



جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة كربلاء

كلية الزراعة

قسم وقاية النبات

**إستخدام طريقة الـ Next-generation sequencing في تشخيص
فايروسات *Begomovirus* في محافظة كربلاء على نبات الطماطة**

رسالة مقدمة الى مجلس كلية الزراعة / جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير
العلوم الزراعية / وقاية النبات

من قبل

محمود عثمان عباس الجنابي

باشراف

أ.د. عدنان عبد الجليل لهوف

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

(وَمَا أُوتِيْتُمْ مِّنَ الْعِلْمِ إِلَّا قَلِيْلًا)

صدق الله العظيم

جزء من سورة الإسراء: 85

الاهداء

إلى.. صاحب الفضل و المنة و العطاء العالي و المتعالي

"الله" جل جلاله و عَظْمُ شأنه.

إلى.. التاج و المعراج و البراق سيد الخلق و احبهم سيدنا محمد عليه افضل
الصلاة السلام و آل بيته و أصحابه أهل المجد و السؤدد

إلى من أنار دروبي والدي العزيز (أدامه الله لنا)

كنتي كسحابة معطاءه سقت الارض فأخضرت

امي (حفظها الله)

إلى. نور حياتي و نبراس طريقي و وحسن عمري

إخوتي (حفظكم الله العزيز)

الى من نطقوا اسمها على مسامعي وتركت براءتها بيننا فطافت روحها الى
بارئها ولم تراها عيني:

عبيري (رحمها الله جل في علاه)

أهديكم عملي المتواضع و أحتسب أجر و ثواب هذا العمل الى وجه الله و إلى
حضرة سيدنا محمد عليه افضل الصلاة و السلام

محمود

التكبر والتقدير

الحمد لله البعيد في قربه، القريب في بعده، المتعالي في رفيع مجده، عن الشيء وضده، الذي اوجد بقدرته
الوجود بعد أن كان عدماً، و أودع كلّ موجود حكماً، و جعل العقل بينهما حكماً، ليميز بين الشيء و ضده،
و ألهمه بما علّمه فعلم مرّ مذاق مصابه من حلاوة شهبه، فمن فكّر بصحيح قصده، و نظر بتوفيق رُشده،
علم أنّ كلّ مخلوق موثوق في قبضتي شقائه و سعده، مرزوق من خزائن نعمه و رفده، قال

تعالى وَعَلَّمَكَ مَا لَمْ تَكُن تَعْلَمُ ۗ وَكَانَ فَضْلُ اللَّهِ عَلَيْكَ عَظِيمًا ﴿١١٣﴾

و أتقدم بالثناء على ما قدمه لي مشرفي طالباً في دراسة الماجستير، أستاذي و قدوتي و أقتدائي، الذي له
الفضل- بعد الله تعالى- على البحث و الباحث حين كان الموضوع كلمات تجول في مخيلتنا حتى أصبحت
رسالة بنتائج مدونة، مرتبة و مؤيدة بالحجج و الاسانيد فأتقدم له بالعلّي في العلم و المودة و الامتنان
مشرفي القيم الاستاذ الدكتور عدنان عبد الجليل لهوف.

كما و أتقدم بوافر التقدير و الاحترام الى عمادة كلية الزراعة جامعة كربلاء المقدسة متمثلة بعميدها الأستاذ الدكتور ثامر خضير الجنابي و مساعديه الافاضل و رئيس قسم وقاية النبات الأستاذ المساعد الدكتور علي عبد الحسين وكافة منتسبيها بمختلف المناصب و المسميات و المقامات.

و الشكر ايضا موصول الى أساتذتي في القسم لما قدموه من مساعده ولو بكلمه و أخص منهم الاستاذ الدكتور عقيل نزال بربير و الاستاذ الدكتور رجاء غازي عبد المحسن لما قدموه لنا عامهً و لي خاصةً من حب و إحتواء و مؤازرة و معلومات لا تثمن بالذهب.
شكري وتقديري الى عمي الاستاذ المساعد الدكتور عبد الباسط عباس علي الجنابي و المهندس ياسر البهادلي مدير شركة أوراك الزراعية و الصديق م . م محمد كاظم المعموري لمساعدتي لجمع عينات نبات الطمّاطة.

كل التقدير و الحب الى اعضاء لجنة المناقشة لقبولهم ومناقشتهم موضوع رسالتي.

مهما نطقت الالسن بأفضالهم وخطت الايدي بوصفهم وجسدت الروح معانيها ابقى مقصراً امام روعتهم وجمهالهم اصدقائي في دراسة الماجستير

كل الحب الى أمني و أماني و مأمني بعد الله جل في علاه وتنزّه عن من سواه جميع أفراد عائلتي.

محمود

بسم الله الرحمن الرحيم

اقرار المشرف

أشهد ان اعداد الرسالة الموسومة (إستخدام طريقة الـ Next-generation sequencing في تشخيص فايروسات *Begomovirus* في محافظة كربلاء على نبات الطماطة) 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
العنوان: كلية الزراعة - جامعة كربلاء
التاريخ: 2022 / 11 / 28

توصية رئيس قسم وقاية النبات

بناء على التوصيات ارشح هذه الرسالة للمناقشة


التوقيع:
الاسم: د. علي عبد الحسين كريم
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد
العنوان: كلية الزراعة / جامعة كربلاء
التاريخ: 2022 / 11 / 28

إقرار لجنة المناقشة

نشهد بأننا أعضاء لجنة المناقشة اطلعنا على الرسالة الموسومة بـ (إستخدام طريقة الـ Next-generation sequencing في تشخيص فايروسات *Begomovirus* في محافظة كربلاء على نبات الطماطة) وقد ناقشنا الطالب في محتوياتها و فيما له علاقة بها ووجدنا انها جديرة بالقبول لنيل شهادة الماجستير في العلوم الزراعية - وقاية النبات.

التوقيع:

رئيس اللجنة: أ.د. رجا غازي عبد المحسن

كلية الزراعة - جامعة كربلاء

التوقيع:

أ.م. د. إستبرق محمد عبد الرضا

كلية الزراعة - جامعة كربلاء

عضواً

التوقيع:

أ.م. د. وسام عدنان راضي

كلية الزراعة - جامعة الكوفة

عضواً

التوقيع:

أ.د. عدنان عبد الجليل لهوف

كلية الزراعة - جامعة كربلاء

عضواً ومشرفاً

التوقيع:

أ.د. ثامر كريم خضير

عميد كلية الزراعة - جامعة كربلاء

التاريخ: 2022 / 11 / 28

الخلاصة

هدفت هذه الدراسة الى تحديد أنواع جنس *Begomovirus* وتوابعها المنتشرة على عدد من العوائل النباتية في محافظة كربلاء باستعمال التقنيات الجزيئية الحديثة مثل Polymerase Chain Reaction ، Realtime- Polymerase Chain Reaction واهم هذه الطرق هي Next Generation sequencing. جُمعت عينات مختلفة من نباتات الطماطة من محافظة كربلاء ظهرت عليها اعراض الإصابة الفايروسيه في موسم النمو 2021-2022، استخلص الحامض النووي الـ DNA باستعمال العدة التجارية وطريقة مبتكرة في هذه الدراسة هي استخلاص الحامض النووي بمادة هاييوكلوريت الصوديوم NaClO (القاصر) وطبقت تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase Chain Reaction باستعمال بادئات تستهدف تشخيص أنواع الجنس الفايروسي *Begomovirus* بالإضافة الى تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل اللحظي Realtime- PCR (RT-PCR) كما استعملت تقنية الجيل التالي لتحديد التسلسل Next Generation sequencing (NGS) بطريقة Metagenomics في تشخيص الفايروسات النباتية المرافقة للنباتات المصابة.

أظهرت النتائج نجاح الطريقة المبتكرة في استخلاص الـ DNA الكلي من النباتات المصابة بفايروس TYLCV. وكانت طريقتي الاستخلاص باستعمال محلول هيدروكسيد الصوديوم لوحده او متبوعاً بتطبيق عملية ترسيب الـ DNA افضل من طريقة استعمال الماء المقطر فقط او مع تطبيق عملية ترسيب الـ DNA ومن جانب اخر حققت العدة التجارية التركيز والنقاوة الأعلى للـ DNA المستخلص من النباتات المصابة نفسها.

أظهرت نتائج اختبار العينات النباتية المصابة باستعمال تقنية PCR نجاح زوج البادئات -PBL1v2040 F و PAR1c496-R في الارتباط وتضخيم مناطق محددة من الحامض النووي الخاص ببعض انواع الجنس *Begomovirus* بالمقابل لم تنجح بقية البادئات المستعملة في هذا الاختبار في اكتشاف الفايروسات المحددة.

بالرغم من عدم نجاح عينات الـ DNA لمحصولي البطاطا والبايما في أتمام عملية تحديد التسلسل لهما باستعمال تقنية الـ NGS الا ان عينات محصول الطماطة نجحت اذ تم الحصول على 52,606,000 سلسلة مقروءات

مزدوجة النهايات (Paired ends reads) باطوال 151 قاعدة نايتروجينية والتي تم إنشاؤها للحصول على بيانات الـ Metagenomics .

لقد أظهرت نتائج تقنية الـ NGS وجود العديد من المتجاورات المتداخلة المشابهة للتسلسل المرجعي للجينوم الكامل لفايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطة *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) إذ غطت تسلسلات الجينوم بأكمله لهذا الفايروس وكان مجموع طول تسلسل هذه المتجاورات 2729 قاعدة نايتروجينية التي نتج عنها جينوم ذو شريط مفرد حلقي احادي الجزء (Monopartite) وذو تنظيم جيني مطابقاً لسلاسل هذا الفايروس وذلك باحتوائه على ستة جينات رئيسة مشفرة للبروتينات الست الرئيسية للفايروس بالإضافة الى المنطقة الوراثية الغير مشفرة ما بين الجينات (Intergenic region). ولقد تم إثبات العلاقة الوراثية بين تسلسل الجينوم الكامل لهذا الفايروس مع العديد من سلالات الفايروس نفسه تحديداً السلالات المعتدلة (Mild) وكانت العزلة TYLCV-Najaf *Tomato yellow leaf curl virus isolate* (MT583814.1) الأكثر تشابه بنسبه وصلت الى 99.30%. تم إيداع هذا الجينوم الكامل لهذه السلالة في قاعدة بيانات NCBI-GenBank بالاسم *Tomato yellow leaf curl virus - Mild strain Karbala-1* وتحت الرمز ON254272.1. إذ اشارت نتائج الفحص والتحليل عن عدم وجود ظاهرتي إعادة التركيب وإعادة التجميع في جينوم فايروس TYLCV-Mild Karbala-1 المشخص في هذه الدراسة علما ان المتجاورات المتداخلة لسلالة الفايروس هذه كانت السائدة في حقول الطماطة التي شملها المسح. ويعد هذا التسجيل الأول لهذا السلالة في محافظة كربلاء، العراق.

بينت النتائج أيضا عدم وجود مقروءات او متجاورات متداخلة شبيهة للتابعين ألفا و دلتا بينما كان هنالك 12,712 مقروءة و 9 متجاورات غطت بشكل تام (100%) الجينوم الكامل لأحد توابع بيتا (β satDNA) وهو *Cotton leaf curl Gezira betasatellite isolate* Al-Ain (KM279620.1) وبنسبة تشابه 94.66% والذي تم تأكيده بنتائج تحليل النشوء والتطور لذلك حفظ الجينوم الكامل لهذا التابع في مستوعب NCBI-GenBank بالاسم *Cotton leaf curl Gezira betasatellite isolate* Karbala وتحت الرمز ON206651.1 ويعد هذا التسجيل الأول لهذا التابع في العراق.

كما بينت النتائج ان هنالك العديد من المتجاورات المتداخلة التي تتشابه مع القطعتين الأولى والثانية (Segment A و Segment B) من جينوم الفايروس *Tomato leaf curl palampur virus* ذو الجينوم ثنائي الأجزاء (Bipartite). كما لوحظ ان هذه المتجاورات تمتلك تنظيماً جينياً مطابقاً لجينوم هذا الفايروس إذ احتوت القطعة الأولى (Segment A) على ستة جينات رئيسة مشفرة لبروتينات ستة رئيسة للفايروس بينما تضمنت القطعة الثانية (Segment B) جينين فقط تشفران لبروتينين بالإضافة الى احتواء القطعتين على

مناطق غير مشفرة ما بين الجينات (Intergenic region). وبالرغم من تسجيل ودراسة الإصابة بهذا الفيروس سابقاً في العراق على نباتات القرع و الداتورة و الخيار إلا ان تشخيصنا له في نبات الطماطة هو الأول على مستوى العراق.

لقد تم أيضا في هذه الدراسة تشخيص جينوم فيروس داخلي ضمن جينوم نبات الطماطة *Solanum lycopersicum*. اذ أشارت نتائج التشابه لمسودة الجينوم التي تم الحصول عليها الى ان الفيروس المشخص هو *Tobacco vein clearing virus (TVCV)* وبنسبه تشابه 87.4% مع نسبة تغطية 98.1% كما اكدت نتائج تحليل التشابه والنشوء هذا التشخيص وقد تم التجميع النهائي لتسلسل جينوم TVCV المشخص في هذه الدراسة وايداعه ضمن بيانات بنك الجينات تحت الرمز ON684329 اذ كان ذو شريط DNA مزدوج طوله 7760 قاعدة نايتروجينية تتضمن أربعة أطر قراءة مفتوحة open reading frames أي جينات تشفر المناطق المحافظة النموذجية لجينوم أنواع الجنس *Solendovirus* التابع لها.

بالإضافة الى ذلك فقط تم الحصول على مسودة الجينوم الكامل لمایتوكوندريا حشرة الذبابة البيضاء المرافقة لنباتات الطماطة المصابة وذلك عن طريق تحديد وجود 14 جين مشفر للبروتينات Protein-coding genes (PCGs) مع وجود جينين للحامض النووي الرايبوسومي Ribosomal RNA genes للوحدة الكبيرة والصغيرة و 22 جين من الحامض النووي الناقل Transfer RNA. واکدت هذه النتيجة ان نوع حشرة الذبابة البيضاء المنتشرة على محصول الطماطة في محافظة كربلاء هو *Bemisia tabaci MEAM1*. وأظهرت نتائج التشخيص الجزيئي باستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل اللحظي Real Time-PCR ان البادرات النامية من البذور المعقمة والبذور غير المعقمة كانت مصابة بالفايروس TYLCV مما يشير الى إمكانية انتقال هذا الفيروس بواسطة البذور.

قائمة المحتويات

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

الصفحة	العنوان	التسلسل
1	Introduction المقدمة	1
4	Literature review استعراض المراجع	2
4	<i>Begomovirus</i> الجنس	1-2
6	تنظيم الجينوم وتكاثره	-1-21
7	DNA-A و DNA-B القرابة الوراثية بين	-1-22
8	Satellites التوابع	-1-23
10	الانتقال	-1-24
11	<i>Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)</i> فايروس	2-2
11	العائلي والمدى الجغرافي التوزيع	1-2-2
13	TYLCV لفايروس الاقتصادية الاهمية و المرضية الاعراض	2-2-2
15	TYLCV لفايروس الجينومي والتنظيم المظهري الشكل	3-2-2
17	TYLCV فايروس سلالات	4-2-2
17	(Mutations) وطفرات (Recombination) تركيب إعادة TYLCV فايروس	5-2-2
18	<i>Tomato leaf curl Palampur virus (ToLCPalV)</i> فايروس	3-2
19	Endogenous (EPRVs) العكسية الداخلية الفايروسات pararetroviruses	4-2
21	النباتية ألفايروسات تشخيص	5-2
22	النباتية الفايروسات تشخيص في الجزيئية التقنيات	1-5-2

30	Materials and Methods المواد وطرائق العمل	3
30	المواد Materials	1-3
30	الأجهزة والمعدات المستعملة في هذه الدراسة	1-1-3
31	The chemical materials المواد الكيميائية	2-1-3
32	Methods طرائق العمل	2-3
32	جمع العينات النباتية	1-2-3
32	النباتية العينات من DNA ال- النووية الحامض استخلاص التجارية العدة باستعمال	2-2-3
33	النباتية العينات من DNA ال- النووية الحامض استخلاص جديدة طريقة باستعمال	3-2-3
34	DNA ال- ترسيب	4-2-3
34	<i>Begomovirus</i> لفايروسات الجزيئي التشخيص	5-2-3
39	<i>Begomoviruses</i> فايروسات انتقال طرق عن التحري الدراسة هذه المشخصة في	6-2-3
39	للنباتات المرافقة البيضاء الذبابة لحشرة الجزيئي التشخيص المصابة	1-6-2-3
40	البذور طريق عن TYLCV فايروس انتقال تقييم	2-6-2-3
42	Results and Discussion النتائج والمناقشة	4
42	النباتية العينات من الكلي DNA ال- النووية الحامض استخلاص	1-4
45	<i>Begomoviruses</i> لفايروسات الجزيئي التشخيص	2-4
45	PCR ال- المتسلسل البلمرة تفاعل تقنية باستعمال التشخيص	1-2-4
47	Next التسلسل لتحديد التالي الجيل تقنية باستعمال التشخيص Generation sequencing (NGS)	2-2-4
50	التشخيص وتحديد الخصائص الجزيئية لفايروس تجعد واصفرار <i>Tomato yellow leaf curl virus</i> أوراق الطمطة (TYLCV)	1-2-2-4
58	<i>Cotton leaf curl</i> التشخيص وتحديد الخصائص الجزيئية للتابع <i>Gezira betasatellite isolate Karbala</i>	-1-2-2-4 1
63	<i>Tomato leaf curl palampur virus</i> (ToLCPaLV) التشخيص وتحديد الخصائص الجزيئية للفايروس	2-2-2-4
73	التشخيص وتحديد الخصائص الجزيئية للفايروس الداخلي <i>Tobacco vein clearing virus</i> (TVCV)	3-2-2-4
84	في جينومات TVCV التحقق من وجود جينوم الفايروس الداخلي العالمية <i>S. lycopersicum</i>	-3-2-2-4 1
86	<i>Bemisia tabaci</i> البيضاء الذبابة لحشرة الجزيئي التشخيص	3-4
92	عن طريق البذور TYLCV تقييم انتقال فايروس	4-4
97	Conclusions and Recommendations الاستنتاجات والتوصيات	5
97	Conclusions الاستنتاجات	1-5

98	Recommendations التوصيات	2-5
103	References المصادر	6
105	Appendix الملحق	

قائمة الجداول

رقم الجدول	عنوان الجدول	الصفحة
1	المستعملة والمعدات الأجهزة	30
2	المستعملة الكيميائية المواد	31
3	الدراسة في المستعملة العدد	31
4	البواديء المستخدمة في تفاعل تسلسل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction	35
5	المتسلسل البلمرة تفاعل اختبارات في الدورات ظروف Polymerase Chain Reaction	36
6	اللحظي المتسلسل البلمرة تفاعل اختبار في المستعملة البواديء زوج TYLCV في تشخيص فيروس الـ Real Time-PCR	41
7	تركيزه في المصابة النباتات من DNA الـ استخلاص طريقة تأثير ونقاوته	43
8	<i>Tomato yellow leaf curl virus - Mild strain Karbala-1</i> سلالة جينوم تنظيم الدراسة هذه في المشخصة	52
9	للفايروس العراقية جينوم السلالة تسلسل بين التشابه تحليل نفس جينومات تسلسلات مع TYLCV-Mld Karbala-1 العالم أنحاء جميع في والسلالة الفايروس	54
10	<i>Cotton leaf curl Gezira betasatellite isolate Karbala</i> العالمية التابع نفس جينومات تسلسلات مع	60
11	في المشخصة ToLCPaLV فايروس للقطعتي الجينومي التنظيم الدراسة هذه	66
12	فايروس من Segment A الأولى القطعة بين التشابه نسبة تحليل نفس تسلسلات جينوم مع الدراسة هذه المعزولة في ToLCPaLV العالمية السلالات من التابعة للعديد القطعة	67
13	فايروس من Segment B الأولى القطعة بين التشابه نسبة تحليل نفس تسلسلات جينوم مع الدراسة هذه المعزولة في ToLCPaLV العالمية السلالات من التابعة للعديد القطعة	70

73	هذه في المشخص TVCV فايروس جينوم مسودة بين التشابه العزلات والسلالات مع جينوم الطماسة مع والمتداخله الدراسه العالمية	14
77	الغلاف لبروتين الامينية الاحماض تسلسل بين التشابه تحليل مع تسلسلات TVCV العراقية للفايروس للسلالة البروتيني العالم أنحاء جميع في الصلة ذات الأخرى الأمانة الأحماض	15
78	الحركة لبروتين الامينية الاحماض تسلسل بين التشابه تحليل الأحماض تسلسلات مع السلالة العراقية TVCV للفايروس العالم أنحاء جميع في الصلة ذات الأخرى الأمانة	16
80	المتعدد للبروتين الامينية الاحماض تسلسل بين التشابه تحليل الأحماض تسلسلات مع السلالة العراقية TVCV للفايروس العالم أنحاء جميع في الصلة ذات الأخرى الأمانة	17
81	عامل لبروتين الامينية الاحماض تسلسل بين التشابه تحليل التابع TVCV للفايروس Trans-activator factor ذات الأخرى الأمانة الأحماض تسلسلات مع العراقية للسلالة العالم جميع أنحاء في الصلة	18
86	مع TVCV الفايروس من العراقية السلالة لجينوم التشابه تحليل الطماسة لنبات ذي الصلة العالمية الجينومات	19
90	البيضاء الذبابة لحشرة المايوتوكوندريا عضية جينوم مسودة مقارنة العالمية العزلات والسلالات مع الطماسة المصابة لنباتات المرافقة الحشرة لذات	20

قائمة الاشكال

الصفحة	عنوان الشكل	رقم الشكل
5	الكاملة الجسيمة شكل	1
6	<i>Begomovirus</i> الجنس فايروسات لأنواع الجينومي التنظيم	2
9	<i>Begomovirus</i> الجنس فايروسات الجينوم لتوابع تركيب	3
12	خارطة التوزيع العالمية لفايروس تجعد واصفرار أوراق الطماسة TYLCV.(4
14	نباتات احد في TYLCV بفايروس للإصابة الخارجية الاعراض محافظة في الصحراوية احد المزارع في المزرعة الطماسة 2021 - 2022 النمو موسم خلال كربلاء	5
16	TYLCV للفايروس الجينومي التركيب	6
19	ToLCPaIV فايروس يسببها التي الانموجية المرضية الاعراض	7
24	فايروس تشخيص في المستعملة الجزئية ابرز الطرق مخطط TYLCV	8
26	Sanger Sequencing لطريقة توضيحي مخطط	9

28	التجميع او بالتوليف التسلسل تحديد لطريقة توضيحي مخطط Sequencing-by-Synthesis	10
40	المبتكرة الطريقة باستعمال المستخلص DNA ال ونقاوة تركيز التجارية والعدة	11
44	تفاعل جهاز باستعمال TYLCV لفايروس الجزئي التشخيص عينات في Exicycler TM 96 اللحظي المتسلسل البلمرة مختلفة بطرق المستخلصة DNA ال	12
46	البادئات زوج باستعمال التضخيم لنواتج الكهربائي الترحيل المصابة النباتات من لعدد PAR1c496-R و PBL1v2040-F النووي الحمض سلّم (Begomovirus الجنس من انواع من بعدد (نايتروجينية قاعدة 10000 المستعمل بحجم	13
48	Phred quality score مقياس المقروءات بحسب جودة	14
48	Phred quality score مقياس المقروءات بحسب جودة	14
51	للجينوم المشابه (الأحمر بالسهم محددة) المتداخلة المتجاورات TYLCV للفايروس المرجعي	15
53	الأخضر اللون . TYLCV للفايروس الانموذجية الجينوم خريطة تشفر التي البروتينات يمثل اللون الأصفر بينما الجينات مواقع يمثل الجينات هذه لها	16
56	TYLCV-Mld Karbala-1 فايروس تسلسل بين الوراثة العلاقة التابعة الأخرى العالمية (والسلالات)سوداء بنقطة المحدد (1 نفسه للفايروس	17
57	TYLCV- الفايروس بسلاطة للإصابة المرافقة المرضية الاعراض /كربلاء محافظة في الطماعة على محصول Mld Karbala-1 العراق	18
59	للجينوم المشابه (الأحمر بالسهم محددة) المتداخلة المتجاورات لسلاطة المرافق Cotton leaf curl betasatellite للتابع المرجعي TYLCV-Mld Karbala-1 الفايروس	19
62	Cotton leaf curl Gezira التابع بين الوراثة العلاقة betasatellite isolate Karbala (المحدد) (مع سوداء بنقطة العالمية المناظرة التوابع	20
64	الأحمر) المشابه اللون ذات بالاسهم (محددة المتداخلة المتجاورات جينوم الفايروس من (B) والقطعة الثاني (A) الأول للقطعة ToLCPaLV	21
65	المتجاورات المتداخلة (محددة بالاسهم ذات اللون الاحمر) المشابهة (من جينوم (B) والقطعة الثانية A للقطعة الأول) ToLCPaLV الفايروس	21
66	للفايروس (Bipartite)الأجزاء ثنائية الانموذجية الجينوم خريطة ToLCPaLV	22

69	من (A) Segment الأولى القطعة سلالة بين الوراثة العلاقة الطماطة لنباتات المحلية المرافقة ToLCPaLV فايروس الأخرى العالمية والسلالات (سوداء بنقطة إليه المشار) المصابة للفايروس نفسه التابعة	23
72	من (B) Segment الأولى القطعة سلالة بين الوراثة العلاقة الطماطة لنباتات المحلية المرافقة ToLCPaLV فايروس الأخرى العالمية والسلالات (سوداء بنقطة إليه المشار) المصابة للفايروس نفسه التابعة	24
74	الفايروس لجينوم المرجعي للتسلسل الخام المقروءات تغطية NC_003378.1 الرمز ذو TVCV	25
76	<i>Tobacco vein clearing virus</i> الداخلي للفايروس الانموجية الجينوم خريطة الجينات المحافظة مواقع يمثل اللون الأخضر . الجينات هذه لها تشفر التي البروتينات يمثل الأصفر اللون بينما	26
82	للفايروس السلالة البروتيني الغلاف لبروتين الوراثة الشجرة (التسلسلات مع) اسود لون ذات TVCV بنقطة محددة(العراقية والتي تشمل الفايروسات من للعديد التابع البروتين لنفس العالمية TVCV الفايروس	27
83	العراقية لسلالة TVCV للفايروس الحركة لبروتين الوراثة الشجرة البروتين لنفس العالمية التسلسلات مع) اسود لون ذات بنقطة محددة(TVCV الفايروس ضمنها من والتي الفايروسات من للعديد التابع	28
83	لسلالة TVCV للفايروس التابع المتعدد للبروتين الوراثة الشجرة لنفس العالمية والتسلسلات) اسود لون بنقطة ذات محددة(العراقية الفايروس تشمل والتي الفايروسات من للعديد التابع البروتين TVCV	29
84	العراقية لسلالة Trans-activator عامل لبروتين الوراثة الشجرة التسلسلات مع) اسود لون ذات بنقطة محددة(TVCV فايروس من والتي تشمل الفايروسات من للعديد التابع البروتين لنفس العالمية TVCV الفايروس	30
87	مايتوكوندريا لجينوم المرجعي للتسلسل المتداخلة المتجاورات تغطية الرمز ذات <i>Bemisia tabaci</i> البيضاء الذبابة حشرة KR559508.1	31
89	البيضاء الذبابة لحشرة الميتوكوندريا لجينوم الأولية المسودة المصابة لنباتات الطماطة المرافقة <i>B.tabaci</i>	32
91	المحلية <i>B.tabaci</i> البيضاء الذبابة حشرة بين الوراثة العلاقة العالمية الأخرى والسلالات) لون اسود ذات بنقطة إليه المشار) نفسها للحشرة التابعة	33
93	النابته البادرات في TYLCV-Mld لفايروس الجزئي التشخيص المقارنة) ومعاملة T2 وغير المعقمة (T1) المعقمة البذور من T3)(34

94	النايته البادرات في TYLCV-Mld لفايروس الجزئي التشخيص (المقارنة) ومعاملة T2 وغير المعقمة (T1) المعقمة البذور من T3)(34
----	---	----

1: المقدمة

Introduction

يعد الجنس *Begomovirus* الأكبر بين اجناس عائلة *Geminiviridae* الفايروسية اذ يتضمن 445 نوع تنتقل بواسطة حشرة الذبابة البيضاء *Bemisia tabaci* وتشكل معظمها تهديداً حقيقياً للعديد من النباتات من نوات الفلقتين التابعة الى عوائل نباتية مختلفة مثل *Solanaceae*، *Papilionaceae*، *Malvaceae*، *Cucurbitaceae* وغيرها (van Regenmortel واخرون، 1997 و ICTV، 2021). تتميز الإصابة بانواع هذا الجنس بأعراض محددة مثل توقف النمو وتقزم النبات والفسيفساء الصفراء وتتجدد الأوراق والتفافها وفي حالة الإصابة الشديدة تكون النباتات متقزمة للغاية وتنتج ثماراً مشوهة (Sattar، 2012).

