او يقطع الجسر الرابط ويطلق سراح الفايروسات لتدخل الى النباتات وتبدأ الإصابة. تستعمل هذه الطريقة فايروسات *Potyvirus* بالإضافة الى فايروس *Caulimovirus* (CaMV) ولكن ببروتين مختلف يسمى P2 (Hull،2013). وبعد دراسات مستفيضة تبين ان هذه البروتينات المساعدة ذات اوزان جزيئية عالية تصنع بناءً على اوامر من الفايروس نفسه وتحصل عليها الحشرة الناقلة اثناء تغذيتها على النباتات المصابة وتعتبر هذه البروتينات احد العوامل المحددة للتخصص بحيث يسبب نوع البروتين تخصص بعض أنواع حشرة المن بنقل أنواع محددة دون غيرها من فايروسات عائلة *Potyviridae* (Racah واخرون،2001).



شكل (1): نموذج تخطيطي يصف الاستراتيجيات المختلفة للتفاعل بين بروتينات الفايروس وبروتينات بعض النواقل الحشرية (Racchah و Fereres، 2015).

1-1-2: أنواع العلاقات بين فيروسات النبات ونواقلها الحشرية

لقد تم وصف أربعة طرق أساسية في نقل الفايروسات بواسطة الحشرات وهي غير الدائمة أو الباقية (Non-persistent)، شبه الدائمة أو شبه الباقية (Semipersistent)، والدائمة أو المستمرة أو الباقية (Persistent) التي تقسم إلى نوعين وهي دائمية أو مستمرة أو باقية دائرية (Persistent:circulative) ودائمة أو مستمرة أو باقية تكاثرية (Persistent:propagative) (Falk و Ng، 2006). ولكن المصطلحات الحديثة ذات العلاقة تسلط الضوء أيضا على كيفية تفاعل فايروسات النبات مع ناقلاتها الحشرية من جهة ان بعضها يرتبط بطبقة الكيوتكل بدون الدخول الى الخلايا تسمى بغير الدائرية (Noncirculative) وأخرى تدخل أمعاء الحشرات وتنتشر أو تتكاثر داخل جسم ناقلاتها الحشرية وتسمى بالدائرية او الدورانية التكاثرية (Circulative and/or Propagative) (Blanc و اخرون، 2014). ونظراً لأهمية هذه العلاقات فقد وددت سرد تفصيل أكثر عنها وهي كالتالي:

أولاً: النقل بالطريقة غير الدائمة أو غير الباقية **Non-persistent**

تنتقل بواسطة هذه الطريقة غالبية الفايروسات النباتية المنقولة بواسطة الحشرات وتمتاز بعدد من الخصائص المنفردة التي تميزها عن طرق النقل الأخرى تتمثل بفترة التغذية القصير نسبياً حيث تحتاج مدى زمنياً من بضعة ثواني الى دقائق قليلة من اجل اكتساب الفايروس من النباتات المصابة وايصاله الى النباتات السليمة. يعود سبب ذلك الى أن الفايروسات النباتية تتواجد في الانسجة السطحية (Epidermis) أو الوسطية (Mesophyll) للأوراق المصابة والذي يسهل من اكتسابها اثناء جلسات التغذية القصيرة التي تقوم بها الحشرة عادةً قبل الشروع بالتغذية المتعمقة. إن هذه العملية تمكن بعض حشرات المن من نقل الفايروسات حتى الى غير عوائلها التي تفضلها في التكاثر والبقاء (Wang ; 2013،Hull) و Zhou (2016).

تمتاز هذه الطريقة أيضاً بعدم وجود فترة حضانة للفايروسات داخل الحشرات الناقلة إذ تبدأ الحشرة بنقل الفايروس مباشرة بعد اكتسابها الفايروس كما أن فترة بقاء الفايروس في داخل الحشرة قابلٌ للنقل بفترة لا تتجاوز بضعة ثواني اثناء التغذية المستمرة ولكن في حالة الهجرة لمسافات بعيدة قد يبقى الفايروس لفترة أطول تتجاوز بضعة ساعات (Bragard وآخرون، 2013). وبما أن الفايروس لا يدخل الى تجويف الجسم عن طريق الهضمية الامامية فانه لا يتكاثر ولا يتواجد في أي عضو اوجهاز داخلي للحشرة باستثناء أجزاء الفم والقناة الهضمية الامامية وهذا بطبيعة الحال معناه أن الفايروس لا ينتقل الى الأجيال اللاحقة للحشرة بسبب عدم تواجده في الأجهزة التناسلية الذكرية والانثوية للحشرة الناقلة (Blanc وآخرون، 2014). وقد لوحظ أيضاً ان الحشرة تفقد الفايروس بعد عملية الانسلاخ مما دفع العلماء الى الاعتقاد بان الفايروسات تتواجد على السطح الخارجي للكيوتكل الذي يغطي جسم الحشرة ويبطن أجزاء الفم والقناة الهضمية وأنها أي الفايروسات تنتقل ميكانيكياً ولكن البحوث الحديثة اشارت وبوضوح الى أن عملية انتقال الفايروسات بهذه الطريقة هي عملية معقدة وتخصصية من حيث أنها أي الفايروسات تكون محمولة على النسيج الكايتيني الداخلي المبطن للقناة الغذائية التي توجد داخل الفكوك الرمحية السفلى للحشرة كما أنها توظف احد الياتي الانتقال والمتمثلة باستراتيجية الغطاء فقط أو استراتيجية المساعد (Jeffrey، 2018).

كمثال لآلية الغطاء فقط ، تبين أن الجسيمات الكاملة لفايروس CMV، ولكن ليس الحمض النووي الريبي الفيروسي المعزول فقط ، قابلية على الانتقال بواسطة حشرة المن من نوع *Myzus persicae* (Pirone وآخرون، 1966) مما يؤكد على وجه التحديد دور بروتين الغلاف البروتيني الفيروسي (CP) (Chen وآخرون، 1990) ومجالات سطح الغلاف المحفوظة (Conserved capsid surface)

domains) المطلوبة لتحقيق الانتقال الفعّال (Liu وآخرون، 2002). وكمثال حول تأثير آلية المكون أو البروتين المساعد، أظهر فايروس CaMV أنه يحتاج العديد من البروتينات الفايروسية الشبيه بالبروتين المساعد بالإضافة الجسيمات الكاملة له من أجل إتمام عملية النقل (Bak وآخرون، 2013) حيث يتفاعل البروتين P2 مع البروتين P3 المرتبط بالغلاف البروتيني الفيروسي من جهة ومن جهة أخرى يرتبط بالرمح المرن لحشرة المن (Plisson وآخرون، 2005; Hoh وآخرون، 2010) وهذا ما أكده المجهر عالي الوضوح High-resolution microscopy الذي أظهر ان البروتين P2 يرتبط و يتمركز عند طرف الرمح المرن بذبك اقترح أن تكون هذه المنطقة كموطئ قدم مشترك محتمل للفيروسات غير الدورانية (Non-circulative viruses) (Uzest وآخرون، 2010) كما أن فايروسات *Potyvirus* تقوم بتشفير بروتين مكون مساعد (HC-Pro) (Govier و Kassanis، 1974) الضروري لانتقال الفيروس، لأنه يسهل الاحتفاظ بالفيروسات في الرمح المرن لحشرة المن من خلال العمل كجسر بين بروتين الغلاف البروتيني (CP) لفايروسات *potyvirus* وبروتين أو بروتينات حشرة المن المتواجد على الرمح المرن (Seo وآخرون، 2010; Jeffrey، 2018).

ثانياً: النقل بالطريقة شبه الدائمة أو شبه الباقية Semi-persistent

تتميز طريقة النقل هذه بأن فترة اكتساب الفايروس من العوائل المصابة وكذلك فترة التلقيح وايصال الفايروس الى النباتات السليمة تكون أطول من نظيرتها في الطريقة السابقة (الطريقة غير الباقية) من حيث احتياجها لفترة زمنية تمتد من عدة دقائق الى ساعات قليلة، ويعود سبب ذلك الى أن الفايروسات المنقولة بهذه الطريقة تتواجد في انسجة النبات العميقة تحديداً في اللحاء مما يتطلب من الحشرة الناقلة وقت أطول للوصول الى تلك الانسجة والحصول عليها عن طريق التغذية (Ammar و Nault، 1991). كما تمتاز هذه الطريقة أيضاً بعدم وجود فترة حضانة للفايروسات مما يعني أن الحشرة تبدأ بنقل الفايروس بعد انتهاء عملية التغذية واكتساب الفايروس مباشرة. ان فترة بقاء الفايروس في داخل الحشرة وقابليته على الانتقال تكون أطول مما في الطريقة السابقة حيث تتراوح بين عدة دقائق الى ساعات عديدة اذا ما كانت الحشرة تتغذى بشكل مستمر ولكن في حالة غياب العائل وعدم قدرتها على التغذية وكذلك اثناء الهجرة تطول الفترة الى بضعة أيام (Hull، 2013). يضاف الى مميزات هذه الطريقة عدم تكاثر الفايروسات داخل الحشرة الناقلة وكذلك عدم مرورها من القناة الهضمية الى أعضاء جسم الحشرة الداخلية. وتفقد الفايروسات المنقولة بهذه الطريقة من الحشرة الناقلة اثناء انسلاخها وقد لوحظ بواسطة المجهر الالكتروني تواجد هذه الفايروسات على السطح الكايتيني الذي يبطن القناة الغذائية التي تتواجد في الفكوك الرمحية السفلى وأيضاً تتواجد في القناة الهضمية الامامية على الاسطح المبطنة للبلعوم ومضخة الامتصاص كما هو الحال في حشرات قفازات الأوراق (Wang و Zhou، 2016). إن اكتساب الفايروس من النبات

العائل والاحتفاظ به في الحشرة الناقلة يتضمن على آليات يلعب فيها بروتين الغلاف البروتيني CP الفايروسي دور كبير (Zhou و Ng، 2015) حيث لوحظ في حالة فيروس الخس الأصفر المعدي *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV)، بواسطة الفحص المجهرى الفلوري المتحد البؤر المناعي أنه يتم الاحتفاظ بالفايروسات في المعى الأمامي لحشرة الذبابة البيضاء *Bemisia tabaci* على ما يبدو بواسطة بروتين CP (Stewart وآخرون، 2010؛ Chen 2010 وآخرون، 2011).

ثالثاً: النقل بالطريقة الدائمة أو الباقية **Persistent**

تتميز الحشرات الناقلة التي تستعمل هذه الطريقة بأنها ذات فترة اكتساب للفايروسات طويلة نسبياً تمتد من دقائق الى ساعات وذلك بسبب تواجد غالبية هذه الفايروسات في نسيج لحاء النبات العائل. وتختلف هذه الطريقة عن الطريقتين السابقتين في ان الفايروسات المكتسبة تحتاج الى فترة حضانة في الحشرة الناقلة تتراوح ما بين ساعات الى بضع أيام في حالة اذا كانت فايروسات دوراة غير متكاثرة ومن بضعت أيام الى أسابيع فيما اذا كانت من النوع المتكاثرة. أما بخصوص بقاء الفايروس داخل الحشرة قابلاً للانتقال منها الى العوائل السليمة فان الفترة قد تطول نسبياً فتمتد من بضعت أيام الى أسابيع في حالة اذا كانت الفايروسات من النوع الدوار الغير متكاثر وقد تمتد هذه الفترة لتكون على طول فترة حياة الحشرة خصوصاً في حالة الفايروسات المتكاثرة. كما تتميز هذه الطريقة بان الحشرة عند انسلاخها لا تفقد الفايروسات. وتنقسم الفايروسات التي تنقل بهذه الطريقة الى مجموعتين:

أ - الطريقة الدوارة الغير المتكاثرة **Circulative non-propagative viruses**

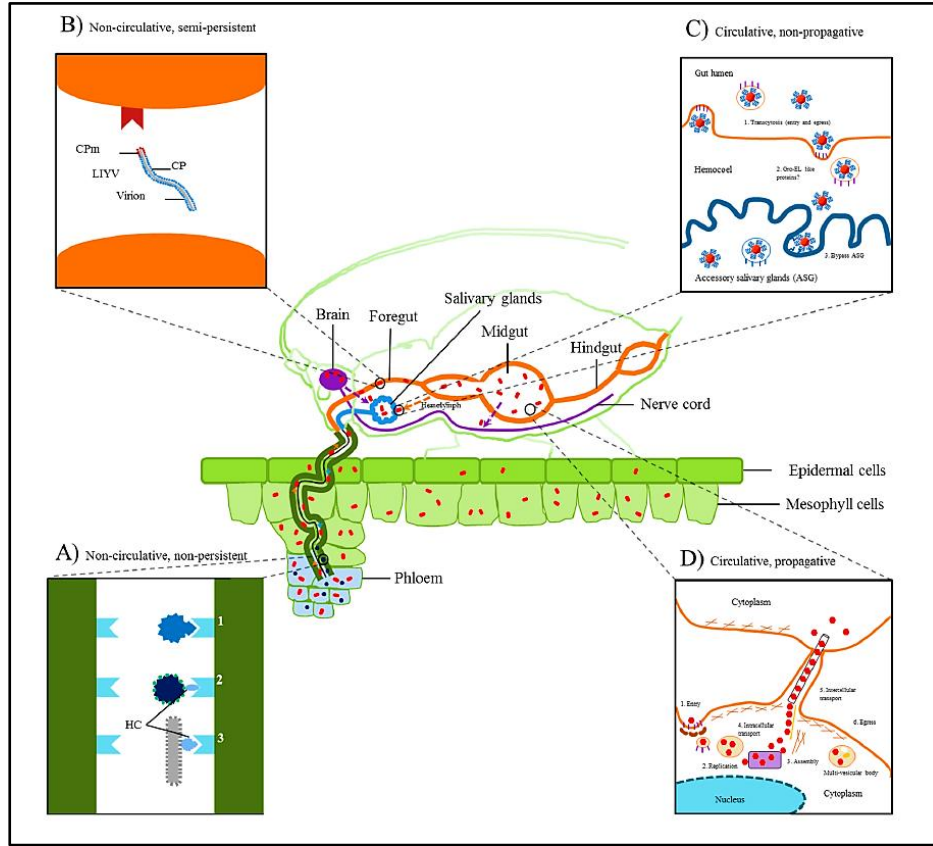
لقد وجد أن هنالك العديد من الفايروسات التي تعود الى الاجناس *Luteovirus* و *Geminiviruses* و *Nanoviruses* تنقل بالطريقة الباقية وبدون تكاثر بواسطة أنواع من حشرات المن وقفازات الأوراق والذبابة البيضاء (Gray وآخرون، 2014). مثال ذلك فايروس اصفرار وتقزم الحبوب *Cereal yellow dwarf virus-RPV* الذي ينقل بواسطة حشرة المن نوع *Rhopalosiphon padi* حيث لوحظ ان جسيمات هذا الفايروس تمر عبر الاغشية المبطنة لخلايا القناة الهضمية الخلفية وتدخل الخلايا عن طريقة عملية تسمى بالحوصلة الداخلة *Endocytosis* كذلك تمر بواسطة حويصلات انبوبية عبر الساييتوبلازم دون أن تتكاثر فيه وبعدها تنتقل هذه الجسيمات الى التجويف الدموي بعد حصول عملية عكسية تسمى بالحوصلة الخارجة *Exocytosis* حيث تصل مع الدم الى الغدد اللعابية الإضافية لحشرة المن بعدها تفرز مع اللعاب اثناء تغذيتها.

تجدر الإشارة الى أن الغلاف البروتيني CP وبروتين CP-read-through protein يلعبان دوراً حيوياً في مراحل مختلفة من عملية النقل حيث تتفاعل هذه البروتينات مع مستقبلات متخصصة تتواجد على الاغشية المبطنة للقناة الهضمية والمنطقة المحيطة بالغدة اللعابية لحشرة المن الناقلة ويعتبر هذا التفاعل هو المحدد للتخصص في نقل هذا الفايروس بواسطة نوع حشرة المن (*R. padi* Reinbold) واخرون، 2003؛ Peter واخرون، 2008؛ Mukhopadhyay، 2011). كما اكتشفت بعض بروتينات النبات العائل التي تبدو أنها ضرورية لاكتساب الفايروس وانتقاله بواسطة حشرة المن (*Cilia*) واخرون، 2012).

ب- الطريقة الدوارة المتكاثرة *Circulative propepative viruses*

تتميز الفايروسات التي تنتقل بهذه الطريقة بأنها تتكاثر وتنتشر داخل انسجة الحشرة الناقلة قبل انتقالها عبر غددها اللعابية الى النبات العائل السليم مع العلم ان فترة حضانتها وبقائها في داخل الحشرة الناقلة تكون أطول تقريبا اكثر من خمسة عشر يوماً مقارنة بما في الفايروسات الدوارة الغير متكاثرة والتي تكون 23 ساعة أي اقل من يوم واحد. كثير من التفسيرات التي حاولت تحديد السبب المباشر لهذا التفاوت منها أن هذه الفايروسات تحتاج الى فترة زمنية طويلة نسبياً من اجل التكاثر داخل الحشرة والانتقال الى الغدة اللعابية لغرض اوصولها الى النبات العائل، يضاف الى ذلك فإن الفايروسات المتكاثرة بعد انتهاء فترة الحضانة تبقى في داخل الحشرة طول فترة حياتها وفي حالات خاصة يمكن لها أن تنتقل عن طريق البيض الى الأجيال اللاحقة. حالياً يوجد على الأقل 49 فايروساً معروفاً ومؤكداً انه من النوع المتكاثر والذي يعتبر البعض منها ذو أهمية اقتصادية من حيث تسببها بامراض مختلفة على محاصيل مهمة مثل الرز والقمح والذرة والبطاطا والطماطة. مثلاً يوجد فايروس واحد من عائلة *Bunyavirida* ينتقل بواسطة حشرة التريبس كذلك يتبع ثلاثة فايروسات جنس *Marafivirus* التي تنقلها أنواع من حشرة قفازات الأوراق بالإضافة الى خمسة فايروسات تعود الى جنس *Tenuivirus* التي تنقلها أنواع من حشرة قفازات النباتات وهناك ثلاثة عشر فايروساً تعود الى عائلة *Reoviridae* التي تنتقل بواسطة قفازات الأوراق والنباتات واخيراً هنالك 27 فايروساً مختلف من عائلة *Rhabdoviridae* تنقل بواسطة أنواع مختلفة من حشرات المن وقفازات الأوراق والنباتات (Nault، 1997). يوجد هنالك العديد من طرق العدوى للحشرات بهذا النوع من الفايروسات المتكاثرة فمثلاً فايروس تقزم الأرز *Rice dwarf virus* الذي ينتقل في حشرة قفازات الأوراق *Nephotettix cincticeps* (Chen واخرون، 2011) يتضمن تفاعل غلافه البروتيني CP مع بروتين P2 الخارجي من اجل الدخول الى خلايا الأمعاء عن طريق عملية الالتقام الخلوي *Endocytosis* عبر حويصلات مغلقة بمادة كلاذرين P2 الخارجي للدخول إلى خلايا الأمعاء عن طريق الالتقام الخلوي عبر حويصلات مغلقة بالكلاذرين (Omura واخرون، 1998؛

Wei، 2007). ويتبع ذلك إطلاق بروتين P2 أي فك ارتباطه بالفايروسات وخروجها من الاجسام الداخلية Endosomes لبدء التكاثر، التجميع والارتباط مع الهياكل الأنوبوية التي تسبب الفايروسات تكوينها داخل الخلايا (Zhou وآخرون، 2007؛ Wei وآخرون، 2009). ويسهل البروتين الفايروسي الغير تركيبى Pns10 من حركة الفايروس من خلية إلى خلية أخرى في النباتات عبر الهياكل الانبوية وتعتبر هذه الخطوة ضرورية لانتشار الفايروس في داخل الخلايا قفازات الأوراق الناقلة وتتحرك الجسيمات الفايروسية عبر هذه الهياكل الأنوبوية على طول الاكتين ومن خلال أنسجة عضلات الأمعاء في القناة الهضمية لتسهيل الانتشار في جميع أنحاء جسم الحشرة بما في ذلك الغدد اللعابية (Chen وآخرون، 2012). وقد اظهر البروتين الفايروسي Pns10 تخصصية في التفاعل مع اكتين سايتوبلازم حشرة القفازات الأوراق *N. cincticeps* التي تعتبر الناقل الرئيسي لها ولكن لم تتفاعل مع اكتين سايتوبلازم حشرة القفازات من نوع *Recilia dorsalis* التي تعتبر ناقلاً غير كفوءٍ مما يشير إلى أن الأكتين كان مهمًا لعملية النقل ولتخصصية العلاقة بين الناقل والفايروس (Chen وآخرون، 2015).



شكل (2): مخطط أساليب نقل فايروسات النبات بواسطة الحشرات. (A) الطريقة الغير باقية، (B) الطريقة الشبه باقية، (C) الطريقة الباقية الدوارة الغير تكاثرية، (D) الطريقة الباقية الدوارة التكاثرية (Dietzgen وآخرون، 2016)

2-1-2: حشرة الذبابة البيضاء *Bemisia tabaci*

أولاً: التصنيف والوصف المظهري ودورة الحياة

تسمى هذه الحشرة بعدة تسميات وهي *Silverleaf whitefly* و *Sweetpotato whitefly* واسمها العلمي هو *Bemisia tabaci Gennadius* والتي تعود الى العائلة التصنيفية Aleyrodidae التي تقع ضمن تحت رتبة Sternorrhyncha التي تعود الى رتبة Hemiptera (Navas-Castillo) واخرون، 2011؛ الخزاعي، 2021). تمتاز بدورة حياتها القصيرة نسبياً اعتماداً على الظروف البيئية السائدة كما ان لديهم عدة أجيال سنوياً (Martin وآخرون ، 2000). وتستغرق دورة حياتها التي تشمل البيضة والحورية الزاحفة و طور الحورية الثاني و طور الحورية الثالث و ذ العذراء والحشرة الكاملة عادةً فترة ثلاثة أسابيع وتعيش فيها الاناث فترة زمنية أطول بمعدل يبلغ 20 يوماً تقريباً بينما يكون في الذكور تسعة أيام عندما تكون درجة الحرارة 25 م° والرطوبة 60% (Butler واخرون ، 1983؛ القاسم ، 1998). تضع الاناث البيض الذي يمتاز بأنه دائري متطاوول من الجهة الخلفية وذو زائد شوكية تساعده على البقاء على السطح السفلي لأوراق النباتات يصل طولها الى 0,03 ملم. وتختلف فترة حضانة البيض بحسب درجة الحرارة والرطوبة المحيطة ولقد وجد ان الظروف المثلى لفقس البيض هي درجة الحرارة 25 م° ورطوبة نسبية 75% الا ان البيض لا يفقس اذا ما بلغت درجة الحرارة اكثر من 36 م°. تفقس البيوض الى طور حوري اول زاحف ذو لون اصفر الى اصفر مخضر وبحجم يتراوح بين 0,15 × 0,26 ملم ذو شعيرات شمعية بالإضافة الى ستة عشر زوجاً من الاهداب الجانبية الصلبة وتكون الارجل متطورة ذات أربعة مفاصل، يتحرك لفترة قصيرة الى أن يجد العائل المناسب للتغذية عن طريق إمتصاص العصارة، وتبقى ملتصقة وثابتة على سطح الورقة (جرجيس؛ 1992، Thompson ، 2011). بعدها ينسلخ الى الطور الحوري الثاني الذي يمتاز بأنه اكثر تطوراً وذو شكل بيضوي بلون اخضر مصفر مع أجزاء قم متطورة وقرون استشعار متميزة بينما يكون الطور الحوري الثالث ذو جسم بيضوي متطاوول بلون اصفر فاتح بعيون صغيرة غير متميزة وقرون استشعار تميل الى الجزء الأوسط من الجسم و يمكن رؤية ثلاثة أزواج من الأهداب على الظهر الى جانب الشعيرات الشمعية. وبالرغم من عدم وجود فترة انسلاخ بين الطور الحوري الثالث و طور العذراء الا أنه توجد اختلافات مظهرية مميزة بينهما حيث تكون العذراء ذات لون اصفر فاتح وشكل بيضوي محدب بحجم 0,56 x 0,48 ملم مع تميز أجزاء الصدر والبطن وتكون قرون استشعار قصيرة ومركبة مع بروز سبعة أزواج من الاهداب الطويلة نسبياً على ظهر العذراء بينما يتواجد الزوج الثامن على طرف الذيل (Stansly و Naranjo، 2010؛ الخزرجي، 2021). أخيراً تمتاز الحشرة الكاملة حديثة الخروج بأنها غضة وذات لون ابيض مصفر وذو زوجين من الاجنحة الصفراء ولكن بعد فترة قصيرة يتحول لونها الى الأبيض كنتيجة لتراكم المادة

الشمعية على الجسم والاجنحة (Fiallo-Olive واخرون،2020). وتمتاز الاناث بمعدل طول 1,15 ملم وعرض 0,35 ملم وذات عينان مركبتان منفصلتان وضيقتان مع وجود عين بسيطة بالقرب من كل منها بالإضافة الى وجود قرني استشعار بطول 0.2 – 0.3 ملم يتكون كل منهما من سبع قطع (Borrer ، 1954 ؛ القاسم ، 1998). كما أنها تمتلك زوجين من الاجنحة الشفافة المغطاة بالمسحوق الشمعي الأبيض كما إن الأرجل تكون مزودة بثلاثة ازواج من الشعيرات أطولها الزوج الخلفي وبعده الأوسط ثم الزوج الأمامي ومن جانب اخر يكون الذكر أصغر حجماً من الأنثى اذ يبلغ طوله حوالي واحد ملم وعرضه 0.2 ملم، والامر نفسه ينطبق على طول قرون الاستشعار والأرجل التي تكون أيضاً اصغر مما في الأنثى ويتميز بطن الذكر بنحافته من المنتصف الى المؤخرة حيث ينتهي بشكله المدبب مع وجود زوج من الماسكات في نهاية البطن (العزاوي ، 1980) يمتلك الذكر والانثى القدرة على الطيران (Thompson،2011).



شكل (3): الحشرة البالغة للذبابة البيضاء. ♀ الانثى ♂ الذكر (Chen واخرون،2016)

لقد أظهرت العديد من الدراسات بأن هناك علاقة عكسية بين مدة تطور الحشرة ودرجات الحرارة، كما يتأثر عمر الحشرة الكاملة للذكور والاناث بتغير درجة الحرارة وأن فترة البقاء للاناث والذكور المتزاوجة تكون أطول من تلك الغير المتزاوجة (العبد المحسن ، 1992). تضع الانثى بيضها في الغالب في حلقة صغيرة كما يوضع بشكل مبعثر أيضاً ويكون معدل عدد البيض خلال فترة حياتها الكاملة هو 100 بيضة تضعها داخل سويق في انسجة السطح السفلي للأوراق وقد يكون هذا البيض اما ملقحاً ينتج حوريات تتحول الى حشرات كاملة من كلاً الجنسين او غير ملقح تنتج عنها حوريات تتحول الى ذكور فقط ويفقس البيض عادة بعد مضي حوالي أربعة أيام إلى سبعة عشر يوماً اعتماداً على درجة الحرارة المحيطة (Brown ، 2007).



شكل (4): مراحل دورة حياة حشرة الذبابة البيضاء *B. tabaci*. البيض، الـ 1st instar الطور الحوري الأول، الـ 2nd instar الطور الحوري الثاني، الـ 3rd instar الطور الحوري الثالث، Pupa العذراء و Adult البالغة (الـ 4th instar). (الـ 2021، الخرجي).

ثانياً: الأضرار الاقتصادية لحشرة الذبابة البيضاء

توضع حشرة الذبابة البيضاء *B. tabaci* في قائمة الآفات الرئيسية التي تؤثر بشكل كبير عالمياً على إنتاج العديد من المحاصيل المهمة وبالخصوص محاصيل القطن والطماطة والتبغ في جميع مناطق زراعته في العالم (De Barro وآخرون، 2011). ويعود سبب ذلك إلى تعدد الأضرار التي تسببها ويمكن تقسيمها إلى الآتي:

أ) الأضرار المباشرة

ينتج هذا النوع من الأضرار عن طريقة تغذية الحشرة على العصارة النباتية وذلك من خلال غرز أجزاء فمها الثاقبة الماصة في أنسجة الورقة من أجل الوصول إلى أوعية اللحاء لتتغذى على محتوياته من السكريات والأحماض الأمينية (Baufeld و Unger، 1994؛ Chen وآخرون، 2016). وتستمر الحشرة في امتصاص عصارة النبات بشراهة طول فترة حياتها حيث لا تتوقف عن التغذية حتى عندما تتزاوج وتضع البيض (Gerling، 1990). وهذا التغذية المستمرة بطبيعة الحال تسبب ضعف النبات وذبوله مع

الاصفرار والتقرم وقلة الحاصل ويرافق عملية التغذية هذه افراز أنزيمات تؤثر في العمليات الفسلجية للنبات مما ينتج عنه عدم انتظام النمو وتشوه وجفاف وتساقط أزهار (Brown، 1991؛ Fiallo-Olivé 2020). واخرون،(2020).

ب) الاضرار غير المباشرة

يرافق تغذية الحشرة على العصارة النباتية افرازها للندوة العسلية Honeydew والتي تتساقط على سطح الأوراق والأزهار والجوز وألياف القطن مما يؤدي الى تراكم الاتربة ونمو فطريات الاعفان السوداء وهذا الامر بطبيعة الحال يؤدي الى إعاقة عملية البناء الضوئي بشكل كبير كما يؤثر في عمليات التنفس والنتج مما ينتج عنها ضعف النبات وانخفاض انتاجه كماً ونوعاً وموته في حالة الإصابة الشديدة (Thompson ، 2011).

ج) الاضرار الأشد خطورة

وهي الاضرار الناتجة عن قدرة حشرة الذبابة البيضاء على النقل الكفوء للعديد من مسببات أمراض النبات الفايروسية التي ينتج عنها خسائر اقتصادية في الحاصل تتراوح بين 50-90% اعتماداً على نوع المحصول والظروف البيئية (Al-ani واخرون، 2011). اذ بالرغم من وجود 1500 نوع تعود الى حشرة الذبابة البيضاء، ولكن القليل منها فقط اظهر المقدرة على نقل الفايروسات النباتية منها الأنواع المعقدة للـ *Bemisia tabaci* جدول (1) (Navas-Castillo واخرون، 2011) التي تشمل 40 نوعاً متشابهاً مظهرياً لذلك تسمى بالانواع المبهمة او اللغز (Cryptic species) ويوضح جدول (1) أبرز هذه الأنواع (Kareem واخرون، 2020؛ Lee واخرون، 2013) تنتشر هذه الأنواع في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية وهي مسؤولة عن نقل العديد من الفايروسات النباتية التي تقدر اعدادها بأكثر من 111 فايروس يعود 90% منها الى جنس *Begomovirus* و 6% الى جنس *Crinivirus* والـ 4% الباقية تعود الى الاجناس *Torradovirus* و *Ipomovirus* و *Carlavirus* (Jones، 2003؛ Mugerwa واخرون، 2018).

جدول (1): بعض أنواع حشرة الذبابة البيضاء المعروفة كناقل لفايروسات النبات (Kareem واخرون، 2020؛ Fiallo-Olivé، 2020)

النمط الاحيائي Biotype	الاختصار	أنواع حشرة الذبابة البيضاء
H	*	<i>B. tabaci</i> Asia 1
ZHJ2	*	<i>B. tabaci</i> Asia II 1
ZHJ1	*	<i>B. tabaci</i> Asia II 3
Cv	*	<i>B. tabaci</i> Asia II 7
Q1	MED	<i>B. tabaci</i> Mediterranean
B	MEAM1	<i>B. tabaci</i> Middle East-Asia Minor 1
B2	MEAM1	<i>B. tabaci</i> Middle East-Asia Minor 1
*	MEAM2	<i>B. tabaci</i> Middle East-Asia Minor 2
A	NW	<i>B. tabaci</i> New World
*	NW2	<i>B. tabaci</i> New World 2

• تعني علامة * على ان نوع الذبابة البيضاء لا يملك اختصار او لا يعرف له نمط احيائي حالياً

يعتبر جنس *Begomovirus* الأكبر من بين الاجناس التسعة التي تعود الى عائلة Geminiviridae (Zerbini واخرون، 2017). وأن طريقة النقل المثلى لفايروسات هذا الجنس هي الدائمة او الباقية Persistent ولكن يوجد جدل مستمر حول فيما اذا كانت من النوع الدوار المتكاثر Circulative propegative او الدوار الغير متكاثر Circulative non-propegative وبرغم ذلك يوجد هناك ادلة متراكمة تشير بوضوح الى أن على الأقل فايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطة *Tomato yellow leaf curl virus* الذي يعتبر من فايروسات الجنس *Begomovirus* الأكثر ضرراً يتكاثر داخل جسم الحشرة (Wang، 2016). بالإضافة الى هذا الفايروس يوجد هناك العديد من الفايروسات المهمة التي تعود الى الجنس نفسه وتنقل بواسطة الحشرة نفسها منها فايروسات *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* ، *Tomato yellow leaf curl Malaga virus* ، *Tomato leaf curl New Delhi virus* التي تشترك بتسببها بالاعراض المرضية نفسها والمتمثلة بتجعد واصفرار أوراق الطماطة بالإضافة الى *Chino del tomato virus* و *Papaya leaf curl China virus* و *Tobacco curly shoot virus* الخ (Pan واخرون، 2018؛ Venkatarvanappa واخرون، 2017؛ Weng واخرون، 2015). اما فايروسات الجنس *Crinivirus*

النوع بعلامات متعرجة بنية على الأجنحة الأمامية (شكل 5) كما تمتلك لصليبية القاعدية على الجهة العلوية من الجناح مع تضخم قاعدة قرن الاستشعاراً تحديداً العقلة الثانية التي تصبح شبيهة بالبصلة بالإضافة الى وجود مهماز ضخم يقع في نهاية ساق الرجل الخلفية (Gnaneswaran وآخرون، 2010 ; حميد، 2016 ; الملاح، 2018).



شكل (5): الصفات المظهرية المميزة لحشرة قافزة الأوراق *M. dorsalis*.
(https://www.inaturalist.org/taxa/552972-Maiestas-dorsalis/browse_photos)

ثانياً: الاضرار الاقتصادية

إن العديد من أنواع قافزات الاوراق ومنها *M. dorsalis* تعتبر أفة حشرية مهمة على العديد من المحاصيل الزراعية وخصوصاً الرز إذ تسبب العديد من الاضرار منها:

(أ) الاضرار المباشرة

ازداد في العقود الماضية تأثير هذه الحشرة واعتبارها كأفة حشرية رئيسية تؤثر وبشكل كبير على محاصيل الرز العالية الإنتاجية مما أدى إلى خسائر ثقيلة في غلة المحصول. وينتج هذا التأثير عن الحوريات والبالغات التي تخترق انسجة اللحاء بواسطة أجزاء فمها الثاقبة الماصة (-Piercing sucking) لكي تمتص النسغ او العصارة النباتية بما تحتويه من مغذيات ضرورية لنمو النباتات وينتج عن الكثافة العالية لتواجدها ونشاطها حالة مرضية (Mathur و Chaturvedi، 1980، Ramya ; واخرون، 2017).

(ب) الاضرار غير المباشرة الأشد خطورة

تمتاز هذه الحشرة أيضاً بقدرتها على العمل كناقل رئيسي للعديد من الفايروسات النباتية الممرضة التي تسبب خسائر اقتصادية كبيرة على العديد من المحاصيل وبصورة رئيسية محصول الرز مثل الفايروسات *Tugro virus* و *Orange leaf virus* بالإضافة الى *Rice grassy stunt virus* (Hibino، 1989 و Ramya ; 1996 واخرون، 2017) يضاف الى ذلك فان اناث حشرة القافزات اثناء وضعها للبيض في انسجة النبات العائل تعمل منافذ تستعملها بعض المسببات المرضية للدخول الى انسجة النبات والتسبب بالاصابة كما ان جميع اطوار الحشرة تفرز اثناء تغذيتها الندوة العسلية التي تسبب في نمو العفن السخامي الذي يغطي سطح الانسجة التي ينمو عليها وبالتالي يحد او يمنع عملية البناء الضوئي التي تسبب التأثير المباشر على نمو النبات (الملاح، 2018).