تستعمل في الوقت الحاضر العديد من الاساليب والتقنيات في عملية تشخيص الفايروسات مثل المجهر الالكتروني والاساليب المعتمدة على الخصائص المصلية للفايروسات مثل طريقتي Direct ELISA و Sandwich ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) بالإضافة الى الاساليب المعتمدة على تحديد تسلسل القواعد النايتروجينية للاحماض النووية الخاصة بالفايروسات والتي تشمل طرق ال-PCR و Real-time Polymerase و Reverse transcriptase polymerase chian reaction و Chian Reaction و Microarrays (Mokili واخرون، 2012). بالرغم من نجاح هذه الأساليب في تشخيص الفايروسات بشكل عام الا ان معظمها لها قيودها او محدوداتها الخاصة فمثلا الطرق التي تعتمد الامصال والاحماض النووية تتطلب معرفة مسبقة بطبيعة الفايروسات المراد تشخيصها (Kapoor و Lipkin، 2001). لذلك شرع المهتمون في مجال التشخيص الدقيق للفايروسات الى إيجاد وسائل او تقنيات بديلة تتجاوز هذه المحددات والقيود منها تقنية Next Generation Sequencing (NGS). أن هذه التقنية سهلت من عملية اجراء المسح والكشف عن الفايروسات الجديدة او الفايروسات المشخصة مسبقاً من

للعديد من العوائل وفي بيئات مختلفة وكذلك من العوائل التي لا تظهر عليها اعراض الاصابة وبشكل غير متحيز ورخيص نسبياً (Lipkin و Firth، 2013). وتعرف هذه التقنية بانها احد تقنيات تحديد تسلسل القواعد النايتروجينية التي تستعمل في تحديد التسلسل المتوازي لشظايا صغيرة متعددة من الـ DNA (Rizzo و Buck، 2012). علماً انها تختلف عن سابقتها بكونها اسرع واكثر انتاج لبيانات تسلسل الحمض النووي لذلك تعتبر تقنية عالية الإنتاجية (High-throughput Voelkerding واخرون، 2009). ان المادة الأولية لهذه التقنية هو الـ DNA النووي مزدوج الشريط الذي يتم استخلاصه من مختلف الخلايا الحية كذلك بالامكان استعمال الـ 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 واخرون، 2001 و Mardis، 2008). لقد استعملت طريقة الـ NGS وبنجاح في تشخيص فايروسات النبات المعروفة مسبقاً وكذلك اكتشاف العديد من الفايروسات النباتية الجديدة ولاول مرة (Adams و Fox، 2016 و Pecman واخرون، 2017 و Wright واخرون، 2020).

وبالرغم من العدد الكبير من الأنواع التابعة للجنس *Begomovirus* الا ان معرفتنا بانواعه المنتشرة في البيئة العراقية محدودة جداً. لذلك فان التعرف عليها وتحديد المدى العائلي والتوزيع الجغرافي لها يمكن ان يزودنا برؤى جديدة حول تنوعها والعلاقة الوراثية بينها من اجل اختيار الاسلوب الافضل في مكافحتها لذلك هدفت هذه الدراسة الى تحديد أنواع جنس *Begomovirus* وتوابعها المنتشرة على عدد من العوائل النباتية في محافظة كربلاء وذلك باستعمال التقنيات الجزيئية الحديثة.

محاور الدراسة

- 1) جمع عينات نباتات طماطة وباميا وبطاطا تظهر عليها اعراض التقزم ، اصفرار العروق، الفسيفساء الأصفر، التقاف او تجعد الأوراق من حقول وبيوت بلاستيكية مختلفة منتشرة في محافظة كربلاء.
- 2) استخلاص الـ DNA من النباتات المصابة وأجراء تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR) باستعمال بادئات متخصصة في تضاعف جين الغلاف البروتيني لانواع الجنس *Begomovirus* وتحديد تسلسل القواعد النايتروجينية DNA sequencing لها من اجل التشخيص الدقيق للأنواع المكتشفة.
- 3) تحديد التسلسل القواعد النايتروجينية للفايروسات المرافقة للنباتات المصابة باستعمال تقنية الـ NGS وتحليل المعلوماتية الحيوية (Bioinformatics Analysis) لبيانات تسلسلات القواعد النايتروجينية التي يتم الحصول عليها.

- 4) أكتشاف وتشخيص أنواع فايروسات الجنس *Begomovirus* المرافقة للنباتات المصابة وتأكيد ذلك باستعمال طريقة الـ PCR.
- 5) دراسة امكانية تحديد وتفسير الجينوم الكامل (Full genome annotation) للفايروسات المشخصة والمكتشفة في عينات النباتات المصابة.
- 6) إجراء تحليل التقارب الوراثي (Phylogenetic Analyses) للفايروسات المكتشفة والمشخصة في هذه الدراسة.
- 7) تقييم انتقال أنواع فايروسات جنس *Begomovirus* بواسطة البذور عن طريق انبات البذور الماخوذة من ثمار الطمطة النامية من النباتات المصابة وفحص بادراتها النامية باستعمال التشخيص الجزيئي PCR و Realtime PCR الخاص بجنس *Begomovirus*.

2: استعراض المراجع

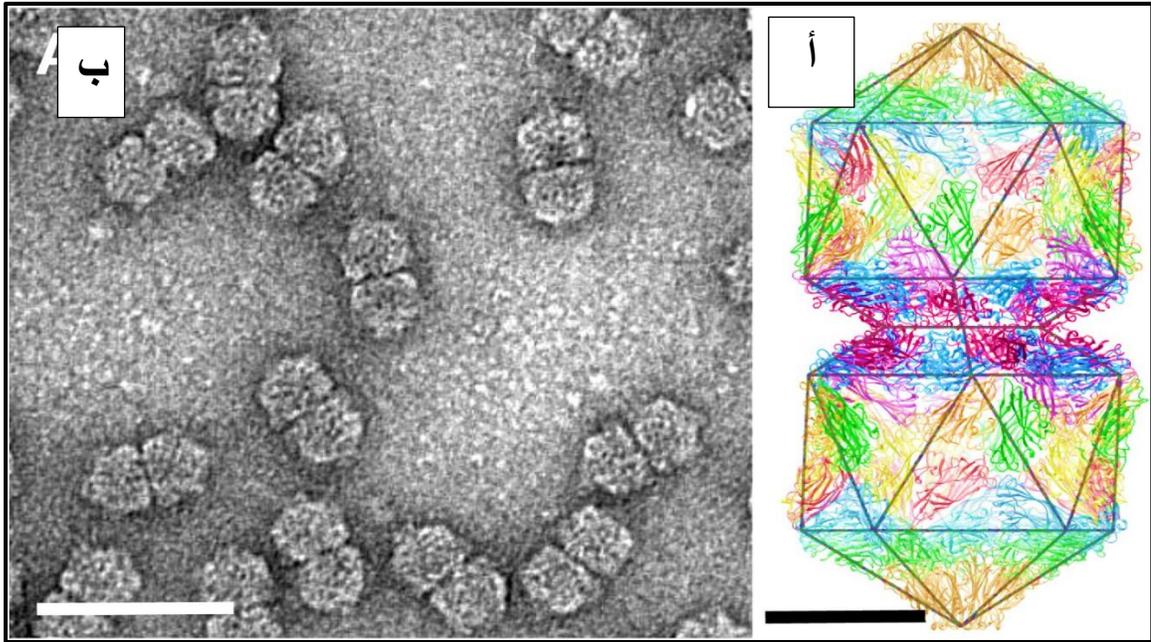
Literature review

1-2: الجنس *Begomovirus*

يُعد جنس *Begomovirus* الذي يعود الى عائلة *Geminiviridae* واحداً من أكثر الاجناس ألفا فيروسية التي تضم انواعاً مختلفة بلغت 445 نوع وهو الأكثر بين مجاميع ألفا فيروسات النباتية ذات الجينوم الـDNA، وقد اشتق اسمه من الحروف الأولى للفايروس *Bean golden yellow mosaic virus* الذي يمثل النوع النموذجي له (Type species) (ICTV، 2021).

ان أنواع جنس *Begomovirus* أصبحت تهديدا خطيرا لإنتاج العديد من النباتات ثنائية الفلقة التي تشمل مختلف محاصيل الخضروات والجذور والألياف في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية والمعتدلة في العالم (ICTV، 2021). وعادة ما تسبب أنواع فايروسات *Begomovirus* أعراض حادة في عوائلها النباتية، بما في ذلك الموزائيك الأصفر والموزائيك الذهبي وتجعد الأوراق بالإضافة الى تقزم النبات وتشوه الثمار وانخفاض الانتاجية. وتشمل مسببات الأمراض أعضاء من أنواع *African cassava mosaic virus* و *Bean golden mosaic virus* و *Cotton leaf curl Multan virus* (He وآخرون، 2020). كما تسبب أنواع أخرى امراض اشد خطورة مختلفة مثل مرض موزائيك الكاسافا في دول جنوب الصحراء الكبرى الافريقية وأيضا مرض تجعد أوراق القطن في شبه القارة الهندية بالإضافة الى امراض تجعد واصفرار أوراق الطماطة والبابايا واصفرار عروق الباميا والموزائيك الأصفر على الماش (-Navas-Castillo وآخرون، 2011). كما انها مسؤولة عن قدر كبير من الأضرار الاقتصادية للعديد من المحاصيل المهمة مثل الطماطة و أفاصوليا و القرع (الكوسا) والكاسافا والقطن (Hull، 2014). فمثلاً فايروس تجعد واصفرار اوراق الطماطة (*Tomato yellow leaf curl vvirus*) وفيروس الموزاييك الأصفر الطماطة (*Tomato yellow mosaic virus*) تسبب خسائر اقتصادية كبيرة في جميع أنحاء العالم خصوصاً في البلدان التي أصبحت فيها هذه ألفا فيروسات منتشرة على نطاق واسع مثل دولة ترينيداد والجمهورية الدومينيكية والمكسيك وكثير من دول أمريكا الوسطى، وكذلك في جميع أنحاء جنوب شرق آسيا والشرق

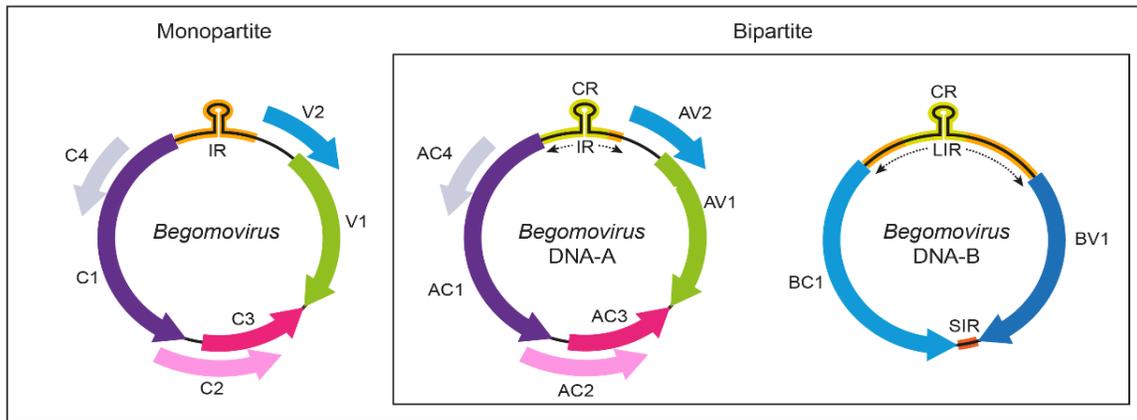
الأوسط، ويمكن أن تسبب هذه الأمراض في الطمطة والفلفل والباذنجان خسارة في المحصول تقدر بنحو 50-60٪ (Saxena و Tiwari، 2017). كذلك تشمل الإصابة العوائل النباتية المتضررة العديد من النباتات الزينة مثل *Hibiscus cannabinus* و *Cyamopsis tetragonoloba* و *Zinnia elegans* (Das وآخرون، 2008 و Kumar وآخرون، 2010). بالإضافة الى العديد من النباتات البرية غير المزروعة والادغال اذ تحولت هذه العوائل النباتية الى بؤرة ساخنة لأحداث إعادة التركيب ومستودع لمختلف المجتمعات ألفا فيروسية مثلها *Xanthium strumarium* و *Ageratum conyzoides* و *Mirabilis jalapa* (Mubin وآخرون، 2012 و Kumar وآخرون، 2011 و Kulshreshtha وآخرون، 2017).
تمتاز الجسيمات ألفا فيروسية الكاملة لانواع هذا الجنس بانها مزدوجة (Paired) غير مغلفة وبمعدل طول 38 نانومتر تقريباً ومعدل قطر 20 نانومتر تقريباً تتكون من قسمين متعددة الوجوه (Icosahedral) ذات شكل تناظري غير كامل يتالف من 110 وحدة فرعية (Subunits) منظمة ومتحدة في 22 لوحة او قسيم (Capsomere) التي تكون الغلاف البروتيني للجسيمة الكاملة (شكل 1) (ICTV، 2021).



الشكل (1): شكل الجسيمة الكاملة. (أ) نموذج تخطيطي كامل لجميع الوحدات الفرعية البالغ عددها 110 في 22 قفيصة ضمن جسيمات متعددة السطوح توضح التناظر الاساسي (Hesketh وآخرون، 2018). (ب) الجسيمات المنقاة من احد الأنواع التابعة لعائلة *Geminiviridae* والتي تظهر وحدات فرعية نموذجية شبه متساوية القياس. مقياس الشريط 50 نانومتر (Zhang, وآخرون 2010).

1-1-2: تنظيم الجينوم وتكاثره

تمتلك أنواع فيروسات الجنس *Begomoviruses* جينومات ذات شريط مفرد حلقي من الـ DNA بأجزاء أحادية (monopartite) أو ثنائية (bipartite). وينتشر كلاً النوعين في جميع دول العالم القديم (Old World) بينما في دول العالم الجديد (New World) معظم الأنواع تكون ذات جينوم ثنائية الأجزاء، مع عدد قليل من الأنواع ذات الجينوم الأحادية الجزء (Brown وآخرون، 2015). وبالنسبة للفايروسات ذات الجينوم ثنائي الأجزاء، يُشار إليهما باسم DNA-A و DNA-B، كل منهما بحجم 2.5-2.6 ألف قاعدة نايتروجينية. ويمكن للمكون DNA-A لأنواع فايروسات الـ *Begomovirus* أن تتكاثر بشكل مستقل ولكنه يتطلب المكون DNA-B لحدوث العدوى الجهازية في النبات العائل. والجدير بالإشارة إلى أن تنظيم الجينوم في الفيروسات أحادية الجزء يكون مشابه بدرجة كبيرة إلى المكون DNA-A في جينوم الأنواع ثنائية الأجزاء (Hanley-Bowdoin وآخرون، 2000 و Fiallo-Olivé وآخرون، 2021 و Devendran وآخرون، 2022). (الشكل 2).



الشكل (2): التنظيم الجينومي لأنواع فايروسات الجنس *Begomovirus*. يُشار إلى قالب القراءة المفتوح (open reading frame) بالوان مختلفة على أنها مشفرة أما على الشريط الموجب (V) أو على الشريط التكميلي السالب (C)، مسبوقةً بتسمية المكون (A أو B) إذا كان جينوم ثنائي الأجزاء. ويشار إلى مواقع الجينات المشفرة للبروتينات المقابلة بأحرف وأرقام مختلفة (Hanley-Bowdoin وآخرون، 2000)

وقد تكمن البروتينات في هذا الجنس إما في الشريط الحساس الموجب (الإتجاه الإيجابي) أو في الشريط المكمل (الإتجاه السلبي). وعادة ما يشفر جينوم أحادي الجزء والمكون DNA-A عدة بروتينات تشمل بروتين النسخ المتماثل (Replicase) وبروتين الغلاف البروتيني (Coat protein) والنقل بواسطة الحشرات و/أو البروتينات التنظيمية (Regulatory proteins) المسؤولة عن التحكم في التعبير الجيني، والتغلب على دفاعات المضيف، بينما يشفر المكون DNA-B إلى بروتينين مختلفين التي لها وظائف في

الحركة داخل وبين الخلايا في النباتات المضيفة. ويشترك المكونين DNA-A و DNA-B في أنواع ألفا فيروسات ذات الجينوم ثنائي الأجزاء بما يقرب من 200 قاعدة نايتروجينية من التسلسل داخل المنطقة الجينية التي تسمى بالمنطقة الشائعة (common region). والتي تشتمل تركيب Stem-loop الذي يشبه ديبوس الشعر ويكون محفوظ تمامًا بين أنواع فايروسات *Geminiviruses* وأيضا تسلسلات متكررة (تُعرف باسم "iterons") وهي تسلسل التعرف على ارتباط بروتين النسخ (Replicase) وضمن هذه الحلقة يوجد تسلسل آخر (TAATATTAC) والذي يعمل كأصل (ori) لتكرار الحمض النووي الكامل في ضفيرة الفيريون (Saxena و Tiwari، 2017). ويحدث تبادل للمكونات بين أنواع هذا الجنس عند حصول الإصابة المعقدة بأكثر من نوع. والآلية المعتادة التي تسمى بالتركيبية الزائفة (Pseudorecombination) تتم عن طريق عملية تعرف باسم "التطعيم المنتظم" إذ يتبرع المكون A بمنطقته المشتركة من خلال إعادة التركيب إلى المكون B الذي يتم التقاطه. وينتج عن ذلك تفاعل تابع جديد بين مكونين (Batista و آخرون، 2022).

2-1-2: القرابة الوراثية بين الـ DNA-A و DNA-B

يعتقد ان المكونين DNA-A و DNA-B من الجينوم لهما تاريخ تطوري جزئي متميز للغاية ومن المحتمل أن يكونا تطوراً تحت ضغوط مختلفة للغاية، إذ نشأ جينوم DNA-B في البداية كتابع تم التقاطه من قبل السلالة أحادية الجزء لجميع فيروسات الـ *Begomovirus* ثنائية الأجزاء وتطور لاحقاً ليصبح مكوناً أساسياً للجينوم، لذلك ينصح باستعمال جينوم المكون DNA-A في اجراء تحليل النشوء والتطور (Phylogenetic analysis) وذلك لان هنالك احتمال كبير ان يكون DNA-B قد حصل له تبادل بين الأنواع والتي ربما تنتج نوع جديد، ومن المعروف أن أكثر من 133 نوعاً من فايروسات جنس *Begomovirus* لها جينومات أحادية الجزء التي جميعها نشأت في العالم القديم إذ لم يتم التعرف حتى الآن على أنواع أحادية الجزء موطنها العالم الجديد، وقد كشفت عملية تحليل جينومات هذا الجنس انها يمكن ان تقسم الى عدة مجاميع وراثية كل منها ذو اصل واحد (Bridson و آخرون، 2010 و Guevara-Rivera و آخرون، 2022). ان التقسيم الرئيس يشمل سلالات العالم القديم وسلالات العالم الجديد. علماً ان سلالات العالم القديم يمكن تقسيمها إلى مجموعات أفريقية وهندية ويابانية و أخرى آسيوية مع عدد صغير من السلالات تتجمع خارجها هذا المجاميع. أما سلالات العالم الجديد فتتقسم إلى مجاميع سلالات أمريكا الوسطى والجنوبية. وإلى جانب هذه التقسيمات الرئيسية يوجد عدد من المجاميع الأصغر والتي تشمل مجموعة واحدة تصيب العوائل النباتية من البقوليات في الهند وجنوب شرق آسيا تسمى بالفايروسات *legumoviruses*

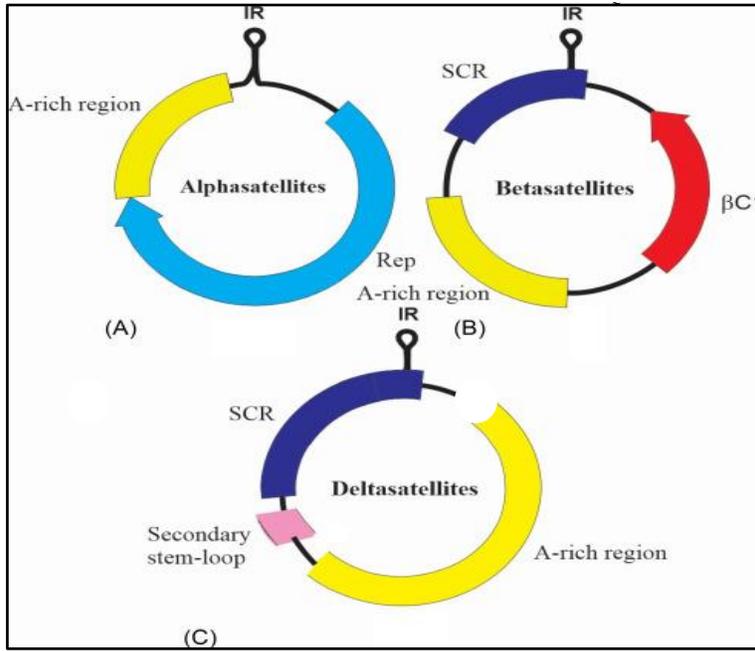
ومجموعة أخرى من الفيروسات الناشئة في بعض أمريكا وآسيا وأوروبا والتي تصيب البطاطا الحلوة وتسمى *sweepviruses* (Ilyas وآخرون، 2009 و Twarenado وآخرون، 2011).

3-1-2: التوابع Satellites

التابع (Satellite) وهو عامل تحت فايروسي (subviral agent) يتكون من حمض نووي اما DNA او RNA يعتمد في تكاثره على فايروس رئيسي اثناء حدوث العدوى المشتركة بينهما للعائل المضيف (Roossinck وآخرون، 1992؛ Zhou، 2013؛ Leeks وآخرون، 2021). لقد تم وصف ثلاثة أنواع من توابع ذات شريط مفرد من الـ DNA الحلقي مرافقة لأنواع جنس *Begomovirus* (شكل 3) وهي : التابع بيتا (Betasatellite)، التابع ألفا (Alphasatellite) والتابع دلتا (Deltasatellite) (Lozano وآخرون، 2016). لقد عرف عن التابع بيتا (المعروفة سابقاً باسم DNA-β) ارتباطه بالعديد من فيروسات *Begomovirus* أحادية الجزء في العالم القديم. يبلغ حجمها 1.3 ألف قاعدة نايتروجينية تقريباً وتحتوي على قالب قراءة مفتوح (open reading frame) واحد يسمى βC1 ، الذي يشفر بروتين يعمل كقماع (suppressor) لعملية إسكات الجين الخاصة بالعائل المضيف التي يستعملها ضد ألفا فيروسات (Cui وآخرون، 2004) وبالتالي هذا البروتين له تأثير على زيادة ضراوة الإصابة بألفا فيروس الرئيسي بشكل كبير ومن جانب اخر فان بقية تسلسل التابع ليس لها فائدة تذكر للفايروس الرئيسي (Briddon و Stanley، 2006). ويعتمد التابع بيتا على ألفا فيروس الرئيسي او المساعد في عملية التكاثر وفي بعض الأحيان التغليف (Mansoor وآخرون، 2003). يُعتقد أن هذا التابع قد يرتبط ويعمل مع أكثر من فايروس مساعد.

النوع الثاني من التوابع المشابه للفايروسات النانوية ذات النسخ المتماثل بشكل مستقل عادة ما تكون مرتبطة بالإصابة المعقدة المتكونه من احد أنواع الجنس *Begomovirus* والتابع بيتا (المعروفة سابقاً باسم DNA-1) (Saunders وآخرون، 2000). ويوجد هنالك على الأقل ثلاثة توابع من النوع ألفا (Rosario وآخرون، 2013). الأول يعمل على تحسين طبيعة الاعراض المرضية عند حصول الإصابة المشتركة مع فايروس رئيسي او مساعد ويكون مرافق للتابع بيتا مما يقترح ان يكون له دور اخر يتمثل بتنظيم الضراوة عن طريق خفضها إلى حد ما، ربما عن طريق تقليل تراكم جزيئات التابع بيتا (Idris وآخرون، 2011). اما الثاني والثالث فقد وجد انهما يرتبطان ببعض انواع *Begomovirus* ثنائية الأجزاء في دول العالم الجديد مثل البرازيل وكوبا وفنزويلا (Romay وآخرون، 2010 و Paprotka وآخرون، 2010).

النوع الثالث من التوابع يسمى بالتابع دلتا الذي يبلغ حجمه حوالي 700 قاعدة نايتروجينية تقريبا ويرتبط عليها بانواع فايروسات *Begomovirus* أحادية الجزء في العالم القديم (Dry وآخرون، 1997) ، و فايروسات ثنائية الأجزاء في العالم الجديد (Fiallo-Olivé وآخرون، 2012). بالإضافة الى مجموعة فايروسات *sweepoviruses* (Lozano وآخرون، 2016) على عكس التابعين بيتا و ألفا، لا يشفر التابع دلتا لأي بروتين وهي بحاجة إلى احد فايروسات *Begomovirus* المساعدة او الرئيسية من التكاثر والحركة في النباتات والانتقال عن طريق حشرة *Bemisia. tabaci* ولا يؤثر في معظم الحالات وجود التابع دلتا في ظهور الأعراض التي تسببها فايروسات *Begomovirus* الرئيسية او المساعدة ، اذ يعتمد تأثيرها على تراكم الحمض النووي للفايروس الرئيسي في النبات المضيف (Ferro وآخرون، 2021 و



Fiallo-Olivé وآخرون، 2016 و

شكل (3): تركيب الجينوم لتوابع فايروسات الجنس *Begomovirus*

(Amin و آخرون، 2021)

4-1-2: الانتقال

تنتقل الأنواع ألفا فيروسية التابعة للجنس *Begomovirus* بشكل إجباري عن طريق ناقل حشري، والذي يمكن أن يكون غالباً الذبابة البيضاء *Bemisia tabaci* أو أنواع أخرى من صنف حشرات الذباب الأبيض. وجدير بالإشارة الى ان حشرة الذبابة البيضاء خصوصا النوع *B. tabaci* تعد من الافات الرئيسية و المهمة في احداث ضرر كبير قد يؤدي الى انهيار الانتاج في كثير من المحاصيل الاقتصادية منها القطن و الطماطة و التبغ في جميع دول العالم (De Barro وآخرون، 2011). والسبب فيما ورد هو تعدد الاضرار التي تنتج عنها والتي يمكن تقسيمها الى ما يلي:

➤ الاضرار المباشرة

ينتج هذا النوع من الاضرار عن طريقة تغذية الحشرة على العصارة النباتية وذلك من خلال غرز أجزاء فمها الثاقبة الماصة في أنسجة الورقة من اجل الوصول الى اوعية اللحاء لتتغذى على محتوياته من السكريات والأحماض الأمينية (Chen وآخرون، 2016). وتستمر الحشرة في امتصاص عصارة النبات بشراهة طول فترة حياتها حيث لا تتوقف عن التغذية حتى عندما تتزاوج وتضع البيض وهذا التغذية المستمرة تسبب ضعف النبات وذبوله مع الاصفرار والتقزم وقلة الحاصل ويرافق عملية التغذية هذه افراز أنزيمات تؤثر في العمليات الفسلجية للنبات مما ينتج عنه عدم انتظام النمو وتشوه وجفاف وتساقط أزهار (Fiallo-Olivé وآخرون، 2020 و سلمان، 2021).

➤ الاضرار غير المباشرة

عند تغذية الحشرة على العصارة النباتية تسبب الأخيرة افراز ندوة عسلية Honeyew والتي تتساقط على المجموع الخضري مسببة تجمع الاتربة ونمو وتكاثر فطريات والاعفان والذي يقود الى التأثير المباشر على انخفاض كفاءة عمليات البناء الضوئي و التنفس و النتح وهذا بطبيعة الحال سوف يقود الى الضعف العام في النبات وعلى مستوى جودة الحاصل و كميته (Thompsو 2011 و سلمان، 2021).

➤ أضرار نقل ألفايروسات

يعود هذا النوع من الاضرار الى قدرة حشرة الذبابة البيضاء على النقل الفعال للعديد من ألفايروسات النباتية التي تسبب خسائر اقتصادية في كبيرة تتراوح بين 50-90% بحسب نوع المحصول والظروف البيئية السائدة اثناء حصول الإصابة (Al-ani وآخرون، 2011). والمعروف عنه ان هنالك 1500 نوع تعود الى حشرة الذبابة البيضاء، ولكن القليل منها فقط له القدرة على نقل ألفايروسات النباتية منها الأنواع المعقدة للنوع *B. tabaci* (Navas-Castillo وآخرون، 2011) التي تشمل 40 نمط حيوي (Biotypes) التي تكون متشابهة مظهرياً لذلك تسمى بالانواع المبهمة او اللغز (Cryptic species) (Kareem وآخرون، 2020)، حيث تنتشر في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية وهي مسؤولة عن نقل العديد من ألفايروسات النباتية التي تقدر اعدادها بأكثر من 111 فايروس يعود 90% منها الى جنس *Begomovirus* (Mugerwa وآخرون، 2018). وتعد الطريقة النموذجية لنقل فايروسات التابعة للجنس *Begomovirus* هي الطريقة الدائمة او الباقية (Persistent transmission) بالرغم من وجود نقاش مستمر حول طريقة النقل هذه هل هي من النوع التكاثري (Circulative propegative) او غير التكاثري (Circulative)

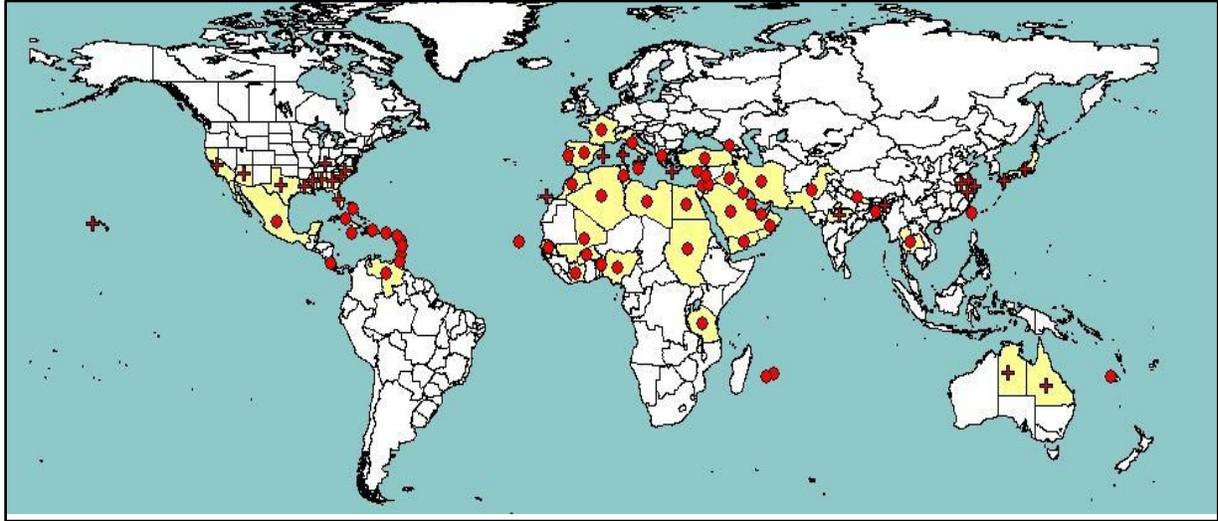
(non-propogative) الا ان هنالك ادلة توضح ان على الأقل فايروس تجعد و اصفرار أوراق الطماطة *Tomato yellow leaf curl virus* ينتقل بالطريقة الدائمة ويتكاثر في الغدد اللعابية لحشرة الذبابة البيضاء (Wang و Zhol، 2016 و He و اخرون، 2020).

2-2: فايروس *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV)

1-2-2: التوزيع الجغرافي والمدى العالمي

يعد فايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطة (TYLCV) احد اهم وابرز الفايروسات التي تعود الى جنس *Begomovirus* المنحدرة من عائلة *Geminiviridae* (Lapidot و Hanssen، 2012). وسجل هذا الفايروس لأول مرة في وادي الأردن التابع الى الأراضي الفلسطينية المحتلة في سنة 1950 وقد سمي المرض الناتج عن الإصابة بقمة الطماطة الصفراء (*tomato yellow top*) (Cohen و Harpaz، 1964). وكانت السودان اول الدول الافريقية التي سجل فيها هذا الفايروس (Yassin و Nour، 1965). وقد تم رصد وتسجيل هذا الفايروس ايضا في نهاية 1980 على محصول الطماطة في العديد من دول القارتين الامريكيتين و قارة اوربا (Accotte و آخرون، 2000). وقد ذكر Wu و اخرون (2006) انه بالرغم من الانتشار السريع لفايروس TYLCV الذي اصبح بسرعة أحد مسببات الأمراض شديدة الخطورة للطماطة في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية والمناطق المعتدلة الدافئة بعد وقت قصير من اكتشافه، الا انه لم يسجل في الصين قبل عام 2006 اذ لوحظ أولاً ظهور مرض الفسيفساء او الموزائيك الأصفر والتي كانت احد الاعراض المرضية لهذا الفايروس على نباتات الطماطة بنسبة إصابة 90% خلال شهر مارس 2006 في حقول مدينة Sungiao الصينية والذي اثبت التشخيص الجزيئي انه فايروس TYLCV بعد ذلك عزل وشخص هذا الفايروس في العديد من المدن الصينية حيث اصبح هذا العامل الممرض الفايروسي تهديد كبير للزراعة بسبب النسب العالية للإصابة ومعدل انتشاره الهائل. وينتشر فايروس TYLCV في العراق بشكل كبير على العديد من المحاصيل وابرزها محصول الطماطة المزروعة في البيوت البلاستيكية و المزارع المكشوفة (المولى، 2013). كما انه ينتشر حالياً في العديد من دول العالم الدافئة و الاستوائية (شكل 4) اذ يعد من الممرضات التي تمتلك مضيفات عائلية واسعة ومتنوعة حيث انه شخص في 49 نوع نباتي تعود الى 16 عائلة نباتية مختلفة (Papayiannis و اخرون، 2011). وبالأخص الطماطة و البطاطا و التبغ و الفلفل و الباذنجان و البطيخ و السمسم و البزاليا و اللوبيا و الباقلاء و القطن و التفاح و القرع و الباميا (Glick و اخرون، 2009 و Marchant و اخرون، 2020 و Prasad و اخرون، 2020 و Li و اخرون، 2022a). كما سجل اصابته للعديد من نباتات الادغال كنبات الخباز *Malva parviflora* ، الكينوا *Chenopodium quina* و الرغيلة *Chenopodium murale* (الجبوري و آخرون، 2014). ونباتات

و *Abelmoschus esculentus* و *Agastache rugosa* و *Alcea rosea* و *Acalypha australis* و *Viola prionantha* إذ تُعد نباتات الادغال هذه عوائل ثانوية بديلة توفر مخزن للفاح الفايروسي خلال موسم النمو وكذلك الفترات الخالية من تواجد العوائل النباتية الرئيسية من المحاصيل الحقلية، لذلك يجب أن تؤخذ في الاعتبار هذه العوائل النباتية البديلة عند وضع استراتيجيات مكافحة لهذا الفايروس (Li واخرون، 2022b).



شكل (4): خارطة التوزيع العالمية لفايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطة (TYLCV). تمثل الدوائر الحمراء تسجيل الفايروس في تلك الدول (EFSA PLH Panel ، 2014).

2-2-2: الاعراض المرضية و الاهمية الاقتصادية لفايروس TYLCV

تتميز الإصابة بهذا الفايروس بنوعين من الاعراض تشمل الاعراض الخارجية (External symptoms) و الاعراض الداخلية (Internal symptoms)، غالباً تظهر اعراض الإصابة بهذا الفايروس بعد 14-21 يوم من العدوى (عباس ، 2017)، وتتوضح الاعراض الخارجية على النموات الحديثة للأوراق بهيئة اختزال بالحجم مع تجعد واصفرار ما بين عروق الأوراق وتنتشر التجاعيد على اطراف الأوراق المصابة وتأخذ اتجاه الأعلى لتكون شكل يشبه الكأس Cup-like shape. وعند اشتداد الإصابة تنتقم النباتات المصابة بشكل واضح وتظهر الازهار لكن سرعان ما تسقط قبل عقد الثمار بنسبة تصل الى 90% (Prasad واخرون، 2020). مما ينتج عنها نقص كبير في الإنتاج وصغر حجم الثمار مع النضج المبكر لها (شكل 5) (Padmanabhan واخرون، 2022). وترتبط شدة ظهور الاعراض حسب المرحلة العمرية للعائل وحساسية الصنف المزروع و الظروف الجوية المحيطة إذ أشار Al-Ani واخرون (2011)

الى نسبة الإصابة بهذا الفايروس في العراق قد تصل الى 100% مسببةً خسائر اقتصادية كبيرة تصل الى ما بين 50-90% خصوصاً عندما يصيب الفايروس نباتات الطماطة في مراحل النمو الأولية. أما فيما يخص الاعراض الداخلية (Intrenal Symptoms) فتحدث في داخل الخلايا اذ تنشأ اجسام دخيلة (Inclusion bodies) تقع في الساييتوبلازم او النواة وهي تكون مختلفة من حيث التراكيب عن المكونات الطبيعية للخلية النباتية (عباس،2017).



شكل (5): الاعراض الخارجية للإصابة بفايروس TYLCV في احد نباتات الطماطة المزروعة في احد المزارع الصحراوية في محافظة كربلاء خلال موسم النمو 2021-2022 (أخذت من قبل الباحث)

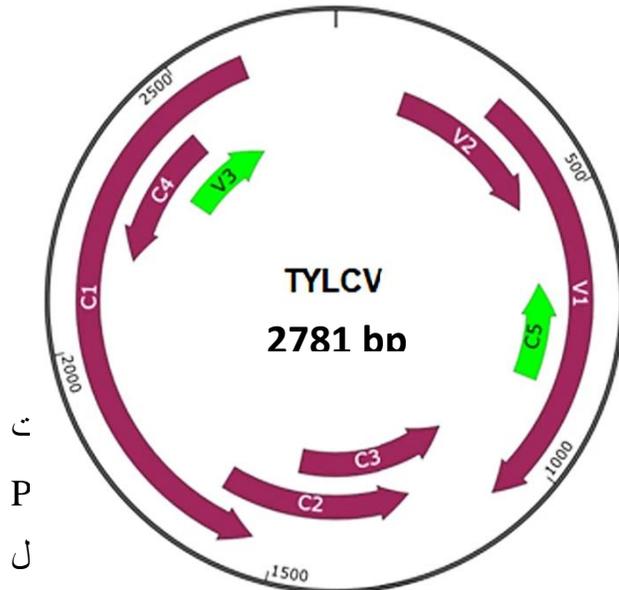
كما تسبب الإصابة بهذا الفايروس خسائر اقتصادية فادحة في الحقول المكشوفة و البيوت البلاستيكية لنبات الطماطة في كثير من دول الشرق الأوسط و جنوب غرب اوربا و افريقيا الاستوائية و جنوب شرق اسيا و جزر الكاريبي اذ تقدر هذه الخسائر 80-100% (Li و اخرون،2022). كما اشار Kökly و آخرون (2006) في تركيا ان هذا الفايروس من اكثر الفايروسات فتكاً على محصول الطماطة في البيوت البلاستيكية و الزراعة المكشوفة مسببة خسائر قد تصل 100% بحسب توقيت الإصابة و صنف البذور المزروعة فضلا عن انتشار و كثافة حشرة الذبابة البيضاء. و يعد فايروس TYLCV مقيداً حقيقياً في الأردن في الحقول

المكتشفة وتحديداً وادي الأردن و المساحات المرتفعة (AL-Abdallat وآخرون، 2011). اما في المملكة العربية السعودية فقد بين Ajlan وآخرون (2007) ان الإصابة بهذا الفيروس خطرة على الطماطة المزروعة في البيوت البلاستيكية و الحقول المكتشفة. جدير بالإشارة الى ان فايروس TYLCV يمكن ان يشترك بالاصابة مع فايروسات أخرى وهذا بدوره سوف يشكل الامراض المعقدة التي تقود الى زيادة ظهور الاعراض المرضية على العائل النباتي. مثلا الإصابة التآزرية بين فايروس TYLCV وفايروس *Tomato chlorosis virus* يؤدي إلى ارتفاع مؤشر شدة المرض ويسبب خسائر فادحة على المحصول المصاب (Li وآخرون، 2022).

2-2-3: الشكل المظهري والتنظيم الجينومي لفايروس TYLCV

يمتلك هذا الفايروس معظم الخصائص المظهرية والجينومية المميزة للجنس *Begomovirus* (شكل 6) منها ان شكل جزيئة الفايروس كروية متعددة الوجوه (Polyhedral partical) وبحجم 20*30 نانومتر غير مغلفة بحافظة، الجينوم يتألف من DNA ذو شريط مفرد (Circular ssDNA) يتراوح طوله ما بين 2500 الى 3000 قاعدة نتروجينية (ICTV ، 2021 ، Al-Kuwaiti وآخرون، 2013). ويتضمن هذا الجينوم ستة جينات (Open reading frames, ORFs) التي تشفر لستة بروتينات فايروسية متعارف عليها تشمل V1 و V2 بالإضافة الى C1 و C2 و C3 و C4 (Li وآخرون، 2022). يشفر الجين V1 لتكوين الغلاف البروتيني الخاص بتغليف الحمض النووي الفايروسي وأيضا يكون مسؤول عن انتشار جسيمات الفايروس بواسطة النواقل الحشرية (Wei وآخرون، 2017). اما الجين V2 فيكون مسؤول عن التشفير لبروتينات الحركة ما بين الخلايا لجسيمات الفايروس بالإضافة الى التشفير لبروتين قانع الاسكات (RNA silencing suppressor) لعمليات إسكات الجينات النسخية و إسكات الجينات بعد النسخ (Wang وآخرون، 2018 و 2020). أما الجين الـ C1 فيشفر لبروتين التكاثر (Replication-associated protein) الذي له دور أساسي في تضاعف الجينوم الفايروسي عن طريق اعادة برمجة دورة الخلية وتسهيل اجراء عملية تكرار الدائرة المتداول (Rolling circle replication) (Basak، 2016). والجين C2 يُشفر بروتين منشط الاستنساخ (transcription activator protein) والذي له دور في اسكات عمليات إسكات الجينات النسخية و إسكات الجينات بعد النسخ وانتشار البروتينات و إشارات حمض الياسمين (Luna وآخرون، 2012 و Rosas-Diaz وآخرون، 2016). اما الجين C3 يكون مسؤول عن تشفير البروتين الخاص بتعزيز او تحسين التكاثر (Replication-enhancing protein) والذي له دور حيوي مهم في تكاثر الفايروس من خلال التفاعل مع POLA2 والتي هي عبارة عن الوحدة الفرعية لانزيم تكاثر الـ DNA الفا (DNA polymerase α) وأيضا التفاعل مع الوحدة الفرعية POLD2 لانزيم تكاثر الـ DNA دلتا

(DNA polymerase δ) (Wu وآخرون، 2021). ان الجين C4 يشفر لبروتين ذو ادوار متعددة في التسبب بظهور الاعراض المرضية والمساهمة في حركة الفايروس وكذلك قمع عمليات ميثلة الحمض النووي للمضيف (Host DNA methylation) وإسكات الحامض النووي الرايبي (RNA silencing) (Luna وآخرون، 2012 ; Guo وآخرون، 2022). وموخرأ أظهرت العديد من الدراسات ان جينوم فايروسات *geminiviruses* والتي تشمل فايروس TYLCV تشفر لبروتينات أخرى صغيرة إضافية ذات أنماط توطين خلوية ووظائف ضراوة مختلفة (Gong وآخرون، 2021 و Chiu وآخرون، 2022 و Zhao وآخرون، 2022). ويعد البروتين V3 من بين هذه البروتينات الصغيرة التي تتمركز في جهاز كولجي وجزئيا في الشبكة الاندوبلازمية وله وظائف متعددة تشمل قمع الاسكات (silencing suppressor) وحركة الفايروس الخلوية (Gong وآخرون، 2022). أيضا هنالك بروتين C5 الذي يُعد كمحدد للإمراضية ومثبط لعملية اسكات الحمض النووي الرايبي (Zhao وآخرون، 2022 و Li وآخرون، 2022). إضافة الى ما سبق يحتوي جينوم الفايروس أيضا على تسلسل يسمى بالمنطقة ما بين الجينات Intergenic region (IR) وهذا التسلسل ضروري في بداية التضاعف و الاستنساخ في الفايروس (Basak، 2016).



شكل (6): التركيب الجينومي لفايروس TYLCV (Li وآخرون، 2022)

ان اول من كشف عن خصائص الجينوم الكامل لهذا بعدها الاكتشافات في تحديد العديد من تسلسلات Padilla وآخرون، 2020). فمثلاً تمكن Kuwaiti

مرة في العراق لاحد سلالات هذا الفايروس (TYLCV-IRAQ1) التي تصيب محصول الطماطة في محافظة بغداد كما تمكن كريم (2016) من تحديد خمس عزلات متباينة لهذا الفايروس عُزلت من مزارع الطماطة المنتشرة في محافظات النجف و كربلاء و المثنى و بابل. إن معرفة التشابه والتباين وتحليل التقارب

الوراثي Phylogenetic analysis بينها وفقاً لتسلسلات بعض المناطق الجينومية المحددة مثل Intergenic region (IR) و جين الغلاف البروتيني (Coat protein) و جين التضاعف (Replication gene) او الجينوم الكامل (Lefevre وآخرون، 2010). يعطينا فكرة عامة عن اماكن نشوءها وطبيعة القرابة وتطورها بين هذه السلالات او العزلات هذا الفايروس (Wang وآخرون، 2015).

4-2-2: سلالات فايروس TYLCV

توجد في الوقت الحاضر العديد من السلالات المختلفة التابعة للفايروس فمثلا ذكر Anfoka وآخرون، (2008) وجود العديد من السلالات المنتشرة بشكل هائل في بلدان البحر الأبيض المتوسط ابرزها TYLCV-Mld و TYLCV-IL و TYLCV-OM و TYLCV-IR (Bananej وآخرون، 2004 و Khan وآخرون، 2008). ايران بالإضافة الى السلالة الصينية TYLCV-CN (Cui وآخرون، 2004). وقد تمكن العابدي (2021) من اكتشاف وتحديد الجينوم الكامل ولأول مرة في العراق لسلالة TYLCV-Mild.

5-2-2: إعادة تركيب (Recombination) وطفرات (Mutations) فايروس TYLCV

مثل جميع الفيروسات ، تتطور الفيروسات التابعة لجنس *Begomovirus* ومنها فايروس TYLCV بسرعة من خلال إعادة التركيب والطفرات الوراثية، لذلك فهي تمتلك قابلية عالية للتكيف مع مدى واسع ومتنوع من البيئات المختلفة ، هذا، بالإضافة إلى القدرة على إصابة مجموعة واسعة من العوائل النباتية، مما يجعل من الصعب على هذه العوائل الحفاظ على قدرتها على المقاومة (Lefevre و Moriones، 2015). تنشأ عملية إعادة التركيب من الإصابة المختلطة للفايروسات في العائل النباتي (Monci، 2002). مؤخراً، تم تسجيل ظهور سلالة مؤتلفة ناتجة عن عملية إعادة التركيب للفايروس TYLCV بحيث ان جينوم هذه السلالة الجديدة يحتوي على منطقة صغيرة تبلغ 124 قاعدة نايتروجينية مشتقة من نوع فايروسي آخر هو *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (Panno، 2018). كما تم تسجيل سلالة أخرى مماثلة معاد تركيبها للفايروس TYLCV في البرتغال (Fiallo-Olivé، 2019). ولقد ثبت أنه ليس فقط الطفرات الوراثية التي يتبعها الانتقاء الطبيعي والانحراف الجيني، ولكن إعادة التركيب بين الأنواع هي المسؤولة عن الاختلاف الجيني بين سلالات الفايروس TYLCV (Díaz-Pendón، 2019). وتُعد الطفرة الوراثية هي مصدر آخر للاختلاف في الجينوم الفيروسي وان نسبة هذه الطفرات في فايروسات الـ RNA عالية جدا بسبب الأخطاء المرافقة لعملية التكرار بواسطة انزيم RNA-dependent RNA polymerases. اما في حالة فايروسات الـ DNA مثل فايروس TYLCV حيث عملية التكرار تحدث بواسطة مساعدة انزيم DNA polymerases الخاصة بالعائل تكون نسبة حدوث

الطفرات الوراثية منخفضة بسبب فعالية التدقيق المتبعة في داخل النبات. وبالرغم من ذلك، يوجد العديد من الدراسات التي لا تتوافق مع هذا الطرح اذ لوحظ نسبة عالية من التباين في مجتمعات فايروس TYLCV كنتيجة مباشرة لحصول الطفرات الوراثية في هذه المجتمعات (Ge، 2007 و Marchant، 2020). جدير بالإشارة الى ان مجتمعات هذا الفايروس التي تم الحصول عليها من حشرة الذبابة البيضاء ذات تباين وراثي عالي مقارنة بتلك المجتمعات التي عزلت من نباتات الطماطة المصابة مما يشير الى حدوث طفرات وراثية بنسبة اعلى في حشرة الذبابة البيضاء (Yang، 2017).

2-3: فايروس (ToLCPalV) *Tomato leaf curl Palampur virus*

وهو من فايروسات العالم القديم (Old World) التي تعود الى جنس *Begomovirus* من عائلة *Geminiviridae* ذو جينوم حلقي بشريط مفرد نوع single strand DNA وبحجم 5500 قاعدة نايتروجينية تقريباً و يتكون من مكونين او قطعتين (bipartite) والمعروفه باسم DNA-A و DNA-B. تتكون القطعة الأولى (Segment DNA-A) من 2756 قاعدة نايتروجينية تتضمن 6 جينات مختلفة تشمل جين AV2 الذي يشفر لانتاج بروتين Precoat protein و جين AV1 لتكوين الغلاف البروتيني Coat protein و جين AC3 الخاص ببروتين تحسين التكاثر Replication enhancer protein و جين AC2 لانتاج بروتين AC2 protein و جين AC1 الذي يشفر لبروتين التكاثر Replication associated protein وأخيراً جين AC4 الخاص بانتاج بروتين AC4 protein. بالمقابل تتكون القطعة الثانية (DNA-B) من 2720 قاعدة نايتروجينية تشتمل غالباً على جينين هما جين BV1 الخاص بانتاج بروتين Nuclear shuttle protein و جين BC1 الذي يشفر لانتاج بروتين الحركة Movement protein وتشارك هاتان القطعتان بتسلسل متشابه من القواعد النايتروجينية يبلغ حوالي 200 قاعدة نايتروجينية تسمى المنطقة المشتركة بين الجينات التي تشتمل على التسلسل المحافظ (conserved stem-loop) بتسلسل 5'-TAATATTAC-3' الواقعة في منطقة اصل منشأ التضاعف أو أصل التضاعف (ICTV، 2020). يصيب هذا الفايروس مدى عائلي واسع مثل محصول الطماطة والخيار و القرع والرقي والبطيخ وأفاصوليا والعديد من أنواع القرعيات مسبباً لها توقف النمو وتجعد الأوراق مع اصفرار وتثخن العروق مع تشوه وصغر حجم الثمار (شكل 7) (Gaikwad و اخرون، 2011 و Heydarnejad و اخرون، 2013 و Manmohan و اخرون، 2020).