2-2: تشخيص الفايروسات النباتية

بصورة عامة ان طرائق تشخيص الكائنات المجهرية بداءت بالتوازي مع تطور المقدرة على مشاهدة الكائنات الحية الدقيقة وتأثيراتها اذ كان روبرت هوك أول من نشر وصفاً للكائنات الدقيقة في عام 1665م عند استعماله لمجهر ضوئي طوره بنفسه من اجل وصف مفصل لفطريات الدقيقة وفي غضون بضع سنوات لاحقه استعمل أنتوني فان ليفينهوك طرقاً مماثلة في وصف بعض البكتيريا والأوليات. وبعد هذا الاكتشافات الأولية ، تم تحديد العديد من البكتيريا ووصفها بأنها من مسببات الأمراض ولكن تم التيقن والاعتراف بوجود كيان اخر ممرض غير معروف قادر على التسبب في بعض الامراض على الكائنات

الحية المختلفة والتي شملت النباتات. وهذا ما تحقق اذ أظهر عمل العلماء Adolf Mayer 1879م و Dmitriy Ivanovsky في العام 1892م عامل ممرض غير بكتيري قادر على التكاثر والانتقال بين نباتات التبغ والتسبب بمرض تبرقش أو فسيفساء التبغ (Hull، 2013). لاحقاً في العام 1898م أجرى العالم Martinos و William Beyrink تجارب الفلترة والتي اثبتت من خلالها بأن مسبب مرض تبرقش او فسيفساء التبغ هو كيان ممرض أصغر من البكتيريا، واطلق عليه تسمية فايروس والتي تعني باللغة اللاتينية السائل السام (Poisonous liquid) ونظراً لصغر حجم جسيمات الفايروس، فقد ظلت غير مرئية حتى ثلاثينيات القرن الماضي عندما تم الكشف عنها بالمجهر الإلكتروني (Thorburn، 2016).

تعتبر عملية التشخيص للمسبب المرضي هي الأساس والخطوة الاولى في إدارة الأمراض النباتية والتنبؤ بخسارة المحاصيل بسبب الإصابة بها (Dijkstra و Van der Want، 2006). ونظراً لأنه بعد الإصابة بالفايروس، لا تؤدي اغلب المعالجات الكيميائية الزراعية للنباتات في السيطرة الفعالة والتامه عليه. لذلك يتم إدارة الأمراض الفايروسية بشكل أكثر فاعلية عن طريق تطبيق تدابير المكافحة قبل حصول الإصابة (Aboul-Ata و اخرون، 2011). ولغرض الوقاية من الأمراض الفيروسية النباتية، من المهم معرفة الأسباب وتمييز النباتات المريضة والنباتات غير المصابة التي تظهر عليها أعراض شبيهة بالفايروس (Pearson و اخرون، 2006). وهذا بالطبع يشمل تشخيص الفايروسات المرافقة لنواقلها سواء أكانت الحشرية ام غيرها. لذلك تم تطوير الكثير من الطرق للكشف عن فايروسات النبات، مثل استعمال النباتات الكاشفة، والفحص المجهرى، والتقنيات المصلية والطرق الجزيئية (Webster و اخرون، 2004 ; Lopez و اخرون، 2008). ومن بين هذه الطرق سوف يتم مراجعة عدد من الطرق الرئيسية في تشخيص فايروسات النبات:

1-2-2: الطرق التشخيصية التي تعتمد على الخصائص الحيوية والمظهرية للفايروسات النباتية

لقد استعملت في بداية دراسة الفايروسات النباتية الاعراض التي تسببها على العوائل النباتية كوسيلة في تشخيصها والتخلص من النباتات المريضة لغرض السيطرة على المرض في بدايته ولكن صاحبة هذه الطريقة مشاكل تؤثر بشكل مباشر على طبيعة هذه الاعراض اذ تجعلها متباينة مثل اختلاف نوع سلالة الفايروس ونوع النبات العائل ووقت حصول الإصابة والظروف البيئية السائدة عند حصول الإصابة يضاف الى ذلك وجود سلالات أو فايروسات نباتية مختلفة تسبب ظهور اعراض متشابهة على العائل نفسه، وفي بعض الأحيان تظهر اعراض مرضية مشابهة للاعراض التي تسببها الفايروسات ولكنها تكون ناتجة عن اختلاف الظروف البيئية او نقص بعض العناصر الغذائية وغيرها (Awasthi، 2020).

ولغرض زيادة الدقة والتغلب على بعض من هذه المشاكل جرى الاعتماد على بعض النباتات الكاشفة مثل *(Nicotiana tabacum)* و *(Chenopodium quinoa)* و *(Phaseolus vulgaris)* التي تظهر عليها اعراض مرضية مميزة كنتيجة للإصابة ببعض الفايروسات وذلك عن طريق استعمال العصارة النباتية المصابة في تلقيحها اذ طبقت هذه الطريقة وبنجاح في تشخيص العديد من الفايروسات النباتية (Horvath، 1993). وبالرغم من إستعمال هذه الطريقة بشكل روتيني في اغلب المختبرات العالمية من اجل تشخيص الفايروسات او حفظها او لغرض اثمارها ولكنها بالوقت نفسه تستهلك وقتاً طويلاً نسبياً مع صعوبة أو استحالة تمييز بعض الفايروسات بالاعتماد فقط على الاعراض المرضية التي تسببها يضاف الى حاجة هذه الطريقة الى الخبرة العالية للقائمين على تنفيذها وتميز الاعراض المرضية التي تظهر على النباتات الملقحة (مكوك واخرون، 2008).

لغرض الحصول على معلومات وافية عن الصفات المظهرية لجسيمات الفايروسات النباتية استعملت المجاهر الالكترونية التي يمكنها اثبات الإصابة بأكثر من فايروس في النبات نفسه، إذا كانت صفاتهم الخارجية مختلفة. وعموماً أن عملية الكشف باستعمال المجهر الالكتروني عن الفايروسات ذات الاشكال العسوية والخيطية يكون اسهل مما لو كانت كروية أو متعددة الوجه وبرغم من هذه الفوائد إلا أن هنالك بعض المعوقات المرافقة لاستعماله منها صعوبة إيجاد الفايروسات في النسيج النباتي المصاب اذا ما كانت بتركيز منخفضة وأيضاً يحتاج استعمال هذا النوع من المجاهر الى مختصين ذوي خبرة في تحضير العينات التي تمر بمراحل مختلفة تحتاج الى مواد وأدوات خاصة بالإضافة التكلفة العالية لهذا النوع من المجاهر والتي قد لا تتوفر في اغلب المؤسسات العلمية والمراكز البحثية (Milne، 1993؛ Knipe ; 2013).

2-2-2: الطرق التشخيصية التي تعتمد الخصائص البروتينية للفايروسات النباتية

أساس عمل هذه الطرق هو الكشف المصلي الناتج عن تفاعل الأجسام المضادة (Antibodies) مع مولدات المضادات أو المستضدات (Antigens) والتي تكون عبارة عن بروتينات والتي منها برويتينات الغلاف للفايروسات (Torrance، 1998). وتحقق هذه الفايروسات بحالتها النقية كمستضدات في الحيوانات الثديية من اجل انتاج الاجسام المضادة المتخصصة التي تستعمل لاحقاً في الكشف عن الفايروسات في النباتات المصابة، اذ تم استعمال هذه التقنية كأداة تشخيصية روتينية للفايروسات (مكوك وقمري ، 1996 ؛ Fegla ; 2001) ويوجد في الوقت الحاضر العديد من الطرق المصلية منها طريقة التخرثر او التراص Agglutination و طريقة لطفة الانسجة المناعية Tissue blot و طريقة الإدمصاص المناعي المرتبط بالإنزيم (ELISA) التي تمثل اكثر الطرق

المصلية استعمالاً في مجال تشخيص الفايروسات النباتية لذلك سوف يتم التطرق اليها بشيء من التفصيل. لقد تم تطوير هذه الطريقة لأول مرة في العام 1977 من قبل العالمان Clark و Adams حيث استعملت وبنجاح في الكشف عن جميع أنواع الفايروسات ومنها فايروسات النبات حيث تعتبر من أكثر الطرق المصلية شيوعاً في الكشف عن الفايروسات في الانسجة النباتية المختلفة والبذور والحشرات الناقلة. تختلف هذه الطريقة عن الطريقة الترسيب او التراص بكونها تجرى على أسطح صلبة مصنوعة عادة من البلاستيك البولي ستيرين (Polystyrene microtiter plates) الصلب. تتمثل مزايا هذه الطريقة في حساسيتها العالية نسبياً ، ويمكن فحص عدد كبير من العينات في الوقت نفسه (Vemulapati وآخرون، 2014). فضلاً عن حاجتها الى كمية قليلة من الاجسام المضادة في الكشف عن الفايروسات، ويمكن أن يكون تنفيذها بطريقة شبه آلية (Naidu و Hughes، 2001). لقد تم تطويرها الى طرق مختلفة عن بعضها البعض في مبدأ وضع الأجسام المضادة والفيروس، ولكن مبدأ التفاعل والمحصلة النهائية تكون متشابهة تقريباً (Clark و Bar-Joseph، 1984؛ Luminex، 2010) مثل Double antibody sandwich-ELISA و Direct antigen coating-ELISA و Triple antibody sandwich-ELISA (Awasthi، 2020). لقد تم توظيف هذه الطريقة في الكشف وبنجاح عن العديد من الفايروسات النباتية المهمة مثل *Citrus tristeza virus* و *Potato leaf roll virus* و *Potato virus X* و *Potato virus Y* (El-Araby وآخرون، 2009؛ Sun وآخرون، 2001). وباعتبارها طريقة تعتمد على التفاعل بين المستضدات والاجسام المضادة لذلك فإن مدى توفر هذه الاجسام التي تستهدف فايروسات محددة أمرٌ ضروري جداً في نجاحها وبالوقت نفسه هنالك نقطة مهمة يجب الإشارة اليها وهي احياناً تقدم هذه الطريقة تشخيصاً خاطئاً بسبب التفاعل الموجب الكاذب الذي ينتج بشكل رئيسي من التفاعل غير المحدد أو التفاعل المتبادل مع عوامل معينة في العينات النباتية (Kfir و Genthe، 1993). أيضاً تحتاج هذه الطريقة الى كمية كبيرة من العينات للكشف عن الفايروسات المستهدفة مع حاجتها الى يومين تقريباً لاتمام طريقة العمل مقارنة بالطرق الجزيئية التي تحتاج الى كمية اقل من العينات وفترة زمنية اقصر (Lievens وآخرون، 2005؛ Luminex، 2010).

2-2-3: الطرق التشخيصية التي تعتمد خصائص الاحماض النووية للفايروسات النباتية

تعتمد طرائق التشخيص الجزيئي على الاحماض النووية ، اذ يمكنها استهداف أي منطقة في الجينوم الذي يمثل 90-95% من الجسيمة الكاملة للفايروس علاوة على ذلك فان هنالك حالات لا يمكن معها استعمال الطرق التشخيصية المصلية المناعية مثل الفايرويدات التي هي عبارة عن حامض نووي RNA فقط كما ان هنالك فايروسات تمتاز بضعف مناعي وأخرى يصعب الحصول عليها بصورة نقية يضاف

اليها فايروسات لها طرزمصلية متنوعة لا يمكن معها انتاج اجسام مضادة تتفاعل معها جميعا مثالها فايروس *Tobacco rattle virus* لذلك يعتبر تطبيق الطرق التشخيصية الجزيئية هو الحل الأمثل (مكوك واخرون،2008). وحالياً يمكن تطبيق الطرق الجزيئية بديلا عن الطرق المصلية في تشخيص العديد من الأمراض النباتية الفايروسية عندما تتوفر المعلومات الوراثية للفايروسات لا بل حتى وان لم تتوفر هذه المعلومات (Hadidi،2019). ويتم استعمال الطرق الجزيئية بشكل شائع في المختبرات بسبب الدقة العالية والحساسية وتتوفر في الوقت الحاضر العديد من الطرق التشخيصية الجزيئية (Jeong واخرون،2014) من أهمها:

اولاً: تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase Chain Reaction

لقد تطورت حساسية الطرق التشخيصية التي تعتمد على الحامض النووي بشكل كبير جداً بعد تطوير العالم Mullis وجماعته (1983) لطريقة اطلقوا عليها اسم تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction والتي تستعمل في تضخيم او عمل ملايين النسخ المتشابه لمنطقة معينة في تسلسل الحامض النووي حتى وإن كان تركيزه منخفضاً جداً (Hadidi واخرون،1995). إن سرعة التنفيذ والتخصص والحساسية العالية لهذه الطريقة التشخيصية جعلتها من اكثر الطرق ملائمة للكثير من مجالات البحوث في علم الاحياء بصورة عامة وعلم الاحياء المجهرية ومنها الفايروسات بصورة خاصة (Candresse واخرون،1998؛ Rubio واخرون،2020). ولتنفيذ هذه الطريقة يتوجب استخلاص الاحماض النووية (DNA + RNA) كما نحتاج زوج من البادئات والتي هي عبارة عن سلسلة بطول 18-30 نيوكليوتيدة مكملة بشكل متعاكس لقطعة من الحمض النووي المراد تضخيمه و انزيم النسخ Taq polymerase ومكونات التفاعل الاخرى بالإضافة الى دورات تفاعل تتكون من ثلاثة خطوات تبدأ بفك الارتباط (Denaturation) بين شريطي ال-DNA عن طريق رفع درجة الحرارة بين 94-95 م° بمدد زمنية مختلفة ثم خفضة درجة الحرارة اعتماداً على طول البادئات ونوع القواعد المكونة لها الى ما بين 45 و 75 م° من اجل التصاق (Annealing) البادئات بالمناطق المستهدفة وبعدها تمدد (Extension) بناء الشريط المتمم الذي يكون امتداداً للبادئات وذلك برفع درجة الحرارة الى 72 م° ولمدة زمنية محددة تعتمد على طول المنطقة المستهدفة. إن هذه الخطوات الثلاث تتكرر ما بين 30 الى 40 مرة علماً أن هنالك خطوةً بفك الارتباط (Denaturation) أولية تسبق هذه الدورات وأيضاً خطوة تمدد (Extension) لمدة 5-10 دقائق بدرجة الحرارة نفسها، بعد انتهاء هذه الدورات. بعد ذلك يتم التحقق من نتائج التفاعل بعملية تسمى بالترحيل الكهربائي عن طريق تحميله على وسط هلام الاكروز وترحيله كهربائياً من القطب السالب الى القطب الموجب ويتم إضافة صبغة بروميد الاثيديوم الى الوسط من اجل ان ترتبط بالحامض النووي المضاعف وتجعله مرئي بعد تسليط الاشعة فوق البنفسجية عليها (Saiki

واخرون،1988؛ McCartney و اخرون،2003). ويعد تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) كأحد التقنيات الأساسية للأبحاث الجزيئية ولها العديد من التطبيقات مثل الاستنساخ و التلاعب الجيني و تحليل التعبير الجيني و التتميط الجيني والطفرات (Boonham و اخرون،2016). بالإضافة إلى ذلك يعتبر كأداة تشخيصية فعالة في الكشف عن مسببات العديد من الأمراض ومنها عن فيروسات النبات في المختبر ويشيع استخدامه في التجارب الجزيئية (Webster و أخرون ، 2004). اذ استعمل وبنجاح في تشخيص الفايروسات ذات الحمض النووي (DNA) مثل أنواع الاجناس *Caulimovirus* و *Badnavirus* و *Geminivirus* و *Nanovirus* (مكوك و اخرون،2008؛ Uyeda و Masuta،2015).

ولغرض تشخيص الفايروسات النباتية ذات الحمض النووية نوع RNA والتي تعتبر الأغلبية فقد طورت تقنية خاصة تسمى Complementary DNA (cDNA) تعمل سلسلة مكملة للشريط الـRNA المفرد وتحويله الى DNA ذو شريطين بواسطة انزيم خاص يسمى Reverse Transcripase (RT) قبل البدء بتقانة الـ PCR لتضخيم الجين أو المنطقة غير المشفرة في جينوم الفايروس كما هو موصوف أعلاه ويطلق على هذه العملية بتفاعل البلمرة المتسلسل العكسي (RT-PCR) (King،2010). وبسبب حساسية وتخصص هذه الطريقة وموثوقيتها ورخصها مقارنة مع الطرق المصلية فقد استعملت بنجاح في تشخيص العديد من الفايروسات النباتية ذات جينوم الـRNA مثل الفايروسات *Potato virus X* و *Potato virus S* و *Potato leaf roll virus* (Ham،2003؛ Peter و اخرون،2009؛ Drygin و اخرون،2012) كذلك اكتشاف الفايروسات المنقولة بحشرة المن (Singh و اخرون،2004؛ Peter و اخرون،2009) وبشكل عام تعتبر طريقة تفاعل البلمرة المتسلسل أساساً لمعظم طرق التشخيص المستعملة حالياً التي تعتمد على خصائص الاحماض النووية (Rubio و اخرون،2020) والتي منها طريقة تفاعل البلمرة المتسلسل المتعدد Multiplex PCR و طريقة تفاعل البلمرة المتسلسل المتداخل Nested PCR و طريقة تفاعل البلمرة المتسلسل اللحظي Real-time PCR (Rajapaksha و اخرون،2019؛ Green و Sambrook،2019).

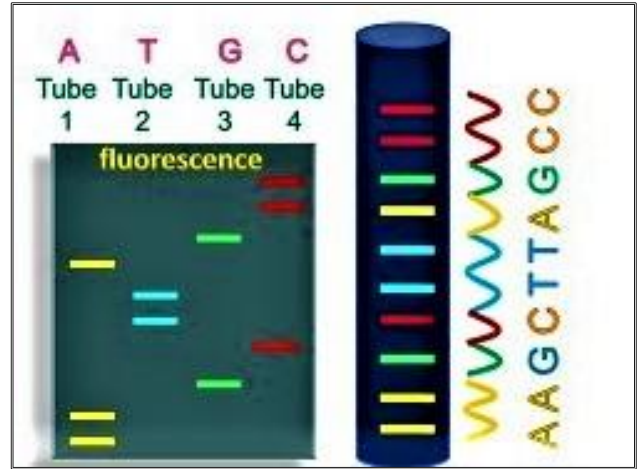
ثانياً: تحديد تسلسل الاحماض النووية DNA و RNA

بعد الجهود الحثيثة من قبل عدد كبير من العلماء حول اكتشاف الحمض النووي وبنيته الإجمالية التي تكملت بالنجاح في العام 1953 من قبل العالمين واتسون وكريك، اصبح لزاماً تحديد التفاصيل الدقيقة وأنماط الهيكل لهذا المركب العجيب اذ يقن علماء الحياة مباشرة بعد هذا الاكتشاف العظيم أن معرفة خصائص هذا المركب يمكن أن توفر نظرة ثاقبة للعديد من المشاكل الحيوية ومنها مسببات الأمراض المسؤولة عن العدوى على العديد من الكائنات الحية التي تشمل العوائل النباتية. ولقد تم تحقيق ذلك بنجاح عن طريق تحديد تسلسل الاحماض النووية باستعمال طرق مختلفة مرت بثلاثة اجيال:

أ) طريقة الجيل الأول First generation sequencing

يعتبر العالمين Sanger و Coulson من أوائل العلماء الذين عملوا في مجال تحديد تسلسل الحامض النووي الـDNA اذ نجحوا في العام 1975 ولأول مرة في تحديد تسلسل عاثي بكتيريا القالون (*E. Coli* bacteriophage) بعد تطويرهم لطريقة إنهاء السلسلة Chain-termination والتي عرفت لاحقاً بطريقة Sanger Sequencing وتتضمن تقانة (Purification) وتمسخ (Denaturation) الحمض النووي متبوعاً بالتضخيم من خلال تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)، ثم يقسم الحمض النووي الناتج إلى أربعة أنابيب في كل أنبوبة انزيم التضخيم بوليميريز الحمض النووي (DNA polymerase) جنباً إلى جنب مع الأربعة النيوكليوتيدات العادية dNTP ويتم إضافة واحد من أربعة نيوكليوتيدات خاصة تعرف بـ dideoxynucleotides (ddNTP) التي تشمل ddATP أو ddCTP أو ddGTP أو ddTTP اذ تعمل كمنهي للسلسلة ، لذلك اذا ارتبطت فانها تعمل على ايقاف بناء امتداد خيط DNA في هذه النقطة علماً أن إندماج هذا النوع من النيوكليوتيدات المنهية بنسبة اندماج النيوكليوتيدات الطبيعية نفسها (Smith وآخرون، 1986). وهذا يؤدي الى انتاج قطع باطوال DNA مختلفة وباعتبار أن نوعاً واحداً فقط من ddNTP تمت اضافته في كل انبوبة لذلك اصبح معروفٌ نهاية كل قطعة مضاعفة والتي يتم وضعها في حارة مخصصة لكل نوع من الأنواع الأربعة للـddNTP هلام الاكاروز ومن ثم اجراء الترحيل الكهربائي واعتمادا على ترتيب القطع وأنواع النيوكليوتيدات المنهية في كل حارة يتم تحديد تسلسل الحامض النووي الـDNA .

طورت هذه العملية لاحقاً واستعملت بشكل اوتوماتيكي او الي من اجل دراسة وتحليل عدد اكثر من العينات وذلك بدمج او لصق واسمات مشعة ذات الوان مختلفة (Fluorescent labels) بكل نوع من النيوكليوتيدات المنهية ddNTP بحيث تكون كل واحدة منها بلون خاص مميز ويمكن قراءة ddNTPs الملونة بعد تحفيزها على اطلاق الاشعة الفلورية بواسطة الليزر والتقاط هذه الإشارات الملونة بواسطة كامرات حساسة وسمح هذا التطور في اجراء هذه الطريقة في انبوبة واحدة (Smith وآخرون، 1986) وينتج تسلسلات او قراءات بطول من 300 الى 750 نيوكليوتيدة (شكل 6). ولقد تم اعتبار هذه الطريقة هي الجيل الأول ضمن تقنيات تحديد تسلسل القواعد النايتروجينية للحمض النووية باعتبارها أول الاختراعات المستعملة في هذا المجال وكانت الوحيدة المعروفة لمدة 30 سنة تقريباً (Schuster، 2008 ; Heather و Chain، 2016). وبرغم هذه المميزات الا أنها تحتاج فترة زمنية طويلة نسبياً لتنفيذها وأيضاً تكلفتها العالية خصوصاً عند تطبيقها على نطاق واسع لذلك أصبحت هذه المحددات حافزاً للمتخصصين من اجل إيجاد طرق بديلة.



شكل (6): مخطط توضيحي لطريقة Sanger Sequencing (www. Illumina.com)

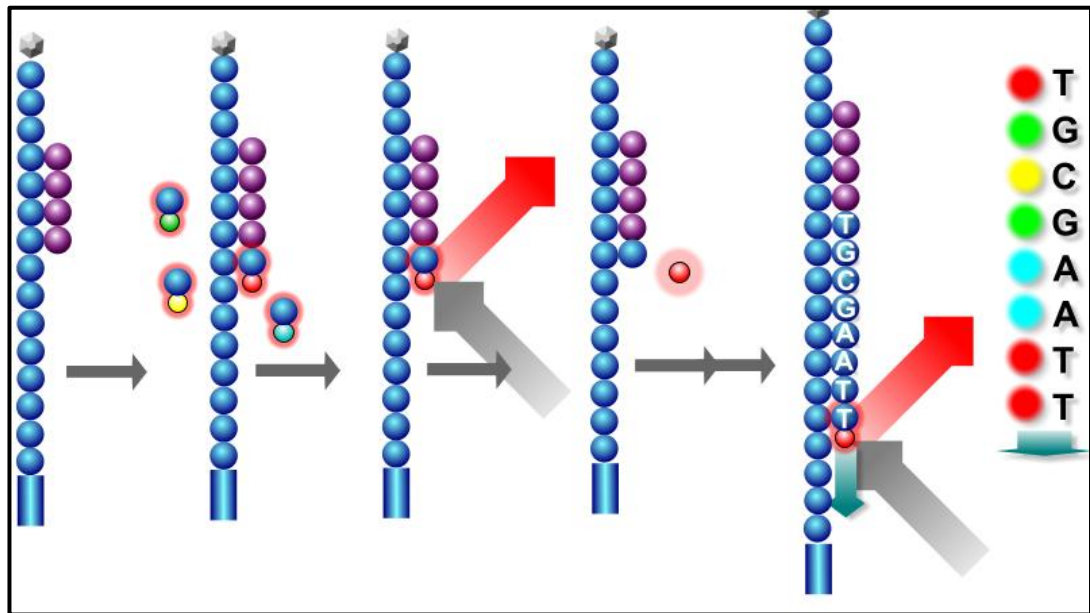
(ب) طرق الجيل الثاني Second generation sequencing

يوجد هنالك العديد من الطرق المستعملة ضمن الجيل الثاني والتي يطلق عليها تسلسل الجيل التالي (NGS) Next Generation Sequencing، ويشار إليه أيضًا بطرق التوازي على نطاق واسع Massively parallel sequencing، أو التسلسل ذو الإنتاجية العالية High sequencing throughput أو التسلسل العميق Deep sequencing حيث زادت هذه الطرق وبشكل كبير من إنتاجية تسلسلات الجينات، عادة ملايين إلى مليارات القراءات التسلسلية بطوال بين 25 الى قاعدة نايتروجينية وخفض الوقت المطلوب والتكلفة بشكل كبير مقارنة بالطرق السابقة (Barba و اخرون، 2014، Mahon و Lehman، 2019). ويوجد في الوقت الحاضر العديد من المنصات المتاحة التي تستعمل طرق NGS مختلفة مثل Ion PGM Sequencing و 454 Pyrosequencing و SOLiD Sequencing و Illumina، علماً أنّ هذه المنصات تتطور و يتحسن اداؤها باستمرار عن طريق شركاتها الخاصة وفيما يلي نظرة عامة على أبرز هذه المنصات التي استعملت في دراستنا:

• Illumina

تستخدم شركة Illumina المعروفة سابقاً باسم Solexa طريقة تحديد التسلسل بالتوليف أو التجميع (SBS) Sequencing-by-Synthesis شكل (7) اذ يتم تثبيت شظايا الحمض النووي سواء كانت الـ DNA أو الـ RNA المقطعة بواسطة انزيمات على خلية تدفق مع بادئات ويتم بعدها تنفيذ عملية تضخيم اومضاعفة بواسطة الـ PCR لإنتاج نسخ متعددة من الهدف في مجموعات والتي يتم غسلها بأربعة أنواع من النيوكليوتيدات المنهية المرتبطة بواسمات أو صبغات فلورية مشعة ذات الوان خاصة

لكل نوع منها (Illumina، 2021). ان هذه النيوكليوتيدات ترتبط عكسياً بشظايا الحمض النووي المقطعة والمثبتة بوجود انزيم البوليميريز الحمض النووي تتنافس هذه النيوكليوتيدات المُعلّمة على مواقع الربط ويستعمل اشعة الليزر لإثارة الأشعة الفلورية وتصوير الموقع الذي تنطلق منه على خلية التدفق بواسطة كامرات حساسة وتتم إزالة الصبغة الفلورية وتكرار العملية (Illumina، 2021). وتكون جميع القراءات المتسلسلة الناتجة بالطول نفسه الذي يتم تحديده بواسطة عدد الدورات التي تنفذ في الجهاز في عملية التسلسل المسماة بالنهاية المزدوجة Pair end ، يتم تحديد تسلسل الجزء المستهدف من الحمض النووي في الاتجاه الأمامي ثم يتم طيها وتحديد تسلسلها في الاتجاه العكسي مما يولد قراءتين عالية الجودة لقطعة او شظية حامض نووي واحدة. وتقدم هذه الشركة العديد من الخدمات المتعلقة بمجال تحديد تسلسل الاحماض النووية منها تحديد تسلسل الجينوم الكامل Whole genome sequencing والتي من خلالها يتم التعرف على تسلسل جميع القواعد النايتروجينية التي تشمل المناطق المشفرة (الجينات) والمناطق غير المشفرة لجينوم الكائن الحي. وأيضا هناك تحديد Transcriptome والذي من خلاله يتم التعرف على تسلسل جميع جزيئات الـ RNA التي تتضمن rRNA و tRNA و mRNA وغيرها من أنواع الـ RNA غير المشفرة التي يتم إنتاجها في الكائن الحي. ويستفاد من هذه الطريقة في تحديد التعبير الجيني اعتمادا على نشاط وكثافة انتاج الـ mRNA المسؤولة عن انتاج البروتينات والتي من خلالها يتم تحديد أي من الجينات النشطة واي منها غير النشط اعتمادا على الظروف أو البيئة التي تعيش بها تلك الكائنات (Thorburn، 2016؛ Rubio وآخرون، 2020؛ Illumina، 2021).



شكل (7): مخطط توضيحي لطريقة تحديد التسلسل بالتوليف او التجميع Sequencing-by-Synthesis

(www. Illumina.com)

ج) طرق الجيل الثالث Third generation sequencing

تعتبر هذه الطرق الاحداث في مجال تحديد تسلسل القواعد النايتروجينية للاحماض النووية وتعتمد في عملها على مبدأ تسلسل الجزيئة المفردة Single molecule sequencing (SMS) او التسلسل اللحظي Real-time sequencing وتمتاز بقدرتها على تحديد تسلسل الجزيئات المفردة من الاحماض النووية الـDNA و الـRNA، مما يلغي الحاجة إلى تضخيم الحمض النووي بواسطة طريقة الـPCR المشتركة بين جميع التقنيات السابق وأيضاً سرعتها تكون عالية اذ تحتاج اقل من يوم مع إنتاج لتسلسلات او قراءات مفردة بمعدل طول بين 5000 الى 15000 وبعضها يتجاوز 100000 قاعدة نايتروجينية كما ان لها القدرة على تجاوز بعض معوقات الطرق السابقة ولكن يعاب عليها تكلفتها العالية ودقتها الأقل مقارنة بطرق الجيل الثاني. يوجد في الوقت الحاضر العديد من المنصات تسمى بأسماء الشركات التجارية التي تطورها ابرزها Pacific Biosciences (PacBio) و Oxford Nanopore Technologies (Mestan واخرون؛ Heather 2011؛ Chain و Zhou و Xiao؛ 2016؛ 2020).

2-3: التشخيص الجزيئي للحشرات باستعمال جينوم المايكوكوندريا

يُعد جينوم المايكوكوندريا للحشرات (mtDNA) هو الناقل الوحيد للمعلومات الوراثية الخارج النواة في الحشرات. وهو عادةً شريط مزدوج من الـDNA الحلقي يبلغ طوله تقريباً من 15 الى 20 الف زوج قاعدة نايتروجينية. وعادةً يحتوي على جينات مختلفة تشمل ثلاثة عشر جين مشفر للبروتينات Protein coding genes (PCGs) و6 جينات من NADH dehydrogenase و3 جينات من cytochrome oxidase subunits (cox1-3) وجينين 4L (nad1-6 و nad4L) وجينين ATPase subunit و (atp6 و atp8) cytochrome b (cytb) بالإضافة الى جينين من نوع الحامض النووي الرايبوسومي Ribosomal RNAs genes (16s و 12s) مع 22 جيناً من نوع الحامض النووي الناقل transfer RNA. والجينوم يكون غني بتوليفة القواعد النايتروجينية من الـA + T كما يحتوي على منطقة التحكم (Wang و اخرون، 2018).

ونظراً لخصائص البينية البسيطة ، والوزن الجزيئي الصغير ، والتكوين المستقر ، والترتيب المحافظ ، وعدم وجود ظاهرة إعادة التركيب ، ووراثة الأمهات ، ومعدل التطور المرتفع نسبياً وسهولة الكشف ، فقد تم استعمال جينوم المايكوكوندريا على نطاق واسع في تشخيص الأنواع واجراء البحوث الجينية

السكانية ودراسة النشوء والتطور للانواع (Kumazawa وآخرون، 1998 ; Wilson وآخرون، 2010). ومع ذلك، هناك مناطق متكررة ومناطق غنية بقواعد الادلين والثايمين في جينات الميتوكوندريا، ويتشابه تسلسل الميتوكوندريا الحقيقي وتسلسل نسخة الميتوكوندريا النووية (الجين الكاذب) بشكل كبير لذلك يحتاج هذا الامر الى تطبيق تقنيات جديد لتجاوز هذه العقبات. لقد استعملت سابقاً وعلى نطاق واسع بعض جينات الميتوكوندريا ، سواء كانت في بناء الشجرة الوراثية أو دراسة تطور السكان، حيث يتم استخدام جين واحد في تشفير البروتين والذي يكون عادةً *cytochrome c oxidase I (coxI)* واحد جينات الـ RNA الرايبوسومي. ولكن بالمقارنة مع استعمال جينوم الميتوكوندريا الكامل الوضع مختلف تماماً، حيث أن استعمال جين واحد يعكس جزءاً فقط من المعلومات الوراثية الفعالة، وغالباً ما يحصل باحثون مختلفون على بيانات وراثية مختلفة تقود الى نتائج متباينة، مما يؤدي إلى الغموض في العلاقة التطورية للعديد من أنواع الحشرات التي لا تزال دون حل ومع التطور المستمر في تقنيات تحديد تسلسل القواعد النايتروجينية، أصبح من الضروري استعمال جينوم الميتوكوندريا بأكمله قدر الإمكان في تحليل النشوء والتطور، وذلك من أجل الحصول على نتائج أكثر دقة (Chen وآخرون، 2021).

Material and methods

3: المواد وطرائق العمل

1-3: المواد Materials

3-1-1: الأجهزة والمعدات المستعملة في هذه الدراسة

جدول (2): الأجهزة والمعدات المستعملة :

الدولة	الشركة المصنعة	الجهاز	ت
Italy	Optika	Dissecting مجهر تشريح microscope	1
South Korea	LabTech	Laminar flow كابينة معقمة cabinet	3
Germany	Memmert	Water Distiller جهاز التقطير	4
USA	Denver Instrument	Precision الميزان الحساس Balance	5
Germany	Boeco	أدوات زجاجية مختلفة	6
Lebanon	Concord	Refrigerator ثلاجة	7
South Korea	LabTech	Deep-Freeze -35 م° ثلاجة	
Taiwan	ExtraGene	انابيب بلاستيكية صغيرة Eppendorf tubes	8
South Korea	LabTech	Autoclave جهاز المؤصدة	9
Germany	Heidolph	Vortex هزاز كهربائي	10
Germany	Labortechnik	جهاز الطرد مركزي المبرد	11
France	Gilson	ماصات دقيقة مختلفة الاحجام Micropipettes	13
France	Gilson	مدقة بلاستيكية صغيرة Plastic micro pestles	14

France	Gilson	ملاحق خاصة بالمصاصات الدقيقة Micropipette tips	21
China	MeticLab	ورق ترشيح Filter paper	22
China	Zhangjiagang	ورق سيلوفين معدني ورق سيلوفين معدني	23
German	Silvercrest	مكنسه كهربائية صغيرة Small vacuum Cleaner	24
*	*	Thermal cycler (PCR)	25
*	*	جهاز ترحيل كهربائي	26
*	*	حمام مائي Water bath	27

● تعني * ان الاجهزة والمعدات المستملة لا تحمل اسم الشركة المصنعة او
البلد

The chemical materials

2-1-3: المواد الكيميائية

جدول (3): المواد الكيميائية المستعمله

المنشأ	الشركة المصنعة	المادة	ت
India	CDH Bioscience	مادة Agarose	1
USA	Sigma-Aldrich	مادة Ethidium Bromide	2
USA	Sigma-Aldrich	مادة Isopropanol	3
USA	Sigma-Aldrich	مادة Phosphate buffered saline	4
Iraq	شركة الجود	كحول ايثانول 96%	5

جدول (4): العدد المستعملة في الدراسة

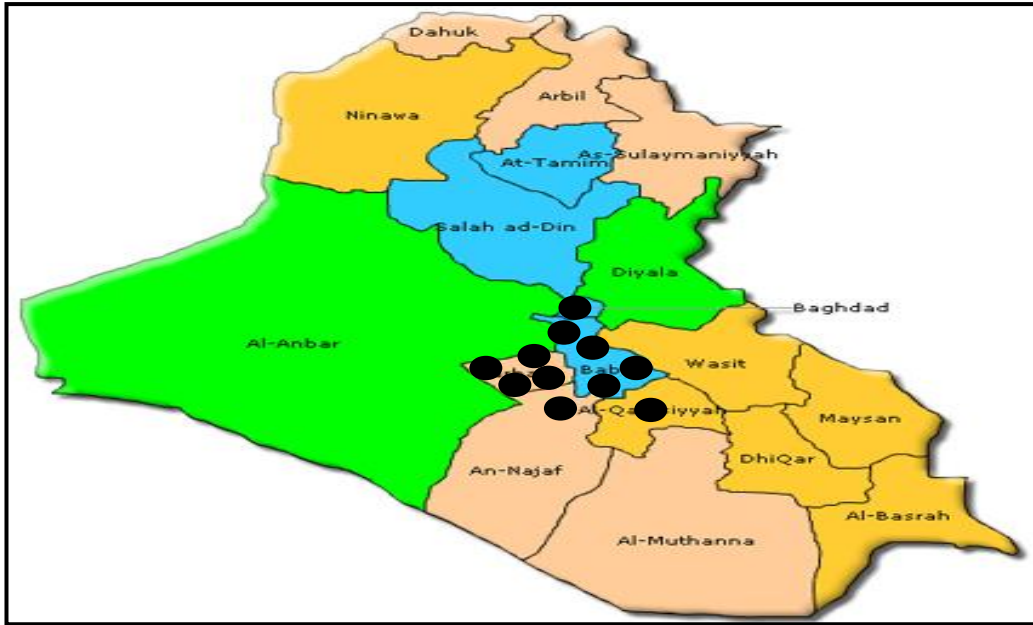
الشركة المصنعة	العدة	ت
Bioneer/ South Korea	AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit	1
	AccuPrep® Universal RNA Extraction Kit	2
	AccuPower® Taq PCR PreMix	3
	AccuPower® RT PreMix (-dye)	4

2-3: طرائق العمل

Methods

1-2-3: جمع عينات الحشرات

جمعت في الموسم الزراعي 2019-2020 عينات حشرات الذبابة البيضاء وقفازات الاوراق من محاصيل ونباتات مختلفة مثل الرز واللوبيا والباويا والبانجان والطماطة والعنب واليقطين. شمل المسح محافظة كربلاء (مزرعة الامام الحسين ع وقضاء طويريج وقضاء عين التمر وناحية الحر) ومحافظة النجف (المزارع الصحراوية) ومحافظة بابل (سدة الهندية و شريفة بنت الحسن (ع) ومنطقة ام الهواء والمعمورية) ومحافظة بغداد (كلية الزراعة – جامعة بغداد) ومحافظة الديوانية (ناحية غماس) (شكل 8). استعملت وسائل جمع مختلفة حسب نوع الحشرة، اذ تم جمع حشرة الذبابة البيضاء بشكل مباشر عن طريق تغطيه الاوراق المصابة بواسطة الاكياس ثم قطعها ووضعها في الثلجة تحت درجة حرارة 20- م° لمدة لحين الاستعمال ثم استعملت العدسة المكبرة والفرشاة الناعمة لجمع عينات الحشرات من الأوراق. اما قفازات الاوراق فقد تم جمعها بواسطة مصائد ضوئية متخصصة يضاف الى هذه الطرق استعمال مكنسة يدوية صغيرة محورة (Dustbuster) (شكل 9) في جمع حشرات الذبابة البيضاء والقفازات. وبعد اجراء عملية الجمع تم حفظ العينات الحشرية اما في كحول تركيز 96% او في محلول RNA /DNA Sheild تحت درجة حرارة 20- م° (Gibb و Oseto، 2020).



شكل (8): خارطة جمهورية العراق. المناطق المعلّمة بالنقاط السوداء تمثل مناطق جمع الحشرات في هذه الدراسة.



شكل (9): آلة جمع الحشرات المحورة. مكنسة شفط صغيرة تعمل بالشحن و تم ربط أنبوب بلاستيكي لها واغلاق الفوهة باحكام باستعمال الشريط اللاصق.

ولقد تم التشخيص المظهري للمبدئي للحشرات التي تم الحصول عليها وذلك بالاستعانة بالاستاذ المساعد الدكتور علي عبد الحسين كريم / قسم وقاية النبات /جامعة كربلاء اختصاص تصنيف الحشرات.

3-2-2: استخلاص الحامض النووي الـDNA من عينات الحشرات

استعملت العدة AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit في استخلاص الـDNA من عينات الحشرات باتباع تعليمات الشركة الموضحة بالخطوات التالية:

(1) سحقت عشر حشرات (الذباب البيضاء) و خمس حشرات (قفازات الاوراق) في انبوبة Eppendorf tube معقمه سعة 1.5 مليلتر مع 300 ميكرو لتر من المحلول الدائري PL باستعمال مدقة بلاستيكية معقمة و اضيف الى الخليط 20 مايكوليتير من انزيم Proteinase K و 10 مايكوليتير من انزيم RNase A و مزج الخليط بصورة جيدة باستعمال الهزاز الكهربائي.

(2) حضنت الانبوبة الحاوية على الخليط في حمام مائي بدرجة 60 مؤوي لمدة عشرة دقائق مع الحرص على رج الانبوبة يدوياً مرتان الى ثلاثة مرات أثناء فترة التحضين

(3) اضيف 100 ميكرو لتر من المحلول الدائري PC الى الانبوبة ثم مزجت محتوياتها جيداً باستعمال الهزاز الكهربائي و حضنت بعدها لمدة خمسة دقائق في الثلج، ان هذه الخطوة مهمة لترسيب البروتينات و السكريات المتعددة و المنظفات .

(4) اجريت عملية الطرد المركزي للانبوبة بسرعة 13000 دوره /دقيقة لمدة خمسة دقائق ثم نقل المحلول الطافي الى انبوبة جديدة و اضيف اليه المحلول الدائري WA1 بمقدار مرة و نصف من حجمه و خلطت المحتويات بصورة جيدة باستعمال جهاز الهزاز الكهربائي و اجريت عملية طرد مركزي لمدة عشرة ثواني بالسرعة أعلاه نفسها

(5) نقل الخليط بحذر الى انبوبة ذات فلتر و اجريت عملية طرد مركزي بسرعة 8000 دورة/دقيقة لمدة دقيقة واحدة، تم بعدها التخلص من المحلول النازل و اعيد استعمال الانبوبة ذات الفلتر مرة اخرى.

(6) اضيف 500 ميكرو لتر من المحلول الدائري W2 و اجريت عملية طرد مركزي بسرعة 8000 دورة/دقيقة لمدة دقيقة، تم التخلص من المحلول النازل و اعيد استعمال الانبوبة ذات الفلتر علماً ان هذه الخطوة اعيدت مرة اخرى.

(7) اجريت عملية طرد مركزي اخر بسرعة 13000 دورة/دقيقة لمدة دقيقة واحدة لغرض إزالة بقايا كحول الايثانول و اي قطرة معلقة على الفلتر.

(8) نقلت انبوبة الفلتر الى انبوبة (Eppendorf tube) معقمه سعة 1.5 مليلتر جديدة و اضيف على منتصف الفلتر 50 ميكرو لتر من المحلول الدائري EA و تركت لمدة دقيقة واحدة ثم اجريت عملية طرد مركزي بسرعة 8000 دورة/دقيقة لمدة دقيقة واحدة للحصول على الـDNA الذي حفظ تحت درجة حرارة -20 م° لحين الاستعمال.

3-2-3: استخلاص الحامض النووي الـRNA من عينات الحشرات

استعملت العدة AccuPrep® Universal RNA Extraction Kit في استخلاص الـRNA من عينات الحشرات باتباع تعليمات الشركة الموضحة بالخطوات التالية:

- 1) سحقت عشر حشرات (الذباب البيضاء) او خمس حشرات (قفازات الاوراق) في انبوبة Eppendorf tube معقمه سعة 1.5 مليلتر بصورة جيدة مع 500 ميكرو لتر من المحلول الدائري RB باستخدام مدقة بلاستيكية معقمة.
- 2) اجريت عملية الطرد المركزي للانبوبة بسرعة 14000 دوره/ دقيقة لمدة ثلاثة دقائق ثم نقل المحلول الطافي بحذر الى انبوبة جديدة وأضيف اليه 200 ميكرو لتر كحول الايثانول بتركيز 96-100% وخطت المحتويات فوراً بصورة جيدة باستخدام الماصة الدقيقة.
- 3) نقل الخليط بحذر الى انبوبة صغيرة ذات فلتر (AccuPrep® Binding Column-III) موجودة بداخل انبوبة سعة 2 مليلتر وأجريت عملية طرد مركزي بسرعة 14000 دورة/دقيقة لمدة عشر ثواني، يتم بعدها التخلص من المحلول النازل ويعاد استعمال الانبوبة ذات الفلتر مرة أخرى.
- 4) اضيف 700 ميكرو لتر من المحلول الدائري RWA1 وأجريت عملية طرد مركزي بسرعة 14000 دورة /دقيقة لمدة 20 ثانية، تم بعدها التخلص من المحلول النازل واعيد استعمال الانبوبة ذات الفلتر مرة أخرى.
- 5) اضيف 500 ميكرو لتر من المحلول الدائري RWA2 وأجريت عملية طرد مركزي بسرعة 14000 دورة في الدقيقة لمدة دقيقتين، يتم بعدها التخلص من المحلول النازل واعيد استعمال الانبوبة ذات الفلتر مرة بنقلها الى انبوبة Eppendorf tube معقمه سعة 2 مليلتر جديدة معقمة.
- 6) أجريت عملية طرد مركزي اخرى بسرعة 14000 دورة/دقيقة لمدة دقيقة واحدة لغرض إزالة بقايا كحول الايثانول واي قطرة معلقة على الفلتر.
- 7) نقلت انبوبة الفلتر الى انبوبة Eppendorf tube معقمه سعة 1.5 مليلتر جديدة واطيف على منتصف الفلتر 50 ميكرو لتر من المحلول الدائري ER وتركت لمدة دقيقة واحدة ثم أجريت عملية طرد مركزي بسرعة 10000 دورة/الدقيقة لمدة دقيقة واحدة للحصول على الـRNA الذي حفظ تحت درجة حرارة -20 م° لحين الاستعمال .

3-2-4: ترسيب الاحماض النووية (RNA+DNA)

بهدف تنقية وزيادة تركيز الاحماض النووية المستخلصة من عينات الحشرات استعملت الطريقة ادناه الواردة في Lahuf (2014):

- (1) إضيف كحول الايثانول المبرد تركيز 100% بمقدار مرتين ونصف من حجم المحلول النهائي للحمض النووي المستخلص بالإضافة الى مركب خلات او اسيتات الصوديوم Sodium acetate تركيز 3 مولاري (pH 5.2) (ملحق 1) بمقدار العشر 0.1% وخلطت المكونات بصورة جيدة باستعمال الهزاز الكهربائي و حضن الخليط بعدها تحت درجة حرار -20 م° لمدة ليلة كاملة.
- (2) أجريت عملية الطرد المركزي المبرد بدرجة حرارة 4 م° وبسرعة 14000 دورة/دقيقة لمدة نصف ساعة، وتم التخلص من كحول الايثانول بحذر باستعمال الماصة الدقيقة.
- (3) غسلت حبيبة الاحماض النووية المترسبة مرتين بصورة جيدة باستعمال 500 ميكرو لتر من كحول الايثانول المبرد تركيز 75% ثم أجريت عملية الطرد المركزي المبرد مرة أخرى بالسرعة نفسها ولمدة عشر دقائق بعدها تم التخلص من الايثانول ثم اعيدت عملية الطرد المركزي لمدة عشر ثواني.
- (4) جفف حبيبة الاحماض النووية المترسبة بالهواء وأعيد خلطها مع 50 ميكرو لتر من الماء المقطر المعقم.

3-2-5: تحضير الحامض النووي المتمم cDNA

لغرض تحضير الـ cDNA استعملت العدة AccuPower® RT PreMix باتباع تعليمات الشركة المصنعة المبينة ادناه:

- (1) مزج الـ RNA القالب المستخلص تركيز 0.5-1 مايكروغرام مع البادئ العكسي تركيز 10-30 بيكومولاري في انبوبة PCR معقمه سعة 0.2 مليلتر
- (2) حضن الخليط في درجة حرارة 70 م° لمدة خمس دقائق بعدها وضعت الانبوبة على الثلج
- (3) نقل الخليط الى انبوبة AccuPower® RT PreMix tube التي تحتوي على كافة المستلزمات لاتمام التفاعل واكمل الحجم الى 20 مايكرو لتر بالماء المقطر المعقم
- (4) خلطت المحتويات جميعها باستعمال الهزاز الكهربائي لمدة عشر ثواني ثم أجريت عملية الطرد المركزي 8000 دورة/دقيقة لمدة عشر ثواني لغرض انزال المحتويات الى قعر الانبوبة.
- (5) وضعت الانبوبة في جهاز الـ PCR وحضنت في درجة حرارة 42 م° لمدة ساعة واحدة، ثم بدرجة حرارة 94 م° لمدة خمس دقائق. اخذ بعدها 5 ميكرو لتر من الناتج (الـ cDNA) واستعمل في تفاعلات البلمرة المتسلسلة الـ PCR اللاحقة.

3-2-6: التشخيص الجزيئي للفايروسات النبات المرافقة للحشرات الناقلة

بهدف التشخيص الجزيئي للفايروسات النباتية المنقولة بواسطة الحشرات الناقلة تم تطبيق تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل الـ(PCR) وتقانة الجيل التالي لتحديد التسلسل الـ Next Generation sequencing الـ NGS للمقارنة بين ادائهما وتحديد ايهما الأفضل في تحقيق هذا الهدف.

اولاً: التشخيص باستعمال تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل الـ PCR

طبقت تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل الـ PCR باستعمال الاحماض النووية التي تم استخلاصها من الحشرات الناقلة والتي شملت الـ DNA و الـ RNA الذي تم تحويله الى cDNA وذلك بالاعتماد على البادئات العامة (جدول 3-7) المتخصصة في تشخيص أنواع بعض من اهم الاجناس الفايروسية المنقولة بواسطة الحشرات والتي شملت *Begomovirus* (Rojas و اخرون، 1993؛ Marwal؛ اخرون، 2013 ; Kumar و اخرون، 2018) و *Carlavirus* (Nie و اخرون، 2008) و *Potyvirus* (Zheng و اخرون، 2010) و *Torradovirus* (Verbeeka و اخرون، 2012).

جدول (5): البوادئ المستخدمة في اختبارات تفاعل البلمرة المتسلسل **Polymerase Chain Reaction الـ PCR**

اسم الجنس	اسماء البوادئ	تواليات البوادئ- 3 5-
<i>Begomovirus</i>	PBL1v2040-F	GCCTCTGCAGCARTGRTCKATCTTCATACA
	PAL1V1978-R	GCATCTGCAGGCCACATYGTCTTYCCNGT
	PAR1c496-R	AATACTGCAGGGCT TYCTRTACATRGG
	PCRc154-R	GGTAATATTAT AHCGGATGG
	AC1048-F	GGRTTDGARGCATGHGTACATG
	AV494-R	GCCYATR TAYA GRAAGCCMAG
	CLP36-F	CCTTAGCTAC GCCGGAGCT
	CLP36-R	AAGGCTGCTG CGTAGCGTAG
<i>Carlavirus</i>	Car-F	CNRTBTCNAAYAAAYATGGC
	Car-R	GGTWTCRSCTCRSYTACWCC
<i>Potyvirus</i>	NIb2-F	GTITGYGTIGAYGAYTTYAAAYAA
	NIb2-R	TCIACIACIGTIGAIGGYTGNCC
<i>Torradovirus</i>	Torrado2-F	TGGGATGARTGYAATGTKCT
	Torrado2-R	CCWGTCCACCA YTTGCAATT

استعملت العدة AccuPower® Taq PCR PreMix في اجراء تفاعل البلمرة المتسلسل وذلك باضافة 5 ميكرو لتر (أكثر من 100 نانو غرام) من الـ DNA الجينومي او الـ cDNA لكل عينة حشرية مع 3 ميكرو لتر (10-30 بيكومولاري) من كل بادئة بالإضافة الى 9ميكرو لتر من الماء المقطر المعقم الى انبوبة الـ PCR التي تحتوي على مكونات التفاعل المجففة اذ خلطت جميع المحتويات بصورة جيدة ثم وضعت في جهاز الـ PCR (Kumar واخرون، 2018).

جدول (6): ظروف الدورات في اختبارات تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction الـ PCR

اسم البادئ	التفكك الابتدائي Initial Denaturation	عدد دورات التضاعف	التفكك Denaturation	الالتصاق Annealing	التمدد Extension	التمدد النهائي Final extension
PBL1v2040F	94 م° لمدة 3 دقائق	30	94 م° لمدة دقيقة	50 م° لمدة دقيقة	72 م° لمدة 3 دقائق	72 م° لمدة 5 دقائق
PAL1V1978 R						
PAR1c496-R						
PCRC154-R						
AC1048-F	94 م° لمدة 3 دقائق	35	94 م° لمدة 45 ثانية	55 م° لمدة 45 ثانية	72 م° لمدة 45 ثانية	72 م° لمدة 5 دقائق
AV494-R						
CLP36-F	94 م° لمدة 3 دقائق	35	94 م° لمدة 50 ثانية	54 م° لمدة دقيقة	72 م° لمدة دقيقة ونصف	72 م° لمدة 10 دقائق
CLP36-R						
Car-F	95 م° لمدة دقيقتين	30	92 م° لمدة 30 ثانية	54 م° لمدة 30 ثانية	72 م° لمدة دقيقة	72 م° لمدة 10 دقائق
Car-R						
NIb2-F	94 م° لمدة دقيقتين	35	95 م° لمدة 45 ثانية	45 م° لمدة 45 ثانية	72 م° لمدة 45 ثانية	72 م° لمدة 5 دقائق
NIb2-R						
Torrado2-F	94 م° لمدة 3 دقائق	40	94 م° لمدة 30 ثانية	52 م° لمدة 30 ثانية	72 م° لمدة دقيقة	72 م° لمدة 5 دقائق
Torrado2-R						

أجريت عملية الترحيل الكهربائي لنواتج عملية التضاعف على وسط هلام الـ Agrose بتركيز 1.4 % والذي حضر بإذابة 0.7 غم من مادة الـ Agrose في 50 مل من المحلول الدارى X1 TAE (ملحق 1) بواسطة التسخين الحراري وبعد انخفاض حرارة الخليط الى 40-45 م° اضيف 5 مايكروليتر من صبغة Ethidium bromide (10 ملغم/ مل) وبعد الخلط الجيد صب المحلول في القالب الخاص الذي جهز بالمشط في أحدى نهايته، بعد اكتمال عملية تصلب مادة الـ Agrose رفع المشط بحذر لتجنب اتلاف الحفر التي صنعها ووضع القالب وما يحتوي في جهاز الترحيل الكهربائي ثم اضيفت كمية من المحلول الدارى X1 TAE الى القالب بحيث تغطيه بشكل كامل ثم اضيف 10 مايكروليتر من الـ DNA المضاعف في كل

حفرة وتم بعدها تشغيل الجهاز بجهد كهربائي 100 فولت لمدة 45 دقيقة. بعد انتهاء عملية الترحيل فحصت هلام الـ Agrose باستعمال الأشعة فوق البنفسجية وملاحظة أحجام حزم الأحماض النووي المضاعفة (Lahuf، 2014).

ثانياً: التشخيص باستعمال تقانة الجيل التالي لتحديد التسلسل Next Generation sequencing (NGS)

أ) أعداد المكتبات الجينومية وتحديد التسلسل عالي الإنتاجية

لقد تم إعداد مكتبات التسلسل (Sequencing libraries) وتحديد تسلسل القواعد النايتروجينية لعينات الحشرات باستعمال طريقة النسخ (Transcriptome/ RNA-seq) الخاص بالحامض النووي الـ RNA في (BGI Hongkong Tech Solution ، Beijing Genomics Institute (BGI) ، هونك كونغ ، الصين. تم تحديد تسلسل القواعد النايتروجينية على منصة Illumina التي تستعمل جهاز NextSeq 1000 & 2000 لمعرفة تسلسل الجينوم الكامل للكائنات الحية حيث تنتج قراءات باطوال محددة مقدارها 150 قاعدة نايتروجينية وكذلك تحديد تسلسل التعبير الجيني مع طول قراءات مقدارها 100 قاعدة نايتروجينية. تم إيداع بيانات التسلسل الأولية في موقع أرشيف قراءة التسلسل Sequence Read Archive (SRA)(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) التابع للمركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية (NCBI) اذ تم تحديد أرقام خاصة لبيانات مشروع الدراسة هذه.

ب) تشذيب قراءات تسلسلات القواعد النايتروجينية

أثناء عمليات تحضير المكتبات الجينومية، تم إدخال البادئات المتخصصة (Specific Primers) والمحولات (Adapters) في شظايا الحمض النووي ليتم تحديد تسلسلها بنجاح. وبطبيعة الحال فإن هذه التسلسلات الاصطناعية المضافة لديها القدرة على التداخل السلبي في نتائج تحليلات المعلوماتية الحيوية اللاحقة، لذلك يتوجب إزالتها من مجموعة البيانات بالإضافة إلى إزالة المقروءات ذات النوعية المنخفضة (أقل من Q30) باستعمال البرامج المتخصصة ومنها برنامج (Bolger) Trimmomatic واخرون، (2014). لقد تم تنفيذ هذه الخطوات على البيانات من قبل شركة BGI ولغرض التأكد من جودة المقروءات بعد إجراء عملية التشذيب استعمل برنامج اخر وهو (Andrews) FastQC (2010) الذي يعطينا تقريراً مفصلاً عن جودة البيانات وذلك من أجل تحديد مدى جودتها من أجل استعمالها في التحليلات النهائية.

ج) تجميع قراءات تسلسلات القواعد النايتروجينية بطريقة *De novo*

بهدف تجميع المقروءات المتسلسلة (Raw reads) في تسلسلات المتجاورات المتداخلة او المقروءات المتجمعة (Contigs) تم استعمال برامج متخصصة لتحقيق هذا الهدف شملت برنامج SPAdes (Bankevich وآخرون، 2012) المتخصص بالمقروءات من نوع الحامض النووي الـDNA وبرنامج Trinity (Grabherr وآخرون، 2011) المتخصص بالمقروءات من نوع الحامض النووي الـRNA، وقد استعملت المعايير الافتراضية المتفق عليها في هذه البرامج. وتم حفظ نتائج عمل هذين البرنامجين بما يخص المقروءات المتسلسلة الأطول في ملفات من نوع FASTA لغرض استعمالها في خطوات التحليل اللاحقة.

د) مقارنة تسلسلات القواعد النايتروجينية المتجمعة او المتجاورات المتداخلة (Contigs) مع التسلسلات العالمية

لغرض إيجاد مناطق التشابه والاختلاف بين تسلسلات القواعد النايتروجينية والبروتينات يستعمل برنامج Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Camacho وآخرون، 2009) الذي يقارن بين تسلسلات القواعد النايتروجينية أو البروتينات المحلية مع جميع التسلسلات المحفوظة في قواعد البيانات وحساب الدلالة الإحصائية لها. ولجعل عملية المقارنة اسرع وادق واكثر تخصصية استعمل هذا البرنامج في مقارنة التسلسلات الأطول التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة مع قاعدة بيانات تسلسلات جميع الفايروسات النباتية المعروفة والمحفوفة في NCBI-Genbank حيث تم الحصول عليها من الموقع <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi/#/virus?> في تاريخ 2020-9-25. حفظت مخرجات هذه العملية في ملف اكسل وتمت مراجعتها وتنظيمها يدوياً وذلك من اجل التخلص من نسب المقروءات ذات نسب التشابه المنخفضة (اقل من 50 قاعدة نايتروجينية).

ه) محاذاة المقروءات مع الجينوم المرجعي لفايروسات النبات

بعد تحديد اهم الفايروسات النباتية المرافقة للحشرات تم الحصول على الجينوم المرجعي لها من قاعدة بيانات متخصصة تسمى RefSeq: NCBI Reference Sequence Database والتي تحتوي على مجموعة التسلسلات المرجعية الشاملة والمتكاملة والغير مكررة والمعرفة بشكل جيد لجميع جينومات وبروتينات الكائنات الحية المعروفة. استعمل برنامج Bowtie2 (Salzberg و Langmead، 2012) في اجراء المحاذاة (Alignment) بين المقروءات المتسلسلة (Raw reads) والجينومات المرجعية لفايروسات النبات المشخصة، من اجل تعيين المقروءات المتسلسلة وتجميعها بهدف انشاء او توليد أطول تسلسلات متفق عليها (Consensus sequence) مشابه لتسلسل الجينوم الفايروسي المرجعي.

و) تحليل النشوء والتطور

استعملت مجموعة التسلسلات المتفق عليها (Consensus sequences) المشابه لتسلسلات الجينومات المرجعية في برنامج BLAST من اجل تحديد نسبة التشابه مع تسلسلات الفايروسات النباتية العالمية وأيضا لتحديد العلاقة الوراثية بينهما حيث تم تنزيل التسلسلات المماثلة واجريت عملية المقارنة بينهما باستعمال برنامج ClustalW الموجود ضمن برامج منصة MEGA (الإصدار العاشر) حيث تم استخدامه من اجل بناء أشجار النشوء والتطور التي تطبق نهج اوطريقة الانضمام إلى الجوار (neighbor-joining) (Kumar واخرون، 2016).

ز) دراسة التباين الوراثي بين سلالات فايروسات النبات المحلية والسلالات العالمية

لغرض دراسة مدى التباين الوراثي بين سلالات فايروسات النبات المحلية المشخصة في هذه الدراسة والسلالات العالمية استعملت طريقة البصمة الوراثية بواسطة تحليل نسبة التشابه بين تسلسلات القواعد النايتروجينية للتسلسل المتفق عليه (Consensus sequences) لكل فايروس مشخص مع تسلسل السلالات العالمية المشابه. لغرض تحقيق ذلك استعمل برنامج ClustalX في فحص نسبة التشابه بين تسلسلات القواعد النايتروجينية للسلالات المجمعة ومن ثم استعمال نتائج التشابه و الاختلاف في برنامج WebLogo الذي يعطينا تمثيل مرسوم لمحاذاة تسلسلات سلاسل القواعد النايتروجينية لسلالات الفايروسات المحلية والعالمية (Crooks واخرون، 2004).

3-2-7: التشخيص الجزيئي لحشرة الذبابة البيضاء التي جمعت في هذه الدراسة

بهدف التشخيص الدقيق للحشرة الناقلة، تم تحليل بيانات المقروءات الخام من نوع RNA-seq (Transcriptome) التي تم استلامها من شركة BGI الصينية والخاصة بحشرة الذبابة البيضاء وذلك باستعمال منصة البرامج Geneious Prime® 2021.2.2. تم اولاً اجراء عملية التجميع لتسلسلات المايٹوكوندريا وذلك من خلال محاذاة المقروءات الخام مع الجينوم المرجعي لمايٹوكوندريا الذبابة البيضاء (NC_006279.1) الذي تم الحصول عليه من قاعدة بيانات الجينومات المرجعية في موقع NCBI (Bernt واخرون، 2013; Kunz 2013 واخرون، 2019) ثم شرح الجينوم المتجمع (Genome annotation) وذلك بتحديد مواقع الجينات وجميع المناطق المشفرة في الجينوم باستعمال منصة البرامج MITOS (Bernt واخرون، 2013). بالإضافة الى هذه التحاليل تم اجراء تحليل النشوء والتطور (Phylogenetic analysis) للتسلسل المتفق عليه (Consensus sequence) وذلك باستعمال برنامج BLAST (Chen واخرون، 2016).

8-2-3: التشخيص الجزيئي لحشرة قفازات الاوراق التي جمعت في هذه الدراسة

لقد تم اجراء خطوات العمل أعلاها في الفقرة 7-2-3 نفسها، على بيانات المقروءات الخام التي تم الحصول عليها لهذه الحشرة بهدف التشخيص الجزيئي للحشرة الناقلة وذلك من خلال تحديد الجينوم الكامل للمايتوكوندرريا من خلال تجميعها بمحاذاتها للجينوم المرجعي للحشرة نفسها.

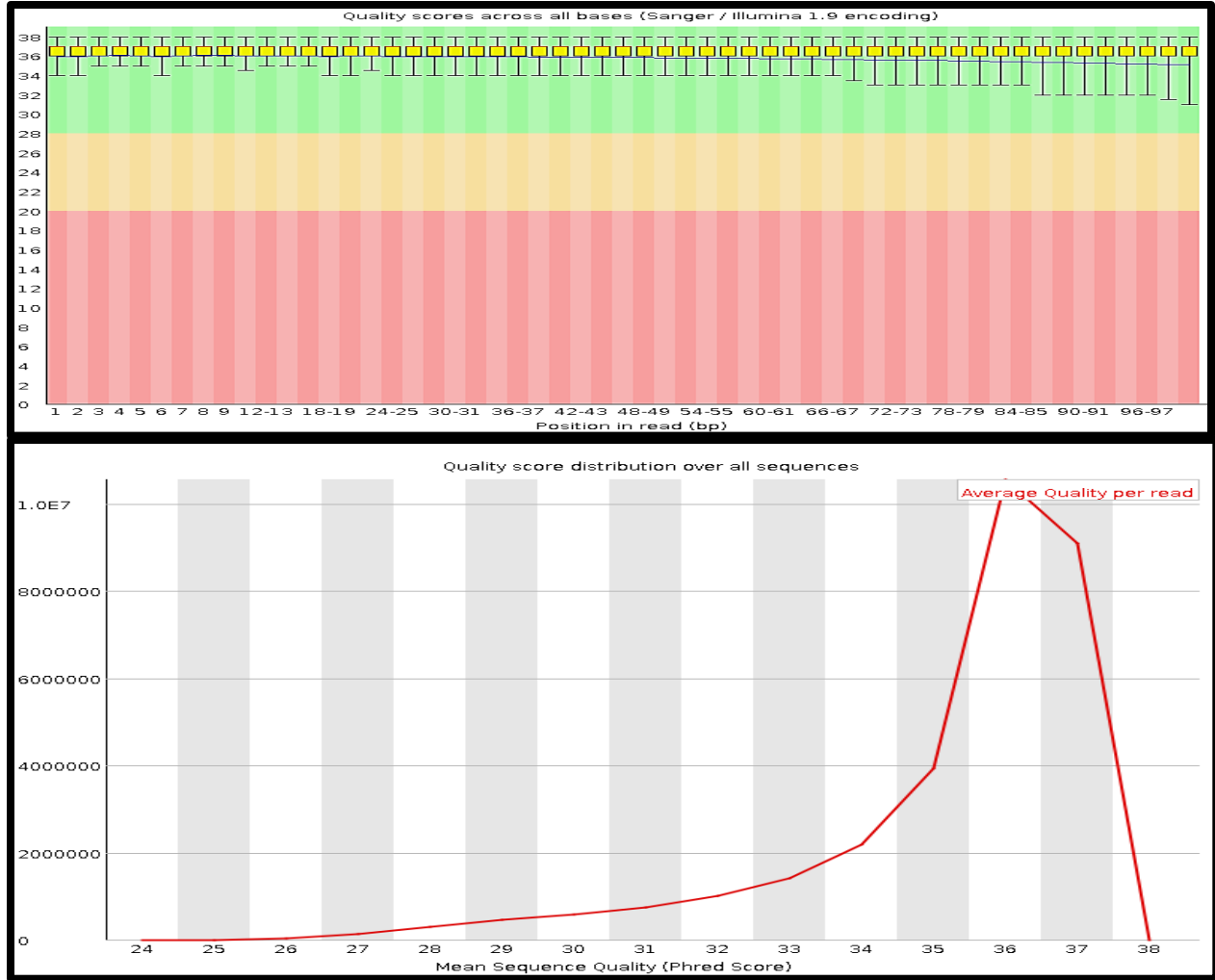
1-4: التشخيص الجزيئي لفايروسات النبات المرافقة للحشرات الناقلة المختارة باستعمال تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل الـPCR

نفذت تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل الـPCR على عينات الـDNA و الـRNA (تم تحويله الى cDNA) المستخلصة من الحشرات الناقلة باستعمال البادئات المتخصصة في تشخيص أنواع الاجناس *Begomovirus* و *Carlavirus* و *Potyvirus* و *Torradovirus* وذلك بتنفيذ شروط التفاعل نفسها المستعملة سابقاً (Rojas و اخرون، 1993؛ Marwal؛ 2013؛ Kumar و اخرون، 2018؛ Nie و اخرون، 2008؛ Zheng و اخرون، 2010؛ Verbeeka و اخرون، 2012). لم تظهر عملية الترحيل الكهربائي أي نواتج تضخيم على هلام الاكاروز. إنَّ هذه النتيجة يمكن أن تفسر أما بعدم وجود أنواع الاجناس الفايروسية المهمة المختارة في هذه الدراسة في العينات الحشرات الناقلة أو أنَّ هذه الأنواع الفايروسية التابعة لهذه الاجناس ذات تباين كبير في تسلسل القواعد النايتروجينية لجينومها أي أنَّها عزلات غير معروفة مسبقاً سببت عدم تمكن البادئات من التفاعل معها وهذا التفسير يتوافق مع ما اشارت اليه العديد من الدراسات السابقة حول الإمكانيات الكبيرة للفايروسات على التنوع الجيني بسبب تكرارها السريع العائد الى دورات حياتها القصيرة نسبياً والتي ينتج عنها أعداد كبيرة من افراد المجتمع الفايروسي. كما تمتلك الفايروسات خصوصاً ذات الجينوم نوع الـRNA، والتي تشتمل على معظم فايروسات النباتات مع الفايرويدات أعلى معدل للتحوير وحصول الطفرات الوراثية وإنتاج عزلات او سلالات جديدة تتطلب تصميم بادئات متخصصة لها من اجل اكتشافها (Gago و اخرون، 2009؛ Rubio و اخرون، 2020).

4-2: التشخيص الجزيئي لفايروسات النبات والحشرات الناقلة لها باستعمال تقانة الجيل التالي لتحديد التسلسل (NGS)

4-2-1: التشخيص الجزيئي لفايروسات النبات المرافقة لحشرة الذبابة البيضاء

تم الحصول على 61,183,994 سلسلة مقروءات مزدوجة النهايات (Paired ends reads) باطوال 100 نيوكليوتيدة والتي تم إنشاؤها عن طريق تحديد تسلسل مكتبات الـ mRNA للحصول على بيانات الـ Transcriptome التي تشمل مجموع كل جزيئات الحمض النووي الريبي المرسل mRNA المعبر عنها من جينات حشرة الذبابة البيضاء. بعد فحص جودة المقروءات التي تم الحصول عليها باستعمال برنامج FastQC (شكل 10) تبين أن تسلسل جميع القواعد النايروجينية في القراءات ذو جودة عالية وبمعدل جودة لكل مقروءة بلغ 36 درجة وبحسب مقياس جودة القراءات المعروف بـ Phred quality score فان هذا يعني ان نسبة دقة التسلسل اكثر من 99,9% واحتمال وجود قاعدة نايتروجينية غير صحيحة ضمن تسلسل المقروءات هو 1 في 10000 ومعدل الجودة هذا يعتبر ضمن المعدلات الموصى بها والتي يجب ان تكون من 30 درجة فما فوق (Ewing واخرون، 1998 ; Korpelainen واخرون، 2015).