شكل (7): الاعراض المرضية النموذجية التي يسببها فايروس ToLCPaIV (Manmohan وآخرون، 2020).

2-4: الفايروسات الداخلية العكسية (EPRVs) Endogenous pararetroviruses

ان جينوم العديد من النباتات يمتلك نسب هائلة تتراوح بين 90-95% من المناطق غير المشفرة في حين مناطق الجينات المشفرة التي تكون نسبها ضئيلة (Heslop-Harrison، 2000). ويعتقد ان المناطق غير المشفرة هذه انها حامض نووي مرافق (Heslop-Harrison و Schmidt، 1998)، اذ انها غير نشطة ولا تخضع لأي عملية استنساخ ابدأ ولكن فيما بعد وجد ان لهذه التسلسلات دور مهم على هيكلية و تكوين الحامض النووي و الكروموسومات اضافةً الى تحزم الكروموسومات و تحويل البروتينات و التعبير الجيني و إعادة التركيب الوراثي كما ان لها دور مهم في حماية المناطق المشفرة (الجينات) ضد ظروف الاجهاد التي يتعرض لها النبات (Alisawi، 2019). لقد اثبتت دراسات عديدة ان هذه المناطق غير المشفرة تشمل جينومات فايروسات، بالرغم من الاعتقاد السابق ولفترة طويلة من الزمن ان الجينوم الفايروسي لا يستطيع التداخل والاندماج مع جينوم العائل النباتي على عكس ما وُجد في العائيات البكتيرية Bacteriophages و الفايروسات الحيوانية Animal viruses. اذ تم التوصل الى هذه الحقيقة من مصدرين مختلفين وهما كيفية حدوث الإصابة بهذه الفايروسات اذ ان المتعارف عليه ان الإصابة الفايروسية تحدث عند انتقال جسيمات الفايروس من خارج العائل الى داخله لكن الغريب في هذه الفايروسات هي مقدرتها على احداث الإصابة تحت ظروف معينة وتحويل النبات من سليم الى مريض بالرغم من عدم وجودها خارج العائل مما يشير الى انها موجودة أصلاً بشكل مدمج مع جينوم العائل النباتي، كذلك التطور

الكبير في طرق وتقنيات التشخيص الجزيئي خصوصاً تقنية الجيل التالي Next generation sequencing (NGS) والتي مكنت العلماء من تحديد تسلسل عدة فيروسات في أماكن محددة من جينوم عوائل نباتية مختلفة على شكل تجمعات (Clusters) (Alisawi، 2019). لقد وجد ان هذه الفيروسات الداخلية العكسية تعود الى عدة اجناس تشمل *Soymovirus* ، *Tungrovirus* ، *Caulimovirus* ، *Rosadnavirus* ، *Badnavirus* ، *Petuvirus* ، *Solendovirus* ، *Cavemovirus* ، *Florendovirus* التي تعود الى عائلة فايروس موزائيك القرنايب *Caulimoviridea* وقد لوحظ ان فايروسات معظم هذه الاجناس لها القدرة العالية على الارتباط بجينوم العائل النباتي (Geering وآخرون، 2014). يمتاز جينوم هذه الفيروسات بانه مزدوج الشريط من نوع الـ DNA الذي يكون تضاعفها بطريقة الاستنساخ العكسي وهي طريقة فريدة من نوعها في لمثل هذه الفيروسات اذ انها تدخل العائل النباتي على هيئة DNA وتتحول الى mRNA ثم فيما بعد الى DNA مرة أخرى لترتبط وتندمج مع جينوم العائل النباتي في نواة الخلية المضيفة فتكون بذلك جزء ثابت ينتقل الى الأجيال المتعاقبة بالتوارث الجيني الخلوي (Geering وآخرون، 2014). وقد تبين لاحقا ان بعض هذه الفيروسات لها القابلية على البدء بعمليات التضاعف بطريقة الاستنساخ العكسي Revers transcription ليتحول الـ DNA الخاص بها الى mRNA ثم الى DNA تارةً أخرى من اجل بناء جسيمة فايروسية مع غلافها البروتيني والتي بدورها تسبب حدوث الإصابة للعائل المضيف السليم خلال فترة سكون جينوم العائل النباتي فتحول النبات الحامل لها من سليم الى مصاب. ولقد تم اثبات حصول هذه الظاهرة مع ثلاثة فيروسات شملت فايروس شفافية عروق البيتونيا *Petunia vein clearing virus* من جنس *Petuvirus* و فايروس تخطط الموز *Banana streak virus* من جنس *Badnavirus* و فايروس شفافية عروق التبغ *Tobacco vein clearing virus* من جنس *Soymovirus* (Alisawi، 2019). أيضا اثبتت الدراسات ان الفيروسات العكسية موجودة بكثرة في العائلة الباذنجانية فمثلا وجد ان جينوم نبات الطماطة يحتوي على قطع واسعة من التسلسلات المتكررة Repetitive sequences والتي تحتوي على الفيروس الداخلي العكسي المسمى LyceEPRV (Endogenous pararetroviruses) اذ وجد في أنواع الطماطة *Solanum lycopersicum* و *Solanum habrochaites* والذي يشبه كثيراً الفيروسات العكسية التي شخصت في نبات التبغ (Staginnus وآخرون، 2007).

جدير بالذكر الى ان حدوث هذا التحول لهذه الفيروسات من حالة السكون الى حالة النشاط تحتاج الى ظروف اجهاد خاصة يتعرض لها النبات المصاب بها مثل ارتفاع درجات الحرارة، قلة الماء، التقليل الجائر، عملية التقسية المصاحبة لعملية الزراعة النسيجية وغيرها (Harper وآخرون، 2002 و Richert- Poggeler وآخرون، 2003 و العابدي، 2021).

2-5: تشخيص ألفا فيروسات النباتية

يُعد الاكتشاف المبكر والتشخيص الدقيق لفايروس TYLCV خطوة حاسمة لتقليل الانتشار المحتمل للأصابة وتقليل الخسائر. ويعد تطبيق أساليب التشخيص الحساسة والمتخصصة أمراً أساسياً لإدارة TYLCV. لقد كانت الطريقة التقليدية في الكشف عن الإصابة بفايروس TYLCV هي من خلال الملاحظة البصرية للأعراض والتي غالباً ما يكون هذا ممكناً فقط بعد حدوث ضرر كبير بالفعل للمحصول المصاب، ويمكن للشخص المدرب فحص عدد النباتات في الحقل عن طريق المشي على طول المزرعة من أجل تحديد النباتات المصابة (Li وآخرون، 2022). ولكن من المعروف عنه أن الإصابة ببعض الفايروسات لا تسبب ظهور إصابة واضحة بالإضافة إلى أن هنالك وجود سلالات أو فايروسات نباتية مختلفة تسبب ظهور أعراض متشابهة على العائل نفسه، وفي بعض الأحيان تظهر أعراض مرضية مشابهة للأعراض الإصابة ألفا فيروسية ولكنها تكون ناتجة عن اختلاف الظروف البيئية أو نقص بعض العناصر الغذائية الخ (Awasthi، 2020). لهذا تم تطوير العديد من الطرق والتقنيات لتشخيص الفايروسات النباتية ومنها فايروس TYLCV، مثلها النباتات الكاشفة، والفحص بالمجهر الإلكتروني، والطرق المصلية والتقنيات الجزيئية (Webster وآخرون، 2004 و Lopez وآخرون، 2008). وسوف يتم الإسهاب في مراجعة التقنيات الجزيئية في تشخيص الفايروسات النباتية باعتبارها ذات علاقة بدراستنا هذه:

2-5-1: التقنيات الجزيئية في تشخيص الفايروسات النباتية

أن أساس عمل تقنيات التشخيص الجزيئي هو الأحماض النووية للمسببات المرضية بصورة عامة ومن ضمنها الفايروسات، إذ يمكنها استهداف أي منطقة أو جين في الجينوم الذي يمثل 90-95% من الجسيمة الكاملة للفايروس. وحالياً يمكن تطبيق التقنيات الجزيئية بديلاً ناجحاً عن الطرق المصلية في تشخيص العديد من الأمراض النباتية ألفا فيروسية وذلك عندما تتوفر المعلومات الوراثية للفايروسات وموخرًا تم تطوير هذا التقنيات من أجل تطبيقها حتى وإن لم تتوفر هذه المعلومات (Hadidi، 2019). أن استعمال الطرق الجزيئية في الوقت الحاضر أصبح بشكل شائع بسبب الدقة والحساسية العالية وحالياً تتوفر العديد من التقنيات التشخيص الجزيئي للفايروسات (Jeong وآخرون، 2014 و سلمان، 2021):

أولاً: تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase Chain Reaction

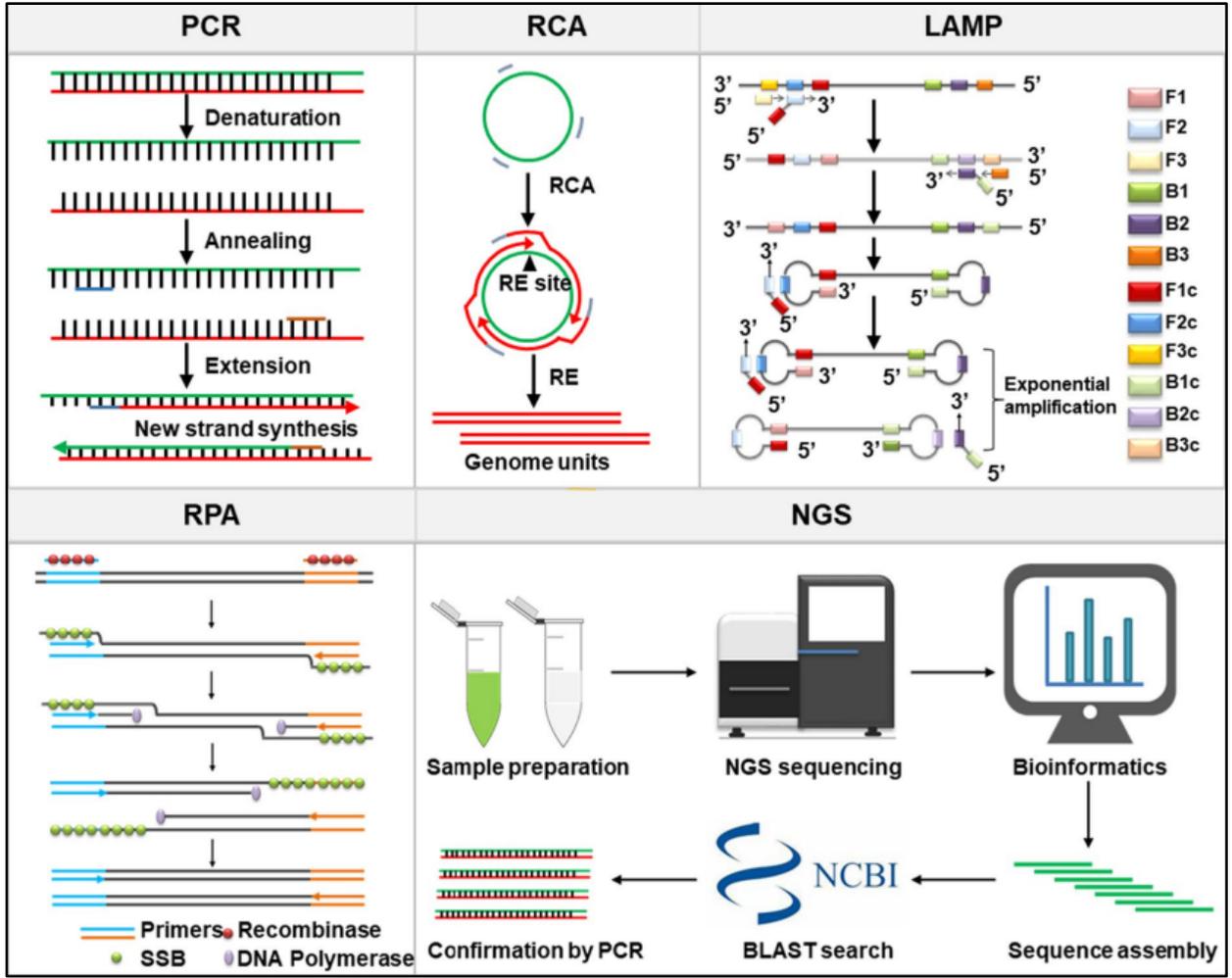
لقد تطورت حساسية ودقة التقنيات التشخيصية الجزيئية بشكل كبير جداً بعد ابتكار العالم Mullis وآخرون (1986) لطريقة أطلقوا عليها تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction

والتي أساس عملها هو في تضخيم او عمل ملايين النسخ المتشابه لمنطقة وراثية او جين معين في تسلسل الحامض النووي حتى وإن كان تركيزه منخفضاً جداً. إن سرعة التنفيذ والتخصص والحساسية العالية لهذه التقنية التشخيصية جعلتها كأحد التقنيات الأساسية للأبحاث الجزيئية ولها العديد من التطبيقات مثل الاستنساخ ، التلاعب الجيني ، تحليل التعبير الجيني ، التتميط الجيني ، والطفرات (Boonham واخرون،2016). بالإضافة إلى ذلك يعتبر كأداة تشخيصية فعالة في الكشف عن مسببات العديد من الأمراض ومنها عن فيروسات النبات (Rubio واخرون،2020). اذ استعمل وبنجاح في تشخيص ألفا فيروسات ذات الحمض النووي (DNA) مثل أنواع الاجناس *Cauliomyovirus* و *Badnavirus* و *Geminivirus* و *Nanovirus* (مكوك واخرون،2008 و Uyeda و Masuta،2015). ولتنفيذ هذه التقنية يتطلب الامر اولاً استخلاص الاحماض النووية (DNA او RNA) كما نحتاج زوج من البادئات (Primer Pair) والتي هي عبارة عن سلسلة بطول 15-22 نيوكليوتيدة تكون مكمله بشكل عكسي لقطعة من الحمض النووي المراد تضخيمه، كذلك يجب اضافة انزيم النسخ Taq polymerase ومكونات التفاعل الاخرى مع تطبيق دورات تفاعل بدرجات حرارة مختلفة تتكون من ثلاثة خطوات تبدأ بفك الارتباط (Denaturation) بين شريطي الـDNA عن طريق رفع درجة الحرارة بين 94-95 م° بمدد زمنية مختلفة ثم خفض 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 بالإضافة الى وجود خطوة فك الارتباط أولية (Initial Denaturation) تسبق هذه الدورات وأيضاً خطوة تمدد نهائية (Final Extension) بعد انتهاء هذه الدورات. وبعد انتهاء التفاعل يتم التحقق من النتائج بعملية تسمى بالترحيل الكهربائي للـDNA على وسط هلام الاكروز وترحيله من القطب السالب الى القطب الموجب ويتم إضافة صبغة بروميد الاثيديوم او صبغة ملانمة أخرى الى الوسط من اجل ان ترتبط بالحامض النووي المضاعف وتجعله مرئي بعد تسليط الاشعة فوق البنفسجية عليها (Saiki واخرون،1988 و سلمان،2021).

ولغرض تشخيص الفايروسات النباتية ذات الحامض النووي نوع RNA تم تطوير تقنية متخصصة تسمى اكمال الـDNA (Complementary DNA) التي تعمل على بناء سلسلة مكمل للـRNA المفرد وتحويله الى شريط مزدوج بواسطة انزيم النسخ العكسي الذي يسمى Reverse Transcripase (RT) قبل البدء بتطبيق تقنية الـPCR لتضخيم الجين أو المنطقة الوراثية المرغوبة في جينوم ألفا فيروس كما هو موصوف أعلاه ويطلق على هذه العملية بتفاعل البلمرة المتسلسل العكسي Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) (King،2010). وبسبب حساسية وتخصص هذه الطريقة

وموثوقيتها ورخصها فقد استعملت بنجاح في تشخيص العديد من ألفا فيروسات النباتية ذات جينوم الـ RNA مثل ألفا فيروسات *Potato virus X* و *Potato virus S* و *Potato leaf roll virus* (Peter) واخرون، 2008 و 2009 و Drygin واخرون، 2012). وبشكل عام تعد طريقة تفاعل البلمرة المتسلسل أساساً لمعظم تقنيات التشخيص الجزيئي المستعملة في الوقت الحاضر (Rubio واخرون، 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 (سلمان، 2021 و Green و Sambrook، 2019).

وفي الوقت الحاضر، ابرز الطرق الجزيئية التي تستعمل في تشخيص فايروس TYLCV تقسم الى قسمين رئيسيين هما طرق تفاعل البلمرة المتسلسل و طرق التضخيم متساوي الحرارة مثالها طريقة PCR و Rolling circle amplification (RCA) و Loop-mediated isothermal amplification و Recombinase polymerase amplification (RPA) بالإضافة الى تقنية تسلسل الجيل التالي (NGS) التي أحدثت ثورة في اكتشاف وتوصيف فايروسات *Geminiviruses* التي تشمل فايروس TYLCV (Li واخرون، 2022) (شكل 8).



شكل (8): مخطط ابرز الطرق الجزيئية المستعملة في تشخيص فايروس (TYLCV) (Li و آخرون، 2022)

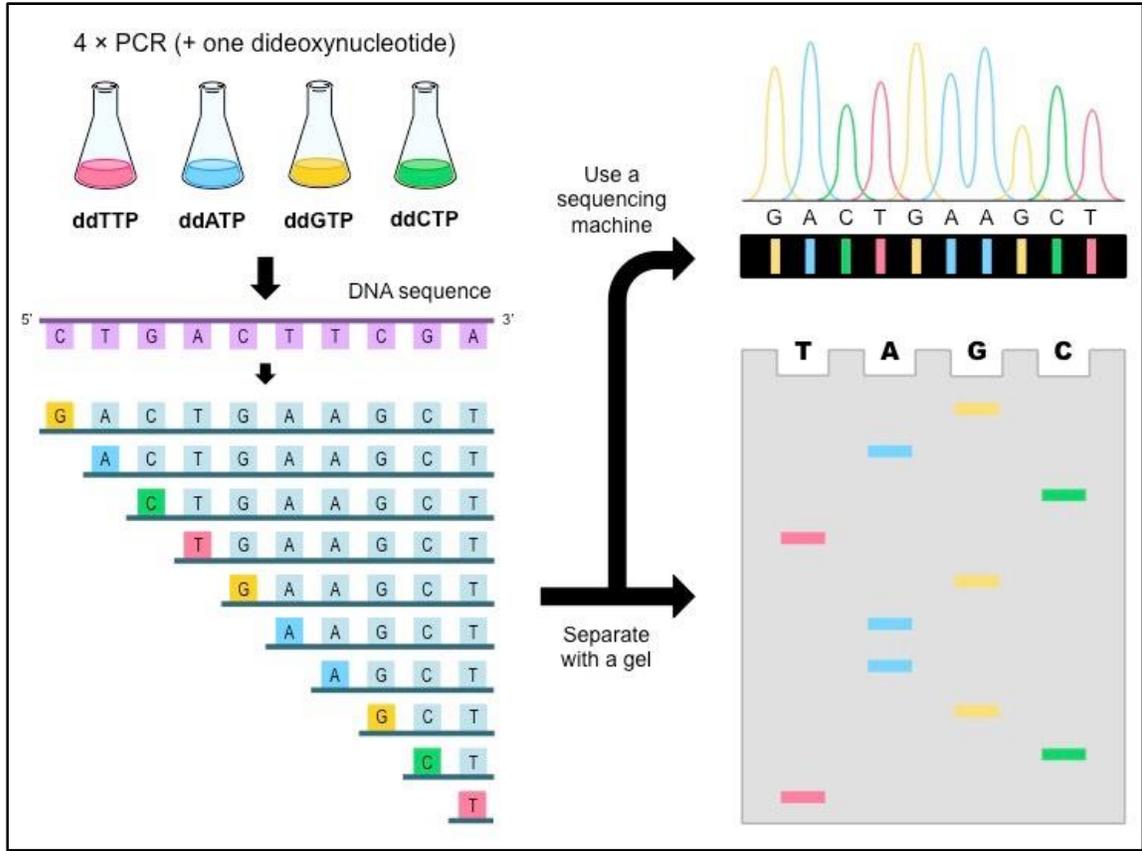
ثانياً: تحديد تسلسل الاحماض النووية DNA و RNA

بعد الجهود الحثيثة من قبل عدد كبير من العلماء حول اكتشاف الحامض النووي وبنيته الإجمالية والتي تكلفت بالنجاح من قبل العالمان Watson و Crick عام 1953 ، اصبح من الضروري تحديد التفاصيل الدقيقة وأنماط الهيكل لهذا المركب الحيوي 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 تقنيات مختلفة بآليات عديدة تعاقبت على ثلاثة أجيال (سلمان، 2021):

➤ طريقة الجيل الأول First generation sequencing

ان اول من وضع الحجر الأساس في مجال تحديد تسلسل الاحماض النووية هما العالمان Sanger و Coulson اذ نجحوا في العام 1975 ولأول مرة بالتاريخ في تحديد تسلسل عاثي بكتيريا الإشريكية القولونية (*Escherichia coli* bacteriophage) بعد تطويرهم طريقة خاصة اطلقوا عليها تسمية إنهاء السلسلة Chain-termination والتي عرفت لاحقاً بطريقة Sanger Sequencing وتتضمن عدة خطوات تشمل تنقية ومسح الحامض النووي المستخلص ثم يقسم بالتساوي ويوزع في أربعة أنابيب في كل أنبوبة انزيم النسخ (Taq polymerase) للحامض النووي 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 لكل انبوبة من الانابيب الاربعة اذ تعمل كمنهي لبناء السلسلة، حيث اذا ارتبطت فانها تعمل على ايقاف بناء امتداد خيط DNA في هذه النقطة. وهذا يؤدي الى انتاج قطع من الـ DNA باطوال مختلفة وباعتبار أن نوعاً واحداً فقط من ddNTP تمت اضافته في كل انبوبة لذلك اصبح معروف نهاية كل قطعة مضاعفة والتي يتم وضعها في حارة مخصصة لكل نوع من الأنواع الأربعة للـ ddNTP في هلام الاكاروز ومن ثم اجراء الترحيل الكهربائي واعتمادا على ترتيب القطع وأنواع النيوكليوتيدات المنهية في كل حارة يتم تحديد تسلسل الحامض النووي الـ DNA. لقد تم تطوير هذه التقنية لاحقاً واستعملت بشكل اوتوماتيكي 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 واخرون، 1986) وينتج تسلسلات او قراءات بطول من 300 الى 750 نيوكليوتيدة (شكل 9). ولقد تم اعتبار هذه التقنية هي الجيل الأول ضمن تقنيات تحديد تسلسل القواعد النايتروجينية للاحماض النووية باعتبارها أول الاختراعات المستعملة في هذا المجال وكانت الوحيدة المعروفة لمدة 30 سنة تقريباً (Chain و Heather، 2016). ورغم 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 وتطوير تقنيات اخرى.



شكل (9): مخطط توضيحي لطريقة Sanger Sequencing (Hames و آخرون، 2005)

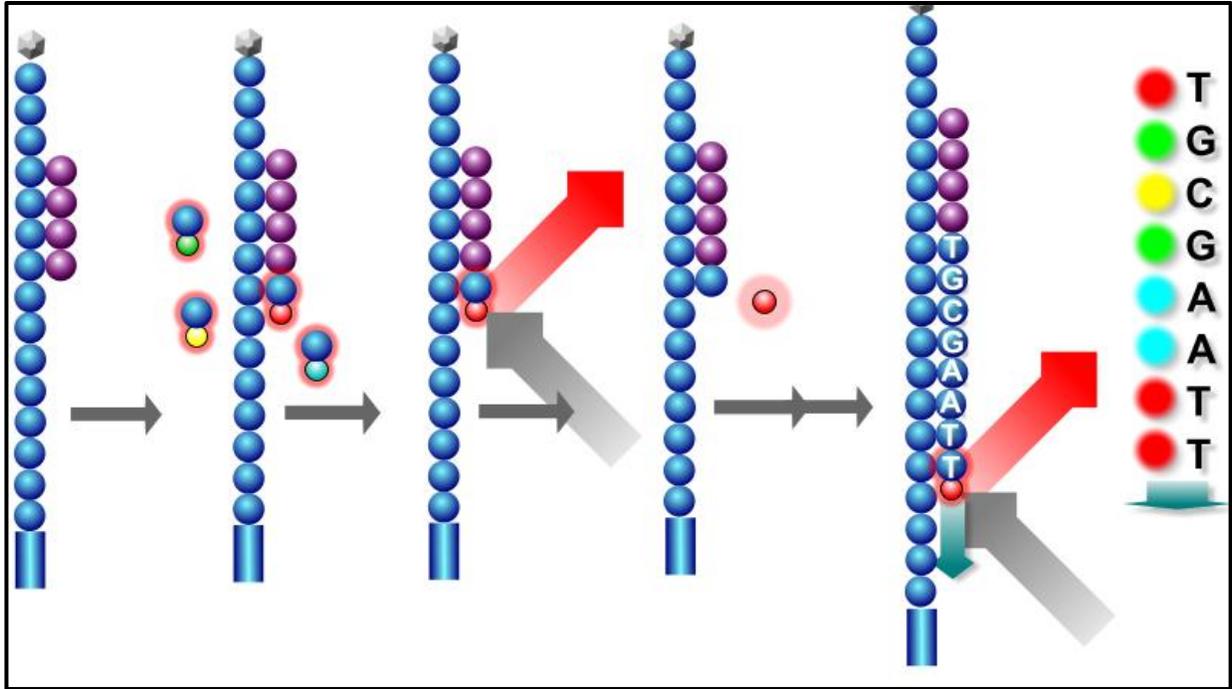
➤ طرق الجيل الثاني Second generation sequencing

يوجد في الوقت الحاضر العديد من التقنيات المستعملة ضمن الجيل الثاني والتي تسمى تسلسل الجيل التالي (NGS) Next generation sequencing، ويشار إليه أيضًا بطرق التوازي على نطاق واسع High sequencing ، او التسلسل ذو الإنتاجية العالية High sequencing ، او التسلسل العميق Deep sequencing ، إذ انها سببت الزيادة وبشكل كبير جدا من إنتاجية تسلسلات القواعد النايتروجينية الى ملايين او مليارات القراءات التسلسلية باطوال بين 25 الى 400 قاعدة نايتروجينية وبنفس الوقت تقليل الوقت المطلوب والتكلفة بشكل كبير مقارنة بالطرق السابقة (Barba واخرون، 2014 و Mahon و Lehman، 2019). ويوجد حاليا العديد من الشركات المتخصصة التي تستعمل طرق تسلسل الجيل التالي مثل Ion PGM Sequencing و Pyrosequencing454 و SOLiD Sequencing و Illumina، علماً أنّ الأساليب المتبعة تختلف بين هذه الشركات والتي يتطور

و يتحسن اداؤها باستمرار وفيما يلي نظرة عامة على تقنية شركة Illumina التي استعملت في دراستنا الحالية:

• Illumina

تستعمل شركة Illumina طريقة تحديد التسلسل بالتوليف او التجميع Sequencing-by-Synthesis (SBS) (شكل 10) اذ يتم تثبيت شظايا الحمض النووي سواء كانت الـ DNA او الـ RNA المقطعة بواسطة انزيمات على خلية تدفق مع بادئات ويتم بعدها تنفيذ عملية تضخيم او مضاعفة بواسطة الـ PCR لإنتاج نسخ متعددة من الهدف في مجموعات والتي يتم غسلها بأربعة أنواع من النيوكليوتيدات المنهية المرتبطة بواسمات او صبغات فلورية مشعة ذات الوان خاصة لكل نوع منها. 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. 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 الـ 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 و Rubio واخرون، 2020، Illumina، 2022).