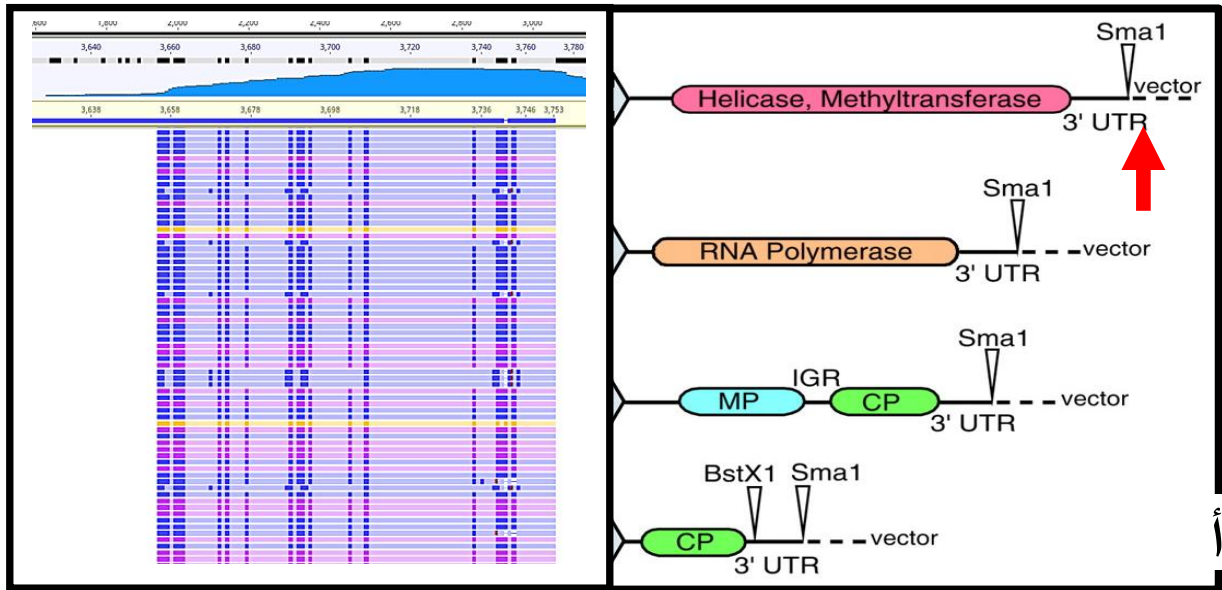


شكل (10): جودة المقروءات بحسب مقياس Phred quality score

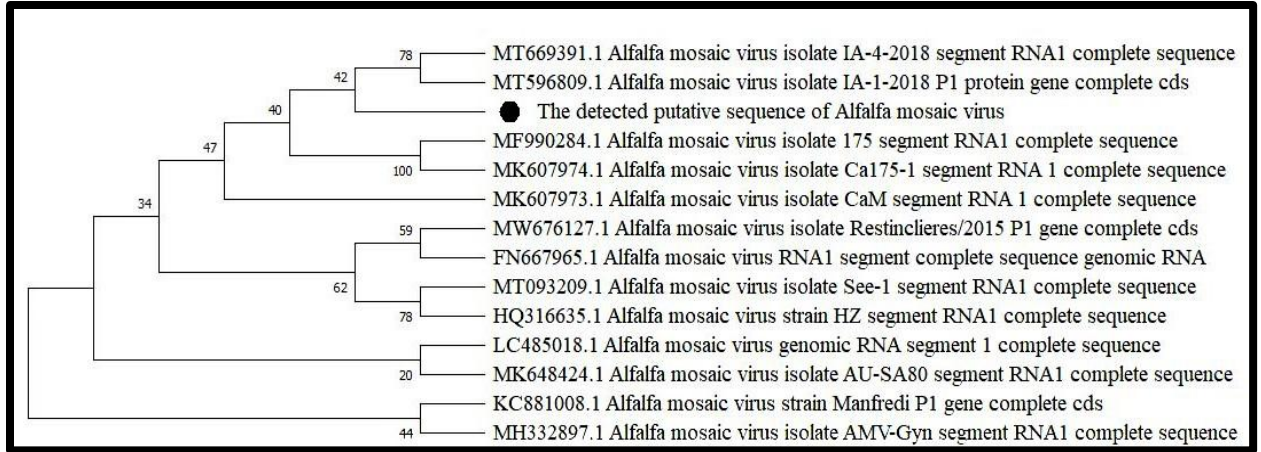
بعد التأكد من جودة المقروءات جمعت بشكل متجاورات متداخلة (Contigs) بواسطة برنامج Trinity اذ تم الحصول على 323,446 متجاورة والتي أظهرت نتائج المقارنة مع بيانات فايروسات النبات العالمية باستعمال برنامج BLAST أن هنالك نسبة كبيرة منها ذات نسبة تشابه عالية مع تسلسلات مختلفة للقواعد النايتروجينية التابعة للعديد من فايروسات النبات المخزنة في بنك الجينات GenBank. ولغرض زيادة مصداقية وقيمة النتائج التي تم الحصول عليها يجب ان تتجاوز عدد المتجاورات المتداخلة 400 فما فوق المشابه لتسلسل الفايروس من اجل اعتباره مشخص في هذه الدراسة اما بقية المتجاورات المتداخلة الأقل وان كانت مشابه لأحد تسلسلات الفايروسات فقد تم اهمالها وفيما يلي وصف للفايروسات التي تم تشخيصها في عينات حشرة الذبابة البيضاء:

أولاً: فايروس *Alfalfa mosaic virus* (AMV)

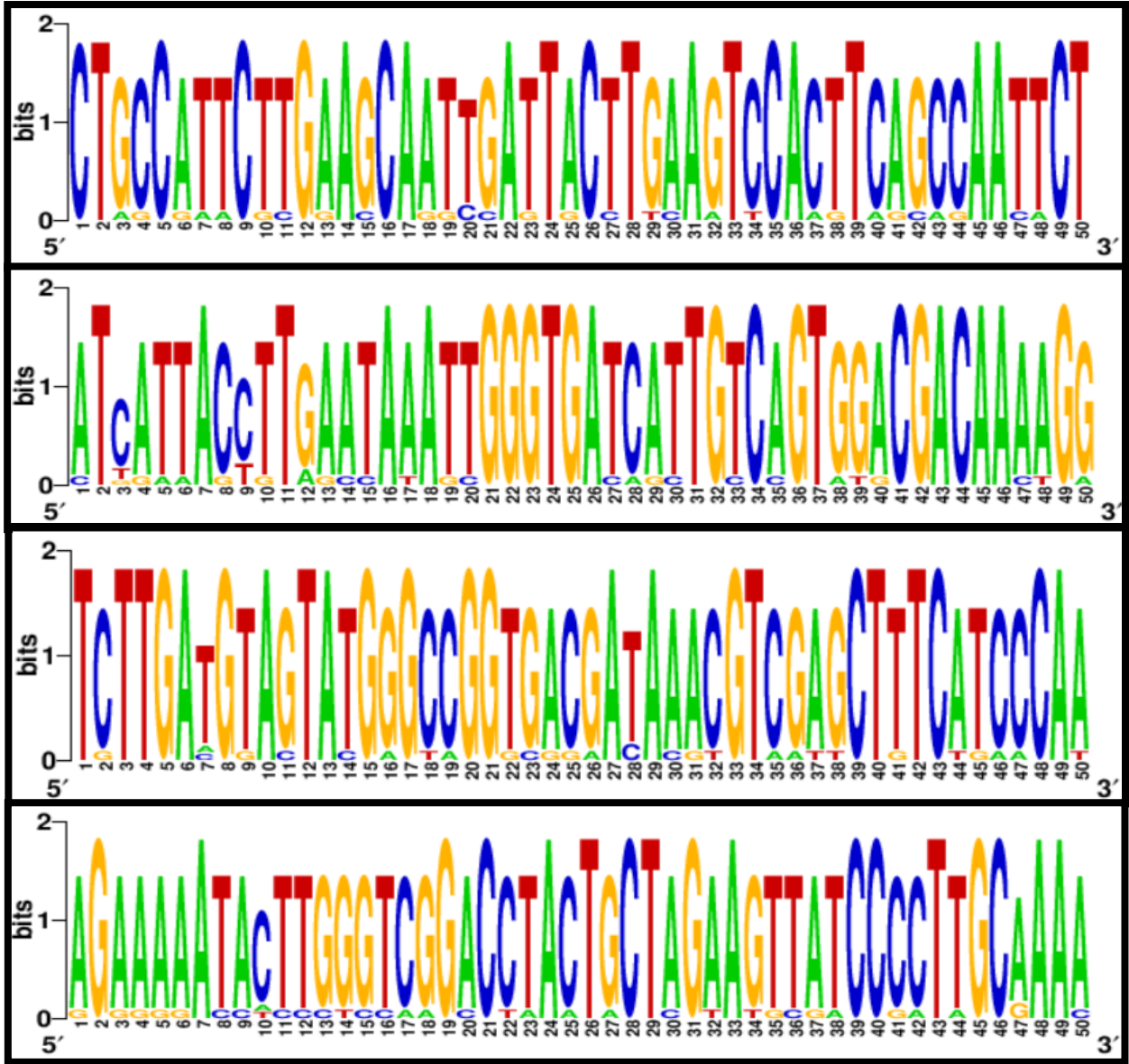
أظهرت نتائج التحليل المعلوماتية الحيوية وجود 48630 متجاورة متداخلة (Contigs) مشابهة لفايروس موزائيك الباقلاء تحديد المنطقة الغير مشفرة (3'UTR) Untranslated region التي تقع في الطرف الثالث من جينوم الفايروس في القطعة الأولى (شكل 11) وكانت نسبة المتجاورة المتداخلة المتجمعة الخاصة بهذا الفايروس هي الأكثر اذ بلغت نسبتها 44.07% من المجموع الكلي للمتجاورات المتداخلة الخاصة بفايروسات النبات المشخصة في حشرة الذبابة البيضاء. إن هذه النتيجة قد تم تأكيدها من خلال تحليل النشوء والتطور الذي أثبت العلاقة الوراثية الواضحة بين التسلسل المفترض الموحد لجميع المتجاورات المتداخلة لهذا الفايروس والتي بلغ طولها 631 نيوكليوتيدة مع العديد من سلالات الفايروس نفسه خصوصاً ذات الرموز MT669391.1 و MT596809.1 (شكل 12). وأظهرت نتائج تحليل التباين الوراثي بين سلالة فايروس موزائيك الباقلاء المحلية والسلالات العالمية أنّ هنالك تبايناً واسعاً بينهم، ويتضح هذا الاختلاف بعدم التشابه في العديد من تسلسلات القواعد النايتروجينية خصوصاً في بداية ونهاية التسلسلات وحتى المنطقة الوسطى التي تعتبر منطقة محافظة، اي لا تحدث فيها تغيرات عادةً وجدت فيها اختلافات متعددة كما هو واضح في الشكل (13).



شكل (11): المنطقة المغطاة بالمتجاورات المتداخلة لفايروس AMV المرافق لحشرة الذبابة البيضاء. (أ) رسم تخطيطي للجينوم الكامل للفايروس (Guogas وآخرون، 2005) والمنطقة المشمولة بالتغطية والمشار إليها بالسهم الأحمر اللون، (ب) تغطية المتجاورات المتداخلة للمنطقة الغير مشفرة في الطرف الثالث للـ RNA 1 من جينوم الفايروس.



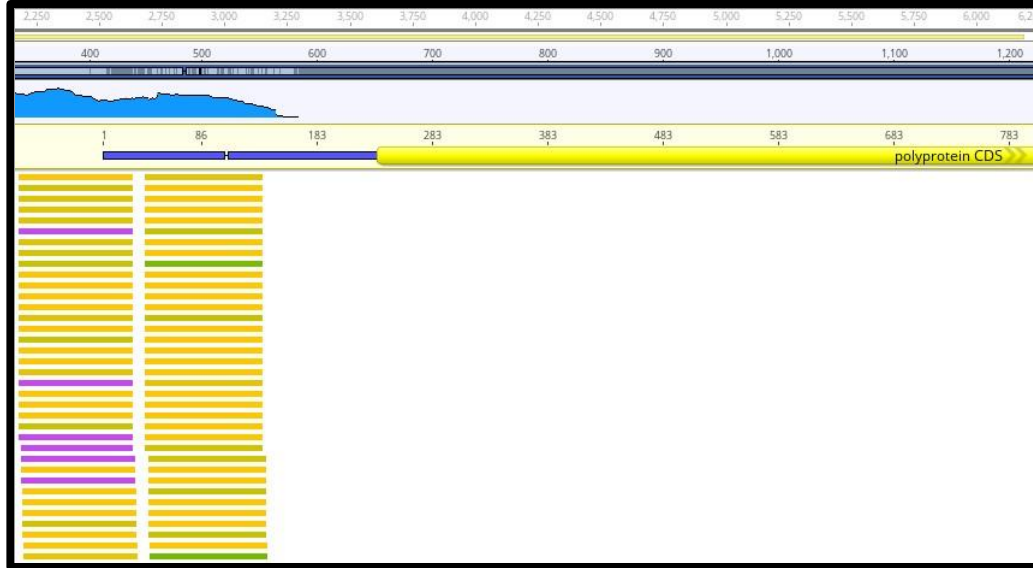
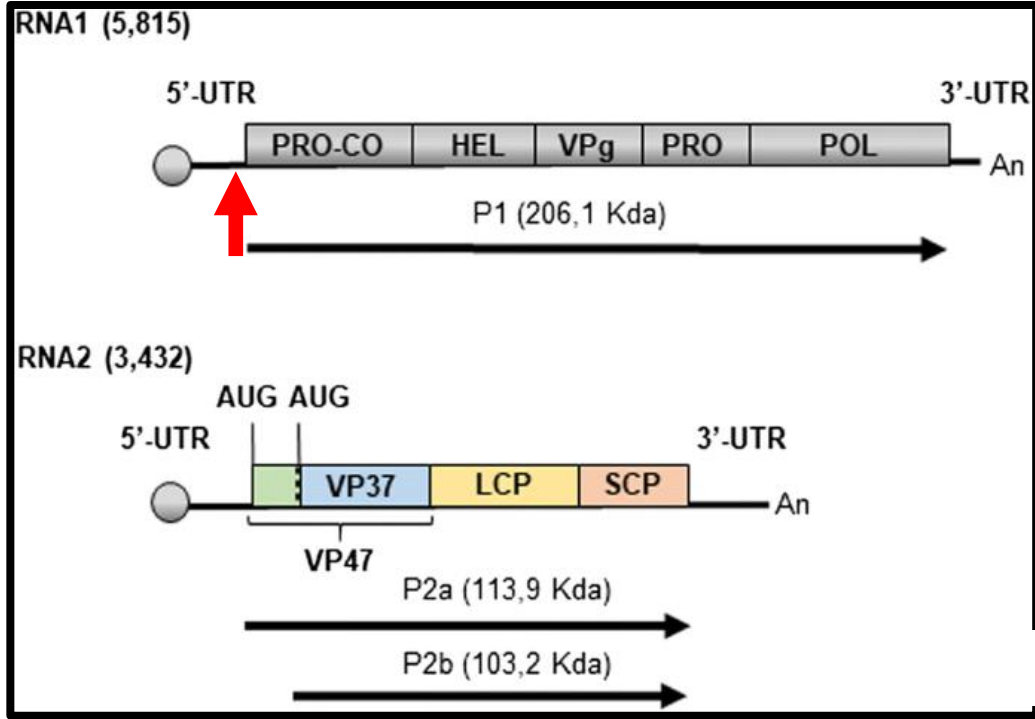
شكل (12): الارتباط الوراثي بين تسلسل فايروس AMV المجمع المرافق لحشرة الذبابة البيضاء (المشار إليه بنقطة سوداء) والسلالات العالمية الأخرى التابعة للفايروس نفسه.



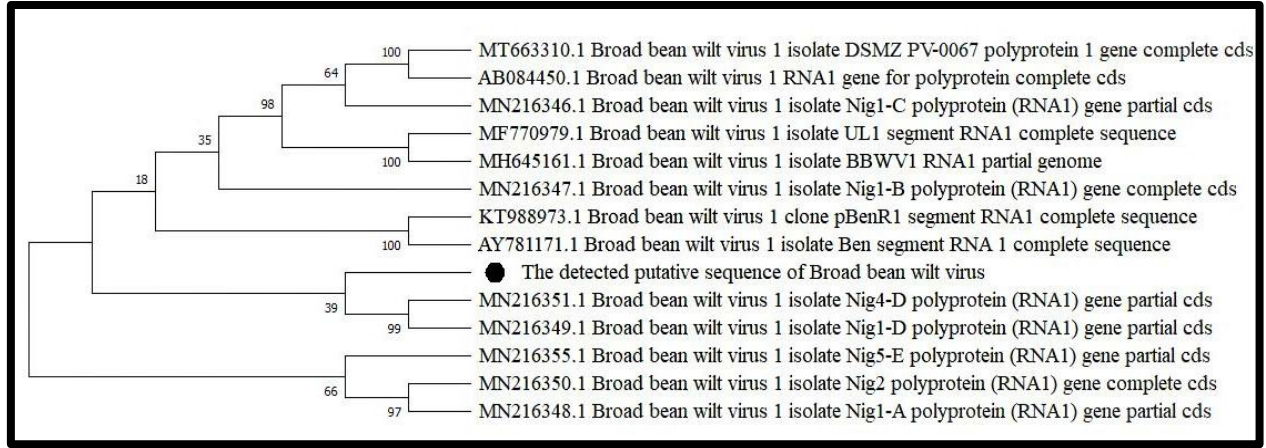
شكل (13): التباين الوراثي بين تسلسلات القواعد النايروجينية للسلالة المحلية المرافق لحشرة الذبابة البيضاء والسلالات العالمية لفايروس AMV. كل قاعدة من القواعد النايروجينية الاربعة لها لونها الخاص والحرف الواحد تعني التشابه التام في القاعدة النايروجينية لجميع السلالات بينما اذا تعددت الحروف وكان باحجام مختلفة فمعناها وجود اختلاف وكلما كبر حجم الحرف فمعناها نسبة التشابه اكبر مما لوكانت الحروف صغيرة.

ثانياً: فايروس *Broad bean wilt virus* (BBWV)

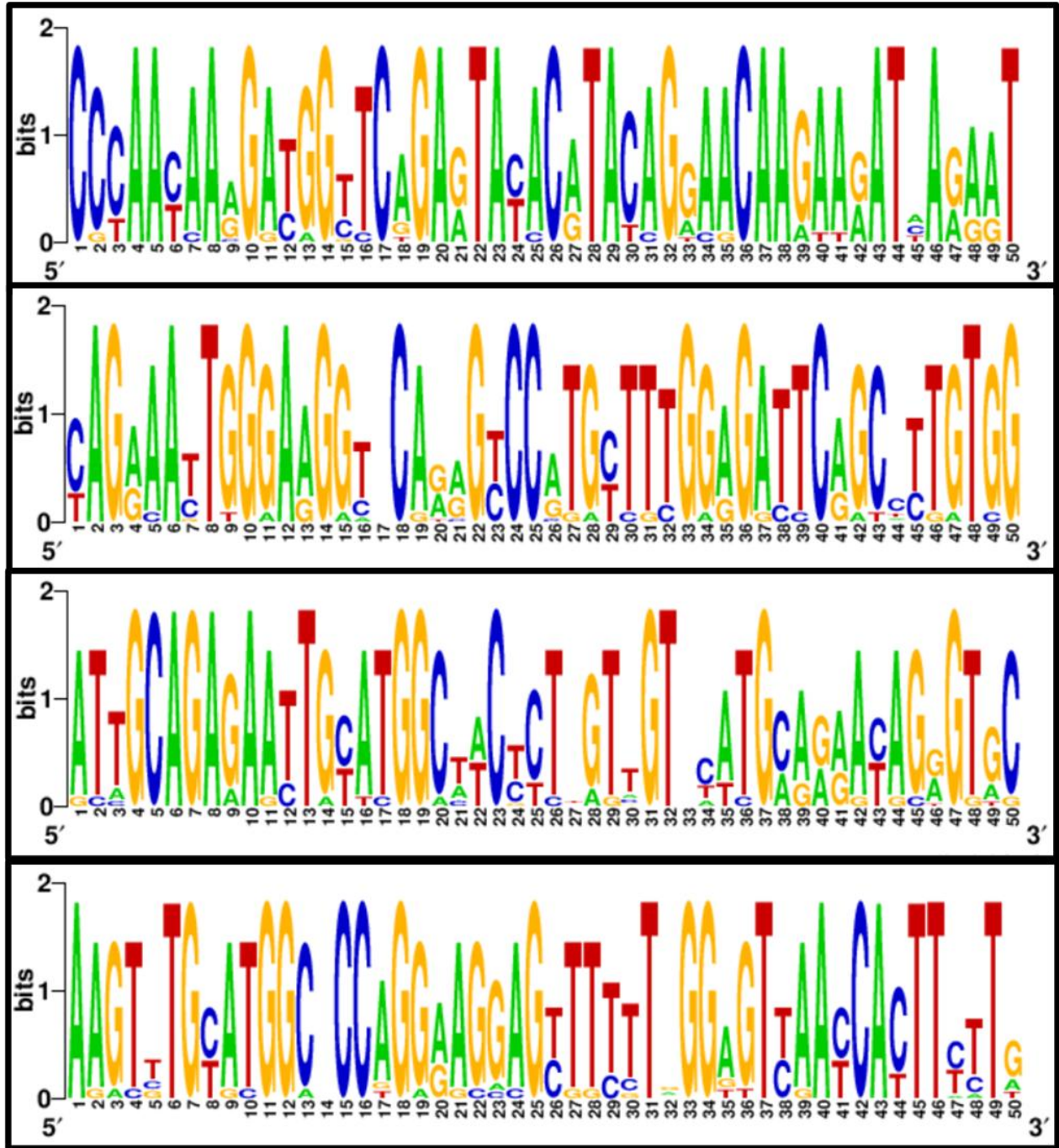
بينت النتائج ان هنالك 25922 متجاورة متداخلة تتشابه مع المنطقة الغير مشفرة (5'UTR) التي تقع في الطرف الخامس من القطعة الأولى لجينوم فايروس ذبول الباقلاء (BBWV) (شكل 14). وحققت المتجاورات المتداخلة المتجمعة الخاصة بهذا الفايروس المركز الثاني بنسبة بلغت 23,49 % من المجموع الكلي للمتجاورات المتداخلة لفايروسات النبات التي اكتشفت في حشرة الذبابة البيضاء. وتم تأكيد هذا التشخيص من خلال بناء الشجرة الوراثية التي أثبتت القرابة الوراثية بين التسلسل الموحد لجميع المتجاورات المتداخلة لهذا الفايروس والتي كانت بطول 569 نيوكليوتيدة مع سلالات عالمية مختلفة تعود للفايروس نفسه وكانت السلالات ذات الرموز MN216351.1 و MN216349.1 الأقرب لها (شكل 15). ولكن من جانب اخر اوضحت نتائج تحليل التباين الوراثي بين سلالة فايروس ذبول الباقلاء المحلية والسلالات العالمية المختارة عشوائياً وجود اختلاف واسع بينهم يتبين من خلال عدم التشابه في العديد من تسلسلات القواعد النايتروجينية حتى في المنطقة المحفوظة، التي لا تحدث فيها تغيرات عادةً كما هو واضح في الشكل (16).



شكل (14): المنطقة المغطاة بالمتجاورات المتداخلة لفايروس BBWV المرافق لحشرة الذبابة البيضاء. (أ) رسم تخطيطي للجينوم الكامل للفايروس (Carpino وآخرون، 2020) والمنطقة المشمولة بالتغطية والمشار إليها بالسهم الأحمر اللون، (ب) تغطية المتجاورات المتداخلة للمنطقة الغير مشفرة الطرف الخامس للـ RNA 1 من جينوم الفايروس.



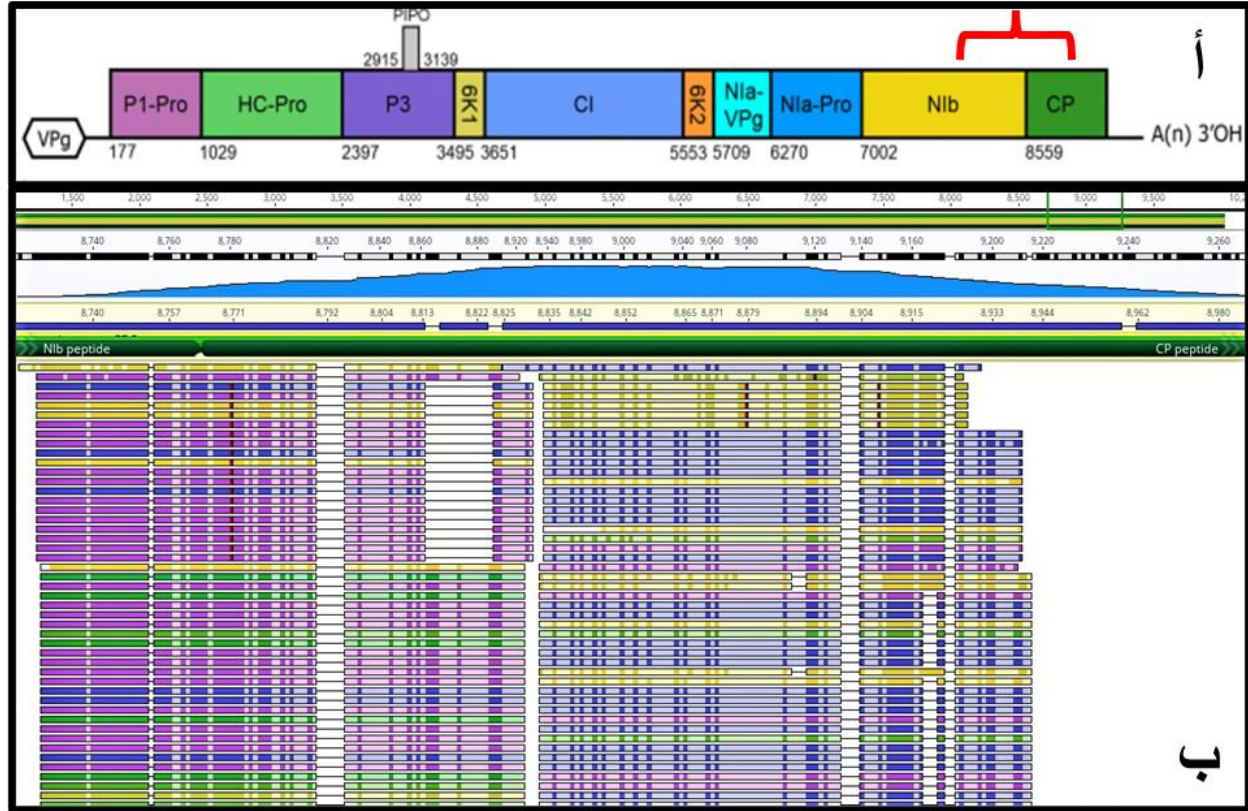
شكل (15): العلاقة الوراثية بين سلالة فايروس **BBWV** المحلية المرافقة لحشرة الذبابة البيضاء (المشار إليه بنقطة سوداء) والسلالات العالمية الأخرى التابعة للفايروس نفسه.



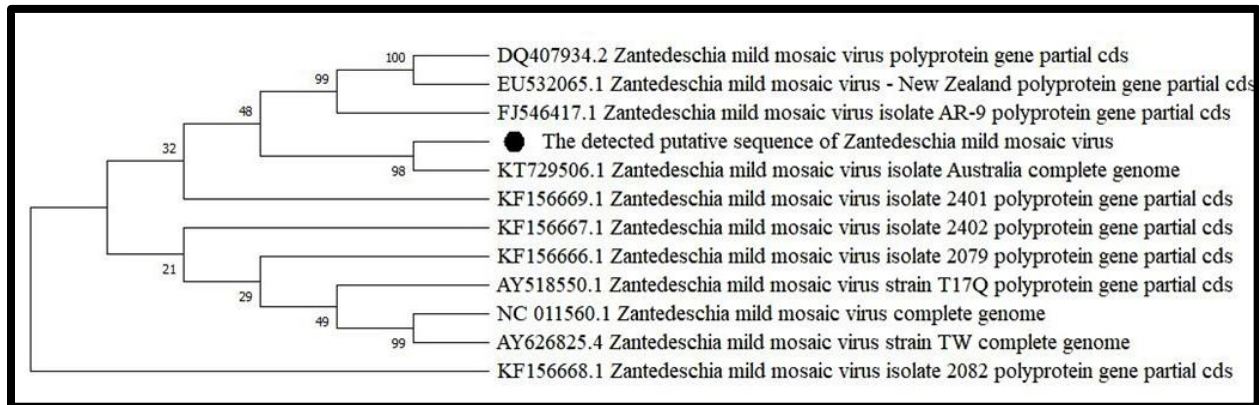
شكل (16): التباين الوراثي بين تسلسلات القواعد النايروجينية للسلسلة المحلية لفايروس BBWV المرافقة لحشرة الذبابة البيضاء والسلالات العالمية.

ثالثاً: فايروس *Zantedeschia mild mosaic virus* (ZaMMV)

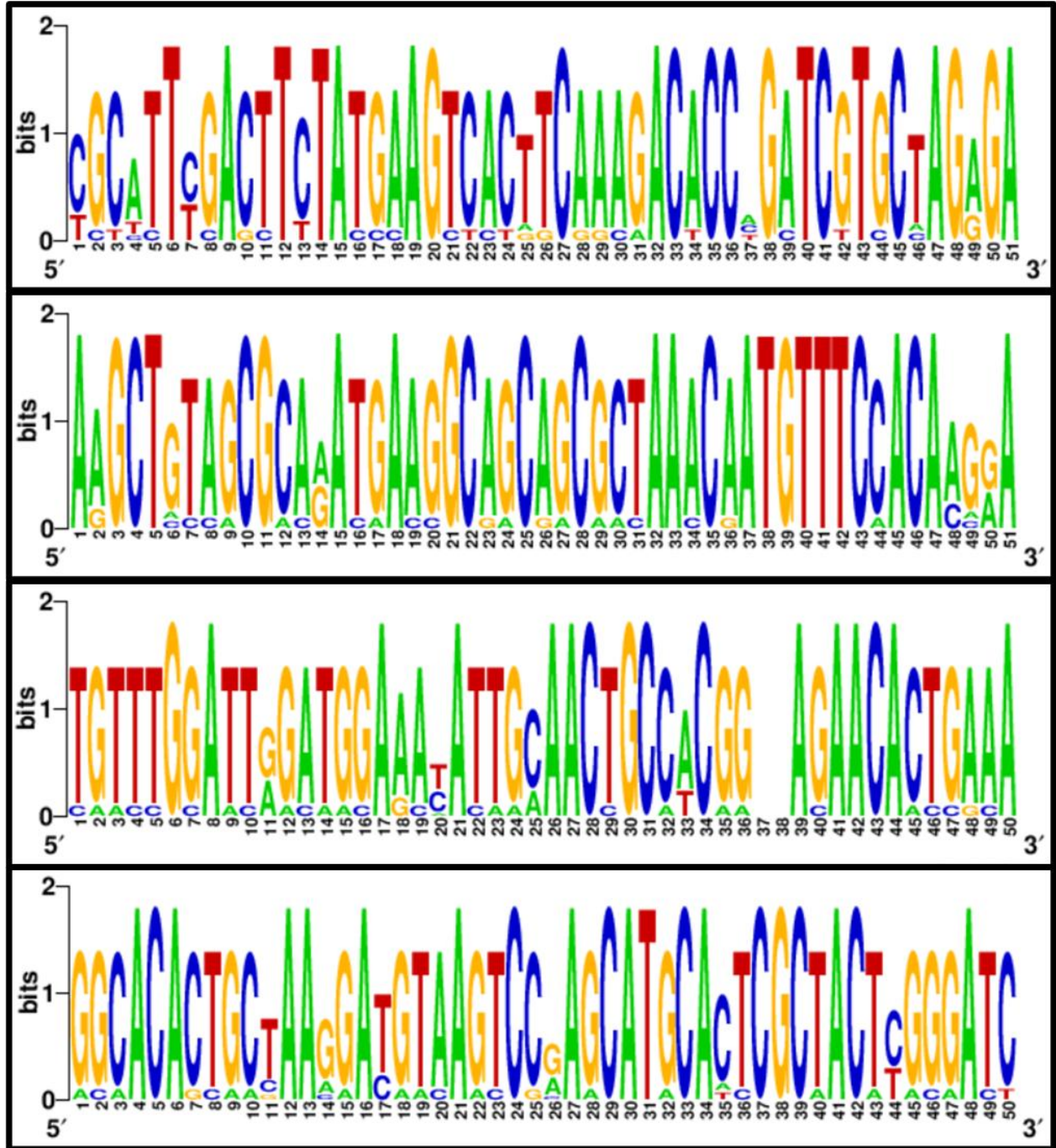
أظهرت النتائج أن فايروس الموزائيك المعتدل للكالا واحداً من أكثر ثلاثة فيروسات شيوعاً في عينات حشرة *B.tabaci* المدروسة، إذ كان عدد المتجاورات المتداخلة التابعة له يمثل ثالث أكبر عدد مكتشف حيث بلغ 20099 أي بنسبة 18,21% وكانت هذه المتجاورات تتشابه مع جينات Coat Protein (CP) وNodulin-26 like Intrinsic Protein (NIP) التي تتواجد بشكل متجاور في جينوم الفايروس (شكل 17). ان هذا التشخيص أكد عن طريق اثبات العلاقة الوراثية بين التسلسل الموحد لجميع المتجاورات المتداخلة لهذا الفايروس والتي بلغت 268 نيوكليوتيدة مع سلالات عالمية للفايروس نفسه ابرزها ذات الرمز KT729506.1 (شكل 18). وتبين من نتائج تحليل التباين الوراثي بين سلالة الفايروس المحلية والسلالات العالمية ان هنالك نسبة تباين كبيرة بينهم يمكن ملاحظتها من خلال عدم التشابه في العديد من تسلسلات القواعد النايتروجينية في المنطقة المحافظة التابعة للسلالات المدروسة (شكل 19).



شكل (17): المنطقة المغطاة بالمتجاورات المتداخلة لفايروس *ZaMMV* المرافق لحشرة الذبابة البيضاء. (أ) رسم تخطيطي للجينوم الكامل النموذجي لجنس الفايروس (Mosquera-Yuqui وآخرون، 2020) والمنطقة المشمولة بالتغطية والمشار إليها بالقوس المعرج الأحمر اللون، (ب) تغطية المتجاورات المتداخلة لجينات CP و Nib من جينوم الفايروس.



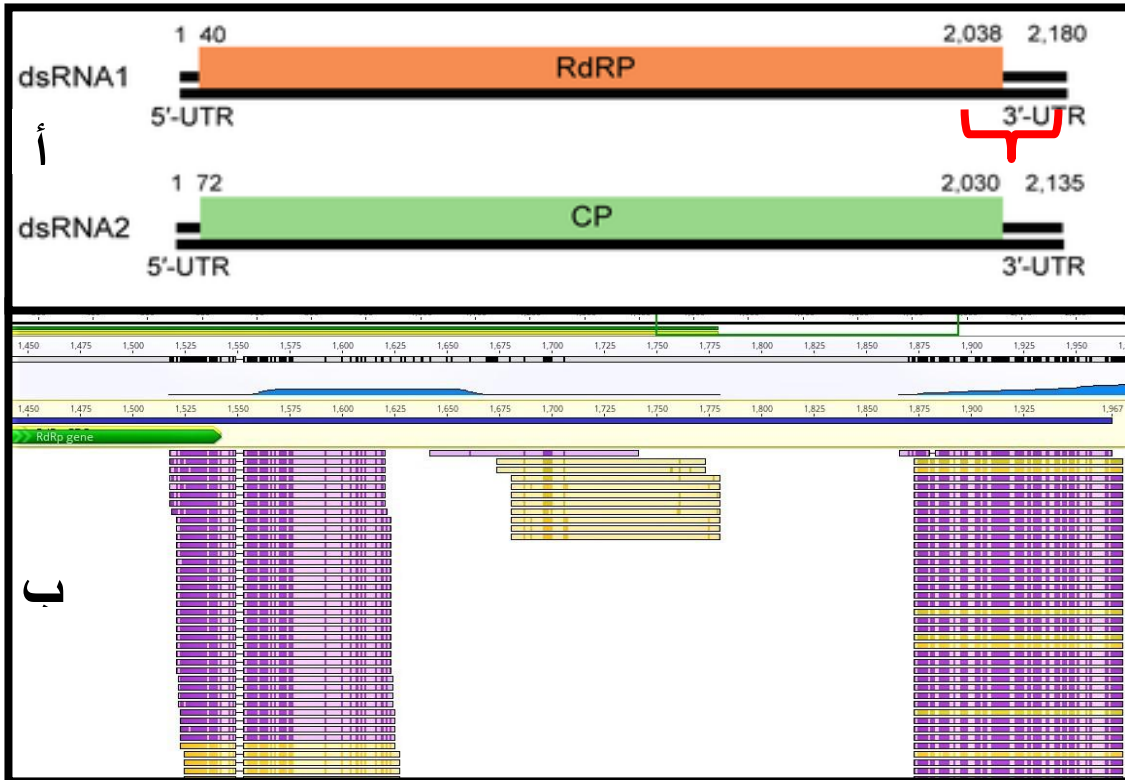
شكل (18): القرابة الوراثية بين سلالة فايروس *ZaMMV* المرافقة لحشرة الذبابة البيضاء (مؤشرة بنقطة سوداء) والسلالات العالمية الأخرى التابعة للفايروس نفسه.