شكل (10): مخطط توضيحي لطريقة تحديد التسلسل بالتوليف او التجميع -Sequencing-by-Synthesis (www. Illumina.com)

➤ طرق الجيل الثالث Third generation sequencing

تعد هذه الطرق الاحداث في مجال تحديد تسلسل القواعد النايتروجينية للاحماض النووية ومبدأ عملها يعتمد على تحديد 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 الحامض النووي بواسطة طريقة الـPCR المشتركة بين جميع التقنيات السابقة وأيضا سرعتها تكون عالية اذ تحتاج اقل من يوم مع إنتاج لتسلسلات او قراءات مفردة بمعدل طول بين 5000 الى 15000 وبعضها يتجاوز 100.000 قاعدة نايتروجينية كما ان لها القدرة على تجاوز بعض معوقات الطرق السابقة ولكن يعاب عليها تكلفتها العالية ودقتها الأقل مقارنة بطرق الجيل الثاني. يوجد حاليا العديد من الشركات المتخصصة بهذه التقنيات ابرزها Pacific Biosciences (PacBio) الامريكية و Oxford Nanopore Technologies البريطانية (Heather و Chain 2016 و Zhou و Xiao 2020).

Material and methods

3 : المواد وطرائق العمل

Materials

1-3: المواد

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

جدول (1): الأجهزة والمعدات المستعملة

الدولة	الشركة المصنعة	الجهاز	ت
Germany	Crivit	Portable refrigerator	1
South Korea	LabTech	Laminar flow cabinet	2
Germany	Memmert	Water Distiller	3
USA	Denver Instrument	Precision Balance	4
Germany	Boeco	أدوات زجاجية مختلفة	5
Lebanon	Concord	Refrigerator	6
South Korea	LabTech	Deep-Freeze -35 م°	7
Taiwan	ExtraGene	Eppendorf tubes	8
South Korea	LabTech	Autoclave	9
Germany	Heidolph	Vortex	10
Germany	Labortechnik	جهاز الطرد مركزي المبرد	11
Germany	MWG Biotch	Thermal cycler PCR	
South Korea	Bioneer Corporation	جهاز تفاعل البلمرة اللحظي Exicycler™ 96 Fast Real-time Quantitative Thermal Block	
France	Gilson	Micropipettes	12
France	Gilson	مدقة بلاستيكية صغيرة Plastic micro pestles	13
France	Gilson	ملاحق خاصة بالماصات الدقيقة Micropipette tips	14
China	MeticLab	ورق ترشيح Filter paper	15

China	Zhangjiagang	ورق سيلوفين معدني	16
-------	--------------	-------------------	----

The chemical materials

2-1-3: المواد الكيميائية

جدول (2): المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة

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 (3): العدد المستعملة في الدراسة

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

Methods

2-3: طرائق العمل

1-2-3: جمع عينات النباتات

جُمعت عينات مختلفة في خريف 2021-2022 من نبات الطمطة (محافظة كربلاء - المزرع الصحراوية) و نبات الباميا (محافظة بابل - قضاء المسيب) و نبات البطاطا (محافظة بغداد - ناحية اللطيفية – ناحية اليوسفية) , (محافظة بابل - قضاء المحاويل - ناحية الامام - منطقة البدعة - ناحية جبلة) اذ جمعت

الأوراق التي تظهر عليها اعراض الإصابة بوضوح مثل التفاف الأوراق و تجعد الاوراق و الفسيفساء الأصفر و التقزم اضافة الى وجود بيوض واطوار مختلفة لحشرة الذبابة البيضاء على السطح السفلي و وُضعت العينات في ثلاجة متنقلة بدرجة حرارة 10 م° و حُفظت بعدها في جهاز تبريد عالي التبريد بدرجة حرارة - 35 م° .

3-2-2: استخلاص الحامض النووي الـDNA من العينات النباتية باستعمال العدة التجارية

استعملت العدة AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (K-3031) في استخلاص الحامض النووي منقوص الاوكسجين من عينات النباتات وفق ما موصى بها في الشركة:

(1) سحقت العينات النباتية (100مايكروليتر) و وضع 300 مايكروليتر من المحلول الدارى PL و وضع 20 مايكروليتر من الانزيم Proteinase K و 10 مايكروليتر من أنزيم RNAase و خلطت المكونات جيدا بالهزاز الكهربائي.

(2) وضعت العينات الحاوية على المكونات في حمام مائي بدرجة 60 م° و لمدة 10 دقائق.

(3) وضع 100 مايكروليتر من المحلول الدارى الى الخليط و مُزجت جيدا بالهزاز الكهربائي و حضنت العينات في الثلج لمدة 5 دقائق و هذه العملية ضرورية لترسيب السكريات و البروتينات و المنظفات .

(4) وضعت العينات في جهاز الطرد المركزي و بسرعة 13000 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق و أخذ المحلول الطافي الى أنابيب Eppendorf و أضيف لها المحلول الدارى WA1 بمقدار مرة و نصف من حجم العينة (750 مايكروليتر) و مُزجت المكونات جيدا في الهزاز الكهربائي لمدة 10 دقائق و بسرعة 13000 دورة/دقيقة.

(5) نقل الخليط الى أنبوبة عمود(أنبوبة ذات فلتر في قاعدتها) و أجريت عليها عملية الطرد المركزي و بسرعة 8000 دورة/دقيقة و لمدة دقيقة و تم التخلص من الراسب.

(6) اضيف 500 مايكروليتر من المحلول الدارى W2 و وضعت العينات في جهاز الطرد المركزي و بسرعة 8000 دورة/ دقيقة و لمدة 1 دقيقة و أستبعد المحلول الراسب و أعيدت الخطوة نفسها كخطوة اختيارية للتخلص من بقايا الكحول(هذه الخطوة مقترحة من قبل الشركة المجهزة للـKit).

(7) وُضعت الانابيب في الطرد المركزي بسرعة 13000 دورة/ دقيقة و لمدة 10 دقيقة للتجفيف تماما من الكحول و فيما اذا كانت قطرات عالقة في الفلتر.

(8) وُضع المحلول الدارى EA في الحمام المائي لمدة دقيقة (مقترح هذا من قبل الشركة)

(9) وُضع الانبوب العمودي ذا الفلتر في انبوبة Eppendorf جديدة سعة 1,5 مليلتر و وضع 100 مايكروليتر من المحلول EA في منتصف الفلتر و بالقرب من قاعدة الانبوبة و تُركت لمدة 1 دقيقة و وضعت الانابيب

في الطرد المركزي و بسرعة 8000 دورة/ دقيقة ولمدة دقيقة أيضا للحصول على DNA و حُزنت العينات في التبريد بدرجة -35م.

3-2-3: استخلاص الحامض النووي الـDNA من العينات النباتية باستعمال طريقة جديدة (طريقة مكتشفة من قبل الباحث)

بهدف تطوير طريقة سهلة وسريعة ورخيصة لغرض استخلاص الـDNA الجينومي الكلي من النباتات المصابة بالفايروسات واستعماله في اجراء العديد من التحاليل الجزيئية ذات العلاقة، جلبت ورقتين نباتيتين ظهرت عليهما اعراض الإصابة الفايروسية وسحقت بعناية باستعمال هاون ومدقة خزفية معقمة وبمساعدة 100-50 ملغم من رمل ناعم (حجم الحبة 200 ملليميتر) معقم ثلاث مرات في جهاز المؤصدة مع إضافة 10 مل من محلول هايبيكلوريت الصوديوم NaClO (القاصر) تركيز 2.5 % او الماء المقطر. بعدها جرت عملية تصفية وفصل مبدئي لحبيبات الرمل والمحتويات الخلوية النباتية باستعمال طبقتين من الشاش ثم أجريت عملية طرد مركزي بسرعة 14000 دورة بالدقيقة لمدة 5 دقائق لغرض التخلص من أي بقايا. بعدها جمع المحلول الطافي وأجريت له عملية تصفية أخرى لمرتين باستعمال فلترالحقن AMTAST PTFE (مقاس المسامة 0.22 مايكروميتر) (AMTAST/ الولايات المتحدة الامريكية). قدر تركيز الـDNA باستعمال جهاز Quawell Nanodrop-Q5000/ الولايات المتحدة الامريكية) وحفظ تحت درجة الحرارة -20 مئوي لحين الاستعمال.

3-2-4: عملية ترسيب الـDNA

ان الغرض من هذه العملية هو الحصول على الـDNA عالي النقاوة و التركيز ممن العينات النباتية و ذلك حسب الطريقة المتعارف عليها الواردة في (Lahuf ، 2014) (طريقة لهوف):

1) اضيف الكحول الايثيلي المركز (99.9%) المبرد بمقدار مرتين و نصف من حجم الحامض النووي النهائي بالإضافة الى مركب خلات الصوديوم Sodium acetate تركيز 3 مولاري (pH 5.2) بمقدار العشر من الحجم النهائي و خلطت المكونات جيداً بالهزاز الكهربائي و حُضنت العينات لمدة 24 ساعة تحت درجة حرارة -35 م.

(2) أجريت عملية الطرد المركزي المبرد بدرجة حرارة 4 م° وبسرعة 14000 دورة/دقيقة لمدة 30 دقيقة، وتم التخلص من كحول الايثانول بحذر شديد بواسطة الماصة الدقيقة.

(3) غُسلت الحبيبات الحاوية على الاحماض النووية المترسبة بواسطة 500 مايكروليتر من الكحول المخفف 75% المبرد بالسرعة نفسها و لمدة 10 دقائق (كُريت هذه العملية مرتين) و بعدها تم التخلص من الكحول المخفف بالماصة الدقيقة بحذر و أُعيدت العينات الى جهاز الطرد المركزي بنفس السرعة السابقة لمدة 10 ثواني.

(4) جُففت العينات الحاوية على الاحماض النووية بدرجة حرارة المختبر و خلط معها 50 مايكروليتر من الماء المقطر المعقم.

3-2-5: التشخيص الجزيئي للفايروسات *Begomoviruses*

لغرض التشخيص الجزيئي للفايروسات *Begomoviruses* وما يرافقها تم تطبيق تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل الـPCR و تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل اللحظي Realtime-PCR وتقنية الجيل التالي لتحديد التسلسل (NGS) Next Generation sequencing.

اولاً: التشخيص باستعمال تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل الـPCR

لقد تم تطبيق تقنية تفاعل الـPCR باستخدام الاحماض النووية التي تم استخلاصها من العينات النباتية باستعمال الطريقتين أعلاه وذلك بالاستناد الى البودائ الموضحة في جدول (3-7) المتخصصة في تشخيص أنواع الجنس *Begomovirus* (Rojas و اخرون، 1993 و Marwal و اخرون، 2013 و Kumar و اخرون، 2018).

جدول (4): البودائ المستخدمة في اختبارات تفاعل البلمرة المتسلسل الـPCR

PCR الـ Reaction

اسم الجنس	اسماء البودائ	3-تواليات البودائ-5
<i>Begomovirus</i>	PBL1v2040-F	GCCTCTGCAGCARTGRTCKATCTTCATACA
	PAL1V1978-R	GCATCTGCAGGCCACATYGTCTTYCCNGT
	PAR1c496-R	AATACTGCAGGGCT TYCTRTACATRGG
	PCRC154-R	GGTAATATTAT AHCGGATGG
	AC1048-F	GGRTTDGARGCATGHGTACATG
	AV494-R	GCCYATRTAYA GRAAGCCMAG

	CLP36-F	CCTTAGCTAC GCCGGAGCT
	CLP36-R	AAGGCTGCTG CGTAGCGTAG

أُستعملت العدة AccuPower® Taq PCR PreMix في اجراء تفاعل PCR وذلك باضافة 5 ميكرو لتر (أكثر من 100 نانوغرام) من الـ DNA لكل عينة نباتية مع 3 ميكرو لتر (30-10 بيكومولاري) من كل بادئة بالإضافة الى 9 ميكرو لتر من الماء المقطر المعقم الى انبوبة الـ PCR التي تحتوي على مكونات التفاعل الجافة و خلطت المحتويات بصورة جيدة ثم وضعت في جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل Thermal cycler PCR وباستعمال ظروف التفاعل الموضحة في الجدول ادناه حسب كل زوج من البادئات (Kumar واخرون، 2018).

جدول (5): 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 PAL1V1978 R PAR1c496-R PCRC154-R	94 م° لمدة 3 دقائق	30	94 م° لمدة دقيقة	50 م° لمدة دقيقة	72 م° لمدة 3 دقائق	72 م° لمدة 5 دقائق
AC1048-F AV494-R	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
CLP36-F CLP36-R	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

اذ أجريت عملية الترحيل الكهربائي لنواتج عملية التضاعف على وسط الـ Agrose بتركيز 1.5 % والذي حضر باذابة 0.5 غم من مادة اعلاه في 50 مل من المحلول الدارى X1 TAE بالتسخين الحراري وبعد انخفاض درجة حرارة الخليط الى 40 م° اضيف 5 مايكرو ليتر من صبغة Ethidium bromide (10ملغم/مل) و خلط جيداً و وضع المحلول في القالب الخاص مجهزاً بالمشط في طرف القالب، و رفع المشط بعد

عملية تصلب الجل ووضع قالب بمحتواه في جهاز الترحيل الكهربائي ثم أكمل الحجم بالمحلول الدارئي X1 TAE حتى تغطي كل المحتوى ثم أضيف 15 مايكروليتر من الـ DNA في كل حفرة و تم تشغيل جهاز الترحيل على جهد 100 فولت و لمدة 30-40 دقيقة و فحص هلام الاكروز بأستعمال جهاز الاشعة فوق البنفسجية بعد أنتهاء عملية الترحيل و ملاحظة احجام الاحماض النووية المضاعفة (Lahuf, 2014).
(الورادة في لهوف)

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

أرسلت عينات الـ DNA التي تم الحصول عليها من النباتات المصابة الى شركة Macrogen, Inc. (سيئول، كوريا الجنوبية) لغرض تحديد تسلسل القواعد النايتروجينية باستعمال تقنية الجيل التالي (NGS) بحسب طريقة Metagenomics. شملت عملية تحليل تسلسل القواعد النايتروجينية بهذه التقنية وتحليل البيانات التي تم الحصول عليها من الشركة باستعمال برامج المعلوماتية الحيوية الخطوات التالية:

أ) أعداد المكتبات الجينومية وتحديد التسلسل عالي الإنتاجية

تم إعداد مكتبات التسلسل الجينومية (Sequencing libraries) باستعمال العدة TruSeq Nano DNA Kit عن طريق تجزئة عشوائية من الحمض النووي وتحديد تسلسل القواعد النايتروجينية لكلا الاتجاهين (Paired-end) للعينات النباتية باستعمال جهاز NextSeq 1000 & 2000 على منصة Illumina اذ تنتج قراءات باطوال محددة مقدارها 151 قاعدة نايتروجينية.

ب) تشذيب قراءات تسلسلات القواعد النايتروجينية

تتضمن عملية تحضير مكتبات التسلسل الجينومية ربط البادئات المتخصصة (Specific Primers) والمحولات (Adapters) في شظايا الحمض النووي ليتم تحديد تسلسلها لاحقاً. لذلك فان هذه التسلسلات الاضافية لديها القدرة على التداخل السلبي في نتائج تحليلات المعلوماتية الحيوية اللاحقة، لذلك يتوجب إزالتها من مجموعة البيانات بالإضافة الى إزالة المقروءات ذات النوعية المنخفضة (أقل من Q30) باستعمال البرامج المتخصصة مثل برنامج Trimmomatic (Bolger وآخرون، 2014). ولغرض التأكد من جودة المقروءات بعد تطبيق عملية التشذيب استعمل برنامج FastQC (Andrews، 2010) الذي

يعطينا تقريراً مفصلاً عن جودة البيانات لغرض إزالة ذات النوعية الرديئة وتحديد الأفضل 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 أو المقروءات المتجمعة (Contigs) تم استعمال برامج متخصصة لتحقيق هذا الهدف شملت برنامج SPAdes (Bankevich وآخرون، 2012) وبرنامج Trinity (Grabherr وآخرون، 2011) 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 أو المتجاورات المتداخلة (Contigs) مع التسلسلات العالمية

لغرض إيجاد مناطق التشابه والاختلاف بين تسلسلات القواعد النايتروجينية والبروتينات استعمل برنامج BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Camacho وآخرون، 2009) الذي يقارن بين تسلسلات القواعد النايتروجينية (BLASTn) أو تسلسلات الأحماض الأمينية (BLASTp) مع جميع التسلسلات المحفوظة في قواعد البيانات وحساب الدلالة الإحصائية لها. ولجعل عملية المقارنة أسرع وادق وأكثر 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 التي تم الحصول عليها من الموقع <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi/#/virus?> في تاريخ 2022-2-25. حفظت مخرجات هذه العملية في ملف اكسل وتمت مراجعتها وتنظيمها يدوياً والتخلص من نسب المقروءات ذات نسب التشابه المنخفض.

و) محاذاة المقروءات مع الجينوم المرجعي لفايروسات النبات المشخصة

بعد تحديد أهم الفايروسات النباتية التابعة للجنس *Begomovirus* التي شخّصت في هذه الدراسة 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 (Langmead وSalzberg، 2012) في إجراء المحاذاة (Alignment) بين المقروءات المتسلسلة (Raw reads) والجينومات المرجعية لفايروسات النبات المشخصة، من أجل تعيين المقروءات

المتسلسلة وتجميعها بهدف انشاء او توليد أطول تسلسلات متفق عليها (Consensus sequence) مشابه لتسلسل الجينوم الفايروسي المرجعي.

ز) تحليل النشوء والتطور

استعملت مجموعة التسلسلات المتفق عليها (Consensus sequences) المشابه لتسلسلات الجينومات المرجعية في برنامج BLASTn 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 تشغيلها من اجل بناء أشجار النشوء والتطور التي تطبق نهج او طريقة الانضمام إلى الجوار (neighbor-joining) (Kumar واخرون، 2016).

ح) تحليل إعادة التركيب Recombination analyses

لغرض تحديد فيما اذا كان هنالك إعادة تركيب لسلسلة الفايروس *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* (TYLCV) المشخصة في هذه الدراسة مع السلالات او الأنواع الأخرى التابعة لجنس *Begomovirus* تم استرجاع التسلسلات الكاملة للفيروسات الاحادية (*monopartite begomoviruses*) المشخصة سابقا في نبات الطماطة والمحفوظة في GenBank ومقارنتها مع تسلسلات الكاملة المتفق عليها (Consensus sequences) لنفس الفايروس باستعمال برنامج ClustalW في برامج منصة MEGA. كذلك جرى مقارنة تسلسل الاحماض الامينية لجينوم نفس الفايروس مع نضائرها من العزلات والسلالات العالمية المحفوظة في قاعدة بيانات GenBank باستعمال برنامج SDT v1.2 مع الاخذ بنظر الاعتبار حذف الفجوات الزوجية (Muhire واخرون، 2014). يضاف الى هذا التحليل إجراء مسح لتحديد مواقع إعادة التركيب على كل بيانات التسلسلات الخاصة بترميز البروتينات في جينوم الفايروس باستعمال طريقة النقطة الواحدة (SBP) single breakpoint scanning وطريقة كشف إعادة التركيب الخوارزمية الجينية genetic algorithm recombination detection (GARD) (Kosakovsky واخرون، 2006)، علماً ان هاتين الطريقتين نفذت ضمن منصة برامج Datamonkey (Weaver واخرون، 2018). ولغرض تأكيد النتائج تم إجراء المزيد من التحقيق في وجود إعادة التركيب المحتملة باستعمال الإعدادات الافتراضية لخوارزميات الكشف السبعة داخل برنامج RDP v 4.13 (Martin واخرون، 2015)، لقد تم التأكيد المعنوي وقبول وجود ظاهرة إعادة التركيب المفترضة والمواد المؤتلفة وتسلسلها الأبوي فقط عندما يتم اكتشافها بأربع طرق من الطرق السبعة على الأقل تحت مستوى معنوية قوي $P \leq 0.05$.

3-2-6: التحري عن طرق انتقال فايروسات *Begomoviruses* المشخصة في هذه الدراسة

3-2-6-1: التشخيص الجزيئي لحشرة الذبابة البيضاء المرافقة للنباتات المصابة

بههدف التشخيص الدقيق لحشرة الذبابة البيضاء المرافقة للأوراق المصابة التي جمعت في هذه الدراسة تم تحليل بيانات المقروءات الخام التي تم استلامها من شركة MacroGen الكورية الجنوبية وذلك باستعمال منصة البرامج Geneious Prime®. اذ تم أولاً إجراء عملية التجميع لتسلسلات جينوم المايكروندريا لهذه الحشرة وذلك من خلال محاذاة المقروءات الخام مع الجينوم المرجعي لمايكروندريا الذبابة البيضاء ذو الرمز (KR559508.1) الذي تم الحصول عليه من قاعدة بيانات الجينومات المرجعية في موقع NCBI (Bernt وآخرون، 2013 و Kunz وآخرون، 2019) ثم شرح الجينوم المتجمع (Genome annotation) وذلك بتحديد مواقع الجينات وجميع المناطق المشفرة في الجينوم باستعمال منصة البرامج MITOS (Bernt وآخرون، 2013). بالإضافة الى هذه التحاليل تم إجراء تحليل النشوء والتطور (phylogenetic analysis) للتسلسل المتفق عليه (Consensus sequence) وذلك باستعمال برنامج BLASTn و 11MEGA (Chen وآخرون، 2016 و Kumar وآخرون، 2016).

3-2-6-2: تقييم انتقال فايروس TYLCV عن طريق البذور

لغرض التأكيد او نفي إمكانية انتقال هذا الفايروس بواسطة البذور تم إجراء هذا الاختبار وذلك بجمع بذور من ثمار الطماطة الماخوذة من نباتات مصابة ظهرت عليها الاعراض النموذجية للإصابة بفايروس TYLCV كذلك تم التأكد من إصابة هذه النباتات بإجراء تفاعل PCR باستعمال زوج من البادئات جدول (6). قسمت البذور التي جمعت الى مجموعتين، اذ عقت المجموعة الأولى سطحياً باتباع طريقة عمل Tabein وآخرون (2021) وذلك باستعمال كحول تركيز 70% لمد 10 دقائق وتعقم لمدة 10 دقائق أخرى في التخفيف العاشر من محلول هايبيوكلوريت الصوديوم NaClO (القاصر التجاري) غسلت عدة مرات بالماء المقطر المعقم لإزالة اثار محلول القاصر. اما المجموعة الثانية من البذور لم يتم تعقيمها و زرعت 10 بذور من كل عينة ثمار في اطباق تحوي على وسط Water agar المعقم. وبعد الانبات ووصول البادرات في المجموعتين الى مرحلة الورقتين جرت عملية استخلاص الـDNA من عينات ورقية لكل بادرة ولغرض التأكد من وجود الفايروس وكميته التقريبي استعمل تفاعل البلمرة المتسلسل اللحظي Real Time-PCR باستعمال زوج البادئات TYLCV-C1-F و TYLCV-C1-R واتباع نفس ظروف التفاعل المذكور في Kil وآخرون (2016). ولغرض زيادة مصداقية التشخيص جرى استعمال معاملة المقارنة التي اضيف فيها الماء المقطر بدلا من الـDNA المستخلص. وقد كانت ظروف التفاعل تتكون من مرحلة التفكك الابتدائي لمدة 5 دقائق تحت درجة حرارة 95 °م متبوعه باربعين دورة تتكون من ثلاثة مراحل مستتسلسه تشمل مرحلة التفكك لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة 95 °م ومرحلة الالتصاق لمدة 15

ثانية في درجة حرارة 60 م و مرحلة التمديد لمدة 20 ثانية في درجة حرارة 72 م وذلك باستعمال جهاز Exicycler™ 96 Fast Real-time Quantitative Thermal Block. كذلك نقلت البادرات الى سنادين حاوية على السماد العضوي (البتموس) المعقم لمرتين بدرجة حرارة 121 م (كل مرة لمدة 60 د) من اجل متابعة إمكانية تطور الاعراض المرضية على البادرات مع الحرص على تغطيتها باستعمال قماش المللم لضمان عدم اصابتها بحشرة الذبابة البيضاء اثناء فترة النمو.

جدول (6): زوج البوادئ المستعملة في اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل اللحظي Real Time-PCR في تشخيص فايروس TYLCV

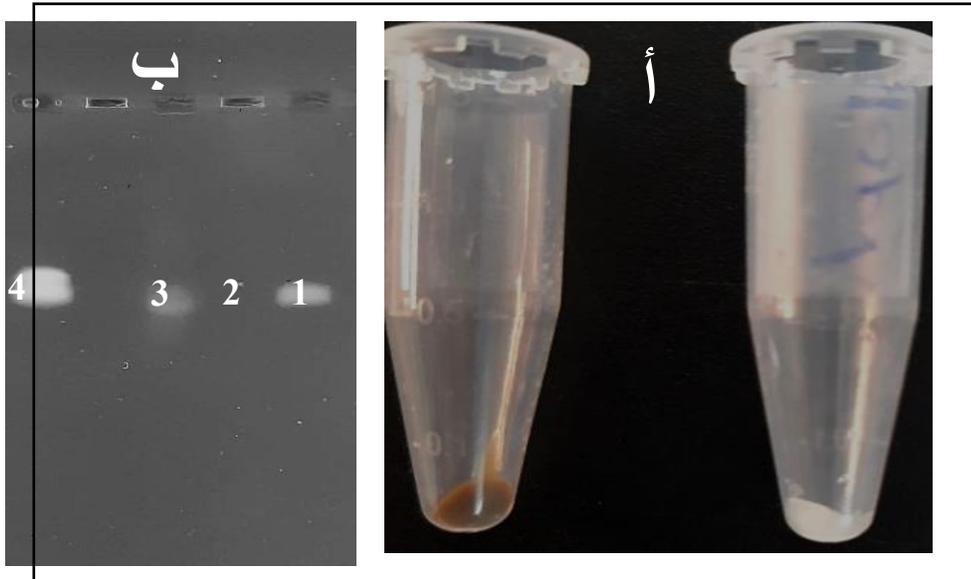
اسم الفايروس	اسماء البوادئ	3-تواليات البوادئ-5
TYLCV	TYLCV-C1-F	GCTCGTAGAGGGTGACGAA
	TYLCV-C1-R	CACAAAGTACGGGAAGCCCA

4: النتائج والمناقشة

Results and Discussion

4-1: استخلاص الحامض النووي الـDNA الكلي من العينات النباتية

أظهرت النتائج نجاح الطريقة المبتكرة في هذه الدراسة في استخلاص الـDNA الكلي من النباتات المصابة بفايروس TYLCV. وكانت طريقتي الاستخلاص باستعمال محلول هايبو كلوريت الصوديوم لوحده او متبوعاً بتطبيق عملية ترسيب الـDNA افضل من طريقة استعمال الماء المقطر فقط او مع تطبيق عملية ترسيب الـDNA وذلك من خلال زيادة تركيز الـDNA الى 1.345 و 1.421 مايكروغرام/مل و نقاوه 1.0 و 1.1 على التوالي مقارنة بـ 0.189 و 0.605 مايكروغرام/مل و 0.4 و 0.7 على التوالي. بالمقابل حققت العدة التجارية المقترنة بعملية ترسيب الـDNA التركيز والنقاوة الأعلى للـDNA المستخلص من النباتات المصابة نفسها، اذ كان التركيز 4 مايكروغرام/مل ونقاوه 1.6 (شكل 11 وجدول 7).