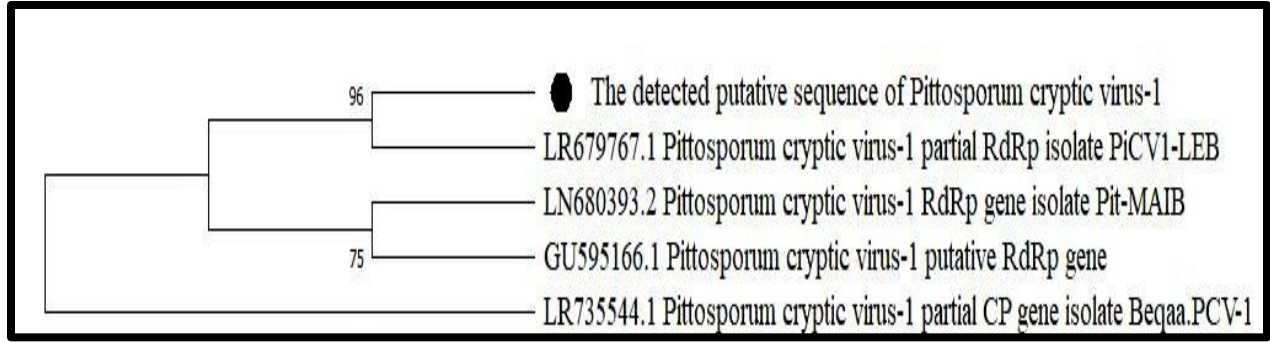
شكل (19): التباين الوراثي بين تسلسلات القواعد النايروجينية للسلسلة المحلية لفايروس ZaMMV المرافقة لحشرة الذبابة البيضاء مع السلالات العالمية.

رابعاً: فايروس 1- *Pittosporum cryptic virus-1* (PiCV1)

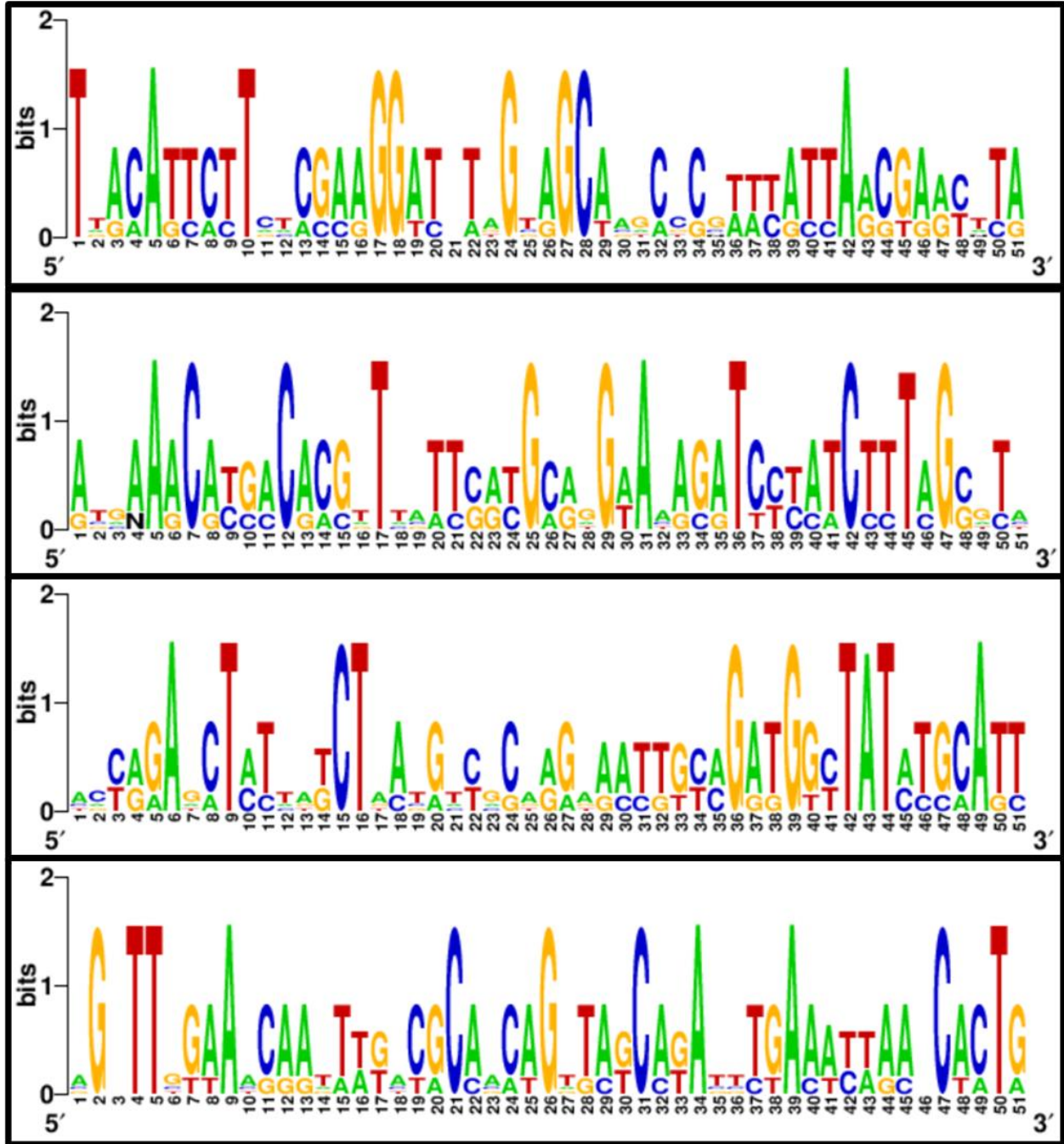
أوضحت النتائج أن هذا الفايروس احتل المرتبة الرابعة بين الفايروسات المكتشفة في عينات حشرة الذبابة البيضاء *B.tabaci* المدروسة، اذ بلغت عدد المتجاورات المتداخلة التابعة له 9254 و بنسبة 8,38 % وكانت هذه المتجاورات تتشابه جزئياً مع جين RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) المسؤول عن انتاج انزيم التكاثر RNA replicase بالإضافة الى المنطقة الغير المشفرة التي تقع في الطرف الثالث 3' UTR (شكل 20). واثبت تحليل العلاقة الوراثية بين التسلسل الموحد للمتجاورات المتداخلة المحددة لهذا الفايروس والتي كانت بطول 1369 نيوكليوتيدة مع السلالات المختلفة العائدة للفايروس نفسه تشخيص هذا الفايروس اذ كانت هنالك قرابةً وراثيةً واضحةً خصوصاً مع السلالة ذات الرمز LR679767.1 (شكل 21). وتبين من نتائج تحليل التباين الوراثي بين سلالة الفايروس المحلية والسلالات العالمية وجود تباين بينهم يمكن ملاحظته في الشكل (22) حيث كان هنالك العديد من القواعد النايتروجينية المتباينة في جميع المناطق من ضمنها المنطقة المحفوظة.



شكل (20): المنطقة المغطاة بالمتجاورات المتداخلة لفايروس PiCV1 المرافق لحشرة الذبابة البيضاء. (أ) رسم تخطيطي للجينوم الكامل النموذجي للعائلة التي ينتمي اليها الفايروس (Zhan واخرون، 2019) والمنطقة المشمولة بالتغطية والمشار إليها بالقوس المعرج الأحمر اللون، (ب) تغطية المتجاورات المتداخلة لجين RdRp والمنطقة الغير مشفرة 3' UTR في الطرف الثالث من القطعة الأولى من dsRNA من جينوم الفايروس.



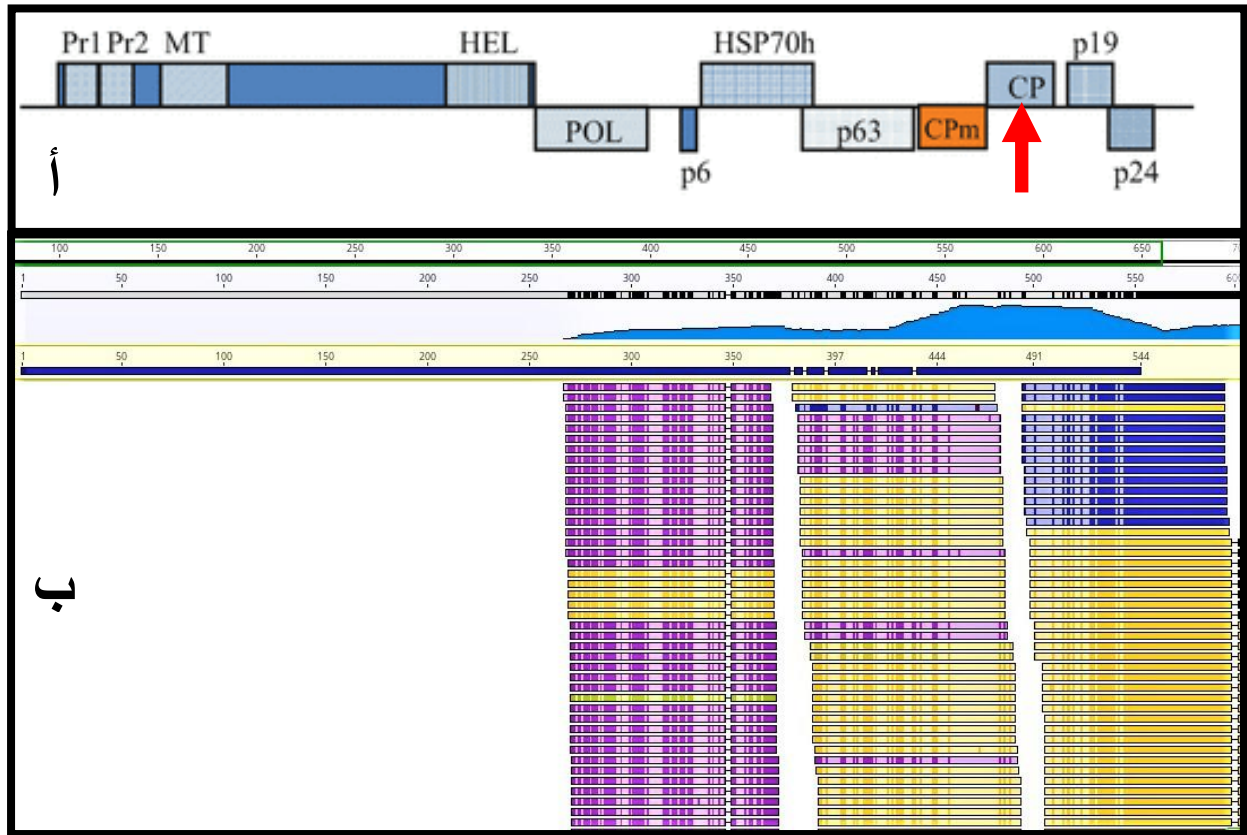
شكل (21): القرابة الوراثية بين سلالة لفايروس **PiCV1** المحلية المرافقة لحشرة الذبابة البيضاء (مؤشرة بنقطة سوداء) والسلالات العالمية الأخرى التابعة للفايروس نفسه.



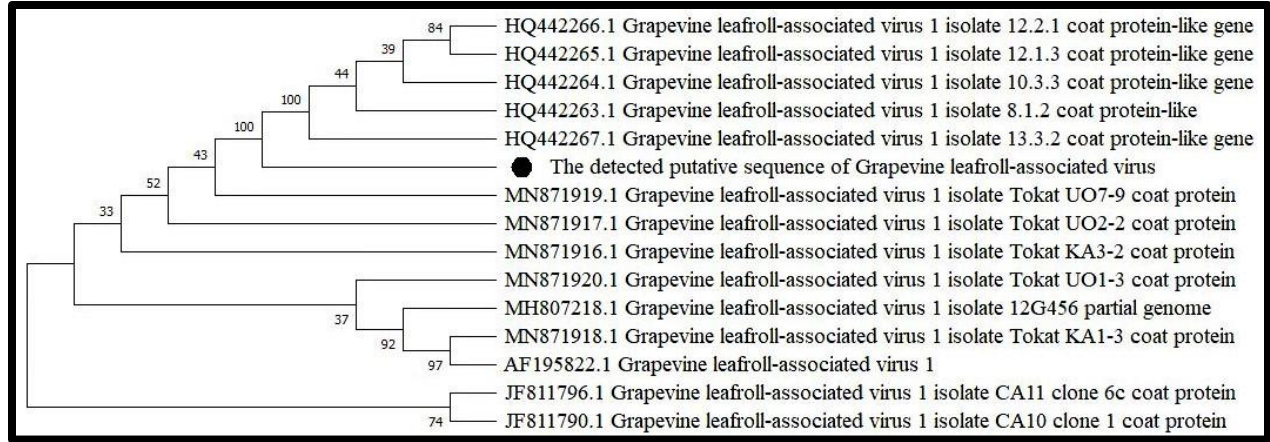
شكل (22): التباين الوراثي بين تسلسلات القواعد النايروجينية للسلالة المحلية PiCV1 المرافقة لحشرة الذبابة البيضاء مع السلالات العالمية.

خامساً: فايروس *Grapevine leafroll-associated virus (GLRaV)*

تم أيضاً تشخيص فايروس GLRaV في عينات حشرة الذبابة البيضاء عن طريق ايجاد 4671 متجاورة متداخلة ذات تشابه كبير مع الطرف الثالث من جين الغلاف البروتيني Coat protein gene (شكل 23) علماً أن نسبة المتجاورات المتداخلة الخاصة به كانت 4,23% وقد تم تجميع هذه المتجاورات الى تسلسل متفق عليه بلغ طوله 937 نيوكليوتيدة. وقد توافق التحليل الوراثي مع هذا التشخيص من خلال وضع الفايروس في الفرع نفسه ومشاركته النسب نفسها مع العديد من السلالات الأخرى التي تعود للفايروس نفسه بشكل رئيس تلك التي تحتوي على الرموز HQ442263.1 و HQ442264.1 و HQ442265.1، HQ442266.1 و HQ442267.1 (شكل 24).

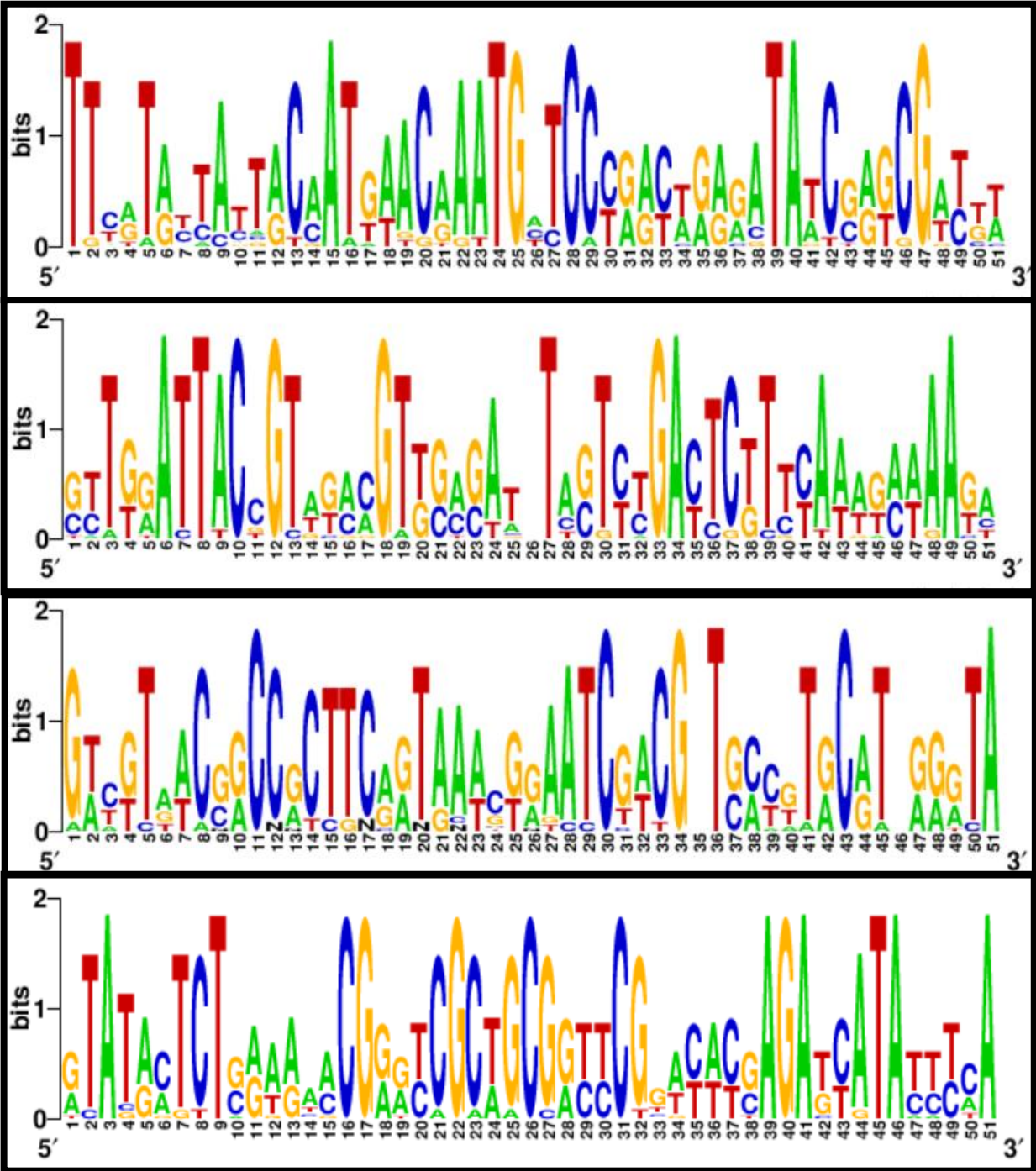


شكل (23): المنطقة المغطاة بالمتجاورات المتداخلة لفايروس GLRaV المرافق لحشرة الذبابة البيضاء. (أ) رسم تخطيطي للجينوم الكامل النموذجي للعائلة التي ينتمي إليها الفايروس (Jelkmann وآخرون، 2012) والمنطقة المشمولة بالتغطية والمشار إليها بالسهم احمر اللون، (ب) تغطية المتجاورات المتداخلة لجين الغلاف البروتيني من جينوم الفايروس.



شكل (24): العلاقة الوراثية بين سلالة فايروس GLRaV المحلية المرافقة لحشرة الذبابة البيضاء (المشار إليه بنقطة سوداء) والسلالات العالمية الأخرى التابعة للفايروس نفسه.

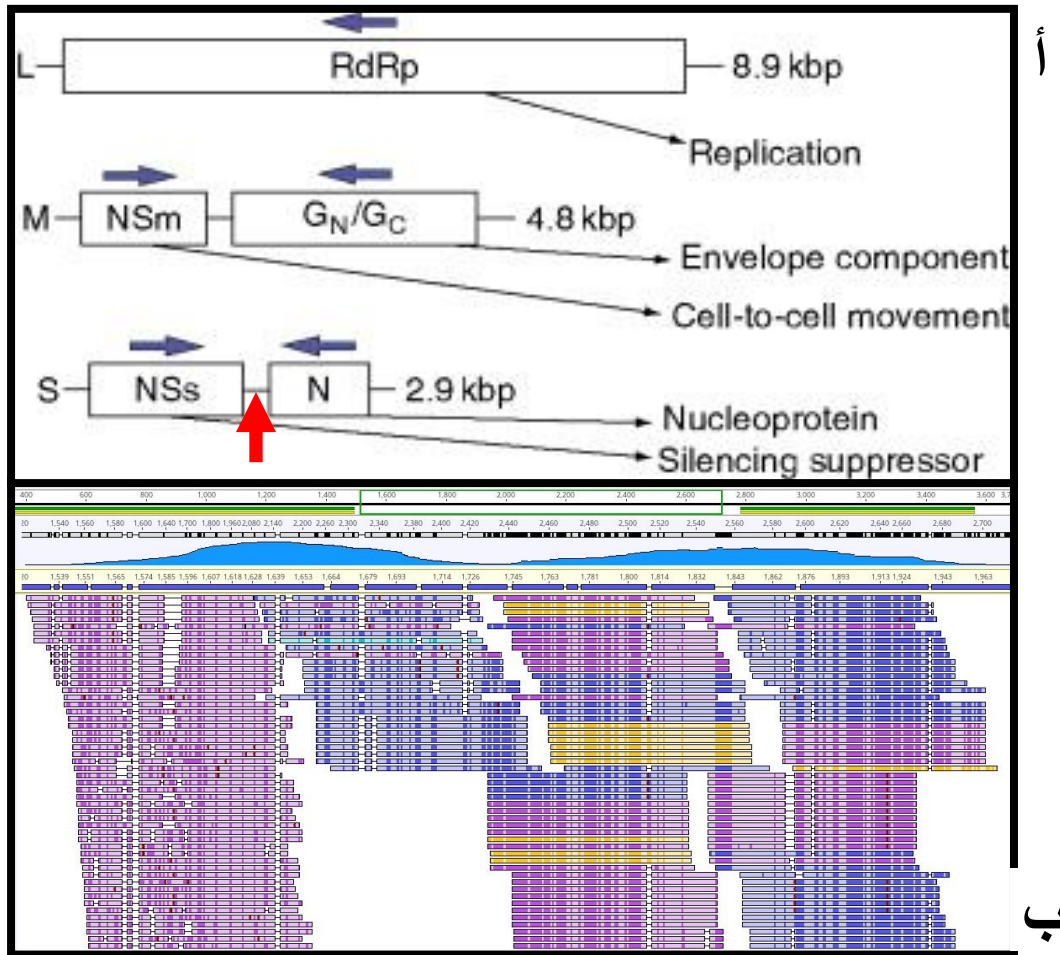
وبرغم ذلك اظهرت نتائج تحليل التباين الوراثي بين السلالة المحلية لهذا الفايروس مع العديد من السلالات العالمية وجود اختلاف واسع بينهم يتضح من خلال عدم التشابه في العديد من تسلسلات القواعد النايتروجينية التابعة لهم (شكل 25).



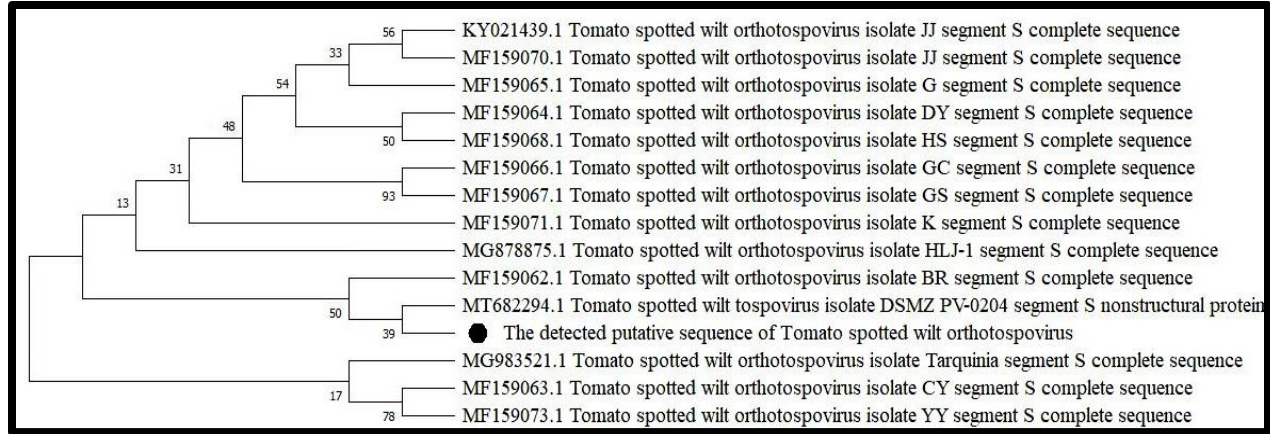
شكل (25): التباين الوراثي بين تسلسلات القواعد النايروجينية للسلالة المحلية لفايروس GLRaV المرافق لحشرة الذبابة البيضاء مع السلالات العالمية.

سادساً: فايروس *Tomato spotted wilt orthospovirus* (TSWOV)

تبين أيضاً من نتائج التحليل وجود فايروس *Tomato spotted wilt orthospovirus* في عينات حشرة الذبابة البيضاء *B.tabaci* المدروسة، وذلك من خلال تحديد المتجاورات المتداخلة التابعة له التي بلغت 1283 و بنسبة 1,16% وكانت هذه المتجاورات تتشابه مع المنطقة الداخلية الغير مشفرة التي تقع بين الجين البروتيني الغير تركيبى Non-structural protein gene وجين الغلاف النووي البروتيني nucleocapsid protein gene علماً ان طول التسلسل المتفق عليه المجمع من هذه المتداخلات بلغ 437 نيوكليوتيدة (26). ان هذا التشخيص تم تأكيده من خلال اثبات العلاقة الوراثية بين السلالة المحلية من هذا الفايروس مع العديد من السلالات العالمية وبالذات السلسلة ذات الرمز MT682294.1 (شكل 27).

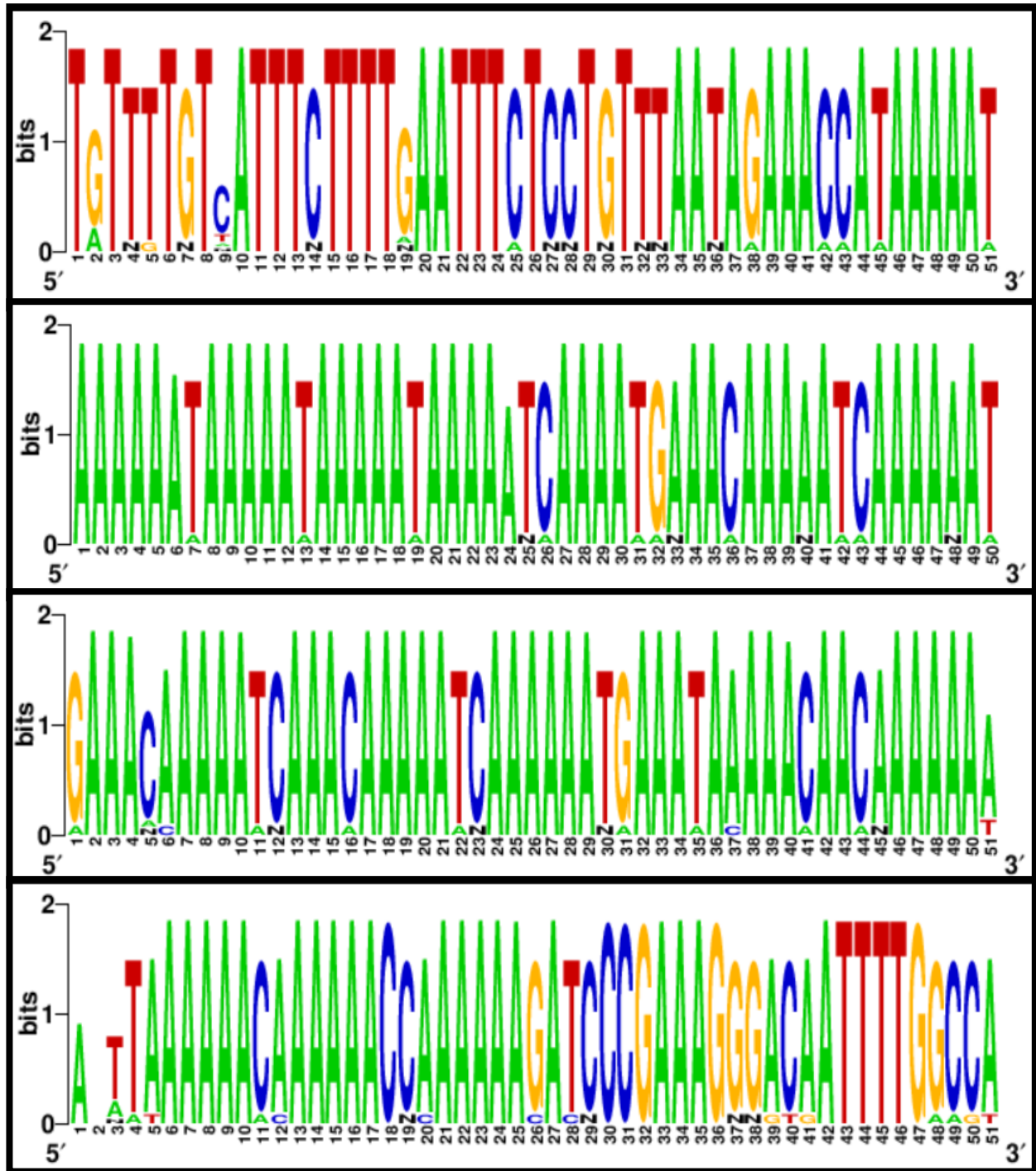


شكل (26): المنطقة المغطاة بالمتجاورات المتداخلة لفايروس TSWOV المرافق لحشرة الذبابة البيضاء. (أ) رسم تخطيطي للجينوم الكامل للفايروس (Peralta, 2017) والمنطقة المشمولة بالتغطية والمشار إليها بالسهم احمر اللون، (ب) تغطية المتجاورات المتداخلة لجين الغلاف البروتيني من جينوم الفايروس.



شكل (27): العلاقة الوراثية بين سلالة فايروس TSWOV المحلية المرافقة لحشرة الذبابة البيضاء (المشار إليه بنقطة سوداء) والسلالات العالمية الأخرى التابعة للفايروس نفسه.

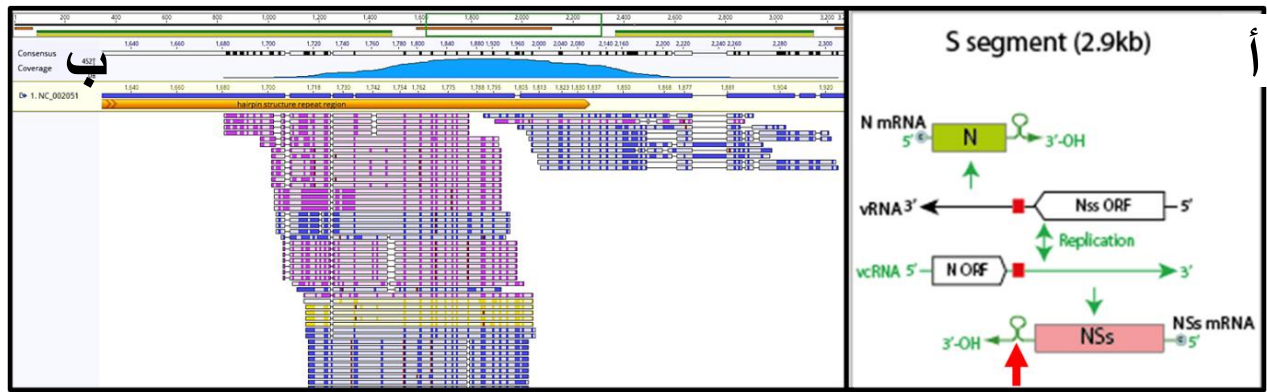
لقد أظهرت نتائج دراسة التباين الوراثي بين سلالة فايروس *Tomato spotted wilt orthotospovirus* المحلية والسلالات العالمية أن نسبة التشابه هي أكثر من الاختلاف إذ يمكننا أن نلاحظ في الشكل (28) أن أغلب القواعد النايتروجينية متشابهة بين السلالات جميعها مما يشير إلى اتساع انتشار هذا الفايروس وقدرته المحافظة على تركيبة الوراثي باختلاف المناطق والدول التي يتواجد فيها.



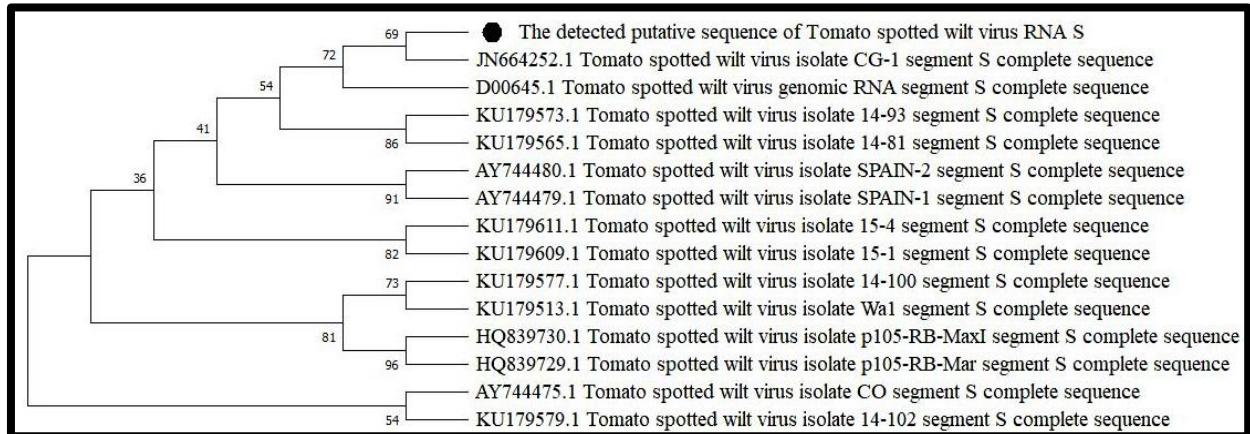
شكل (28): التشابه والتباين الوراثي بين تسلسلات القواعد النايروجينية للسلالة المحلية لفايروس TSWOV المرافقة لحشرة الذبابة البيضاء مع السلالات العالمية.

سابعاً: فايروس *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)

آخر فايروس مشخص في عينات حشرة الذبابة البيضاء كان فايروس TSWV وذلك من خلال اكتشاف 464 من المتجاورات المتداخلة التابعة له والتي كانت بنسبة 0,42% بين مجتمع فايروسات النبات المشخصة. لقد كانت هذه المتجاورات المتداخلة تشبه في الغالب المنطقة المكررة لبنية دبوس الشعر Hairpin structure repeat region التي تتواجد في القطعة S من جينوم الفيروس (29). لقد بلغ طول التسلسل المتفق عليه 261 نيوكليوتيدة والذي اظهر تشابهاً عالياً مع العديد من سلالات فايروس TSWV العالمية ولكن كانت اقرب سلالة هي ذات الرمز JN664252.1 (شكل 30).

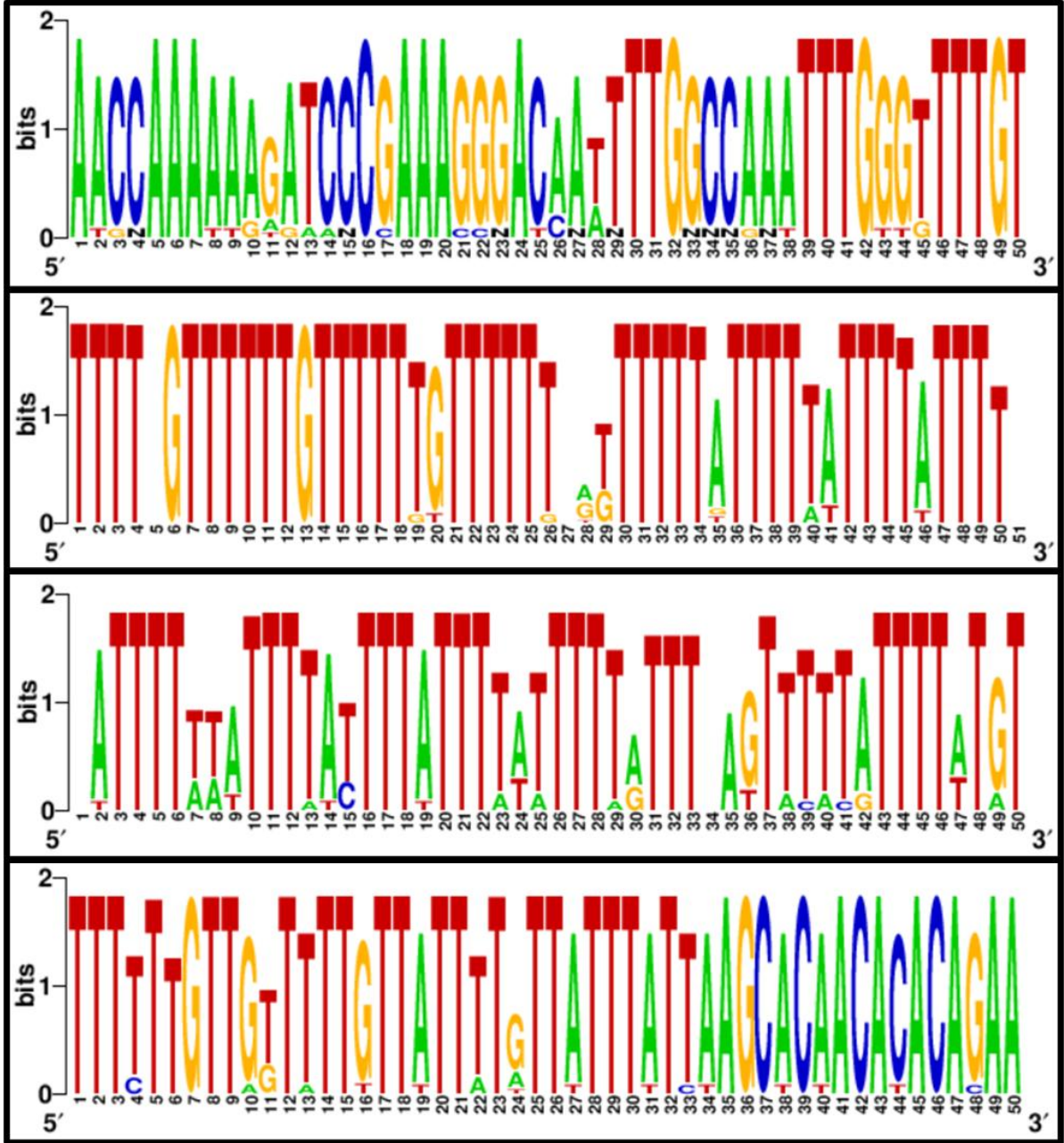


شكل (29): المنطقة المغطاة بالمتجاورات المتداخلة لفايروس TSWV المرافق لحشرة الذبابة البيضاء. (أ) رسم تخطيطي للجينوم الكامل للفايروس (Peralta، 2017) والمنطقة المشمولة بالتغطية والمشار إليها بالسهم احمر اللون، (ب) تغطية المتجاورات المتداخلة لجين الغلاف البروتيني من جينوم الفيروس.