شكل (11): تركيز ونقاوة الـDNA المستخلص باستعمال الطريقة المبتكرة والعدة التجارية. (أ) الانبوبة في جهة اليمين تحتوي في قعرها (مؤشرة بسهم ذو لون ابيض) على الـDNA المستخلص من النبات المصابة باستعمال محلول هايبوكلوريت الصوديوم بينما الانبوبة في جهة اليسار (مؤشرة بسهم ذو لون ابيض) فتحتوي على الـDNA المستخلص باستعمال الماء المقطر. (ب) الترحيل الكهربائي للـDNA المستخلص باستعمال الطريقة المبتكرة في هذه الدراسة والعدة التجارية.

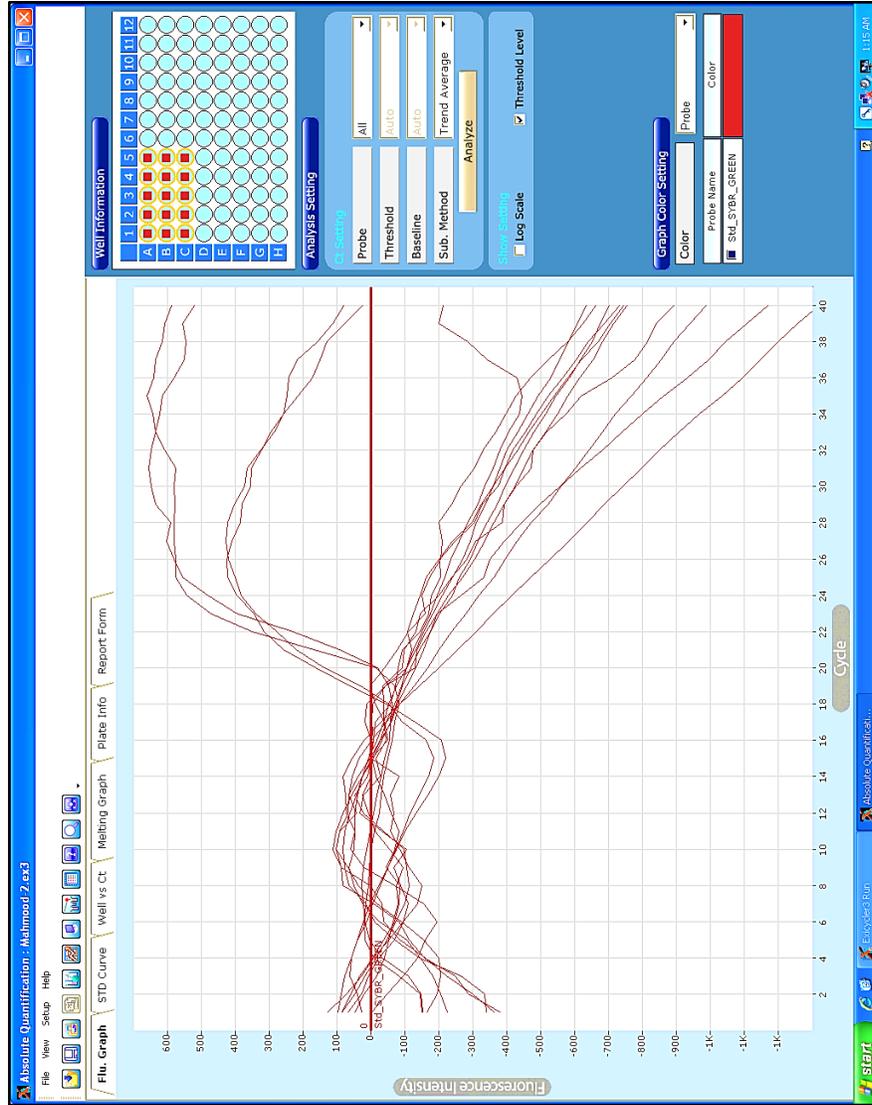
ان الحزمة رقم 1 هي للـDNA الذي تم استخلائه باستعمال محلول هايبوكلوريت الصوديوم والممر رقم

هي للـDNA المستخلص بالماء المقطر فقط بينما الحزمة 3 خاصة بالـDNA الذي تم استخلاصه بالماء المقطر مع اجراء عملية الترسيب والحزمة رقم 4 خاصة بالـDNA المستخلص بالعدة التجارية (شكل 11 و جدول 7). وهذه النتائج تتوافق مع نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل اللحظي (Realtime PCR) (شكل 12) التي اثبتت نجاح طرق الاستخلاص باستعمال محلول هايبوكلوريت الصوديوم فقط او مع اجراء عملية الترسيب وطريقة استعمال الماء المقطر المتبوعة باجراء عملية الترسيب اذ حققت هذه الطرق نتائج ايجابية باكتشاف الفايروس في دورات التضاعف (Ct) Cycle thresholds (21.08 و 19.75 و 18.91) على التوالي بينما لم يكتشف DNA طريقة استعمال الماء المقطر فقط مما يشير وبوضوح الى ان كمية ونوعية الـDNA المستخلص بهذه الطريقة لم يكن بالمستوى الملائمة للحصول على تضاعف وتحقيق نتائج ايجابية.

جدول (7): تأثير طريقة استخلاص الـDNA من النباتات المصابة في تركيزه ونقاوته

ت	طريقة الاستخلاص	التركيز (مايكروغرام/مل)	النقاوة (A260/A280)	Ct
1	العدة التجارية فقط	3.5	1.4	22.33
2	العدة التجارية + ترسيب الـDNA	4	1.6	*-
3	محلول هايبوكلوريت الصوديوم فقط	1.345	1.0	21.08
4	محلول هايبوكلوريت الصوديوم + ترسيب الـDNA	1.421	1.1	19.75
5	الماء المقطر فقط	0.189	0.4	**0
6	الماء المقطر + ترسيب الـDNA	0.605	0.7	18.91

* لم تستعمل في الاختبار
** عدم نجاح عملية التضاعف



شكل (12): التشخيص الجزيئي لفايروس TYLCV باستعمال جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل اللحظي ExicyclerTM 96 في عينات DNA المستخلصة بطرق مختلفة

وبالرغم من تحقيق العدة التجارية سوءً كانت مع تطبيق طريقة ترسيب DNA او بدونها النتائج الأفضل الا انها تطلبت وقت أطول (25 دقيقة تقريباً) وتكلفة اعلى (1.36 دولار امريكي للعينة الواحدة) بالإضافة الى تعدد خطواتها (9 خطوات) والتي تحتمل حصول الأخطاء التجريبية غير المقصودة مقارنة بالطريقة المبتكرة خصوصاً باستعمال محلول هايبوكلوريت الصوديوم التي امتازت بوقت اقل (8 دقائق للعينة) وعدد خطوات اقل (4 خطوات) وذلك لعدم وجود خطوة التنقية باستخدام مادتي الفينول والكلوروفورم التي تعتبر مواد خطيرة وسامة لذلك تعد هذه الطريقة غير مصحوبة بمخاطر صحية اثناء العمل او اثناء التخلص من النفايات السامة (Zhang وآخرون، 2010). ان هذا الانخفاض بالوقت كان مصحوبا بانخفاض التكلفة وبشكل كبير جدا (0.66 دولار علما ان تقدير التكلفة هذا كان بالاعتماد على اسعار الأدوات والمواد الكيميائية المستخدمة في الطريقة الجديدة والمتوفرة في السوق. علاوة على ذلك فان الكمية المطلوبة من النسج النباتي لإجراء عملية الاستخلاص تكون قليلة. اضع الى ذلك وكنتيجة لحذف عدة خطوات والتي قد

تتضمن اتصال سطحي بين الـDNA وبعض الادوات مثل الملاعق والهاون والمدقة فان امكانية تلوث الـDNA والذي قد يقود الى فشل عملية الـPCR قد انخفضت بشكل واضح (Manzanilla-Lopez واخرون، 2008 و Lahuf واخرون، 2019). بالإضافة الى هذه المزايا فإن هذه الطريقة لا تتطلب اجهزة خاصة مثل جهاز الطرد المركزي المبرد والتي قد لا تتواجد في بعض المختبرات. ان هذه الميزات يمكن ان تجعل هذه الطريقة ملائمة جدا لدراسة اعداد كبيرة من العينات النباتية المصابة اثناء دراسات المسح او الدراسات الوبائية او التنوع الاحيائي. وقد تكون هذه الطريقة قابلة للتطبيق في اكتشاف ليس فقط الفايروسات ذات جينوم الـDNA ولكن أيضاً في اكتشاف مسببات الأمراض النباتية مثل الفيتوبلازما والبكتيريا والفطريات في مختلف أنواع النباتات.

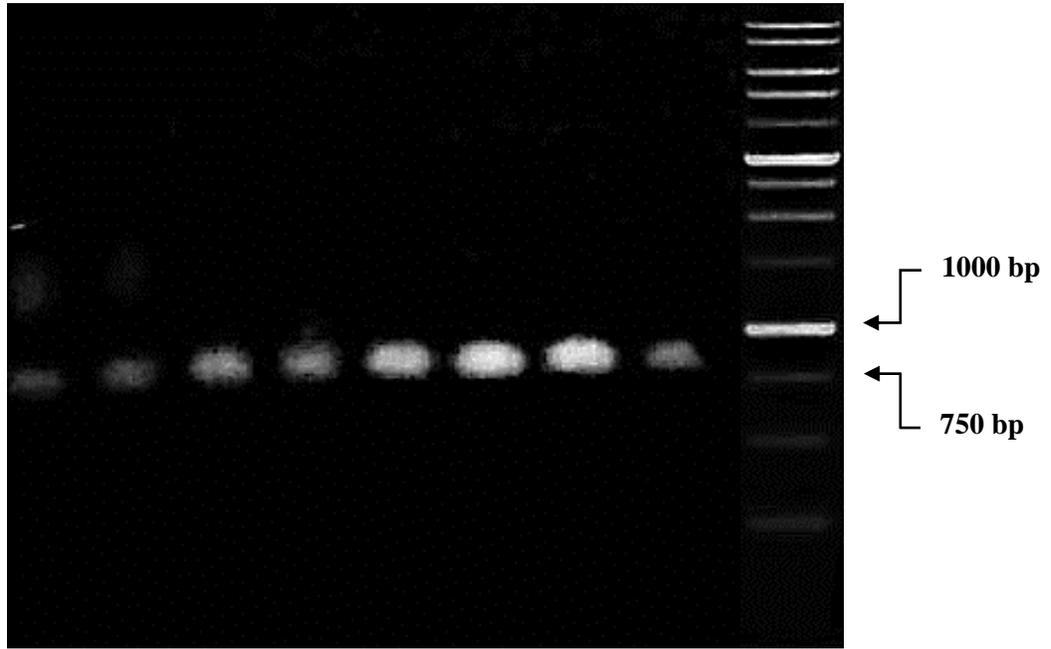
4-2: التشخيص الجزيئي لفايروسات *Begomoviruses*

4-2-1: التشخيص باستعمال تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل الـPCR

أظهرت نتائج اختبار العينات النباتية التي ظهرت عليها اعراض الإصابة بفايروسات الجنس *Begomovirus* انها مصابة فعلاً بانواع مختلفة من هذا الجنس وذلك عن طريق نجاح زوج البادئات PAR1c496-R و PBL1v2040-F في الارتباط وتضخيم مناطق محددة من الحامض النووي الخاص بانواع الجنس أعلاه (شكل 13) ويمكن الملاحظة وبشكل واضح ان نواتج التضخيم ليست بنفس الحجم مما قد يشير الى وجود اكثر من نوع في العينات المصابة وهذا معناه وجود إصابة معقدة أي حدوث الإصابة بنوعين او أكثر من فايروسات الجنس *Begomovirus*. بالمقابل لم تنجح بقية البادئات المستعملة في هذا الاختبار في اكتشاف الفايروسات المحددة على الرغم من شيوع استعمالها في تشخيص فايروسات هذا الجنس.

وقد يعود سبب ذلك الى حصول طفرات وراثية او ان الفايروسات المتواجدة في النباتات المصابة قيد الدراسة تعود الى سلالات او عزلات أخرى غير معروفة مسبقاً. أن هذا الطرح يتوافق مع النتائج التي تم الحصول عليها مسبقاً من قبل العديد من الباحثين والتي سجلوا فيها العديد من السلالات التابعة لنفس هذا الجنس الفايروسي في بلدان الشرق الأوسط مثل عمان والمملكة العربية السعودية وأيران بالإضافة الى بعض من دول حوض البحر الأبيض المتوسط (Idris واخرون، 2001 و Bananej واخرون، 2004 و Khan واخرون، 2008). كذلك وجد تباين واضح بين في تسلسل القواعد النايتروجينية للغلاف البروتيني لعدد من العزلات الفايروس TYLCV التي تمكن التميمي (2020) من عزلها وتشخيصها في نباتات الطماطة. كذلك لم يحصل الباحث العابدي (2021) أي نواتج تضخيم باستعمله ثلاثة بوادئ مختلفة

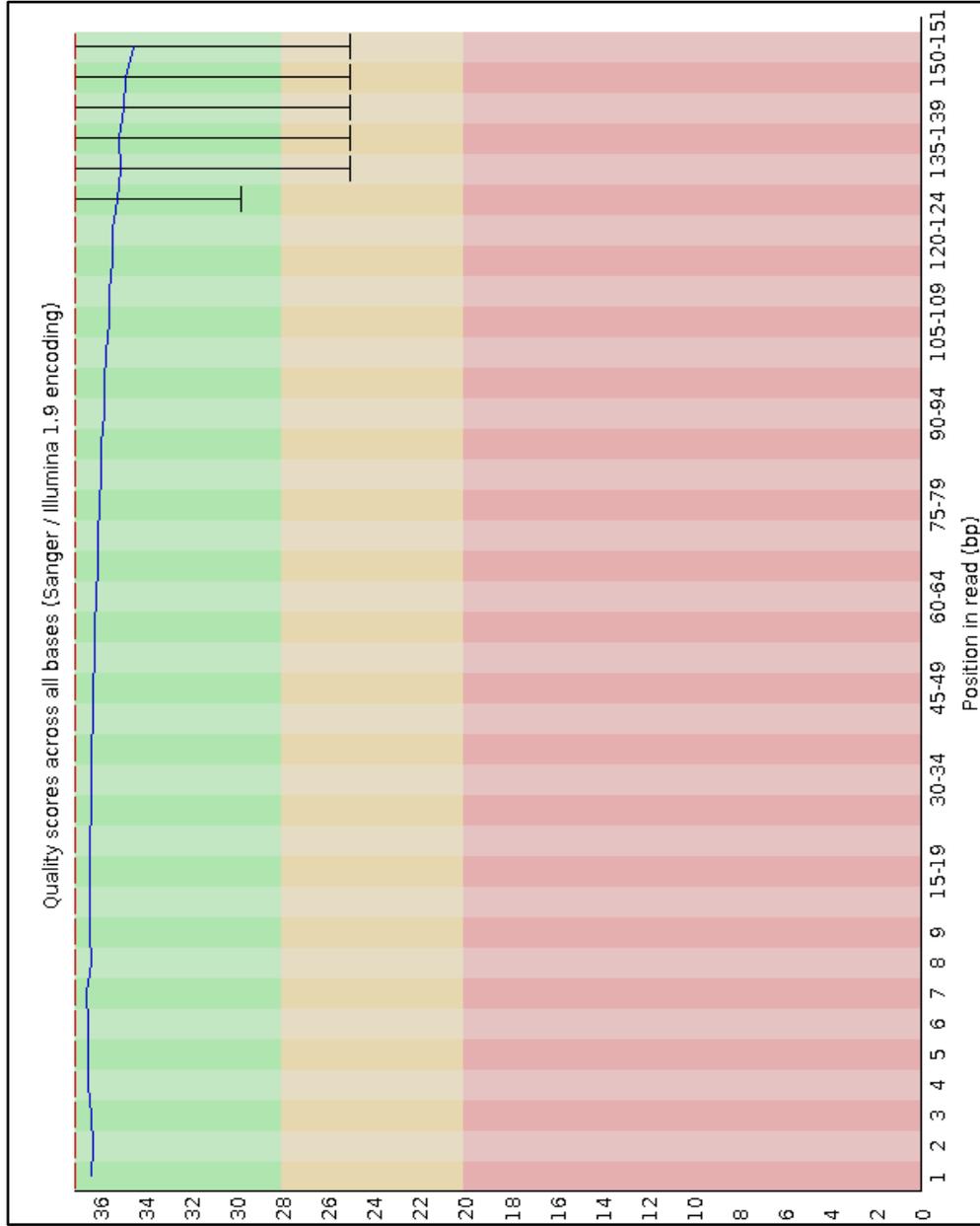
متخصصة في تشخيص ثلاثة سلالات من فايروس TYLCV وبالرغم من انه في نفس الدراسة تمكن من تحديد الجينوم الكامل لواحدة من هذه السلالات باستعمال تقنية الجيل التالي لتحديد التسلسل.



شكل (13):الترحيل الكهربائي لنواتج التضخيم باستعمال زوج البادئات PBL1v2040-F و PAR1c496-R لعدد من النباتات المصابة بعدد من انواع من الجنس *Begomovirus* (سَلْم الحمض النووي المستعمل بحجم 10000 قاعدة نايتروجينية)

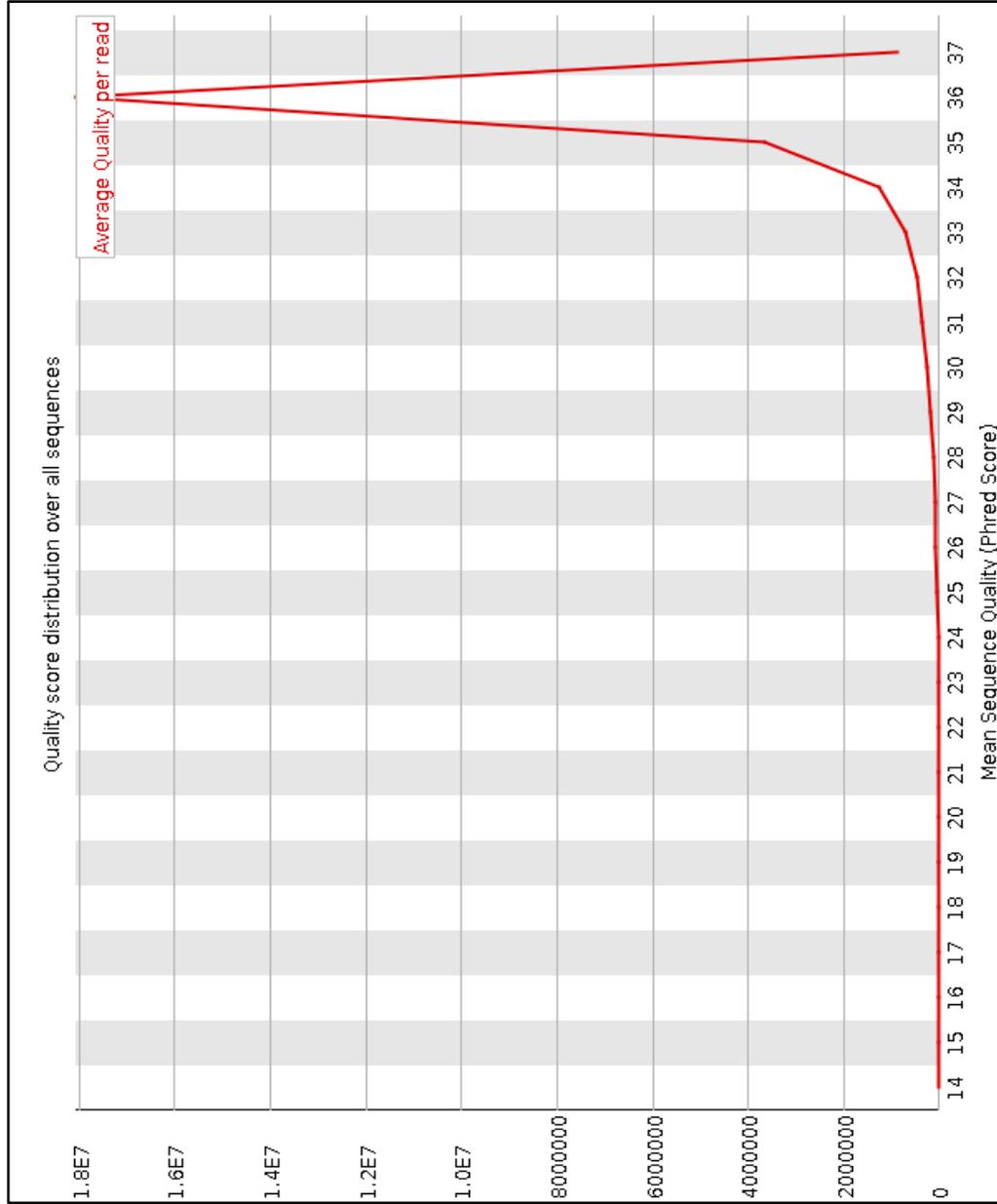
2-2-4: التشخيص باستعمال تقنية الجيل التالي لتحديد التسلسل Next Generation sequencing (NGS)

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها من شركة Macrogen, Inc ان عينات محصولي البطاطا والباميا لم تنجح في أتمام عملية تحديد التسلسل لهما بينما عينات محصول الطماطة نجحت اذ تم الحصول على 52,606,000 سلسلة مقروءات مزدوجة النهايات (Paired ends reads) بطوال 151 قاعدة نايتروجينية والتي تم إنشاؤها عن طريق تحديد تسلسل مكتبات الـ DNA للحصول على بيانات الـ Metagenomics. فحصت كفاءة وجودة المقروءات (Reads) التي تم الحصول عليها باستعمال برنامج FastQC (شكل 14). اذ تبين أن تسلسل جميع القواعد النايتروجينية في القراءات ذو جودة عالية وبمعدل بلغ 36 درجة بحسب مقياس جودة القراءات المعروف بـ Phred quality score الذي يعني مع هذا المعدل ان نسبة دقة التسلسل اكثر من 99.9% واحتمال وجود قاعدة نايتروجينية غير صحيحة ضمن تسلسل



شكل (14): جودة المقروءات بحسب مقياس Phred

المقروءات هو 1 في 10000 ومعدل الجودة هذا يعد ضمن المعدلات الموصى بها الذي يوصي بان يكون المعدل 30 فما فوق لاجراء عملية التحليل والدراسة للمقروءات (Ewing واخرون، 1998 و Korpelainen واخرون، 2015).



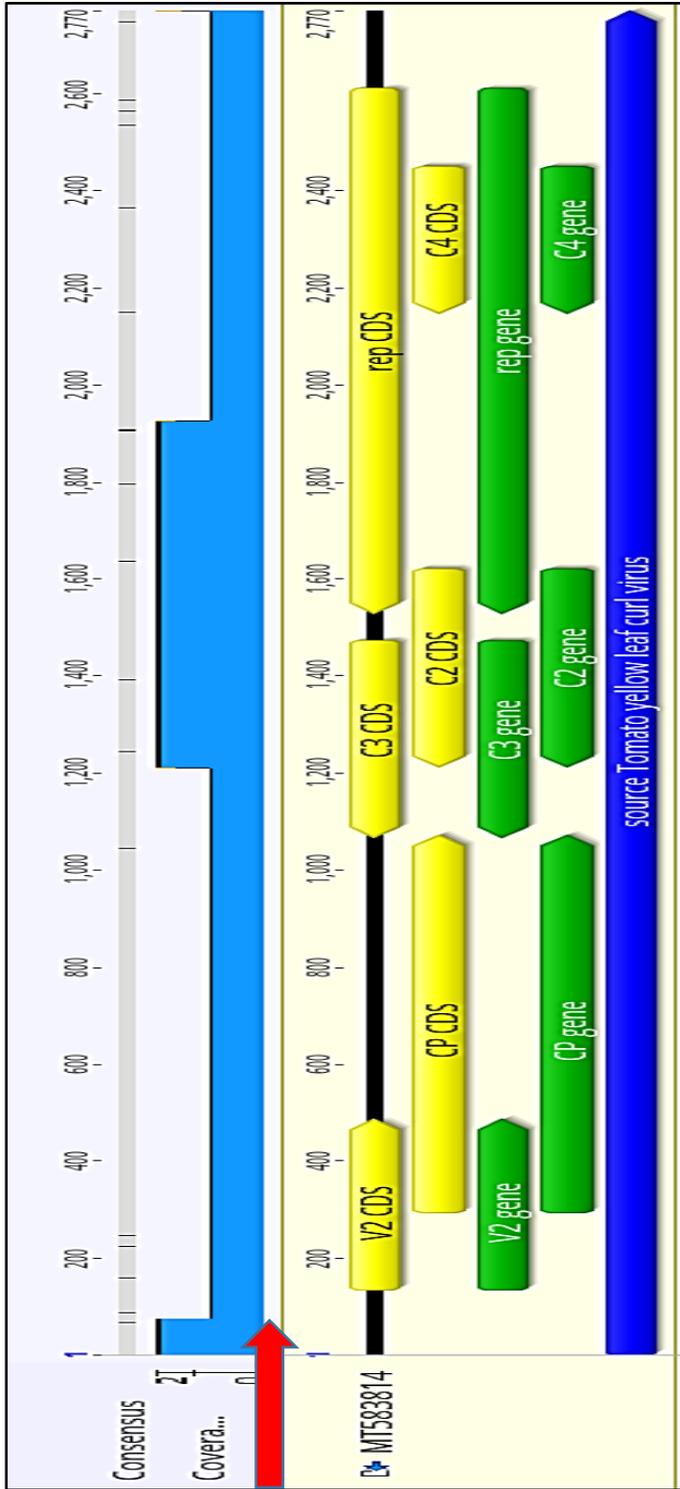
شكل (14): جودة المقروءات بحسب مقياس مقياس Phred quality score

بعد التأكد من جودة المقروءات أجريت عملية مقارنة وحذف للمقروءات الشبيهة بالكروموسومات الاثنى عشر لجينوم الطماطة اذ بلغ عدد القراءات المتبقية 6,623,029 مقروءة والتي جمعت اولاً بشكل متجاورات متداخلة (Contigs) باستعمال طريقة التجميع DeNovo assembly التي اعطتنا 321,760 متجاورة متداخلة (Contigs) التي أظهرت نتائج مقارنتها مع البيانات المخزنة في بنك الجينات GenBank باستعمال برنامج BLASTn أن هنالك نسبة 1.126% منها تتشابه مع العديد من الفايروسات النباتية والتي كان اغلبها من أنواع الجنس *Begomovirus* ولغرض زيادة مصداقية ودقة النتائج تم اعتماد المتجاورات المتداخلة ذات الحجم 500 قاعدة نايتروجينية فما فوق المشابهة لتسلسل الفايروس من اجل اعتباره مشخص

في هذه الدراسة اما بقية المتجاورات المتداخلة الأقل وان كانت مشابه لأحد تسلسلات الفايروسات فقد تم اهمالها. بعدها تم اجراء عملية التجميع بطريقة Reference assembly بالاعتماد على التسلسلات النموذجية (Reference genome) لجينوم الفايروسات المشخصة في عملية التجميع الأولى وفيما يلي وصف للفايروسات التي تم تشخيصها في عينات الطماطة المصابة:

1-2-2-4: التشخيص وتحديد الخصائص الجزيئية لفايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطة *Tomato* (TYLCV) *Yellow Leaf Curl Virus*

لقد أظهرت النتائج وجود العديد من المتجاورات المتداخلة (Contigs) المشابهة للتسلسل المرجعي للجينوم الكامل لفايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطة (TYLCV) اذ غطت تسلسلات الجينوم بأكمله وكان مجموع طول تسلسل هذه المتجاورات 2729 قاعدة نايتروجينية (شكل 15).



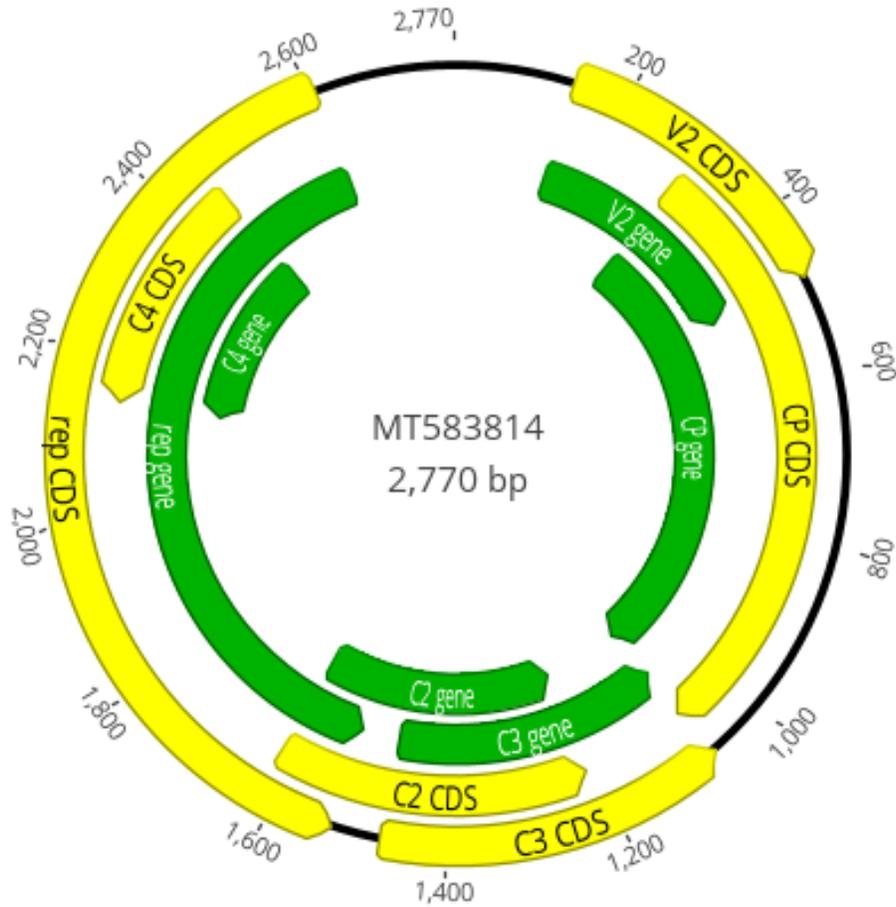
شكل (15): المتجاورات المتداخلة (محددة بالسهم الأحمر) المشابهة للجينوم المرجعي للفايروس TYLCV

كما انه يمتلك تنظيماً جينياً مطابقاً للغالبية العظمى من سلالات هذا الفايروس (شكل 16) وذلك باحتوائه على ستة جينات رئيسية مشفرة للبروتينات الست الرئيسية للفايروس وكما موضح في الجدول (8) بالإضافة الى المناطق ما بين الجينات (Intergenic region) غير المشفرة. وقد تم إيداع الجينوم الكامل لهذه السلالة في قاعدة بيانات NCBI-GenBank بالاسم *Tomato yellow leaf curl virus - Mild strain*

TYLCV-Mld Karbala-1 وتحت الرمز ON254272.1 (ملحق 1). جدير بالإشارة الى ان النتائج اشارت أيضا وبشكل واضح ان جينوم سلالة الفايروس المشخصة ذات شريط مفرد حلقي من الـDNA أحادي الجزء (Monopartite).

جدول (8):تنظيم جينوم سلالة 1-Karbala-Mild strain Tomato yellow leaf curl virus المشخصة في هذه الدراسة

الجين	البروتين	الموقع في الجينوم	رمز الإيداع في بنك الجينات
V2	Movement protein	452-102	UQS49423.1
V1	Coat protein	1038-262	UQS49424.1
C3	C3 protein	1439-1035	UQS49425.1
C2	C2 protein	1587-1180	UQS49426.1
C1	Replicase protein	2575-1496	UQS49427.1
C4	C4 protein	2418-2116	UQS49428.1



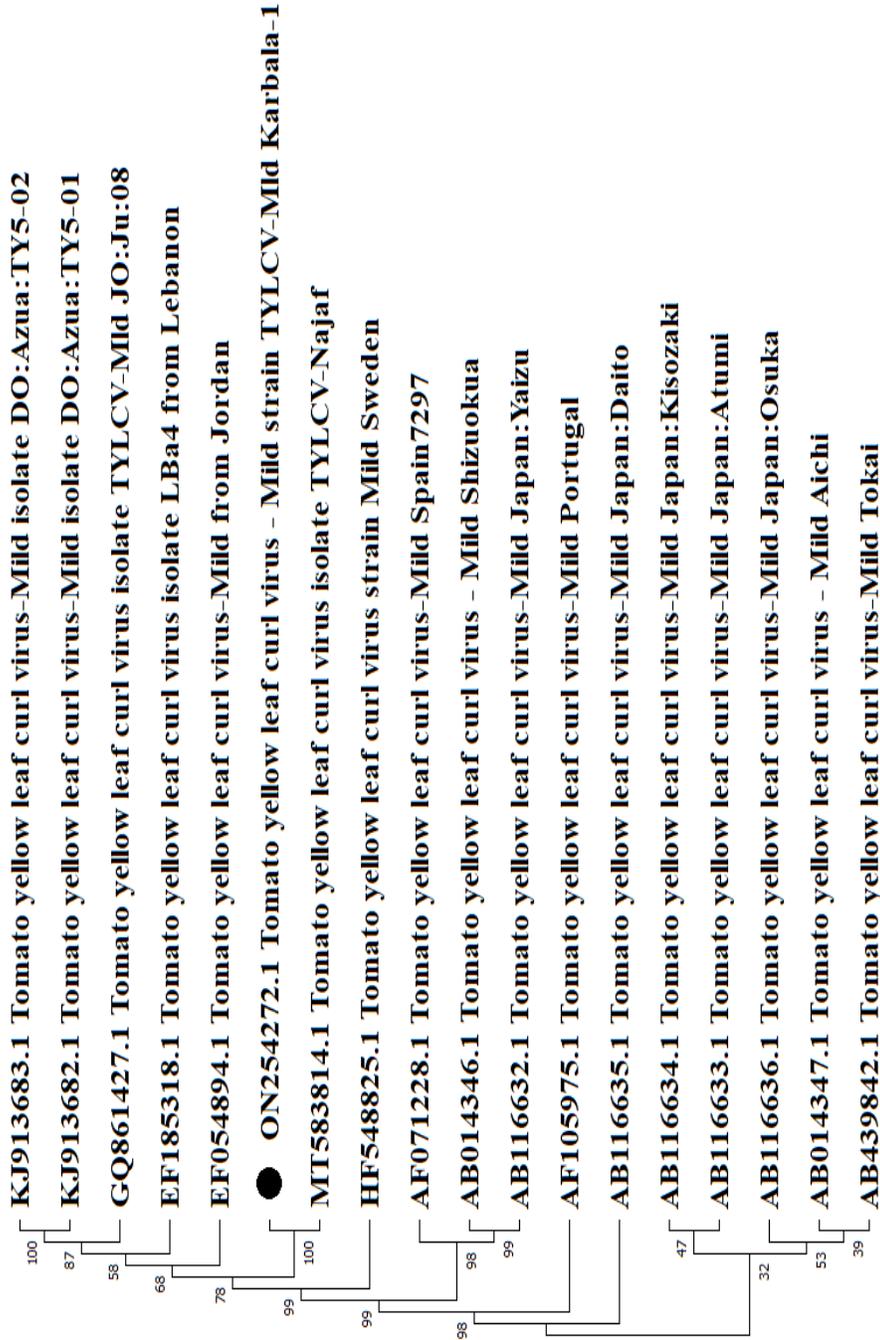
شكل (16): خريطة الجينوم الانموزجية للفايروس TYLCV. اللون الأخضر يمثل مواقع الجينات بينما اللون الأصفر يمثل البروتينات التي تشفر لها هذه الجينات.

ولقد قد تم تأكيد هذه النتيجة عن طريق تحليل النشوء والتطور (Phylogenetic analysis) الذي أثبت العلاقة الوراثية الواضحة بين التسلسل الموحد لجميع المتجاورات المتداخلة المشابهة لهذا الفايروس مع العديد من سلالات الفايروس نفسه خصوصاً السلالات المعتدلة (Mild) وبنسبة تشابهه من 95 فما فوق وكانت العزلة *Tomato yellow leaf curl virus isolate TYLCV-Najaf* (MT583814.1) الأكثر تشابهه بنسبه وصلت الى 99.30% (جدول 9 وشكل 17). بينما كانت تشترك بنفس الأصل مع السلالات الأردنية (EF054894.1 و GQ861427.1) واللبنانية (EF185318.1).

جدول (9): تحليل التشابه بين تسلسل جينوم السلالة العراقية للفايروس TYLCV-Mld Karbala- 1 مع تسلسلات جينومات نفس الفايروس والسلالة في جميع أنحاء العالم

رمز السلالة	نسبة التشابه (%)	تغطية التسلسل (%)	مجموع درجات التشابه	اسم السلالة
ON254272.1	-	-	-	<i>Tomato yellow leaf curl virus - Mild strain TYLCV-Mld Karbala-1, complete genome</i>
MT583814.1	99.30	100	4935	<i>Tomato yellow leaf curl virus isolate TYLCV-Najaf, complete genome</i>
AB116635.1	95.83	93	4141	<i>Tomato yellow leaf curl virus-Mild [Japan:Daito] DNA, complete genome</i>
AB116634.1	95.83	93	4141	<i>Tomato yellow leaf curl virus-Mild [Japan:Kisozaki] DNA, complete genome</i>
AB116636.1	95.79	93	4135	<i>Tomato yellow leaf curl virus-Mild [Japan:Osuka] DNA, complete genome</i>
AB014347.1	95.79	93	4135	<i>Tomato yellow leaf curl virus - Mild[Aichi] genomic DNA, complete sequence</i>
GQ861427.1	95.77	94	4152	<i>Tomato yellow leaf curl virus isolate TYLCV-Mld[JO:Ju:08], complete genome</i>
AB014346.1	95.73	94	4146	<i>Tomato yellow leaf curl virus - Mild[Shizuokua] genomic DNA, complete sequence</i>
EF185318.1	95.73	94	4145	<i>Tomato yellow leaf curl virus isolate LBa4 from Lebanon, complete genome</i>
AB116633.1	95.63	93	4113	<i>Tomato yellow leaf curl virus-Mild [Japan:Atumi] DNA, complete genome</i>
AB116632.1	95.61	100	4130	<i>Tomato yellow leaf curl virus-Mild [Japan:Yaizu] DNA, complete genome</i>
AF105975.1	95.44	100	4355	<i>Tomato yellow leaf curl virus-Mild[Portugal], complete genome</i>
AB439842.1	95.31	99	4316	<i>Tomato yellow leaf curl virus-Mild[Tokai] DNA, complete genome</i>

KJ913683.1	95.25	100	4327	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> - Mild isolate DO:Azua:TY5-02:2011, complete genome
KJ913682.1	95.18	99	4314	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> - Mild isolate DO:Azua:TY5-01:2011, complete genome
AF071228.1	95.18	99	4313	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> -Mild[Spain7297], complete genome
HF548825.1	95.08	99	4305	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> strain Mild[Sweden-Imported-02-09], complete genome
EF054894.1	95.07	100	4300	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> -Mild from Jordan, complete genome



شكل (17): العلاقة الوراثية بين تسلسل فايروس TYLCV-Mld Karbala-1 (المحدد بنقطة سوداء) والسلاسل العالمية الأخرى التابعة للفايروس نفسه

أن نتيجة التشابه العالية هذه تتوافق مع نتائج الفحص والتحليل عن وجود ظاهرتي إعادة التركيب (Recombination) وإعادة التجميع (Reassortment) اللذان لم يتم الكشف عنهما في جينوم فايروس TYLCV-Mld Karbala-1 المشخص في هذه الدراسة إذ كانت تشابه تسلسل القواعد النايتروجينية والاحماض الامينية للجينات الست عالية جدا تصل الى 99% خصوصاً مع سلالة TYLCV-Najaf.

أن المعروف عن سلالة *Tomato yellow leaf curl virus-Mild* انها تسبب اعراض مرضية معتدلة على النبات الذي تصيبه لذلك سميت بالسلالة المعتدلة (Mild strain) وهذا ما تم ملاحظته من قبل العابدي (2021) مع عزلة TYLCV-Najaf التي شخّصت في محافظة النجف الاشراف بكونها تسبب اعراض مرضية خفيفة الا ان السلالة التي شخّصت في هذه الدراسة سببت اعراض مرضية شديدة على النباتات الطماطة المصابة (شكل 18).

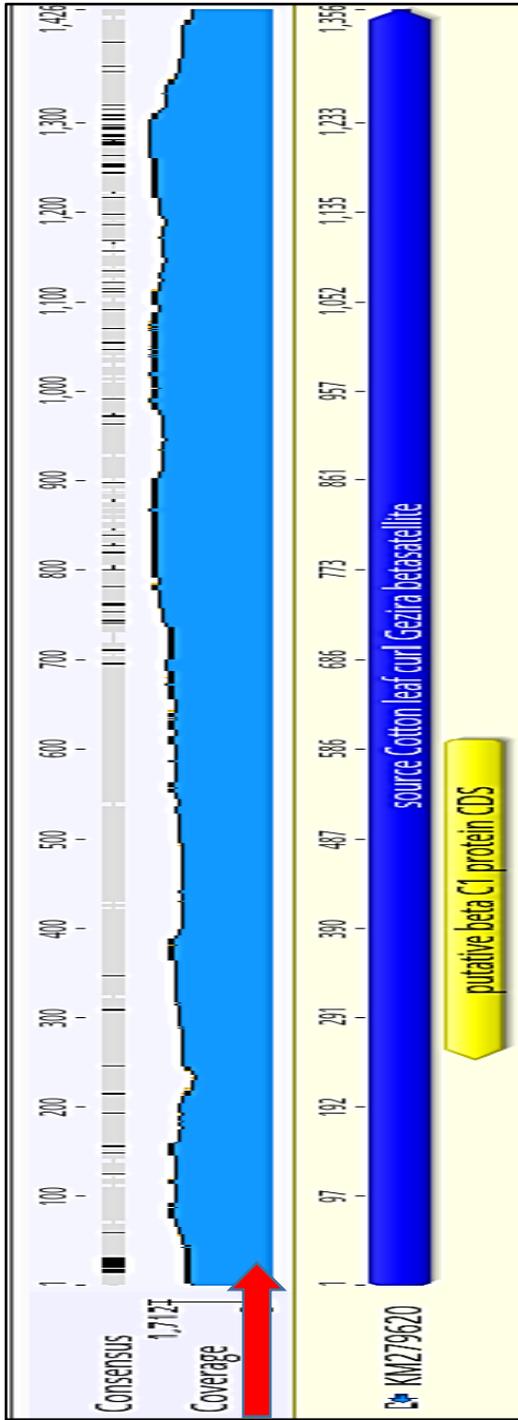


شكل (18): الاعراض المرضية المرافقة للإصابة بسلالة الفايروس TYLCV-Mild Karbala-1 على محصول الطماطة في محافظة كربلاء/ العراق. (ألتقطت من قبل الباحث)

أن هذا التناقض جعلنا ن فكر بالتحري عن امكانية تواجد سلالات أخرى تابعة لنفس الفايروس ربما تكون هي السبب في احداث هذه الاعراض المرضية. لذلك تمت إعادة عملية تحليل التشابه باستعمال الجينوم المرجعي للعديد من السلالات التابعة لهذا الفايروس مثل TYLCV-Israel و TYLCV-Sardinia و TYLCV-Sicilia. واطهرت النتائج عدم وجود أي من هذه السلالات في العينات النباتية قيد الدراسة وهذا بطبيعة الحالة يشير الى سيادة السلالة المعتدلة TYLCV-Mild في مزارع الطماطة التي شملتها الدراسة في محافظة كربلاء.

1-1-2-2-4: التشخيص وتحديد الخصائص الجزيئية للتابع *Cotton leaf curl Gezira betasatellite isolate Karbala*

اعيدت عملية تحليل التشابه باستعمال الجينوم المرجعي للعديد من التوابع المعروفة بمرافقتها لانواع فايروسات الجنس *Begomovirus* والتي شملت التابع بيتا (Betasatellite) و التابع ألفا (Alphasatellite) والتابع دلتا (Deltasatellite). اذ أظهرت النتائج بعدم وجود مقروءات او متجاورات متداخلة شبيهه للتابعين ألفا و دلتا بينما كان هنالك 12,712 مقروءة و9 متجاورات غطت بشكل تام (100%) الجينوم الكامل أحد توابع بيتا (β satDNA) وهو *Cotton leaf curl Gezira betasatellite isolate* (KM279620.1) Al-Ain وبنسبة تشابه 94.66% (شكل 19).



شكل (19): المتجاورات المتداخلة (محددة بالسهم الأحمر) المشابهة للجينوم المرجعي للتابع *Cotton leaf curl* المرافق المرافق لسلسلة الفايروس 1-Karbala-1. TYLCV-Mld

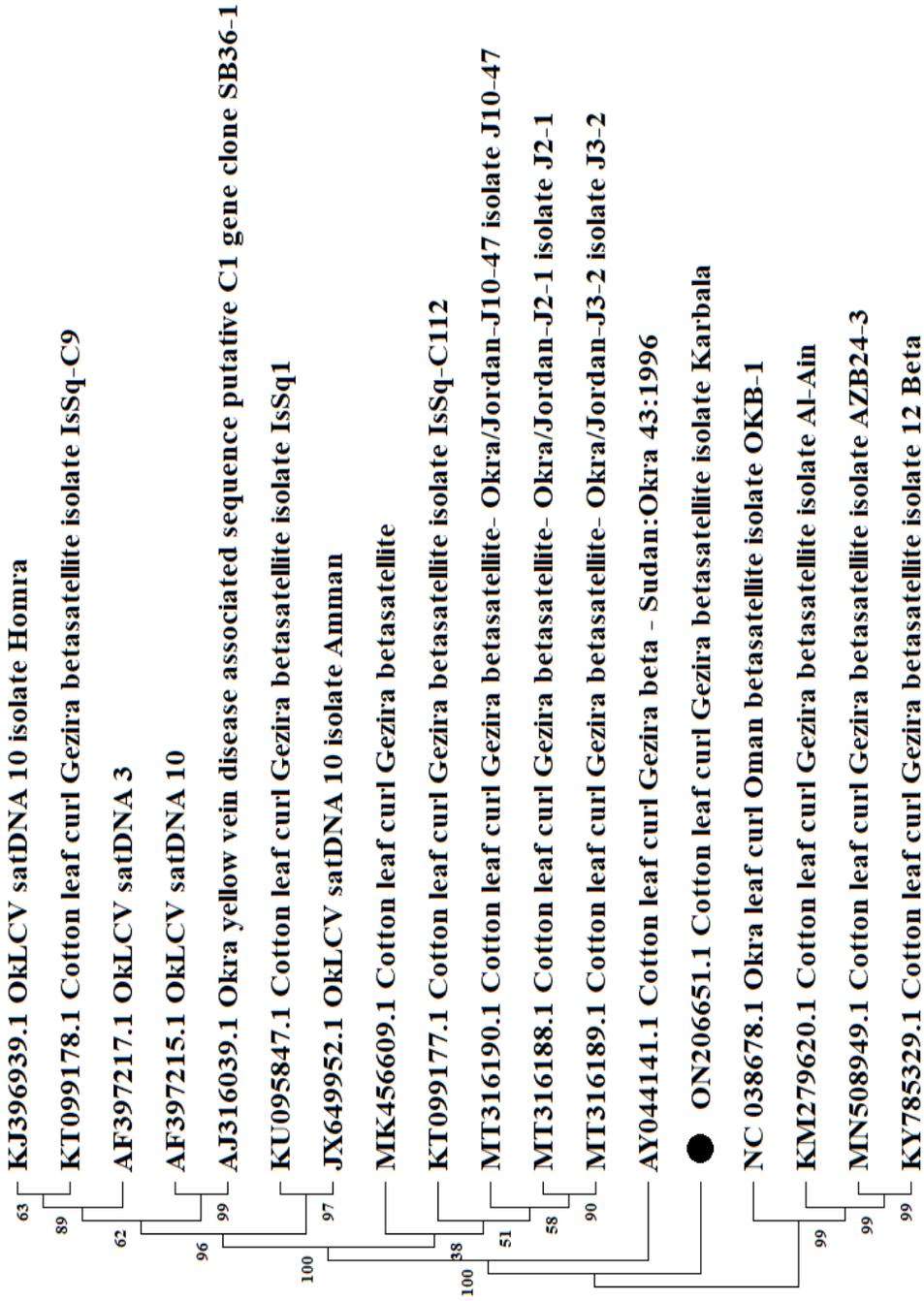
لغرض تأكيد هذه النتائج أجريت عملية تحليل النشوء والتطور بمقارنة التسلسل الموحد للجينوم الكامل لهذا التابع المشخص مع العديد من سلالات التابع بيتا اذ أوضحت النتائج وجود قرابة وراثية وبنسب تشابه من 90% فما فوق مع العديد من التوابع بيتا المشخصة في الأردن (MT316188.1 و MT316190.1) والسعودية (MN508949.1) والامارات (KM279620.1) وعمان (NC_038678.1). لذلك حفظ

الجينوم الكامل لهذا التابع في مستوع NCBI-GenBank بالاسم *Cotton leaf curl Gezira* betasatellite isolate Karbala وتحت الرمز ON206651.1 (جدول 10 و شكل 20 و ملحق 2).

جدول (10): تحليل التشابه بين تسلسل الجينوم الكامل للتابع *Cotton leaf curl Gezira* betasatellite isolate Karbala مع تسلسلات جينومات نفس التابع العالمية

اسم التابع	مجموع درجات التشابه	تغطية التسلسل (%)	نسبة التشابه (%)	رمز التابع
<i>Cotton leaf curl Gezira</i> betasatellite isolate Karbala, complete sequence	-	-	-	ON206651.1
<i>Cotton leaf curl Gezira</i> betasatellite isolate Al-Ain, complete sequence	2060	97	94.66	KM279620.1
<i>Okra leaf curl Oman</i> betasatellite isolate OKB-1, complete sequence	2041	100	93.83	NC_038678.1
<i>Cotton leaf curl Gezira</i> betasatellite isolate AZB24-3, complete genome	2023	97	94.15	MN508949.1
<i>Cotton leaf curl Gezira</i> betasatellite-[Okra/Jordan-J2-1] isolate J2-1,	1653	88	92.37	MT316188.1
<i>Cotton leaf curl Gezira</i> betasatellite-[Okra/Jordan-J10-47] isolate J10-47	1646	88	92.28	MT316190.1
OkLCV satDNA 10, complete sequence	1644	85	92.27	AF397215.1
<i>Cotton leaf curl Gezira</i> betasatellite-[Okra/Jordan-J3-2] isolate J3-2	1631	88	92.03	MT316189.1
<i>Cotton leaf curl Gezira</i> betasatellite isolate IsSq1,	1631	88	92.16	KU095847.1
<i>Okra yellow vein</i> disease associated sequence putative C1 gene, clone SB36-1	1618	85	91.87	AJ316039.1
OkLCV satDNA 10 isolate Homra	1539	88	90.46	KJ396939.1
<i>Cotton leaf curl Gezira</i> betasatellite isolate IsSq-C112	1528	88	90.43	KT099177.1
OkLCV satDNA 10 isolate Amman	1526	88	91.76	JX649952.1
<i>Cotton leaf curl Gezira</i> betasatellite	1504	89	89.87	MK456609.1

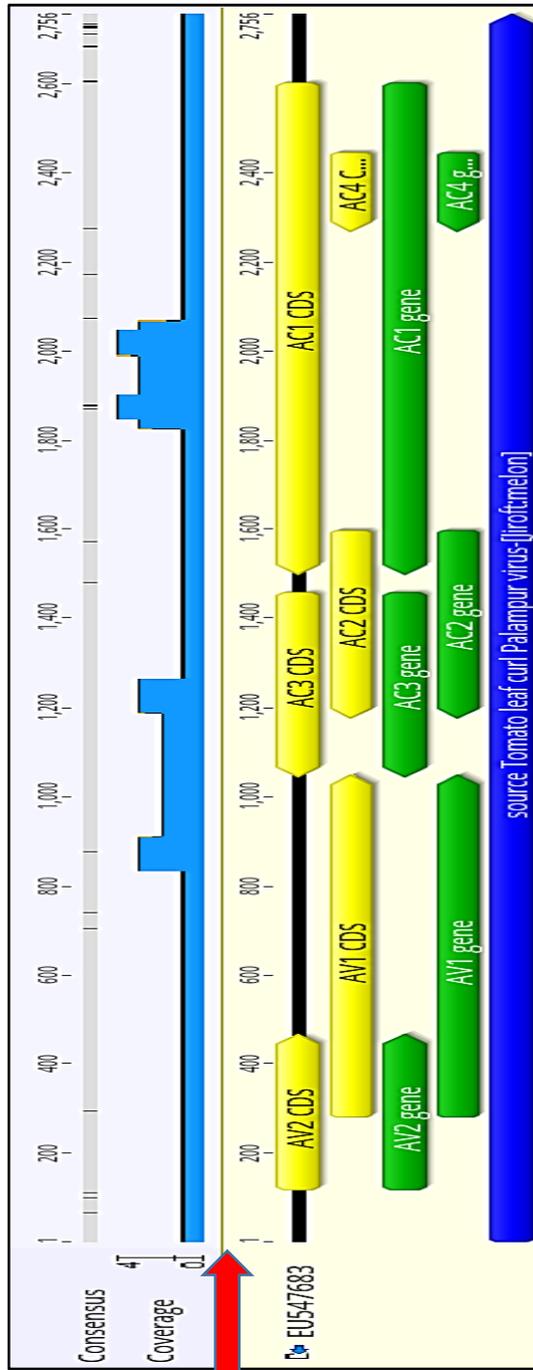
KY785329.1	89.14	86	1467	<i>Cotton leaf curl Gezira</i> betasatellite isolate 12_Beta, complete sequence
KT099178.1	91.15	88	1223	<i>Cotton leaf curl Gezira</i> betasatellite isolate IsSq-C9, complete sequence
AF397217.1	91.05	85	1219	OkLCV satDNA 3, complete sequence
AY044141.1	91.79	86	1134	<i>Cotton leaf curl Gezira</i> beta - [Sudan:Okra 43:1996]



شكل (20): العلاقة الوراثية بين التابع Karbala Cotton leaf curl Gezira betasatellite isolate (المحدد بنقطة سوداء) مع التتابع المناظرة العالمية.