شكل (30): العلاقة الوراثية بين سلالة فايروس TSWV المحلية المرافقة لحشرة الذبابة البيضاء (المشار إليه بنقطة سوداء) والسلالات العالمية الأخرى التابعة للفايروس نفسه.

كذلك أظهرت نتائج دراسة التباين الوراثي بين السلالة المحلية لهذا الفيروس مع السلالات العالمية ان نسبة التشابه كانت عالية نسبياً حيث يمكننا ملاحظة ذلك في الشكل (31) الذي يبين ان هنالك نسبة عالية من القواعد النايروجينية كانت متشابهة بين السلالات جميعها.



شكل (31): التشابه والتباين الوراثي بين تسلسلات القواعد النايروجينية للسلالة المحلية لفيروس TSWV المرافقة لحشرة الذبابة البيضاء مع السلالات العالمية.

4-2-2: التشخيص الجزيئي لحشرة الذبابة البيضاء *Bemisia tabaci*

أظهرت نتائج التحليل باستعمال برنامج MITOS المتخصص بتحديد وتفسير أو شرح جينومات مايتوكوندريا أعضاء مجموعة الـ Metazoan من المملكة الحيوانية ان الحشرة المشمولة بالدراسة هي ل *B. tabaci* (شكل 32) ولقد تم الحصول على مسودة الجينوم الأولية (Draft genome) لمايتوكوندريا هذه الحشرة من خلال استعمال بيانات تسلسل النسخ Transcriptome حيث كانت عدد المقروءات المشابهة لجينوم المايتوكوندريا المرجعي 6,719,751 من بين 61,183,994 أي بنسبة 10,98% وبمعدل عمق التغطية (Average coverage depth) بلغ 43,856. وقد كانت نسب القواعد النايتروجينية متباينة حيث بلغت للادينين (A) 28,90% ، السايروسين (C) 13,96% ، الكوانين (G) 14,89% ، الثايمين (T) 40,02% ونسبة قليلة جداً بلغت 2,22% للقواعد النايتروجينية الغير محددة (N). ويمكننا ملاحظة التحيز الواضح للقاعدتين T + A التي بلغ مجموع نسبهما 68,92%. لقد بلغ طول تسلسل المايتوكوندريا للذبابة البيضاء *B. tabaci* المجمعة في هذه الدراسة 15,711 زوج قاعدة نايتروجينية تحتوي على 8 جينات مشفرة للبروتينات Protein-coding genes (PCGs) والتي شملت (Cox1) cytochrome c oxidase subunit I، (Cox2) cytochrome c oxidase subunit II، (Cob) cytochrome b، (Cox3) cytochrome c oxidase subunit III، (Nad2) dehydrogenase subunit 2، (Nad4) NADH dehydrogenase subunit 4، (Nad4L) NADH dehydrogenase subunit 4L و (Nad5) NADH dehydrogenase subunit 5. جدير بالإشارة الى ان معظم هذه الجينات كانت مكررة أي موجود باكثر من نسخة في البيانات التي تم تحليلها. كذلك كان هنالك جينين للحامض النووي الرايبوسومي Ribosomal RNA genes هما rRNA S و rRNA L وجينين اخرين من الحامض النووي الناقل Transfer RNA و هما tRNAY و (tac) و (aac) tRNA N.

MITOS WebServer

Downloads:

[BED file](#)
[GFF file](#)
[TBL file](#)
[Gene Order file](#)
[FAS file](#)
[FAA file](#)

Raw data:

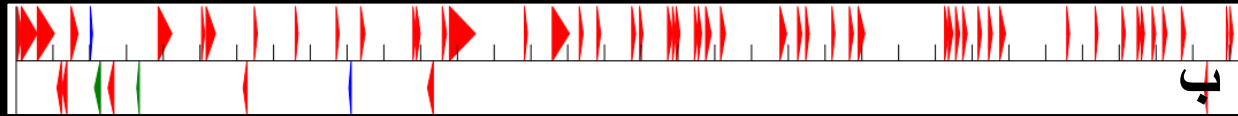
[protein_plot](#)
[ncRNA_plot](#)
[raw_data](#)

Misc:

[Job settings](#)

Jobid: Bemisia tabaci mitochondrial genome (Bemisia)

Name	Start	Stop	Strand	Length	Structure
cox1-0_b	26	160	+	135	
cox1-0_c	139	573	+	435	
cox2-0	576	1040	+	465	
nad5	1112	1234	-	123	
nad4_b	1243	1380	-	138	
cob-0	1492	1683	+	192	
trnY(tac)	2018	2076	+	59	svg ps
rrnL	2132	2290	-	159	svg ps
cox3-0	2499	2657	-	159	
rrnS	3282	3349	-	68	svg ps
cox2-1	3863	4237	+	375	
cob-8	5046	5126	+	81	
nad2-0_a	5167	5421	+	255	
cox3-1	6176	6280	-	105	
cox2-11	6475	6561	+	87	
cox2-10	7595	7669	+	75	
cob-10	8703	8786	+	84	
trnN(aac)	9051	9111	-	61	svg ps
cox2-5_a	9370	9489	+	120	
cox2-6_b	10792	10887	+	96	
cob-9	10883	10990	+	108	
nad4_a	11190	11345	-	156	
cox2-6_a	11591	11704	+	114	
nad2-1	11784	12491	+	708	
cox2-7_b	13823	13903	+	81	
nad2-0_b	14582	15046	+	465	
cob-2	15316	15420	+	105	
cox2-8	15796	15897	+	102	
cox2-4_a	16744	16848	+	105	
cox2-7_a	16958	17047	+	90	
cob-3	17718	17849	+	132	
cob-11	17852	17950	+	99	
cox2-3_b	17951	18055	+	105	



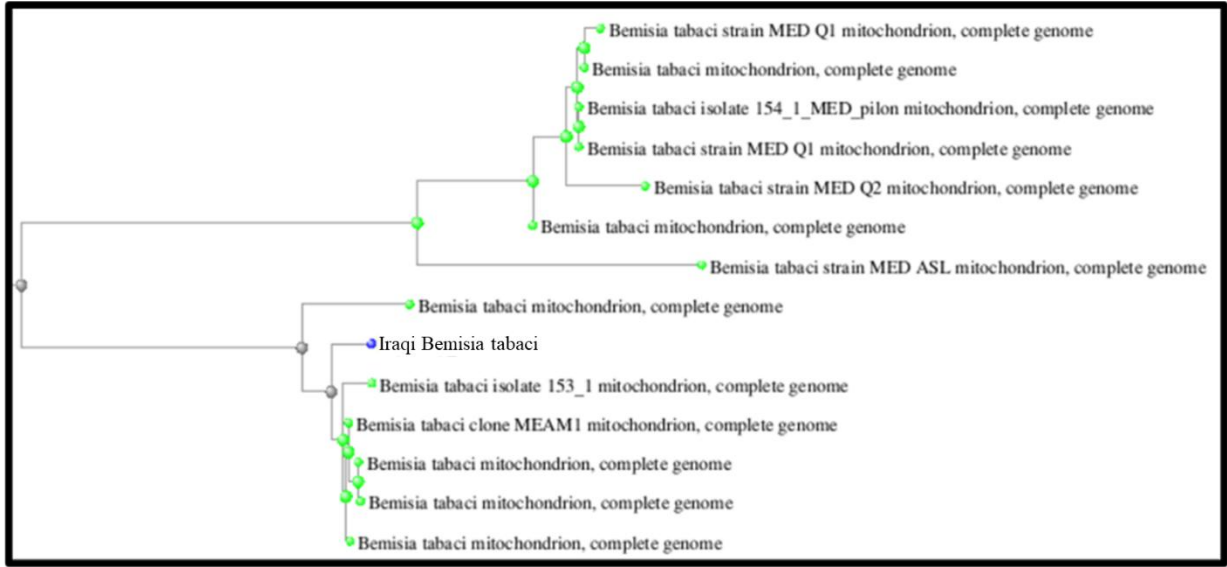
شكل (32): المسودة الأولية لجينوم الميتوكوندريا لحشرة الذبابة البيضاء *B. tabaci* المدروسة. (أ) جدول الجينات التي تم تحديدها في مسودة جينوم المايوتوكوندريا لحشرة الذبابة البيضاء، (ب) شرح توضيحي لجينوم الميتوكوندريا الجينات المشفرة للبروتينات ذات لون احمر ، الجينات المشفرة للحمض النووي الرايبوسومي ذات لون ازرق، و المشفرة للحمض النووي الناقل ذات لون اخضر. أن هذا الشكل تم انشاءه بواسطة برنامج MITOS (Bernt واخرون،2013).

لقد أظهر تحليل مقارنة التشابه (جدول 7) الذي تضمن مقارنة التسلسل الكامل لمسودة الجينوم الأولية لحشرة الذبابة البيضاء التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة مع ما متوفر من جينومات للمايوتوكوندريا حشرة الذبابة البيضاء في بنك الجينات GenBank ان الحشرة هي نوع *B. tabaci* MEAM1 وذلك من خلال تسجيل اعلى مجموع تشابه بلغ 29531 و ونسبة تشابه بلغت 99,85% مع السلالة العالمية *Bemisia tabaci* clone MEAM1 وهذه النتيجة تم تاكيدها في تحليل و النشوء والتطور الذي أوضح مدى العلاقة الوراثية القوية مع السلالات التي تعود الى النوع أعلاه من خلال تجمعها في فرع واحد في حين كانت السلالات التي تعود الى النوع *Bemisia tabaci* strain MED في فرع اخر (شكل 33).

تعد مسودة جينوم المايكوبلازما لحشرة الذبابة البيضاء التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة هي الأولى على مستوى العراق إذ كانت هنالك العديد من الدراسات السابقة حول التشخيص الجزيئي لحشرة الذبابة البيضاء في العراق تقتصر على استعمال الواسمات الجينية تحديداً جينات cytochrome C oxidase subunit (Kareem، 2018؛ الخزاعي، 2021). كما اكدت نتائج هذه الدراسة انتماء الحشرة المدروسة الى النوع المعقد من ذبابة القطن البيضاء *B. tabaci* تحديداً للمجموعة الجينية Middle East-Asia Minor1 وهذا يتوافق مع ما وجدته كل من Kareem وآخرون (2020) والخزاعي (2021) مع العلم أن هذا النوع يعتبره البعض انه الأكثر انتشاراً على مستوى العالم (Li وآخرون، 2005؛ Mugerwa وآخرون، 2018). وتعد هذه النتيجة ذات أهمية في تحديد الأنواع الجينية التابعة لحشرة الذبابة البيضاء المنتشرة في البيئة العراقية من اجل إيجاد الوسائل الكفوءة في مقاومتها مستقبلاً.

جدول (7): مقارنة مسودة جينوم حشرة الذبابة البيضاء المدروسة مع السلالات العالمية للحشرة نفسها

رمز السلالة	نسبة التشابه (%)	تغطية التسلسل (%)	مجموع درجات التشابه	اسم النوع
*	*	*	*	<i>Iraqi Bemisia tabaci</i>
KR559508.1	99.85	92	29531	<i>Bemisia tabaci clone MEAM1</i>
KY951450.1	99.85	92	29051	<i>Bemisia tabaci</i>
KY951452.1	99.85	92	29046	<i>Bemisia tabaci</i>
KY951449.1	99.85	92	28247	<i>Bemisia tabaci</i>
MH186145.1	99.85	92	26992	<i>Bemisia tabaci isolate 153_1</i>
KU877168.1	98.84	92	25616	<i>Bemisia tabaci</i>
MH205754.1	96.93	73	21209	<i>Bemisia tabaci strain MED ASL</i>
MH205752.1	97.08	71	21132	<i>Bemisia tabaci strain MED Q1</i>
MH047295.1	97.08	70	21009	<i>Bemisia tabaci isolate154_1_MED</i>
KY951447.1	97.22	70	21004	<i>Bemisia tabaci</i>
MH714535.1	97.22	70	20946	<i>Bemisia tabaci strain MED Q1</i>
MH205753.1	96.78	68	20210	<i>Bemisia tabaci strain MED Q2</i>
JQ906700.1	97.08	66	20085	<i>Bemisia tabaci</i>



شكل (33): العلاقة الوراثية بين حشرة الذبابة البيضاء *B.tabaci* المحلية (المشار إليه بنقطة زرقاء) والسلالات العالمية الأخرى التابعة للحشرة نفسها. لقد تم انشاء هذه الشجرة الوراثية باستعمال برنامج BLAST التابع الى المركز الدولي لمعلومات التقانة الحيوية National Center for Biotechnology Information.

4-2-3: التشخيص الجزيئي لفايروسات النبات المرافقة لحشرة قافزة او نطاظ الأوراق

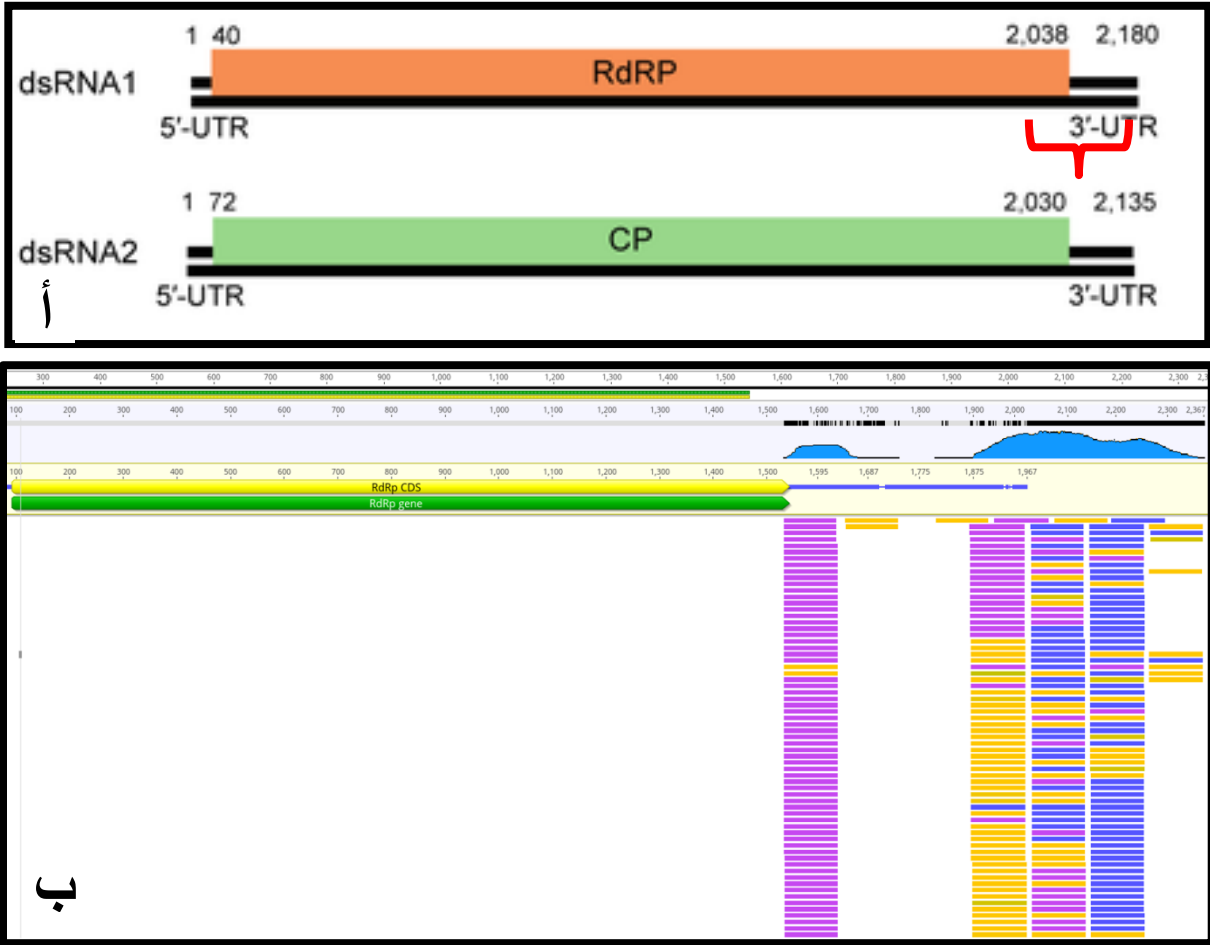
بلغ عدد سلاسل المقروءات المزدوجة النهايات التي تم الحصول عليها من عينات حشرة قافزة الاوراق 61,396,870 وبطول 100 نيوكليوتيدة لكل سلسلة والتي تم بناءها عن طريق تحديد تسلسل مكتبات ال-mRNA من اجل الحصول على بيانات ال-Transcriptome الخاصة بهذه الحشرة المدروسة. اذ تم التأكد من جودة المقروءات بعد فحصها ببرنامج FastQC وتبين أنها أيضاً ذات جودة عالية اذ بلغ معدل الجودة لكل قاعدة نايتروجينية في كل سلسلة مقروءة 36 درجة وهذا المعدل يعتبر جيد حسب مقياس جودة القراءات المعروف بـ Phred quality score و يعد ضمن المعدلات الموصى بها التي تستعمل في هذا النوع من الدراسات (Korpelainen وآخرون، 2015).

وتم انتاج العديد من المتجاورات المتداخلة (Contigs) بواسطة برنامج SPade حيث بلغ عددها 293,590 متجاورة والتي أظهرت نتائج المقارنة مع تسلسلات جينومات فايروسات النبات العالمية وجود عدد من الفايروسات المرافقة لحشرة قافزة الأوراق وذلك من خلال وجود نسبة تشابه مع العديد من تسلسلات القواعد النايتروجينية التابعة للعديد من فايروسات النبات. وطبقت الشروط في السابق نفسها في تحليل بيانات حشرة الذبابة البيضاء من حيث وجوب تجاوز عدد المتجاورات المتداخلة عدد الـ 400 المشابه لتسلسل الفايروس من اجل اعتبار تشخيصه موثقاً في هذه الدراسة اما بالنسبة لبقية المتجاورات

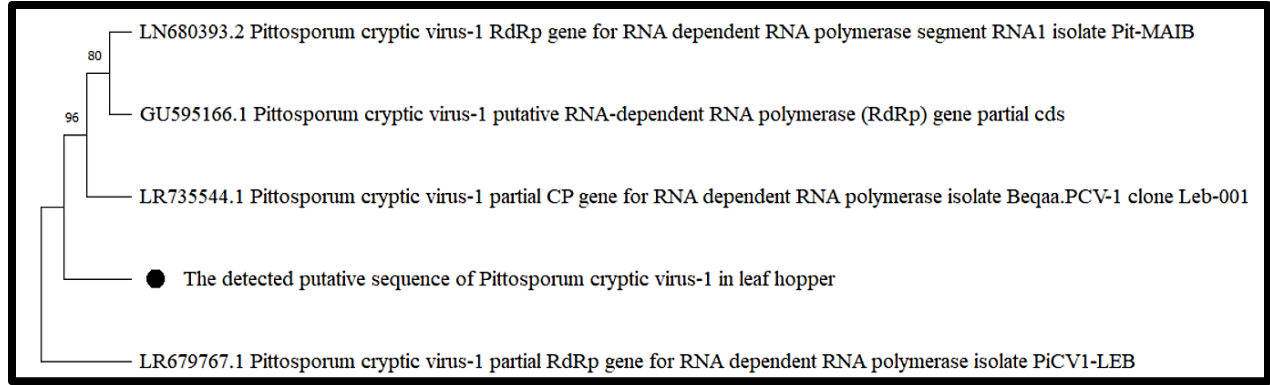
المتداخلة الأقل وان كانت مشابه لأحد تسلسلات الفايروسات فقد تم اهمالها وفيما يلي وصف للفايروسين اللذان تم تشخيصهما في عينات حشرة قفاز او نطاط الاوراق:

أولاً: فايروس *Pittosporum cryptic virus-1* (PiCV1)

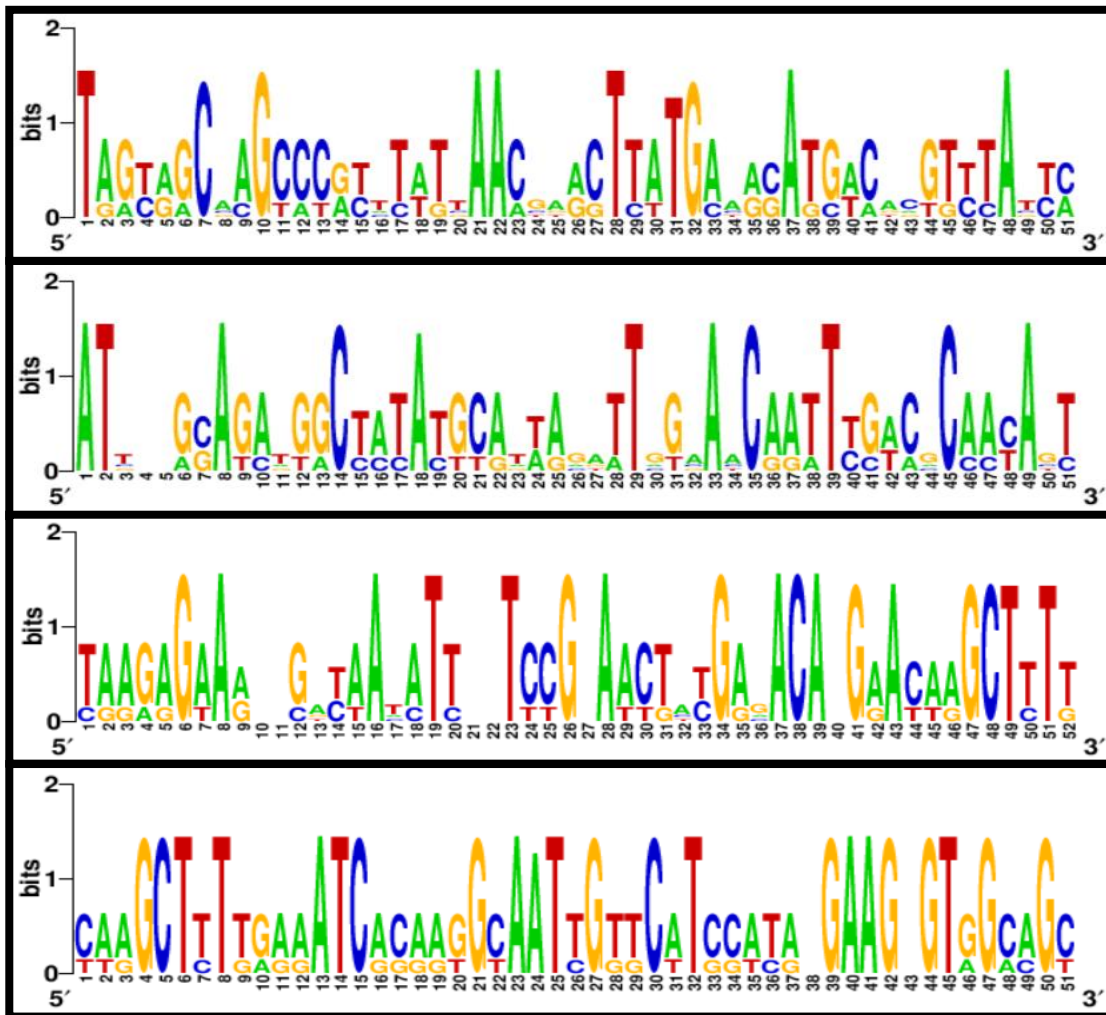
تبين من نتائج تحليل بيانات حشرة قافزة الأوراق وجود فايروس PiCV1، وذلك من خلال تحديد العديد من المتجاورات المتداخلة التابعة له والتي بلغت 16,011 التي بشكل كبير مع المنطقة الغير المشفرة التي تقع في الطرف الثالث ونهاية جين RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) ضمن الـ RNA 1 التابع للفايروس (شكل 34). واكد تحليل العلاقة الوراثية بين التسلسل الموحد للمتجاورات المتداخلة المحددة لهذا الفايروس والتي بلغ طولها 719 نيوكليوتيدة مع السلالات المختلفة للفايروس نفسه من خلال اثبات القرابة الوراثية معها خصوصاً مع السلالة ذات الرمز LR679767.1 (شكل 35). ولكن كان هنالك تباين وراثي واضح بين سلالة الفايروس المحلية والسلالات العالمية والذي يمكن ملاحظته في الشكل (36) حيث كان هنالك العديد من القواعد النايروجينية المتباينة التسلسل المدروسة.



شكل (34): المنطقة المغطاة بالمتجاورات المتداخلة لفايروس PicV1 المرافق لحشرة قافزة الأوراق. (أ) رسم تخطيطي للجينوم الكامل النموذجي للعائلة التي ينتمي إليها الفايروس (Zhan وآخرون، 2019) والمنطقة المشمولة بالتغطية والمشار إليها بالقوس المعرج الأحمر اللون، (ب) تغطية المتجاورات المتداخلة لمنطقة الغير مشفرة في الطرف الثالث وجين RdRp من القطعة الأولى من dsRNA من جينوم الفايروس.



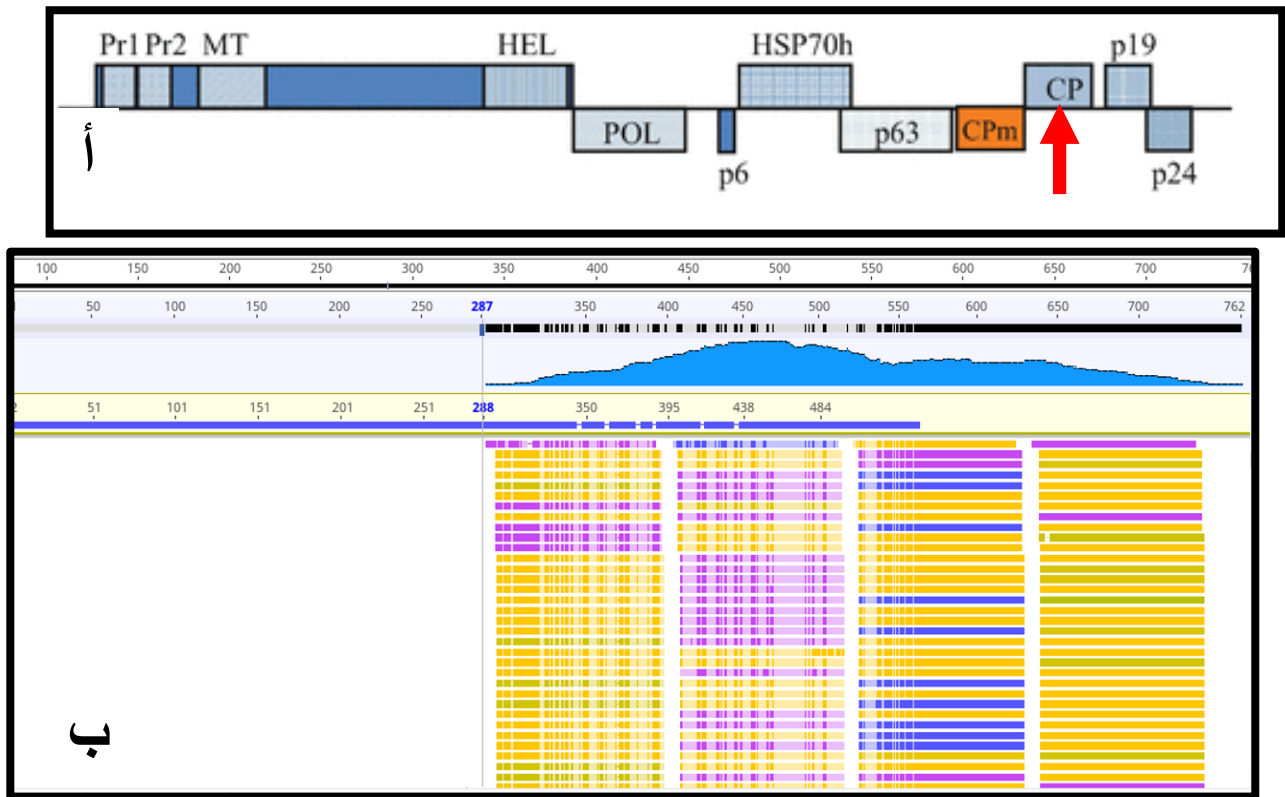
شكل (35): القرابة الوراثية بين سلالة لفايروس **PiCV1** المحلية المرافقة لحشرة قافزة الأوراق (موشرة بنقطة سوداء) والسلالات العالمية الأخرى التابعة للفايروس نفسه.



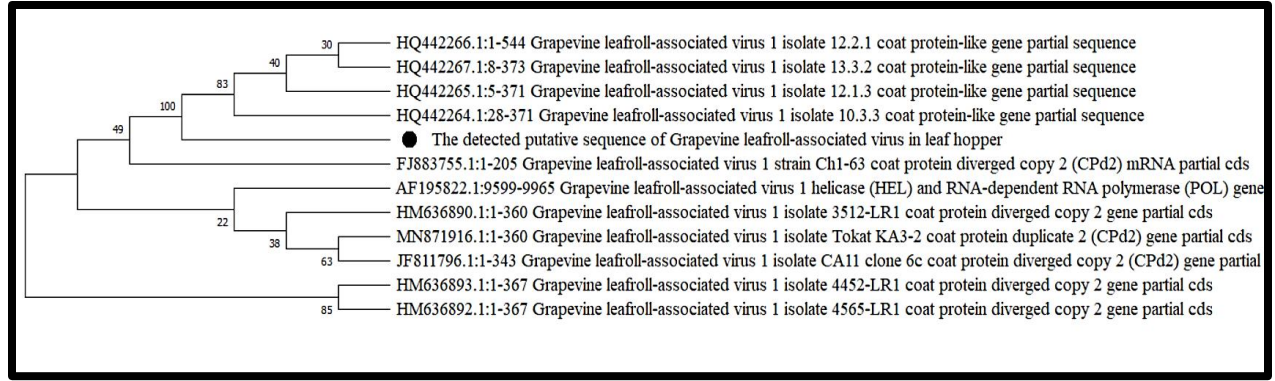
شكل (36): التباين الوراثي بين تسلسلات القواعد النايروجينية للسلالة المحلية **PiCV1** المرافقة لحشرة قافزة الأوراق مع السلالات العالمية.

ثانياً: فايروس *GLRaV Grapevine leafroll-associated virus*

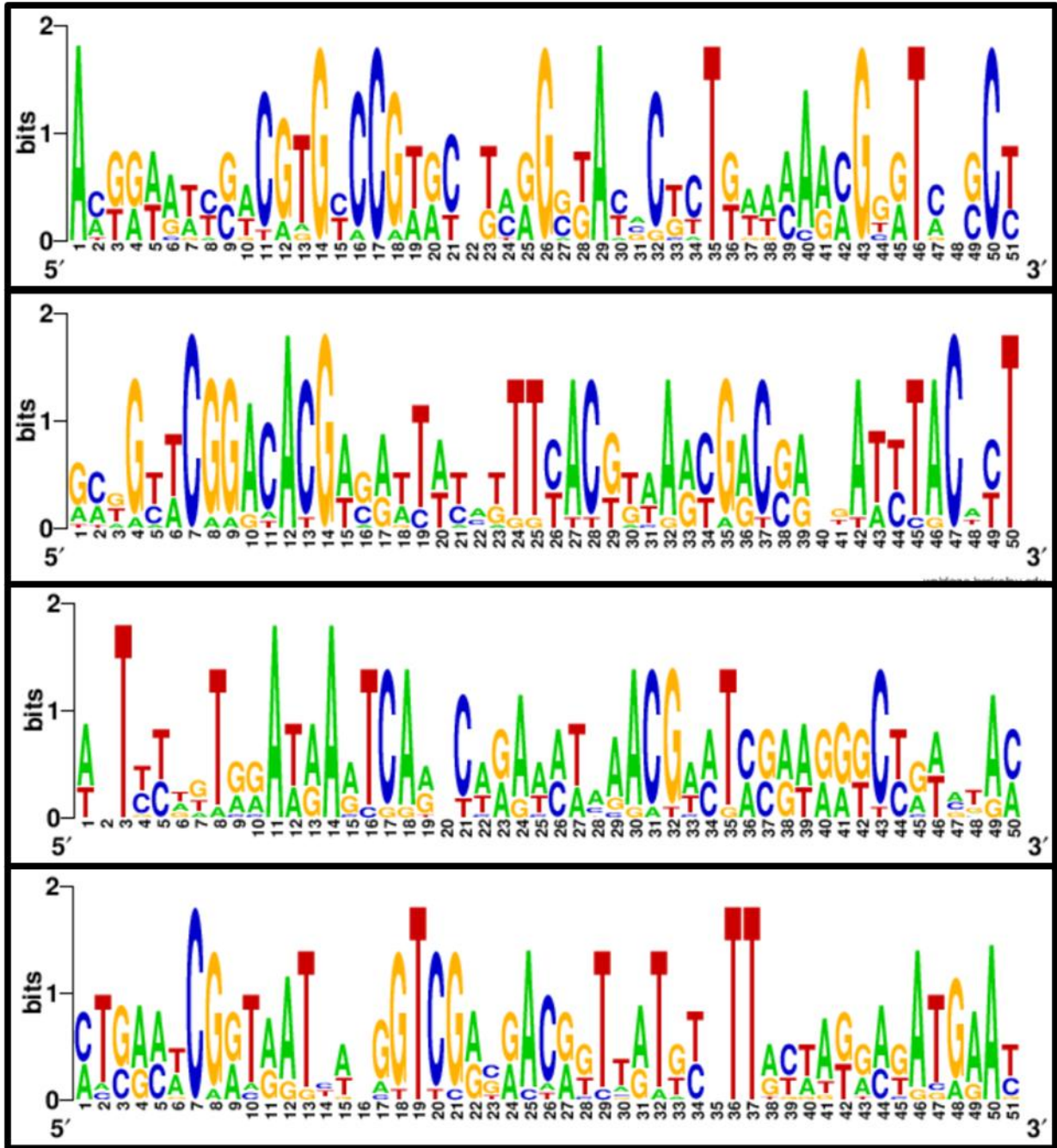
تم تشخيص فايروس *GLRaV* في عينات حشرة قافزة الاوراق عن طريق تحديد 19,609 متجاورة متداخلة ذات تشابه واضح مع الطرف الثالث من جين الغلاف البروتيني CP (شكل 37). ووحدت المتجاورات المتجاورة في تسلسل متفق عليه بلغ طوله 458 نيوكليوتيدة. لقد تم تأكيد هذا التشخيص عن طريق تواجد الفايروس المكتشف في هذه الدراسة في الفرع الوراثي نفسه الذي يشمل العديد من سلالات الفايروس نفسه، وبشكل رئيس تلك التي تحتوي على الرمز HQ442264.1 (شكل 38). ولكن اظهرت نتائج تحليل التباين الوراثي وجود اختلاف بين السلالة المحلية والسلالات العالمية لهذا الفايروس ويتضح ذلك من خلال عدم التشابه في العديد من تسلسلات القواعد النايتروجينية التابعة لهم (شكل 39).



شكل (37): المنطقة المغطاة بالمتجاورات المتداخلة لفايروس *GLRaV* المرافقة لحشرة قافزة الأوراق. (أ) رسم تخطيطي للجينوم الكامل النموذجي للعائلة التي ينتمي إليها الفايروس (Jelkmann وآخرون، 2012) والمنطقة المشمولة بالتغطية والمشار إليها بالسهم احمر اللون، (ب) تغطية المتجاورات المتداخلة لجين الغلاف البروتيني من جينوم الفايروس.



شكل (38): العلاقة الوراثية بين سلالة فايروس GLRaV المحلية المرافقة لحشرة قافزة الأوراق (المشار إليه بنقطة سوداء) والسلالات العالمية الأخرى التابعة للفايروس نفسه.



شكل (39): التباين الوراثي بين تسلسلات القواعد النايروجينية للسلالة المحلية لفايروس GLRaV المرافقة لحشرة قافزة الأوراق مع السلالات العالمية.

4-2-4: حشرة قافزة او نطاط الأوراق *Maiestas dorsalis*

أوضح نتائج برنامج MITOS أن حشرة قافزة او نطاط الأوراق المدروسة هي *M. dorsalis* (شكل 40) اذ تم الحصول على مسودة الجينوم الأولية لميتوكوندريا هذه الحشرة عن طريق تحليل بيانات تسلسل النسخ Transcriptome لعينات هذه الحشرة اذ بلغ عدد المقروءات المشابهة لجينوم الميتوكوندريا المرجعي لهذه الحشرة 1,490,895 من بين 61,396,870 أي بنسبة 2,42% وبمعدل عمق التغطية 9,711 (شكل 41). علماً ان نسبة القواعد النايتروجينية للادينين (A) كانت 38,85% ، السايتوسين (C) 13,13% ، الكوانين (G) 9,27% ، الثايمين (T) 30,73% ونسبة قليلة من القواعد النايتروجينية الغير محددة (N) بلغت 8,01%. وقد كانت مجموع نسب القاعدتين T + A هي الأكثر اذ بلغ 69.58%. و بلغ طول تسلسل جينوم الميتوكوندريا الاولي لحشرة قافزة الأوراق *M. dorsalis* المجمع في هذه الدراسة 15,378 قاعدة نايتروجينية تحتوي على جميع الجينات الثلاثة عشر المشفرة للبروتينات cytochrome C oxidase subunit I والتي شملت جينات cytochrome C oxidase subunit II،(Cox1) cytochrome C oxidase subunit III،(Cox2) cytochrome C oxidase subunit III،(Cox3) cytochrome b،(Cob) NADH dehydrogenase subunit 1،(Nad1) NADH dehydrogenase subunit 2،(Nad2) NADH dehydrogenase subunit 3،(Nad3) NADH dehydrogenase subunit 4،(Nad4) NADH dehydrogenase subunit 5،(Nad5) NADH dehydrogenase subunit 6،(Nad6) NADH dehydrogenase subunit 4L،(Nad4L) ATPase subunit 6،(atp6) ATPase subunit 8،(atp8). ولو حظ ايضاً ان بعض من الجينات المشفرة للبروتينات كانت موجود باكثر. كذلك كان هناك جينين للحامض النووي الرايبوسومي Ribosomal RNA genes هما rRNA L و rRNA S وثلاثة عشر جين من الحامض النووي الناقل Transfer RNA والتي شملت tRNA A(gca) ، tRNA ، tRNA E(gaa)،C(tgc) ، tRNA G(gga)، tRNA K(aag) ، tRNA L1(cta)،tRNA ، tRNA Y(tac)، tRNA S1(agg) ، tRNA R(cga) ، tRNA N(aac)، L2(tta) ، tRNA W(tga) و tRNA V(gta) .

MITOS WebServer

Downloads:

[BED file](#)
[GFF file](#)
[TBL file](#)
[Gene_Order file](#)
[FAS file](#)
[FAA file](#)

Raw data:

[protein_plot](#)
[ncRNA_plot](#)
[raw_data](#)

Misc:

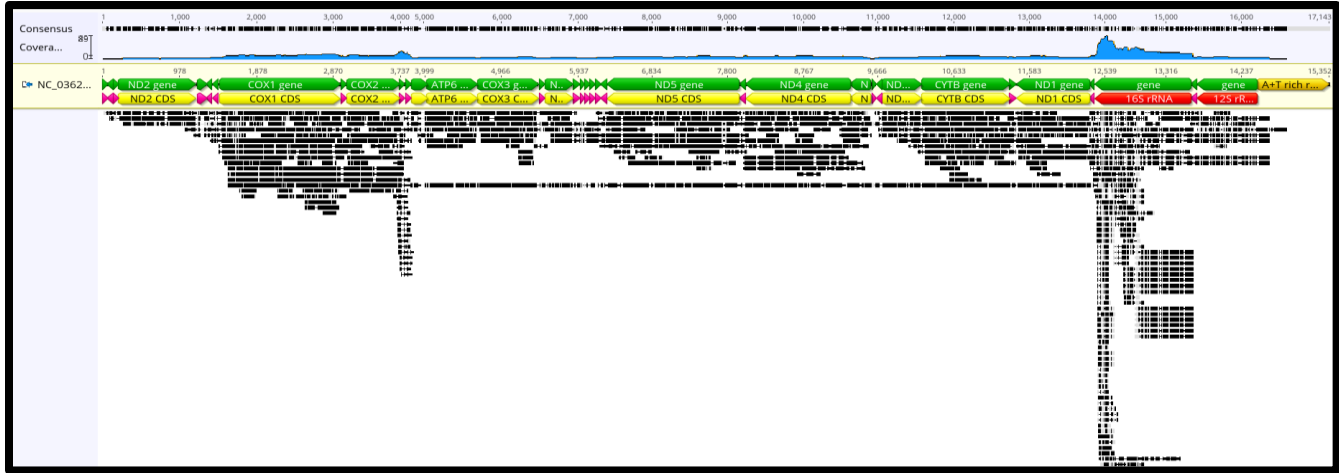
[Job settings](#)

Jobid: The highest match NC_036296.1 (The)

Name	Start	Stop	Strand	Length	Structure
nad2	50	238	+	189	
trnW(tga)	267	337	+	71	svg ps
trnC(tgc)	330	392	-	63	svg ps
trnY(tac)	412	453	-	42	svg ps
cox1	508	2019	+	1512	
trnL2(tta)	2057	2121	+	65	svg ps
cox2	2137	2787	+	651	
trnK(aag)	2804	2875	+	72	svg ps
atp8-0	2986	3075	+	90	
atp6	3288	3761	+	474	
cox3_a	3822	4055	+	234	
cox3_b	4057	4323	+	267	
trnG(gga)	4336	4399	+	64	svg ps
nad3	4430	4705	+	276	
trnA(gca)	4755	4819	+	65	svg ps
trnR(cga)	4820	4882	+	63	svg ps
trnN(aac)	4882	4951	+	70	svg ps
trnS1(agc)	4951	5017	+	67	svg ps
trnE(gaa)	5019	5073	+	55	svg ps
nad4l-0	5152	5325	-	174	
nad4l-1	5328	5351	-	24	
nad5_b	5360	5581	-	222	
nad5_a	5610	6293	-	684	
nad4_b	6285	7031	-	747	
nad4_a	7072	7467	-	396	
nad6	7500	7595	+	96	
cob	7606	8697	+	1092	
nad1	8730	9635	-	906	
trnL1(cta)	9636	9701	-	66	svg ps
rrnL	9730	10345	-	616	svg ps
trnV(gta)	10811	10867	-	57	svg ps
rrnS	10835	11559	-	725	svg ps



شكل (40): المسودة الأولية لجينوم الميتوكوندريا لحشرة قافزة الاوراق *M. dorsalis* المدروسة. (أ)
 جدول بالجينات التي تم تحديدها في مسودة جينوم الميتوكوندريا لحشرة قافزة الاوراق ، (ب) شرح
 توضيحي لجينوم الميتوكوندريا الجينات المشفرة للبروتينات ذات لون احمر ، الجينات المشفرة للحامض
 النووي الرايبوسومي ذات لون ازرق، و المشفرة للحامض النووي الناقل ذات لون اخضر. أن هذا الشكل
 تم انشاءه بواسطة برنامج MITOS (Bernt وآخرون، 2013).



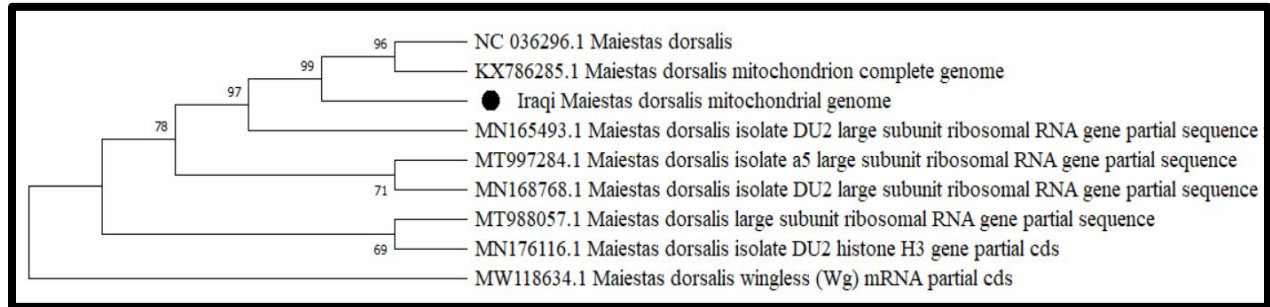
شكل (41): جينوم مايتوكوندريا حشرة قافزة الأوراق المغطى بالمتجاورات المتداخلة

وبينت نتائج مقارنة التسلسل الكامل لمسودة الجينوم الأولية لحشرة قافزة او نطاط الاوراق التي تم اكتشافها في هذه الدراسة مع ما متوفر من جينومات المايتوكوندريا للحشرة نفسها، ان الحشرة تتشابه بشكل كبير مع حشرة *M. dorsalis* وذلك من خلال تحقيق اعلى مجموعات تشابه بلغت 9145 و 9148 ونسبة تشابه بلغت 88,46% مع السلالتين ذوات الرموز KX786285.1 و NC_036296.1 . جدير بالإشارة الى نسبة التشابه انخفضت وبشكل كبير مع الأنواع الأخرى من حشرات قافزات الأوراق (جدول 8). إن هذا التشخيص تم تاييده في تحليل النشوء والتطور الذي اظهر مدى العلاقة الوراثية القوية مع السلالات التي تعود الى النوع نفسه من خلال تجمعها مع السلالات أعلاه نفسها في فرع وراثي (شكل 42).

وبعد مراجعتنا للمصادر المتعلقة بحشرة قافزة او نطاط الأوراق نوع *Maiestas dorsalis* تبين انها تنتشر في العديد من دول قارة اسيا التي تشتهر بزراعة محصول الرز والتي تشمل الصين والفلبين وتايلند وفيتنام و الهند والنيبال (Chen وآخرون، 2016؛ Cook و Perfect، 1989؛ Kittayapong وآخرون، 2003؛ Vromant وآخرون، 2002؛ Reynolds وآخرون، 1999؛ Dahal وآخرون، 1997). ولكن لم نجد في العراق تسجيل لهذا النوع لذا يعتبر تشخيصنا هذا والمستند على مسودة الجينوم الكاملة تقريباً لمايتوكوندريا الخاصة به هو الاول في العراق. علماً ان هذا النوع ناقل للعديد من الفايروسات الخطيرة التي سببت على مدى العقود القليلة الماضية خسائر اقتصادية كبيرة لمحصول الرز في دول شرق وجنوب شرق آسيا، بما في ذلك التفشي والوبائية المتكررة للفايروسات المعروفة والناشئة (Yang، 2017). لذلك يعد هذا التشخيص ذو أهمية في تحديد انواع قفازات اوراق الرز المنتشرة في البيئة العراقية والاهتمام بها ودراستها بشكل اكثر شمولية من اجل إيجاد الوسائل الفعالة في الحد من مخاطرها في المستقبل.

جدول (8): مقارنة مسودة جينوم لحشرة قافزة الاوراق *M. dorsalis* المدروسة مع السلالات العالمية للحشرة نفسها وحشرات اخرى

اسم النوع	مجموع درجات التشابه	تغطية التسلسل (%)	نسبة التشابه (%)	رمز السلالة
Iraqi <i>M. dorsalis</i>	*	*	*	*
<i>M. dorsalis</i>	9148	74	88.46	KX786285.1
<i>M. dorsalis</i>	9145	69	88.46	NC_036296.1
<i>Paramacrosteles nigromaculatus</i>	4834	59	80.90	NC_045270.1
<i>Japananus hyalinus</i>	4683	59	82.30	KY129954.1
<i>Mukaria splendida</i>	4511	59	82.02	NC_053559.1
<i>Drabescus ineffectus</i>	3944	46	82.39	NC_050258.1
<i>Penthimia melanocephala</i>	3502	51	80.63	NC_051525.1
<i>Exitianus indicus</i>	28	37	81.64	KY039128.1
<i>Abrus expansivus</i>	2587	32	82.12	NC_045238.1



شكل (42): العلاقة الوراثية بين حشرة قافزة الاوراق *M. dorsalis* المحلية (المحددة بنقطة سوداء) والسلالات العالمية الأخرى التابعة للحشرة نفسها.

بشكل عام، تعد عملية الاكتشاف والتشخيص الدقيق والسريع للفايروسات بما في ذلك تلك التي تصيب العوائل النباتية مشكلة باستعمال التقنيات التقليدية وذلك بسبب الحاجة الى متطلبات عزل الفايروس وتحديد تسلسل الجينوم جزئياً أو كلياً. ولكن، في العقدين الأخيرين، تم الإعلان عن تقنيات تسلسل الجيل التالي

(NGS) وتحليل المعلومات الحيوية وتطبيقها في جوانب مختلفة من اكتشاف وتشخيص الاحياء المجهرية الدقيقة المختلفة بما في ذلك الفايروسات التي ترافق او تصيب النباتات (Barba، واخرون، 2014) والحشرات (Kobayashi واخرون، 2017) والفطريات (Chiapello واخرون، 2020) والبشر (Chiu، 2013). أن تقانة NGS تنتج أنواعاً مختلفةً من البيانات بما في ذلك بيانات تسلسل النسخ Transcriptome التي تم استعمالها بنجاح في تحديد العديد من فايروسات النباتات والحشرات وذلك من خلال تحليل الحمض النووي الريبي الفيروسي الصغير (Zografidis) Small viral RNA (واخرون، 2015).

تعتمد معظم فايروسات النبات على ناقلات حشرية في بقائها وانتقالها وانتشارها بين العوائل النباتية، ومن بين هذه النواقل الحشرية بعض أنواع الجنسين *Bemisia* و *Trialeurodes* التي اثبتت قدرتها كناقل مهم وحيوي للعديد من فايروسات النبات (Anon، 2001؛ Fereres و Raccah، 2015). فمثلاً وجد نوع واحد يعود الى الجنس الاول وهو *B. tabaci* أنه قادر على اكتساب الفايروسات اثناء التغذية على انسجة النباتات المصابة. وقد اكتسب هذا النوع أهميته بكونه أفةً حشرية وناقلًا للعديد من الفايروسات مثل *Tomato yellow leaf curl virus* و *Cucurbit yellow stunting disorder virus* و *Cucumber vein yellowing virus* و *Tomato torrado virus* التي تصيب المحاصيل والفواكه والخضروات ونباتات الزينة مسببة لها خسائر اقتصادية سنوية كبيرة في العديد من المناطق التي تشمل البيئات الاستوائية وشبه الاستوائية والقاحلة والمتوسطية (De Barro، 2011؛ Jones، 2003؛ Navas-Castillo واخرون، 2011). كذلك اثبتت حشرة قافزة الأوراق *M. dorsalis* قدرتها على نقل العديد من الفايروسات النباتية مثل *Rice dwarf virus* و *Rice gall dwarf virus* و *Rice ragged stunt virus* و *Rice stripe mosaic virus* و *Rice tungro virus* (Yang واخرون، 2017؛ Azgar و Yonzon، 2017؛ Zhao واخرون، 2019). ووجد في الدراسة الحالية العديد من تسلسلات الـ RNA المشتقة من فايروسات النبات في حشرات *B. tabaci* و *M. dorsalis* من خلال تحليل تسلسل النسخ Transcriptome إذ كان معظمهم ذا كثافة تغطية عالية الكمية وبناءً على هذه الكمية الكبيرة من قراءات التسلسل، لذلك يمكن تقديم اقتراح مفاده أن هذه الفايروسات التي تم تحديدها يتم التعبير عنها باستمرار في هاتين الحشريتين المنتشرة في البيئة العراقية ولكن لا يوجد تقرير او دراسة سابقة تشير الى أن الفايروسات المكتشفة في هذه الدراسة ممكن انتقالها بواسطة هاتين الحشريتين. بالرغم من ذلك أن انتقال العديد من فايروسات النبات عن طريق ناقلات حشرية متنوعة هو حدث شائع تم اثباته في العديد من الدراسات الحديثة. فمثلاً تمكن Ghosh واخرون (2019) من التشخيص ولأول مرة لفايروس جديد اسمه *Pepper whitefly-borne vein yellows virus* والذي يعود الى جنس *Polerovirus*

المعروف عن أنواعه أنها تنتقل بواسطة حشرة المن *Myzus persicae* ولكنهم اثبتوا ان الفايروس الجديد ينتقل بواسطة حشرة الذبابة البيضاء المعروف عن قدرتها العالية على نقل العديد من فايروسات النبات ذات الجينوم نوع الـ DNA و RNA. وأيضا في دراسة أخرى قام بها Ottati وآخرون (2020) حول قافزة او نطاط الأوراق *Scaphoideus titanus* التي تعتبر ناقلاً اوحداً ورئيساً للفايتوبلازما *Grapevine flavescence dorée* وجدوا أن هذه الحشرة قادرة أيضا على نقل تسعة فايروسات جديدة لم يكن معروف عنها انتقالها بواسطة هذه الحشرة من قبل مع العلم أن هذه الحشرة تعود الى عائلة حشرة *M. dorsalis* عائلة Cicadellidae نفسها، وهذا بطبيعة الحال يعني أن حشرات *B. tabaci* و *M. dorsalis* لها المقدرة على نقل فايروسات جديدة منها ما تم تشخيصه من فايروسات في هذه الدراسة. جدير بالإشارة الى أن الفايروسات التي تم اكتشافها في هذه الدراسة كانت ذات تباين واضح مع السلالات العالمية وهذه النتيجة يمكنها أن تفسر سبب عدم نجاح التشخيص الجزيئي للفايروسات المرافقة للحشرات باستعمال تقانة الـ PCR إذ إن البادئات يمكنها الالتحام مع التسلسلات المحافضة فقط واي تغيير في هذه التسلسلات يسبب فشل عملية التضخيم باستعمال هذه التقانة لذا يمكننا التأكيد على أهمية استعمال تقانة تسلسل الجيل التالي (NGS) في التغلب على هذه المعوقات المرافقة لتطبيق تقانة الـ PCR والتقنيات الجزيئية الأخرى.

إن النهج القائم على الحمض النووي الريبي (RNA) مثل الـ Transcriptome في تجميع جينات المايوتوكونديريا mtDNA الخاصة بالحشرات والحصول على الجينوم الكامل لها يتغلب على بعض القيود المفروضة على الاستراتيجيات التقليدية القائمة على الحمض النووي (DNA) في تحديد تسلسل جينوم المايوتوكونديريا والكشف عن التغيرات. وعلى وجه التحديد، تستعمل الاستراتيجية القائمة على الحمض النووي الريبي طريقة مباشرة في استخراج إجمالي الحمض النووي الريبي الخلوي من اجل الحصول على كمية عالية من الحمض النووي mtDNA عالي الجودة. علماً ان هذه الطريقة لا تعاني من الصعوبات والتحديات التي يمكن أن تحدث في طريق تداخل PCR (overlapping PCR) طول السلسلة ولا تتأثر بالنسخ النووية للحمض النووي الـ DNA للميتوكونديريا. ونظراً لأن عدد بيانات النسخ Transcriptomes المتاحة في المستودعات العامة ينمو بسرعة، يمكن أن يكون هذا النهج مفيداً بشكل خاص لتجميع ميتوجينومات (Mitogenomes) جديدة من الأنواع غير المعروفة مسبقاً (Moreira وآخرون، 2015). ولقد تم استعمال النهج المبتكر القائم على الحمض النووي الريبي في تجميع جينوم الميتوكونديريا الكامل للعديد من الحشرات (Hahn وآخرون، 2013; Kocher وآخرون، 2014; Moreira وآخرون، 2016; Gomes-dos-Santos وآخرون، 2020).

5: الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations

Conclusions

1-5: الاستنتاجات

1- أفضلية تقانة الـNGS على تقانة الـPCR في تشخيص العديد من الفايروسات النباتية في عينات حشرة الذبابة البيضاء والتي شملت سبعة فايروسات وهي AMV ، BBWV ، ZaMMV ، PiCV1 ، GLRaV ، TSWOV و TSWV بينما في حشرة قافزة الأوراق *Maiestas dorsalis* شخص فقط فايروسين هما PiCV1 و GLRaV.

2- لقد كانت معظم السلالات الفايروسية المشخصة في هذه الدراسة ذات تباين وراثي واضح مع العديد من السلالات العالمية وذلك من خلال نسب الاختلاف العالية بين تسلسلات القواعد النايتروجينية في المناطق المحفوظة التي تقع في جينات او مناطق وراثية مختلفة وهذه الحقيقة قد تفسر سبب عدم نجاح تقانة الـPCR في تشخيص هذه الفايروسات.

3- الحصول لأول مرة في العراق بواسطة تقانة الـNGS على مسودة الجينوم الأولية (Draft genome) لمايتوكوندريا حشرة الذبابة البيضاء التي تتكون من 15,711 قاعدة نايتروجينية تحتوي على تسلسل 8 جينات مشفرة للبروتينات (PCGs) و جينين للحامض النووي الرايبوسومي Ribosomal RNA genes و جينين من الحامض النووي الناقل Transfer RNA والتي اكدت على أن النوع الحشري المنتشر في البيئة العراقية هو *B. tabaci* MEAM1.

4- التشخيص الجزيئي لحشرة قافزة او نطاط الأوراق باستعمال تقنية الـNGS ايضاً من خلال تحديد الجينوم الكامل تقريباً لمايتوكوندريا هذه الحشرة الذي يتكون من 15,378 قاعدة نايتروجينية تحتوي على جميع الجينات الثلاثة عشر المشفرة للبروتينات (PCGs) و جينين للحامض النووي الرايبوسومي Ribosomal RNA genes وثلاثة عشر جين من الحامض النووي الناقل Transfer RNA والتي اثبتت أن نوع حشرة قافزة أو نطاط الأوراق الناقل للفايروسات هو *Maiestas dorsalis* ويعتبر هذا التشخيص هو الأول لهذه الحشرة في العراق.

5-2: التوصيات

Recommendations

- 1- استعمال تقانة الـNGS بالطريقة التي اتبعت في هذه الدراسة نفسها في التشخيص الجزيئي للفايروسات المنقولة بواسطة حشرات ناقلية أخرى مثل المن والثربس وقافزات او نطاطات النبات المنتشرة في البيئة العراقية.
- 2- دراسة إمكانية تحديد الجينوم الكامل للفايروسات المشخصة في هذه الدراسة وذلك عن طريق المزج بين تقنيات الـNGS وتقانة الـPCR من أجل تأكيد نتائج هذه الدراسة والتحقق من أسباب التباين الوراثي بينها وبين السلالات العالمية.
- 3- الاستمرار بالتحري عن أنواع حشرات قافزات أو نطاطات الأوراق في حقول الرز العراقية وكذلك الأنواع الأخرى لحشرة الذبابة البيضاء التي يمكن ان تتواجد في البيئة العراقية باستعمال الأسلوب نفسه المتبع في هذه الدراسة.
- 4- دراسة إمكانية تطبيق تقانة الـNGS وبالطريقة المستعملة نفسها في هذه الدراسة في تشخيص الفايروسات التي تصيب الانسان والحيوان وتنقل بواسطة حشرات البعوض والقمل والبرغوث.

6: المصادر

6-1: المصادر العربية

- جرجيس ، سالم جميل ومحمد عبدالكريم محمد . (1992). حشرات البساتين .جامعة الموصل .وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . 559 صفحة.
- حميد، رواء جعفر (2016). دراسة تصنيفية مظهرية لبعض أنواع عائلة قفازات الاوراق من رتبة نصفية الأجنحة Hemiptera :Cicadellidae من بعض مناطق العراق. أطروحة دكتوراه . كلية التربية للعلوم الصرفة/ ابن الهيثم – جامعة بغداد.
- الخزاعي، ضرغام عبد العزيز عبد (2021). العزل والتشخيص الجزيئي للذبابة البيضاء *Bemisia tabaci* (Genn) (Hemiptera: Aleyrodidae) مع تقييم كفاءة بعض المبيدات الحشرية مختبرياً وحقلياً في محافظة كربلاء. رسالة ماجستير، كلية الزراعة ، جامعة كربلاء، العراق.
- العبد المحسن ، عبد المحسن محمد حسين . (1992) . دراسة بيولوجية حول الذبابة البيضاء *Bemisia* سعود.
- العزاوي، عبد الله فليح . (1980) . الحشرات الاقتصادية . كلية الزراعة، جامعة بغداد، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . 256 . صفحة.
- القاسم، صبحي .(1998) الذبابة البيضاء وبائيتها وأخطارها وطرق مكافحتها في البلدان العربية (نشرة زراعية . إعداد الوحدة العلمية لشركة المواد الزراعية . (الطبعة الثالثة) 30 صفحة.
- مكوك، خالد محي الدين وجابر إبراهيم فجلة و صفاء غسان قمري (2008). الامراض الفيروسية للمحاصيل الزراعية المهمة في المنطقة العربية. دار النهضة العربية ، بيروت، لبنان.
- مكوك، خالد محي الدين و صفاء قمري.(1996). الكشف عن عشرة فيروسات تصيب المحاصيل البقولية بالإختبار المصلي لبصمة النسيج النباتي. مجلة وقاية النبات العربية، 14 : 3 – 9.
- الملاح، نبيل مصطفى (2018). حشرات نصفية الأجنحة الضارة بالنباتات الاقتصادية. دار اليازوري للنشر والتوزيع، عمان – الأردن.

- Aboul-Ata, A. E.; Mazyad, H.; El-Attar, A. K.; Soliman, A. M.; Anfoka, G.; Zeidaen, M.; Gorovits, R.; Sobol, I. and Czosnek, H. (2011). Diagnosis and control of cereal viruses in the Middle East. *Advances in Virus Research* 81: 33-61.
- Adams, I. and Fox, A. (2016). “Diagnosis of plant viruses using next-generation sequencing and metagenomic analysis,” in *Current Research Topics in Plant Virology*, eds A. Wang and X. Zhou (Cham: Springer), 323–335. doi: 10.1007/978-3-319-32919-2_14.
- Adams, M. J.; Lefkowitz, E. J.; King, A. M. Q.; Harrach, B.; Harrison, R. L.; Knowles, N. J.; Kropinski, A. M.; Krupovic, M.; Kuhn, J. H.; Mushegian, A. R.; Nibert, M.; Sabanadzovic, S.; Sanfaçon, H.; Siddell, S. G.; Simmonds, P.; Varsani, A.; Zerbini, F. M.; Gorbalenya, A. E. and Davison, A. J. (2016). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2016). *Archives of Virology* 161:2921-2949. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2977-6>.
- Al-ani, R. A., Adhab, M. A., Hamad, S. A. H., & Diwan, S. N. H. (2011). Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), identification, virus vector relationship, strains characterization and a suggestion for its control with plant extracts in Iraq. *African Journal of Agricultural Research* 6(22): 5149–5155. <https://doi.org/10.5897/AJA R11.1107>.
- Amari, K.; Gonzalez-Ibeas, D.; Gómez, P.; Sempere, R. N.; Sanchez-Pina, M. A.; Aranda, M. A.; Diaz-Pendon, J. A.; Navas-Castillo, J.; Moriones, E.; Blanca, J.; Hernandez-Gallardo, M. D. and Anastasio, G. (2008). *Tomato torrado virus* is transmitted by *Bemisia tabaci* and infects pepper and

eggplant in addition to tomato. *Plant Dis.* 92:1139.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-92-7-1139A>.

- Ammar, E. D. and Nault. L.R. (1991). *Maize chlorotic dwarf viruslike particles associated with the foregut in vector and nonvector leafhopper species*. *Phytopathology* 81: 444-448.
- Ando, H. (1910). On *Rice dwarf disease*. *J. Jpn. Agric. Soc.* 347:1–3
- Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Anon (2001). *Crop Protection Compendium, Global Module, 3rd edn.* CAB International CD-Rom Database, UK.
- Awasthi, L.P. (2020). *Applied plant virology advances, detection, and antiviral strategies.* Academic Press is an imprint of Elsevier, London, UK
- Azgar, A. and Yonzon, R. (2017). Studies on the transmission and virus-vector relationship of *Rice tungro virus* (RTV) in different rice genotype. *International Journal of agricultural science and research* 7(4): 321-326.
- Bak, A.; Gargani, D.; Macia, J.L.; Malouvet, E.; Vernerey, M.S.; Blanc, S.; Drucker, M. (2013). Virus factories of *cauliflower mosaic virus* are virion reservoirs that engage actively in vector transmission. *Journal of Virology* 87:12207–12215.
- Bankevich, A.; Nurk, S.; Antipov, D.; Gurevich, A. A.; Dvorkin, M.; Kulikov, A. S.; et al. (2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology* 19(5): 455-477.

- Barba, M.; Czosnek, H. and Hadidi, A. (2013). Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. *Viruses* 6,106–136. doi: 10.3390/v6010106.
- Baufeld, P. and Unger, J.G. (1994). New aspects on the significance of *Bemisia tabaci* (Genn.). *Nachrichten blatt – des – deutschen – Pflanzenschutz – zdienstes (Germany)*. 46(11): 252-257.
- Bernt, M.; Donath, A.; Juhling, F.; Externbrink, F.; Florentz, C.; Fritsch, G.; Putz, J.; Middendorf, M. and Stadler, P. (2013). MITOS: improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation. *Mol Phylogenet Evol.* 69:313–319.
- Bioinformatics and Evolutionary Genomics, Ghent University. <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>. Accessed 5 Aug 2021.
- Blanc, S.; Drucker, M. and Uzest, M. (2014). Localizing viruses in their insect vectors. *Annual Review of Phytopathology* 52: 402–425.
- Bolger, A. M.; Lohse, M. and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30 (15): 2114-2120.
- Boonham, N.; Tomlinson, J. and Mumford, R. (2016). *Molecular Methods in Plant Disease Diagnostics*. Gutenberg Press Ltd, Tarxien, Malta.
- Boore, J.L. (1999). Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*. 27:1767–1780. <https://doi.org/10.1093/nar/27.8.1767> PMID: 10101183.
- Borrer, D. J. and Delong, D. M. (1954). *An introduction to the study of insects*. Holt, Rinehart and Winston. New York, USA.
- Bottrell, D.G. and Schoenly, K.G. (2012). Resurrecting the ghost of green revolutions past: The brown planthopper as a recurring threat to high-yielding rice production in tropical Asia. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 15:122–140.

- Bragard, C.; Caciagli, P.; Lemaire, O.; Lopez-Moya, J.J.; MacFarlane, S.; Peters, D.; Susi, P.; Torrance, L. (2013). Status and prospects of plant virus control through interference with vector transmission. *Annual Review Phytopathology*. 51: 177–201.
- Brown, J. K. (2007). The *Bemisia tabaci* complex : Genetic phenotypic Drives Begomovirus spread and virus Diversification The university of Arizona .department of plant sciences.
- Brown, J.K. (1991). An update on the whitefly – transmitted geminiviruses in the Americas and the Caribbean Basin. *FAO Plant Prot. Bull.* 39(1): 5-23.
- Butler, G.D.; Henneberry, J.T.J. and Clayton, T.E. (1983). *Bemisia tabaci* (Hemiptera :Aleyrodidae) Development ,Oviposition ,and Longevity in Relation to temperature .*Annual Entomology* 76 (2):310-313.
- Camacho, C.; Coulouris, G.; Avagyan, V.; Ma, N.; Papadopoulos, J.; Bealer, K. and Madden, T. L. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10(1), 421. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-10-4>.
- Candresse, T.; Hammond, R.W. and Hadidi, A. (1998). Detection and identification of plant viruses and viroids using polymerase chain reaction (PCR). Pages 399–416. In: *Control of plant virus diseases*. A. Hadidi, R.K. Khetarpal and K. Koganezawa (eds.). APS Press, St. Paul, MN, USA.
- Carpino, C.; Ferriol, I.; Elvira-González, L. et al. (2020). Broad bean wilt virus 1 encoded VP47 and SCP are suppressors of plant post-transcriptional gene silencing. *European Journal of Plant Pathology* 158, 1043–1049.<https://doi.org/10.1007/s10658-020-02117-3>.
- Chapman, J. (2019). A review of methods for the detection of pathogenic microorganisms. *Analyst* 144: 396–411

- Chen, A.Y.S.; Walker, G.P.; Carter, D. and Ng, J.C.K. (2011). A virus capsid component mediates virion retention and transmission by its insect vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, USA* 108: 16777–16782.
- Chen, B.; Francki, R.I.B. (1990). Cucumovirus transmission by the *aphid Myzus persicae* is determined solely by the viral coat protein. *Journal General Virology* 71: 939–944.
- Chen, H.Y.; Chen, Q.; Omura, T.; Uehara-Ichiki, T. and Wei, T.Y. (2011). Sequential infection of *Rice dwarf virus* in the internal organs of its insect vector after ingestion of virus. *Virus Research* 160: 389–394.
- Chen, Q.; Chen, H.Y.; Mao, Q.Z.; Liu, Q.F.; Shimizu, T.; Uehara-Ichiki, T.; Wu, Z.J.; Xie, L.H.; Omura, T. and Wei, T.Y. (2012). Tubular structure induced by a plant virus facilitates viral spread in its vector insect. *PLOS Pathogens* 8:e1003032.
- Chen, Q.; Wang, H.T.; Ren, T.Y.; Xie, L.H.; Wei, T.Y. (2015). Interaction between non-structural protein Pns10 of rice dwarf virus and cytoplasmic actin of leafhoppers is correlated with insect vector specificity. *Journal of General Virology* 96: 933–938.
- Chen, W.; Hasegawa, D.K.; Kaur, N. et al. (2016). The draft genome of whitefly *Bemisia tabaci* MEAM1, a global crop pest, provides novel insights into virus transmission, host adaptation, and insecticide resistance. *BMC Biology* 14: 110. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0321-y>
- Chen, X.; Yuan, Z.; Li, C.; Dietrich, C.H. and Song, Y.(2021). Structural features and phylogenetic implications of Cicadellidae subfamily and two

new mitogenomes leafhoppers. PLoS ONE 16(5):e0251207. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251207>.

- Chen, Y.; Lu, C.; Li, M.; Wu, W.; Zhou, G. and Wei, T. (2016). Adverse effects of Rice gall dwarf virus upon its insect vector *Recilia dorsalis* (Hemiptera: Cicadellidae). *Plant Disease* 100: 784-790.
- Chiapello, M.; Rodríguez-Romero, J.; Ayllón, M.A. and Turinam, M. (2020). Analysis of the virome associated to grapevine downy mildew lesions reveals new mycovirus lineages. *Virus Evolution* 6: veaa058.
- Chiu, C.Y. (2013). Viral pathogen discovery. *Current Opinion in Microbiology* 16: 468–478.
- Cilia, M.; Peter, K.A.; Bereman, M.S.; Howe, K.; Fish, T.; Smith, D.; Gildow, F.; MacCoss, M.J.; Thannhauser, T.W.; Gray, S.M. (2012). Discovery and targeted LC-MS/MS of purified Polerovirus reveals differences in the virus-host interactome associated with altered aphid transmission. *PLoS ONE* 7: e48177.
- Clark, M.F. and Adams, A.N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34: 475– 483.
- Clark, M.F. and Bar-Joseph, M. (1984). Enzyme immunosorbent assays in plant virology. Pages 51–85. In: *Methods in virology*. K. Maramorosch and H. Koprowski (eds.). Academic Press, New York, USA.
- Cook, A.G. and Perfect, T.J. (1989). Population dynamics of three leafhopper vectors of rice tungro viruses, *Nephotettix virescens* (Distant), *N. nigropictus* (Stål) and *Recilia dorsalis* (Motschulsky) (Hemiptera: Cicadellidae), in farmers' fields in the Philippines. *Bulletin of Entomological Research* 79: 437-451.

- Crooks, G.E.; Hon, G.; Chandonia, J.M. and Brenner, S.E. (2004). WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Research* 14:1188-1190.
- Dahal, G.; Shrestha, R.B. and Thapa, R.B. (1997) Species composition and relative abundance of rice green leafhoppers (*Nephotettix* spp.) in different altitudinal regions of Nepal. *International Journal of Pest Management* 43:49-58.
- De Barro, P. J.; Liu, S. S.; Boykin, L. M. and Dinsdale, A. B. (2011). *Bemisia tabaci*: A statement of species status. *Annual Review of Entomology* 56: 1–19. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085504>.
- De Barro, P.J.; Li, S.S.; Boykin, L.M. and Dinsdale, A.B. (2011). *Bemisia tabaci*: a statement of species status. *Annual Review of Entomology* 56(1):1–19.
- Dietzgen, R. G. ; Mann, K. S. and Johnson, K. N. (2016). Plant virus–insect vector interactions: current and potential future research directions. *Viruses* 8: 303-324. doi:10.3390/v8110303.
- Drygin, Y. F.; Blintsov, A. N.; Grigorenko, V. G.; Andreena, I. P.; Opsipov, A. P.; Varitzev, Y. A.; Uskov, A. I.; Kravchenko, D. V. and Atabekov, J. G. (2012). Highly sensitive field test lateral flow immunodiagnosics of PVX infection. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93: 179-189.
- Du, P.V.; Cabunagan, R.C.; Cabauatan, P.Q.; Choi, H.S.; Choi, I.R.; Chien, H.V. and Huan, N.H. (2007). Yellowing syndrome of rice: etiology, current status, and future challenges. *Omonrice* 15:94-101.
- El-Araby, S. W., Ibrahin, A. I.; Hemeida, A. A.; Mahmo, A.; Soliman, M. A.; El-Attar, K. A. and Mazyad, M. H. (2009). Biological, serological and molecular diagnosis of three major potato viruses in Egypt. *International Journal of Virology* 5: 77-88.

- Ewing, B.; Hillier, L.; Wendl, M.C. and Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research* 8(3):175-85. doi: 10.1101/gr.8.3.175. PMID: 9521921.
- Fegla, G.I.; El-Samra, I.A.; Younes, H.A. and Abd El-Aziz, M.H. (2001). Comparative studies for detection of tomato mosaic Tobamovirus (ToMV), cucumber mosaic *Cucumovirus* (CMV) and *potato Potyvirus* (PVY). *Journal of the Advances in Agricultural Research* 6: 239-253.
- Fereres, A. and Raccach, B. (2015). *Plant Virus Transmission by Insects*. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Fiallo-Olivé, E.; Pan, L.; Liu, S. and Navas-Castillo, J. (2020). Transmission of Begomoviruses and other whitefly-borne viruses: dependence on the vector species. *Phytopathology* 110 (1): 10-17.
- Gago, S.; Elena, S. F.; Flores, R. and Sanjuan, R. (2009). Extremely high mutation
- Gerling, D. (1990). *White flies, their bionomics, pest status and management*. Intercept, publisher Ltd916 Andover, Hants, UK 350 PP.
- Gibb, T.J. and Oseto, C. (2020). *Insect Collection and Identification Techniques for the Field and Laboratory*. Academic Press, Elsevier. The Netherland.
- Gnaneswaran, G.; Hemachandra, K. S.; Wijayagunasekara, H. N. P. and Ahangama, D. (2010). A key for identification of Deltocephaline genera (Hemiptera: Cicadellidae: Deltocephalinae) associated with vegetable ecosystem in Sri Lanka. *Tropical Agricultural Research* 21(4): 421-426.
- Gomes-dos-Santos,A.; Nande,M.; Espinoza-Ramos, L. A.; Pepe-Victoriano, R. G.; Contreras-Mamani, Z.; Huanacuni, J. I. ; Quispe- Mayta, J. M. ; Fernández-Cárdenas, C. P. ; Froufe, E. and Castro, L. F. C. (2020).

Constructing the mitochondrial genome of the Peruvian grunt *Anisotremus scapularis* Tschudi, 1846 (Lutjaniformes: Haemulidae) using RNA-seq data, *Mitochondrial DNA Part B*, 5:2, 1921-1923, DOI: 10.1080/23802359.2020.1754950.

- Govier, D.A. and Kassanis, B. (1974). Virus-induced component of plant sap needed when aphids acquire potato virus Y from purified preparations. *Virology* 61: 420–426.
- Grabherr, M. G.; Haas, B. J.; Yassour, M.; Levin, J. Z.; Thompson, D. A.; Amit, I.; ... et al. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology* 29(7): 644-652.
- Gray, S.; Cilia, M. and Ghanim, M. (2014). Circulative, “nonpropagative” virus transmission: An orchestra of virus-, insect-, and plant-derived instruments. *Advance Virus Research* 89: 141–199.
- Green, M.R. and Sambrook, J. (2019). Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc.* Feb 1;2019(2). doi: 10.1101/pdb.prot095182. PMID: 30710024.
- Guogas, L.M.; Laforest, S.M. and Gehrke, L. (2005). Coat protein activation of alfalfa mosaic virus replication is concentration dependent. *Journal of Virology* 79(9):5752-61. doi: 10.1128/JVI.79.9.5752-5761.2005. PMID: 15827190; PMCID: PMC1082755.
- Hadidi, A. (2019). Next-generation sequencing and CRISPR/Cas13 editing in viroid research and molecular diagnostics. *Viruses* 11: 120.
- Hadidi, A.; Levy, L. and Podleckis, E.V. (1995). Polymerase chain reaction technology in plant pathology. Pages 167–187. In: *Molecular methods in plant pathology*. R.P. Singh and U.S. Singh (eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

- Hahn, C.; Bachmann, L. and Chevreux, B. (2013). Reconstructing mitochondrial genomes directly from genomic next-generation sequencing reads – A baiting and iterative mapping approach. *Nucleic Acids Res* 41. doi:10.1093/nar/gkt371.
- Ham, Y. I. (2003). Review on the occurrence and studies of potato viral diseases in Korea. *Research in plant disease* 9: 1-9.
- Heather, J. M. and Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* 107 (1): 1-8.
- Hibino, H. (1989). Insect-borne viruses in rice. In: Harris KF, editor. *Advances in disease vector research*. 6:209-241. Springer-Verlag, New York, USA.
- Hibino, H. (1996). Biology and epidemiology of rice viruses. *Annual Review Phytopathology* 34:249-274.
- Hogenhout, S.A.; Ammar, E.D.; Whitfield, A.E. and Redinbaugh, M.G. (2008). Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annu. Rev. Phytopathol*, 46, 327–359.
- Hoh, F.; Uzest, M.; Drucker, M.; Plisson-Chastang, C.; Bron, P.; Blanc, S.; Dumas, C. (2010). Structural insights into the molecular mechanisms of cauliflower mosaic virus transmission by its insect vector. *Journal of Virology* 84: 4706–4713.
- Horvath, J. (1993). Host plants in diagnosis. Pages 15–48. In: *Diagnosis of plant virus diseases*. R.E.F. Matthews (ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Hull, R. (2013). *Plant Virology*, 5th Edition. Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA.

- Illumina. (2021). Illumina Sequencing Methods. From <https://www.illumina.com/techniques/sequencing.html>.
- Jeffrey, W. D. (2018). Molecular Plant Virology. Volume I, Virus Structure and Assembly and Nucleic Acid-Protein Interactions. CRC Press, USA.
- Jelkmann, W.; Mikona, C.; Turturo, C. et al.(2012). Molecular characterization and taxonomy of grapevine leafroll-associated virus 7. Arch Virol 157, 359–362. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1176-8>.
- Jeong, J.; Ju1, H. and Noh, J. (2014). A review of detection methods for the plant viruses. Research in Plant Disease 20(3): 173-181.
- Jones, D. R. (2003). Plant viruses transmitted by whiteflies. European Journal of Plant Pathology 109: 195–219.
- Kapoor, A. and Lipkin, W.I. (2001). Virus discovery in the 21st century. In: eLS. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0023621>.
- Kareem, A.A. (2018). Population genetic structure and symbionts of whitefly *Trialeurodes vaporariorum* and *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), in the UK and Iraq, Doctoral dissertation, Newcastle University, UK.
- Kareem, A.A. ; Logan, S. A. ; Port, G. and Wolff, K. (2020). *Bemisia tabaci* in Iraq: Population structure, endosymbiont diversity and putative species. Journal of Applied Entomology 00:1–11.DOI: 10.1111/jen.12736.
- Kfir, R. and Genthe, B. (1993). Advantages and disadvantages of the use of immunodetection techniques for the enumeration of microorganisms and toxins in water. Water Science and Technology 27: 243-252.
- Kim, J.; Cha, D.J.; Kwon, M. and Maharjan, R. (2016). Potato virus Y (PVY) detection in a single aphid by one-step RT-PCR with boiling technique. Entomological Research 46 (4): 278-285.

- King, A. M. Q.; Lefkowitz, E. J.; Mushegian, A. R.; Adams, M. J.; Dutilh, B. E.; Gorbalenya, A. E.; Harrach, B.; Harrison, R. L.; Junglen, S.; Knowles, N. J.; Kropinski, A. M.; Krupovic, M.; Kuhn, J. H.; Nibert, M. L.; Rubino, L.; Sabanadzovic, S.; Sanfaçon, H.; Siddell, S. G.; Simmonds, P.; Varsani, A.; Zerbini, F. M. and Davison, A. J. (2018). Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology* 163:2601-2631. [https://doi.org/ 10.1007/s00705-018-3847-1](https://doi.org/10.1007/s00705-018-3847-1).
- King, M. (2010). *RT-PCR Protocols Second Edition*. Humana Press, Totowa, NJ, USA.
- Kittayapong, P.; Jamnongluk, W. ; Thipaksorn, A.; Milne, J.R. and Sindhusake, C. (2003). Wolbachia infection complexity among insects in the tropical rice-field community. *Molecular Ecology* 12:1049-1060.
- Knipe, D. M. and Howley, P. M. (2013). *Fields virology 6th edition*. Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer, Philadelphia, USA.
- Ko, C.; Chang, S. and Hu, C. (2006). Survey of whiteflies and their transmission of plant viruses in Taiwan. National Taiwan University (NTU) `s publications, Taipei, Taiwan.
- Kobayashi, D.; Isawa, H.; Fujita, R.; Murota, K.; Itokawa, K.; Higa, Y.; Katayama, Y.; Sasaki, T.; Mizutani, T.; Iwanage, S.; et al. (2017). Isolation and characterization of a new iflavivirus from *Armigeres* spp. mosquitoes in the Philippines. *Journal of general virology* 98:2876–2881.
- Kocher, A.; Kamilari, M.; Lhuillier, E.; Coissac, E.; Pe´neau, J.; Chave, J. and Murienne, J. (2014). Shotgun assembly of the assassin bug *Brontostoma colossus* mitochondrial genome (Heteroptera, Reduviidae). *Gene* 552:184–94.

- Korpelainen, E.; Tuimala, J.; Somervuo, P.; Huss, M. and Wong, G. (2015). RNA-seq data analysis: A practical Approach. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA.
- Kumar, R.; Palicherla, S.R.; Mandal, B. and Kadiri, S. (2018). PCR based detection of betasatellite associated with the begomoviruses using improved universal primers. *Australasian Plant Pathology*. 47: 115–118. <https://doi.org/10.1007/s13313-017-0537-5>.
- Kumar, S.; Strcher, G. and Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870–1874.
- Kumazawa, Y.; Ota, H.; Nishida, M. and Ozawa, T. (1998). The complete nucleotide sequence of a snake (*Dinodon semicarinatus*) mitochondrial genome with two identical control regions. *Genetics*. 150:313–329. <https://doi.org/10.1046/j.13652443.1998.00217.x> PMID: 9725849.
- Kunz, D.; Tay, W. T.; Court, L. N.; Elfekih, S.; Gordon, K. H. J.; Evans, G. A. and De Barro, P. J. (2019). Draft mitochondrial DNA genome of a 1920 Barbados cryptic *Bemisia tabaci* ‘New World’ species (Hemiptera: Aleyrodidae), *Mitochondrial DNA Part B*, 4:1, 1183-1184, DOI10.1080/23802359.2019.1591197
- Lahuf, A.A. (2014). Host resistance and molecular interaction studies on Potato mop-top virus and its vector *Spongospora subterranea*. Ph.D. thesis, University of Aberdeen, Scotland, UK.
- Langmead, B. and Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9(4): 357-359.
- Lee, W.; Park, J.; Lee, G. S.; Lee, S. and Akimoto, S. I. (2013). Taxonomic status of the *Bemisia tabaci* complex (Hemiptera: Aleyrodidae) and

reassessment of the number of its constituent species. PLoS One 8:e63817.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063817>.

- Li, Z.X.; Hu, D.X.; Song, Y. and Shen, Z.R. (2005). Molecular differentiation of the B biotype from other biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), based on internally transcribed spacer 1 sequences. *European Journal of Entomology* 102(2): 293-297.
- Lievens, B.; Grauwet, T. J. M. A.; Cammue, B. P. A. and Thomma, B. P. H. J. 2005. Recent developments in diagnostics of plant pathogens: a review. *Research in Microbiology* 9: 57-79.
- Lin, X.D.; Yao, Y.; Wang, B.; Emlen, D.J. and Lavine, L.C. (2016). Ecological trade-offs between migration and reproduction are mediated by the nutrition-sensitive insulinsignaling pathway. *International Journal of Biological Sciences* 12 (5):607–616.
- Lipkin, W.I. and Firth, C. (2013). Viral surveillance and discovery. *Curr Opin Virol* 3:199–204.
- Liu, S.J.; He, X.H.; Park, G.; Josefsson, C.; Perry, K.L. (2002). A conserved capsid protein surface domain of *Cucumber mosaic virus* is essential for efficient aphid vector transmission. *Journal of Virology* 76:9756–9762.
- Lopez, M. M.; Llop, P.; Olmos, A.; Marco-Noales, E.; Cambra, M. and Bertolini, E. (2008). Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? *Current Issues in Molecular Biology* 11: 13-45.
- Lu, G. ; Ye, Z.; He, Y.; Zhang,Y.; Wang,X.; Huang, H.; Zhuo,J.; Sun, Z.; Yan, F. Chen,J; Zhang, C. and Li, J.(2020). Discovery of Two Novel Negeviruses in a Dungfly Collected from the Arctic. *Viruses* 12: 692; doi:10.3390/v12070692.

- Luminex. (2010). xMAP Technology Technical Note: Overcoming the cost and performance limitations of ELISA with xMAP technology. <http://www.luminexcorp.com/prod/groups/public/documents/lmncorp/308-xmap-vs.-elisa-white-paper.pdf> (Accessed Jul. 22, 2019).
- Mahon, C. R. and Lehman, D. C. (2019). Textbook of diagnostic microbiology, Sixth edition. Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, USA.
- Makkouk, K. M. and Kumari, S. G. (2006). Molecular diagnosis of plant viruses. Arab. Journal of Plant Protection 24: 135-138.
- Mardis, E.R. (2008). The impact of next-generation sequencing technology on genetics. Trends Genet 3: 133-141.
- Markham, P.G.; Bedford, I.D. and Liu, S. (1994). The transmission of geminiviruses by *Bemisia tabaci*. Journal of Pesticide Science 42(2): 123-128.
- Martin, J.H.; Mifsud, D. and Rapisarda, C. (2000). The whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) of Europe and the Mediterranean basin. Bulletin of Entomological Research 90(5):407-448.
- Marwal, A.; Sahu, A.K. and Gaur, R.K. (2013) Molecular characterization of begomoviruses and DNA satellites associated with a new host Spanish Flag (*Lantana camara*) in India. ISRN Virol. <https://doi.org/10.5402/2013/915703>.
- Mathur, K.C. and Chaturvedi, D.P. (1980). Biology of leaf and planthoppers, the vectors of Rice virus diseases in India. Proceedings of Indian National Science Academy. B:46: 797-812.
- Malathi, V. G., Renukadevi, P., Chakraborty, S., Biswas, K. K., Roy, A., Sivalingam, P. N., ... & Mandal, B. (2017). Begomoviruses and their satellites occurring in India: distribution, diversity and pathogenesis. In *A century of plant virology in India* (pp. 75-177). Springer, Singapore.

- McCartney, A. H.; Foster, S. J.; Fraaije, B. A. and Ward, E. (2003). Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Management Science* 59: 129-142.
- Mehta, P.; Wyman, J.A.; Nakhla, M.K.; and Maxwell, D.P. (1994). Transmission of tomato yellow leaf curl geminivirus by *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology* 87(5): 1291-1297.
- Mestan, K. K.; Ilkhanoff, L.; Mouli, S. and Lin, S. (2011). Genomic sequencing in clinical trials. *Journal of Translational Medicine* 9:222-232.
- Milne, G. R., & Gordon, M. E. (1993). Direct mail privacy-efficiency trade-offs within an implied social contract framework. *Journal of Public Policy & Marketing*, 12(2), 206-215.
- Mokili, J.L. ; Rohwer, F. and Dutilh, B.E. (2012). Metagenomics and future perspectives in virus discovery. *Curr Opin Virol* 2:63–77
- Moreira, D. A.; Buckup, P. A.; Britto, M. R.; Magalhães, M. G. P.; de Andrade, P. C. C.; Furtado, C. and Parente, T. E. (2016). The complete mitochondrial genome of *Corydoras nattereri* (Callichthyidae: Corydoradinae). *Neotropical Ichthyology*, 14(1): e150167.DOI: 10.1590/1982-0224-20150167.
- Moreira, D. A., Magalhães, M. G., de Andrade, P. C, Furtado, C., Val, A. L. & Parente, T. E. (2015). An RNA-based approach to sequence the mitogenome of *Hypoptopoma incognitum* (Siluriformes: Loricariidae). *Mitochondrial DNA. Part A, DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 27(5), 3784-3786.
- Mosquera-Yuqui, F.; Garrido, P. and Flores, F.J. (2020). Molecular characterization and complete genome of alstroemeria mosaic virus (AIMV). *Virus Genes* 56: 87–93. <https://doi.org/10.1007/s11262-019-01712-9>.

- Mugerwa, H.; Seal, S.; Wang, H. L.; Patel, M. V.; Kabaalu, R.; Omongo, C. A.; Alicai, T.; Tairo, F.; Ndunguru, J.; Sseruwagi, P. and Colvin, J. (2018). African ancestry of New World, *Bemisia tabaci*-whitefly species. *Sci. Rep.* 8:2734. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20956-3>.
- Mukhopadhyay, S. (2011). *Plant Virus, Vector Epidemiology and Management*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Madison Avenue New York, USA.
- Mullis, K.F.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G. and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51: 263–273.
- Naidua, R. A. and Hughes, J. A. (2001). Methods for the detection of plant virus diseases. In: *Proceedings of a Conference Organized by IITA, Plant Virology in Sub Saharan Africa* pp. 233-260. International Institute of Tropical Agriculture. Oyo State, Niger
- Nault, L.R. (1997). Arthropod transmission of plant viruses: A new synthesis. *Annals of the Entomological Society of America*, 90: 521-541.
- Navas-Castillo, J.; Fiallo-Olivé, E. and Sánchez-Campos, S. (2011). Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annual Review Phytopathology* 49:219-248.
- Ng, J. C. K. and Falk, B.W. (2006). Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* 44:183-212.
- Ng, J.C.K. and Zhou, J.S. (2015). Insect vector-plant virus interactions associated with non-circulative, semi-persistent transmission: Current perspectives and future challenges. *Current opinion virology* 15: 48–55.

- Nie, X.; Bai, Y.; Molen, T.A. and Desjardins, D. C. (2008). Development of universal primers for detection of potato carlaviruses by RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 149 (2):209-216.
- Omura, T.; Yan, J.; Zhong, B.X.; Wada, M.; Zhu, Y.F.; Tomaru, M.; Maruyama, W.; Kikuchi, A.; Watanabe, Y. and Kimura, I. (1998). The P2 protein of rice dwarf phyto-reovirus is required for adsorption of the virus to cells of the insect vector. *Journal of Virology* 72: 9370–9373.
- Ottati, S.; Chiapello, M.; Galetto, L.; Bosco, D.; Marzachi, C. and Abbà, S. (2020). New viral sequences identified in the Flavescence Dorée Phytoplasma vector *Scaphoideus titanus*. *Viruses* 12: 287-307; doi:10.3390/v1203 0287.
- Pearson, M. N.; Clover, G. R. G.; Guy, P. L.; Fletcher, J. D. and Beever, R. E. (2006). A review of the plant virus, viroid and mollicute records for New Zealand. *Australasia Plant Pathology* 35: 217-252.
- Pecman, A.; Kutnjak, D.; Gutiérrez-Aguirre, I.; Adams, I.; Fox, A. and Boonham, N. (2017). Next generation sequencing for detection and discovery of plant viruses and viroids: comparison of two approaches. *Front. Microbiol.* 8:1998.doi: 10.3389/fmicb.2017.01998.
- Peralta, S. M. G. (2017). Induction and suppression of antiviral RNA silencing by *Tomato spotted wilt virus*. A thesis for the degree of master of science, University of Nebraska, USA.
- Peter, K. A.; Gildow, F.; Palukaitis, P. and Gray, S. M. (2009). The C terminus of the Pulerovirus P5 readthrough domain limits virus infection to the phloem. *Journal of Virology* 83: 5419-5429.
- Pirone, T.P. (1964). Aphid transmission of a purified stylet-borne virus acquired through membrane. *Virology* 23:107-108.

- Pirone, T.P. (1991). Viral genes and gene products that determine insect transmissibility. *Seminars in Virology* 2: 81-87.
- Pirone, T.P.; Megahed, E. (1966). Aphid transmissibility of some purified viruses and viral RNAs. *Virology* 30:631–637.
- Plisson, C.; Uzest, M.; Drucker, M.; Froissart, M.; Dumas, C.; Conway, J.; Thomas, D.; Blanc, S.; Bron, P. (2005). Structure of the mature P3-virus particle complex of cauliflower mosaic virus revealed by cryo-electron microscopy. *Journal of Molecular Biology* 346: 267–277.
- Raccach, B.; Blanc, S. and Huet, H. (2001). Molecular basis of vector transmission: Potyvirus. In: *Virus-Insect-Plant Interactions*. K. Harris, J.E. Duffus and O.P. Smith (eds.), Academic Press, San Diego, USA.
- Raigond, B.; Verma, A.; Kochhar, T. ; Roach, S. ; Sharma, S. and Chakrabarti, S. K. (2018). Development of simplified and rapid nucleic acid release protocol for PCR based detection of *Potato viruses*. *Phytoparasitica* 46(2): 28-41. DOI: 10.1007 /s12600-018-0650-1.
- Rajapaksha, P., Elbourne, A., Gangadoo, S., Brown, R., Cozzolino, D., & Chapman, J. (2019). A review of methods for the detection of pathogenic microorganisms. *Analyst*, 144(2), 396-411
- Ramya, N.; Srinivasa, N. and Meshram, N. M. (2017). Note on genus *Maiestas* (Hemiptera: Cicadellidae) with diagnosis of important species. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 5(5): 1626-1636.
- Reinbold, C.; Herrbach, E. and Brault, V. (2003). Posterior midgut and hindgut are both sites of acquisition of cucurbit aphid-borne yellows virus in *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*. *Journal of General Virology* 84: 3473–3484

- Reynolds, D.R. ; Mukhopadhyay, S. ; Riley, J.R. ; Das, B.K.; Nath, P.S. and Mandal, S.K. (1999). Seasonal variation in the windborne movement of insect pests over northeast India. *International Journal of Pest Management* 45:195-205
- Rizzo, J.M. and Buck, M.J. (2012). Key principles and clinical applications of "next-generation" DNA sequencing. *Cancer Prev. Res. (Phila)* 5: 887-900.
- Rochow, W.F. (1970). Barley yellow dwarf virus: phenotypic mixing and vector specificity. *Science* 167:875-878.
- Rojas, M.R.; Gilbertson, R.L.; Russell, D.R. and Maxwell, D.P. (1993). Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77:340–347.
- Rubio, L.; Galipienso, L. and Ferriol, I. (2020). Detection of plant viruses and disease management: relevance of genetic diversity and evolution. *frontiers Plant Science* 11: 1092.doi: 10.3389/fpls.2020.01092.
- Saiki, R.; Gelfand, D.; Stoffel, S.; Scharf, S.; Higuchi, R.; Horn, G.; Mullis, K. and Erlich, H. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- Sanger, F. and Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology* 94(3): 441-448.
- Schuster, S. (2008). Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nature Methods* 5: 16–18. <https://doi.org/10.1038/nmeth1156>.
- Seo, J.K.; Kang, S.H.; Seo, B.Y.; Jung, J.K. and Kim, K.H. (2010). Mutational analysis of interaction between coat protein and helper component-proteinase of Soybean mosaic virus involved in aphid transmission. *Molecular Plant Pathology* 11: 265–276.

- Singh, P. R.; Dilworth, D. A.; Singh, M. and McLaren, L. D. (2004). Evaluation of simple membrane-based nucleic acid preparation protocol for RT-PCR detection of potato viruses from aphid and plant tissues. *Journal of Virological Methods* 121: 163-170.
- Smith, L.; Sanders, J.; Kaiser, R. et al. (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321: 674–679. <https://doi.org/10.1038/321674a0>.
- Stansly, P. A., Naranjo, S. E. (2010). *Bemisia: Bionomics and Management of a Global Pest*. Springer, Germany.
- Stewart, L.R.; Medina, V.; Tian, T.Y.; Turina, M.; Falk, B.W. and Ng, J.C.K. (2010). A mutation in the *Lettuce infectious yellows virus* minor coat protein disrupts whitefly transmission but not in planta systemic movement. *Journal of Virology* 84: 12165–12173.
- Sun, W.; Jiao, K.; Zhang, S.; Zhang, C. and Zhang, Z. (2001). Electrochemical detection for horseradish peroxidase-based enzyme immunoassay using p-aminophenol as substrate and its application in detection of plant virus. *Analytica Chimica Acta* 434: 43-50.
- Tamaki, N. (1901). On dwarf disease of rice plant and “tsumaguro-yokabai”. *J. Jpn. Agric. Soc*, 241, 22-30.
- Thompson, W.M.O. (2011). *The Whitefly, Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) Interaction with Geminivirus-Infected Host Plants: *Bemisia tabaci*, Host Plants and Geminiviruses. Springer, Germany.
- Thorburn, F. (2016). The use of next generation sequencing in the diagnosis and typing of viral infections. PhD thesis, University of Glasgow, Scotland, UK.

- Torrance, L. (1998). Developments in serological methods to detect and identify plant viruses. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 52: 27-32.
- Uyeda, I. and Masuta, C. (2015). *Plant virology protocols new approaches to detect viruses and host responses* Third edition. Springer Science and Business Media, New York, USA.
- Uzest, M.; Gargani, D.; Dombrovsky, A.; Cazevielle, C.; Cot, D.; Blanc, S. (2010). The “acrostyle”: A newly described anatomical structure in aphid stylets. *Arthropod Structure & Development* 39: 221–229.
- Valverde, R. A.; Navas-Castillo, J.; Moreira, M. A. and Ramos, A. (2003). Viruses of sweet potato (*Ipomoea batatas*) in Costa Rica, southern Spain, and the Canary Islands (Abstr.). Page 262 in: Eighth Int. Cong. Plant Pathol. Christchurch, New Zealand.
- Van der Want, J. P. H. and Dijkstra, J. (2006). A history of plant virology. *Archives of Virology* 151:1467-1498.
- Vemulapati, B.; Druffel, K. L.; Husebye, D.; Eigenbrode, S. D. and Pappu, H. R. (2014). Development and application of ELISA assays for the detection of two members of the family Luteoviridae infecting legumes: *Pea enation mosaic virus* (genus *Enamovirus*) and *Bean leafroll virus* (genus *Luteovirus*). *Annual Applied Biology* 165: 130-136.
- Venter, J.C.; Adams, M.D.; Myers, E.W.; Li, P.W. and Mural, R.J. (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351.
- Verbeek, M.; van Bekkum, P. J.; Dullemans, A. M. and van der Vlugt, R. A. A. (2014). Torradoviruses are transmitted in a semi-persistent and stylet-borne manner by three whitefly vectors. *Virus Res.* 186:55-60. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.003>.

- Verbeeka, M.; Tangb, J. and Wardb, L. I. (2012). Two generic PCR primer sets for the detection of members of the genus *Torradovirus*. *Journal of Virological Methods* 185:184–188.
- Voelkerding, K.V.; Dames, S.A. and Durtschi, J.D. (2009). Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin. Chem.* 55: 641-658.
- Vromant, N. ; Nhan, D.K. ; Chau, N.T.H. and Ollevier, F. (2002). Can fish control planthopper and leafhopper populations in intensive rice culture? *Biocontrol Science and Technology* 12: 695-703.
- Wang, A. and Zhou, X. (2016). *Current Research Topics in Plant Virology*. Springer International Publishing, The Netherland.
- Wang, J.J.; Yang, M.F.; Dai, R.H.; Li, H. and Wang, X.Y. (2018). Characterization and phylogenetic implications of the complete mitochondrial genome of Idiocerinae (Hemiptera: Cicadellidae). *International Journal of Biological Macromolecules*, 120:23662372. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.191> PMID: 30179694.
- Watson, J.D. and Crick, F.H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. Apr. 25;171(4356): 737-8. doi: 10.1038/171737a0. PMID: 13054692.
- Webb, M.D. and Viraktamath, C.A. (2009) Annotated check-list, generic key and new species of old world deltocephalini leafhoppers with nomenclatorial changes in the *Deltocephalus* group and other *Deltocephalinae* (Hemiptera, Auchenorrhyncha, Cicadellidae). *Zootaxa* 2163: 1-64.
- Webster, C. G.; Wylie, J. S. and Jones, M. G. K. (2004). Diagnosis of plant viral pathogens. *Current Science* 86: 1604-1607.

- Wei, T.; Hibino, H. and Omura, T. (2009). Entry of rice dwarf virus from insect vector cells involves secretory exosomes derived from multivesicular bodies. *Communicative & Integrative Biology* 2: 324–326.
- Wei, T.Y.; Chen, H.Y.; Ichiki-Uehara, T.; Hibino, H. and Omura, T. (2007). Entry of Rice dwarf virus into cultured cells of its insect vector involves clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Virology* 81: 7811–7815.
- Whitfield, A.E.; Falk, B.W.; Rotenberg, D. (2015). Insect vector-mediated transmission of plant viruses. *Virology* 479: 278–289.
- Wilkinson, L. (2001) Beijerinck, Martinus Willem. In: eLS. Wiley. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0002363>.
- Wilson, A.C.; Cann, R.L.; Carr, S.M.; Matthew, G.; Gyllenstein, U.B.; Helm-Bychowski KM, et al. (2010). Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society* 26(4):375–400. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1985.tb02048.x>.
- Wright, A. A.; Cross, A. R. and Harper, S. J. (2020). A bushel of viruses: Identification of seventeen novel putative viruses by RNA-seq in six apple trees. *PLOS ONE* | <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227669>.
- Xiao T. and Zhou W. (2020). The third-generation sequencing: the advanced approach to genetic diseases. *Translational Pediatrics* 9: 163–173. [10.21037/tp.2020.03.06](https://doi.org/10.21037/tp.2020.03.06).
- Yang, X.; Zhang, T. Chen, B. and Zhou, G. (2017). Transmission biology of *Rice stripe mosaic virus* by an efficient insect vector *Recilia dorsalis* (Hemiptera: Cicadellidae). *Frontiers in Microbiology*. 8:2457.doi: [10.3389/fmicb.2017.02457](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02457).

- Zanardo, L. G. and Carvalho, C. M. (2017). *Cowpea mild mottle virus* (*Carlavirus*, *Betaflexiviridae*): A review. *Tropical Plant Pathology* 42:417-430. <https://doi.org/10.1007/s40858-017-0168-y>.
- Zhan, B.; Cao, M.; Wang, K.; Wang, X. and Zhou, X. (2019). Detection and Characterization of *Cucumis melo Cryptic Virus*, *Cucumis melo Amalgavirus* 1, and *Melon Necrotic Spot Virus* in *Cucumis melo*. *Viruses* 11(1): 81. <https://doi.org/10.3390/v11010081>.
- Zhao, P.; Sun, X.; Li, P.; Sun, J.; Yue, Y.; Wei, J.; Wei, T. and Jia, D. (2019). Infection characteristics of *Rice Stripe Mosaic Virus* in the body of the vector leafhoppers. *Frontiers in Microbiology* 9: 3258 URL=<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.03258>.
- Zheng, L.; Rodoni, B.C.; Gibbs, M.J. and Gibbs, A.J. (2010). A novel pair of universal primers for the detection of potyviruses. *Plant Pathology* 59: 211-220.
- Zhou, F.; Pu, Y.; Weit, T.; Liu, H.; Deng, W.; Wei, C.; Ding, B.; Omura, T. and Lin, Y. (2007). The P2 capsid protein of the nonenveloped rice dwarf phyto-reovirus induces membrane fusion in insect host cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA* 104: 19547–19552.
- Zografidis, A.; Nieuwerburgh, F.V.; Kolliopoulou, A.; Apostolou-Karampelis, K.; Head, S.R.; Defore, D.; Smagghe, G. and Swevers, L. (2015). Viral small-RNA analysis of *Bombyx mori* larval midgut during persistent and pathogenic cytoplasmic polyhedrosis virus infection. *Journal of Virology* 89: 11473–11486.

Abstract:

The aim of this study was to identify the plant viruses and their insect vectors that are common on various plant hosts in Karbala Province and other near provinces using different molecular techniques.

The insect (Whiteflies and leafhoppers) samples distributed on a number of plant hosts were collected, DNA and RNA extracted from these insect samples and cDNA was prepared using the RNA extracted. The Polymerase Chain Reaction (PCR) technique was applied utilizing specific primer sets that are used for diagnosis of the species of the most common viral genus (*Begomovirus*, *Torradovirus*) transmitted by these insects. As well as, the Next Generation sequencing (NGS) specifically the Transcriptome method was operated to identify the plant viruses and their insect vectors.

The results showed the superb capability of the NGS comparing with PCR in diagnosing a number of plant viruses associated with the whitefly insect that infest *Zantedeschia mild mosaic* included *Alfalfa mosaic virus*, *Broad bean wilt virus*, *Tomato Grapevine leafroll-associated virus*, *Pittosporum cryptic virus-1 virus*, *spotted wilt orthotospovirus* and *Tomato spotted wilt virus*. On the other hand, the *Grapevine leafroll-associated virus* and *Pittosporum cryptic virus-1* were identified in the leafhopper insect. Additionally, the majority of plant viruses found were in significant genetic variation comparing with the global viral strains and this is possible the main reason for the unsuccessful PCR test in diagnosis of the plant viruses transmitted by the studied insects.

Furthermore, the draft genome of the whitefly mitochondria was determined for the first time in Iraq using the NGS technique. This genome comprised 8 Protein-coding genes (PCGs), two ribosomal RNA genes and two genes of transfer RNA.

This finding confirmed that the species of whitefly insect common in the Iraq environment is *Bemisia tabaci* MEAM1. Moreover, the almost complete genome of leafhopper mitochondria was uncovered using the NGS method and was found to contain 13 Protein-coding genes (PCGs), two ribosomal RNA genes and 13 transfer RNA genes. This discovery confirmed that the leafhopper species is *Maiestas dorsalis* and this finding is the first record in Iraq.

This study reveals the importance of NGS application in molecular diagnosis of plant viruses and their vectors due to its fast and precise performance comparing with other traditional molecular approaches. However, the relatively high cost and bioinformatic analysis experience needed for the NGS data are the main obstacles that prevent or slow down application of NGS commonly.

Ministry of Higher Education and Scientific Research
University of Kerbala
College of Agriculture
Department of Plant Protection



**Molecular diagnosis of some plant viruses spread on a
number of plant families in Iraq using next generation
sequencing (NGS) technology**

A thesis submitted to

The council of the College of Agriculture / University of Kerbala as a
partial fulfilment of the requirements for the degree of Master in
Science in Agriculture - Plant Protection

By

Mohammed Dawood Salman

Supervised by

Assistant professor Dr. Adnan Abdaljeleel Lahuf

1442 A.H.

2021 A.D.