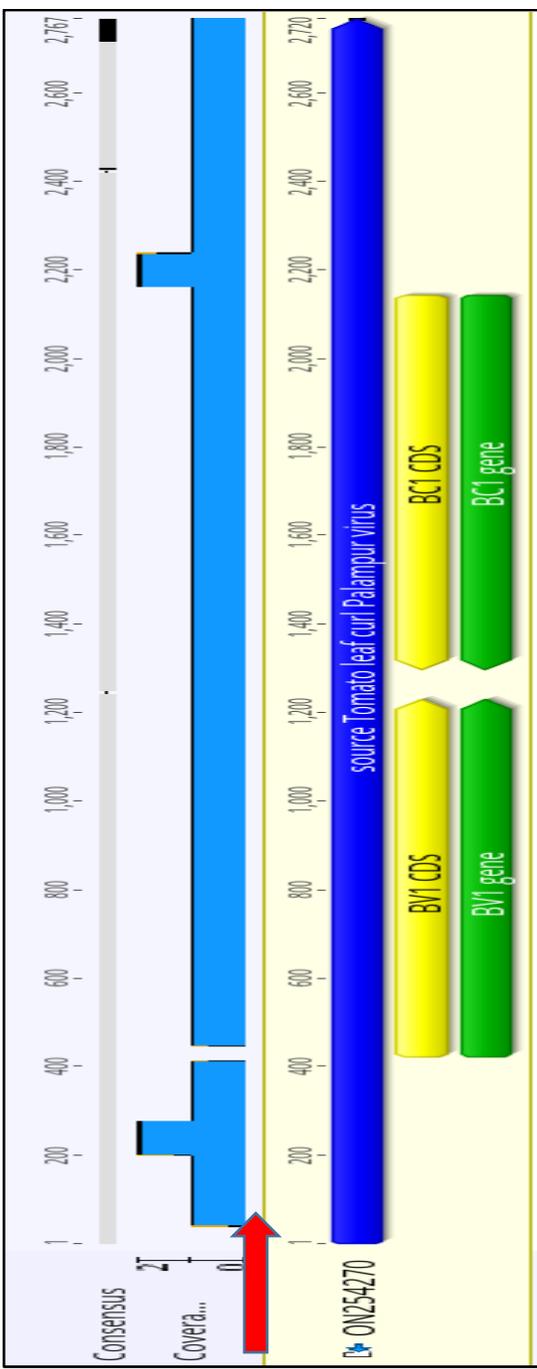
4-2-2-2: التشخيص وتحديد الخصائص الجزيئية للفايروس *Tomato Leaf Curl Palampur (ToLCPaLV) Virus*

لقد بينت النتائج ان هنالك العديد من المتجاورات المتداخلة التي تتشابه مع القطعتين الأولى والثانية (Segment A و Segment B) من جينوم الفايروس ToLCPaLV باعتباره ذو جينوم ثنائي الأجزاء (Bipartite). كما لوحظ ان هذه المتجاورات تمتلك تنظيماً جينياً مطابقاً لجينوم هذا الفايروس اذ احتوت القطعة الأولى (Segment A) على ستة جينات رئيسية مشفرة لبروتينات ستة رئيسية للفايروس بينما تضمنت القطعة الثانية (Segment B) جينين فقط تشفران لبروتينين (الشكل 21 و 22 و جدول 11) بالإضافة الى احتواء القطعتين على مناطق غير مشفرة ما بين الجينات (Intergenic region).



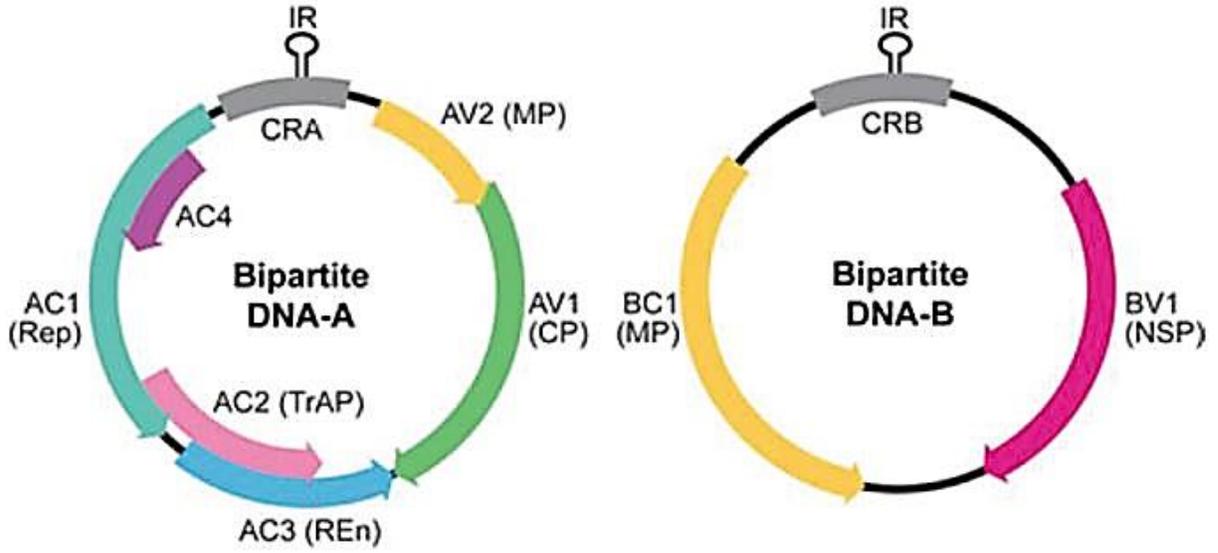
شكل (21): المتجاورات المتداخلة (محددة بالاسهم ذات اللون الاحمر) المشابهة للقطعة الأولى (A) والقطعة الثانية (B) من جينوم الفايروس ToLCPaLV

A



شكل (21): المتجاورات المتداخلة (محددة بالاسهم ذات اللون الاحمر) المشابهة للقطعة الأول (A) والقطعة الثانية (B) من جينوم الفايروس ToLCPaLV

B



شكل (22): خريطة الجينوم النموذجية ثنائية الأجزاء (Bipartite) للفايروس ToLCPaLV

جدول (11): التنظيم الجينومي للقطعتي فايروس ToLCPaLV المشخصة في هذه الدراسة

القطعة الأولى Segment A			
رمز الإيداع في بنك الجينات	الموقع في الجينوم	البروتين	الجين
UQS49417.1	467-120	Precoat protein	AV2
UQS49418.1	1050-280	Coat protein	AV1
UQS49419.1	1457-1047	Replication enhancer protein	AC3
UQS49420.1	1596-1177	AC2 protein	AC2
UQS49421.1	2602-1499	Replication associated protein	AC1
UQS49422.1	2445-2269	AC4 protein	AC4
القطعة الأولى Segment B			
UQS49415.1	1231-425	Nuclear shuttle protein	BV1
UQS49416.1	2143-1298	Movement protein	BC1

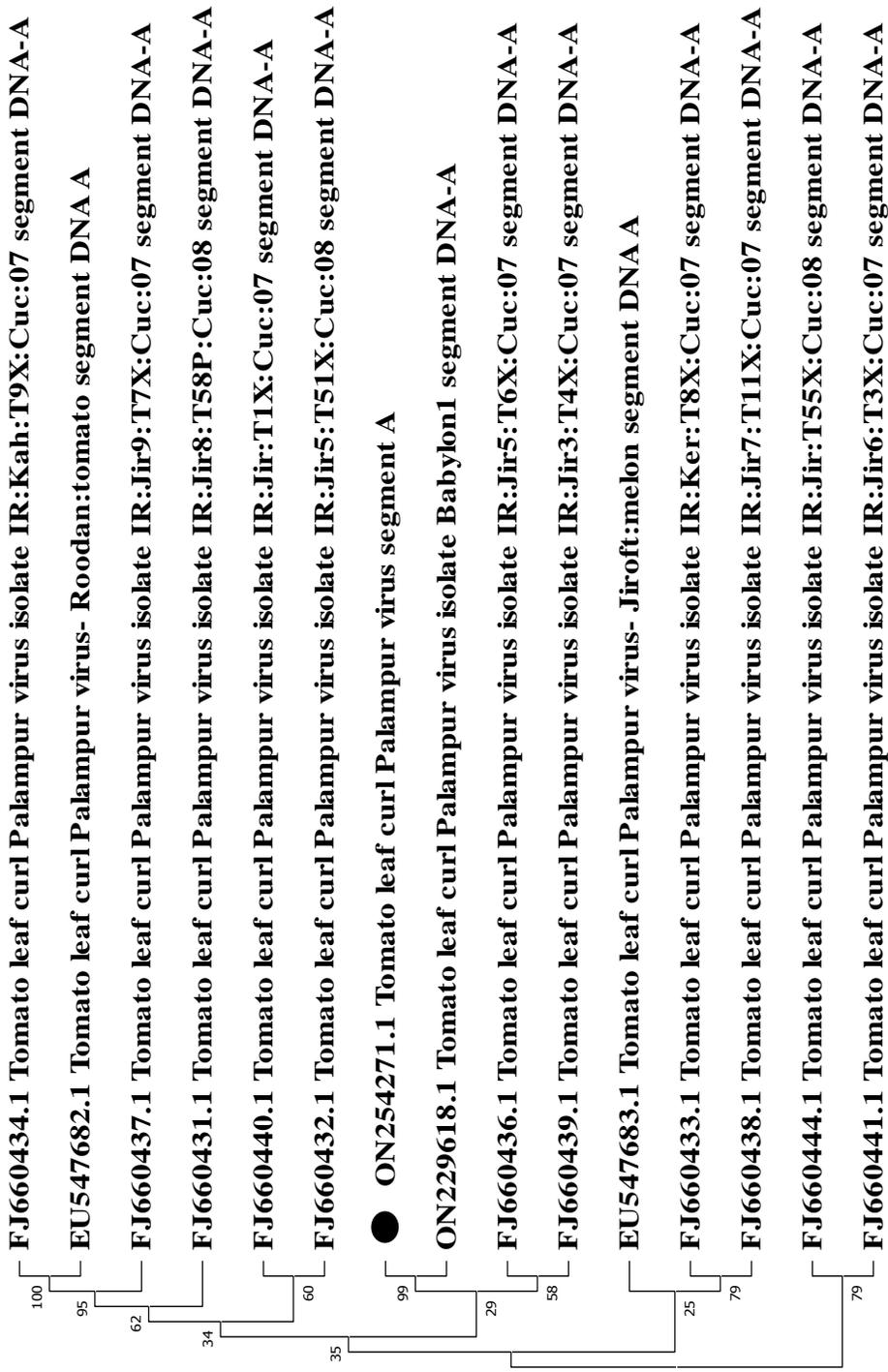
وقد تم إيداع الجينوم الكامل لهاتين القطعتين ضمن قاعدة بيانات NCBI-GenBank بالاسمين *Tomato leaf curl Palampur virus* و *Tomato leaf curl Palampur virus segment A* و *Tomato leaf curl Palampur virus segment B* وتحت الرمزين ON254270.1 و ON254271.1 على التوالي (ملحق 3). ولغرض تأكيد

هذا التشخيص تم تحليل النشوء والتطور لهاتين القطعتين من جينوم فايروس ToLCPaLV عن طريق بناء الشجرة الوراثية التي أثبتت القرابة الوراثية بين التسلسل الموحد لجميع المتجاورات المتداخلة المشابهة لقطعتي هذا الفايروس والتي كانت باطوال 2756 و 2720 قاعدة نايتروجينية على التوالي مع عزلات وسلالات عالمية مناظرة لهما. إذ كان هنالك العديد من السلالات العالمية ذات نسبة تشابه زادت عن 98% مع تسلسل القطعة A مثل السلالات ذات الرموز FJ660436.1 و EU547683.1 بالإضافة الى السلالة المحلية ON229618.1 المعزولة من نبات الخيار في محافظة بابل والتي كانت الأقرب لها وراثيا (جدول 12 و شكل 23). وأيضا كانت هنالك نسبة تشابه زادت عن 95% بين تسلسل القطعة B مع عدد من السلالات المناظرة والاقرب كانت السلالة المحلية أيضا بنسبة تشابه بلغت 97.50% (جدول 13 و شكل 24).

جدول (12): تحليل نسبة التشابه بين القطعة الأولى (Segment A) من فايروس ToLCPaLV المعزولة في هذه الدراسة مع تسلسلات جينوم نفس القطعة التابعة للعديد من السلالات العالمية

رمز السلالة	نسبة التشابه (%)	تغطية التسلسل (%)	مجموع درجات التشابه	اسم النوع
ON254271.1	-	-	-	<i>Tomato leaf curl Palampur virus</i> segment A,
FJ660436.1	98.66	100	4916	<i>Tomato leaf curl Palampur virus</i> isolate IR:Jir5:T6X:Cuc:07 segment DNA-A,
EU547683.1	98.66	100	4916	<i>Tomato leaf curl Palampur virus</i> -[Jiroft:melon] segment DNA A
FJ660439.1	98.62	100	4911	<i>Tomato leaf curl Palampur virus</i> isolate IR:Jir3:T4X:Cuc:07 segment DNA-A,
FJ660433.1	98.62	100	4911	<i>Tomato leaf curl Palampur virus</i> isolate IR:Ker:T8X:Cuc:07 segment DNA-A,
ON229618.1	98.58	100	4905	<i>Tomato leaf curl Palampur virus</i> isolate Babylon1 segment DNA-A
FJ660444.1	98.55	100	4900	<i>Tomato leaf curl Palampur virus</i> isolate IR:Jir:T55X:Cuc:08 segment DNA-A
FJ660440.1	98.55	100	4900	<i>Tomato leaf curl Palampur virus</i> isolate IR:Jir:T1X:Cuc:07 segment DNA-A

FJ660438.1	98.51	100	4894	<i>Tomato leaf curl Palampur virus</i> isolate IR:Jir7:T11X:Cuc:07 segment DNA-A
FJ660432.1	98.48	100	4889	<i>Tomato leaf curl Palampur virus</i> isolate IR:Jir5:T51X:Cuc:08 segment DNA-A
FJ660431.1	98.48	100	4889	<i>Tomato leaf curl Palampur virus</i> isolate IR:Jir8:T58P:Cuc:08 segment DNA-A
FJ660441.1	98.44	100	4883	<i>Tomato leaf curl Palampur virus</i> isolate IR:Jir6:T3X:Cuc:07 segment DNA-A
FJ660437.1	98.22	100	4850	<i>Tomato leaf curl Palampur virus</i> isolate IR:Jir9:T7X:Cuc:07 segment DNA-A
FJ660434.1	98.22	100	4850	<i>Tomato leaf curl Palampur virus</i> isolate IR:Kah:T9X:Cuc:07 segment DNA-A
EU547682.1	98.15	100	4839	<i>Tomato leaf curl Palampur virus</i> -[Roodan:tomato] segment DNA A

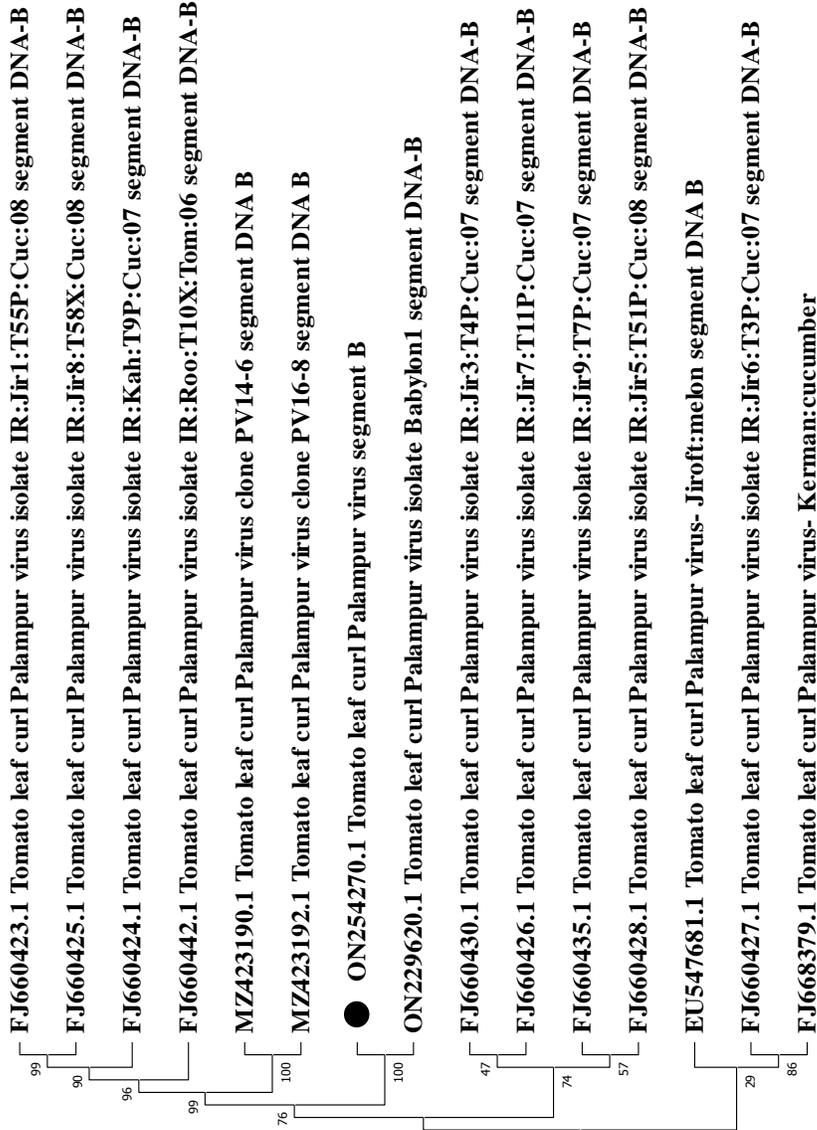


شكل (23): العلاقة الوراثية بين سلالة القطعة الأولى (Segment A) من فايروس ToLCPaLV المحلية المرافقة لنباتات الطماطة المصابة (المشار إليه بنقطة سوداء) والسلالات العالمية الأخرى التابعة للفايروس نفسه

جدول (13): تحليل نسبة التشابه بين القطعة الأولى (Segment B) من فايروس ToLCPaLV المعزولة في هذه الدراسة مع تسلسلات جينوم نفس القطعة التابعة للعديد من السلالات العالمية

رمز السلالة	نسبة التشابه (%)	تغطية التسلسل (%)	مجموع درجات التشابه	اسم النوع
ON254270.1	-	-	-	<i>Tomato leaf curl Palampur virus</i> segment B
ON229620.1	97.50	100	4645	<i>Tomato leaf curl Palampur virus</i> isolate Babylon1 segment DNA-B
FJ660430.1	97.28	100	4612	<i>Tomato leaf curl Palampur virus</i> isolate IR:Jir3:T4P:Cuc:07 segment DNA-B
FJ660426.1	97.24	100	4606	<i>Tomato leaf curl Palampur virus</i> isolate IR:Jir7:T11P:Cuc:07 segment DNA-B
FJ660435.1	97.17	100	4597	<i>Tomato leaf curl Palampur virus</i> isolate IR:Jir9:T7P:Cuc:07 segment DNA-B
FJ660427.1	97.17	100	4595	<i>Tomato leaf curl Palampur virus</i> isolate IR:Jir6:T3P:Cuc:07 segment DNA-B
FJ660428.1	97.02	100	4575	<i>Tomato leaf curl Palampur virus</i> isolate IR:Jir5:T51P:Cuc:08 segment DNA-B
FJ668379.1	96.95	100	4562	<i>Tomato leaf curl Palampur virus</i> -[Kerman:cucumber]
EU547681.1	96.29	100	4464	<i>Tomato leaf curl Palampur virus</i> -[Jiroft:melon] segment DNA B
MZ423190.1	95.92	100	4407	<i>Tomato leaf curl Palampur virus</i> clone PV14-6 segment DNA B
FJ660442.1	95.70	100	4375	<i>Tomato leaf curl Palampur virus</i> isolate IR:Roo:T10X:Tom:06 segment DNA-B
FJ660423.1	95.70	100	4375	<i>Tomato leaf curl Palampur virus</i> isolate IR:Jir1:T55P:Cuc:08 segment DNA-B
FJ660424.1	95.55	100	4351	<i>Tomato leaf curl Palampur virus</i> isolate IR:Kah:T9P:Cuc:07 segment DNA-B
FJ660425.1	95.37	100	4324	<i>Tomato leaf curl Palampur virus</i> isolate IR:Jir8:T58X:Cuc:08 segment DNA-B

MZ423192.1	95.26	100	4307	<i>Tomato leaf curl Palampur virus</i> clone PV16-8 segment DNA B
------------	-------	-----	------	--



شكل (24): العلاقة الوراثية بين سلالة القطعة الأولى (Segment B) من فايروس ToLCPaLV المحلية المرافقة لنباتات الطماطة المصابة (المشار إليه بنقطة سوداء) والسلالات العالمية الأخرى التابعة للفايروس نفسه

تُعد فايروسات ToLCPaLV من الفايروسات المهمة التابعة الى الجنس *Begomovirus* والذي سجل لأول مرة في مدينة Palampur الهندية في العام 2008 (Kumar وآخرون، 2008) بعدها سجل في باكستان

(Ali وآخرون، 2010) وإيران (Heydarnejad وآخرون، 2013). وبالرغم من تسجيل ودراسة الإصابة بهذا الفيروس سابقاً في العراق على نباتات القرع والداثورة (Mohammed وآخرون، 2021) وعلى نبات الخيار إلا أن تشخيصنا له في نبات الطماطة هو الأول على مستوى العراق.

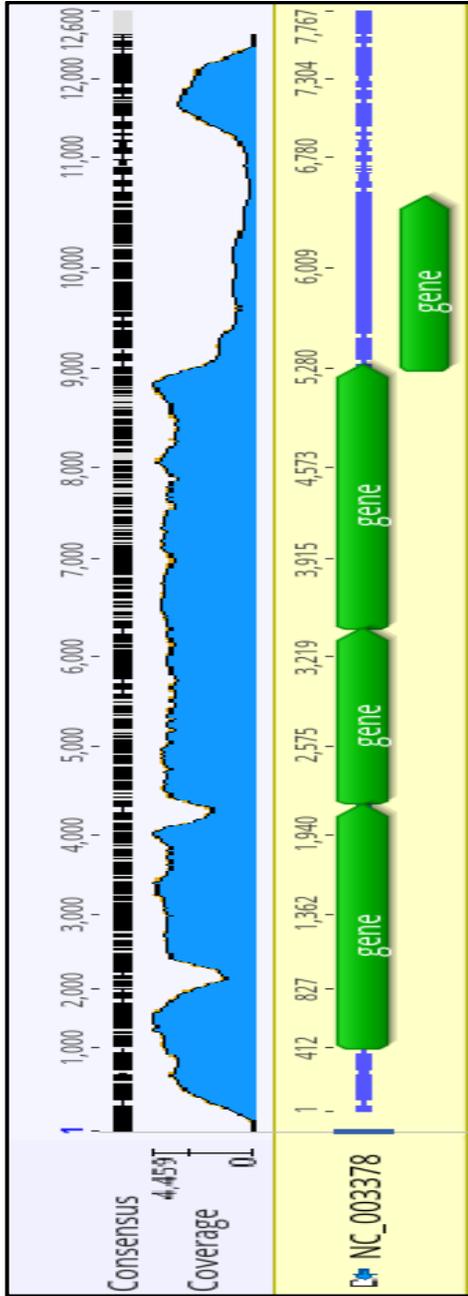
3-2-2-4: التشخيص وتحديد الخصائص الجزيئية للفايروس الداخلي *Tobacco vein clearing virus*

تم تشخيص جينوم فيروس داخلي ضمن جينوم نبات الطماطة *Solanum lycopersicum* باستعمال تقنية الجيل التالي لتحديد التسلسل. إذ أشارت نتائج التشابه لمسودة الجينوم التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة إلى أن الفايروس المشخص هو *Tobacco vein clearing virus* (TVCV) والذي هو أحد أنواع الجنس *Solendovirus* التابع للعائلة *Caulimoviridae* إذ حققت نسبة تشابه بلغت 81.60% مع سلالة نفس الفيروس *Tobacco vein clearing virus* ذات الرمز AF190123.1 (جدول 14).

جدول (14): التشابه بين مسودة جينوم فايروس TVCV المشخص في هذه الدراسة والمتداخله مع جينوم الطماطة مع العزلات والسلالات العالمية

اسم النوع	مجموع درجات التشابه	تغطية التسلسل (%)	نسبة التشابه (%)	رمز السلالة
<i>Tobacco vein clearing virus</i>	4865	70	81.60	AF190123.1
<i>Sweet potato vein clearing virus isolate Fiji</i>	108	2	76.11	MH188860.1
<i>Sweet potato vein clearing virus strain Dom1</i>	102	2	75.66	HQ694979.1

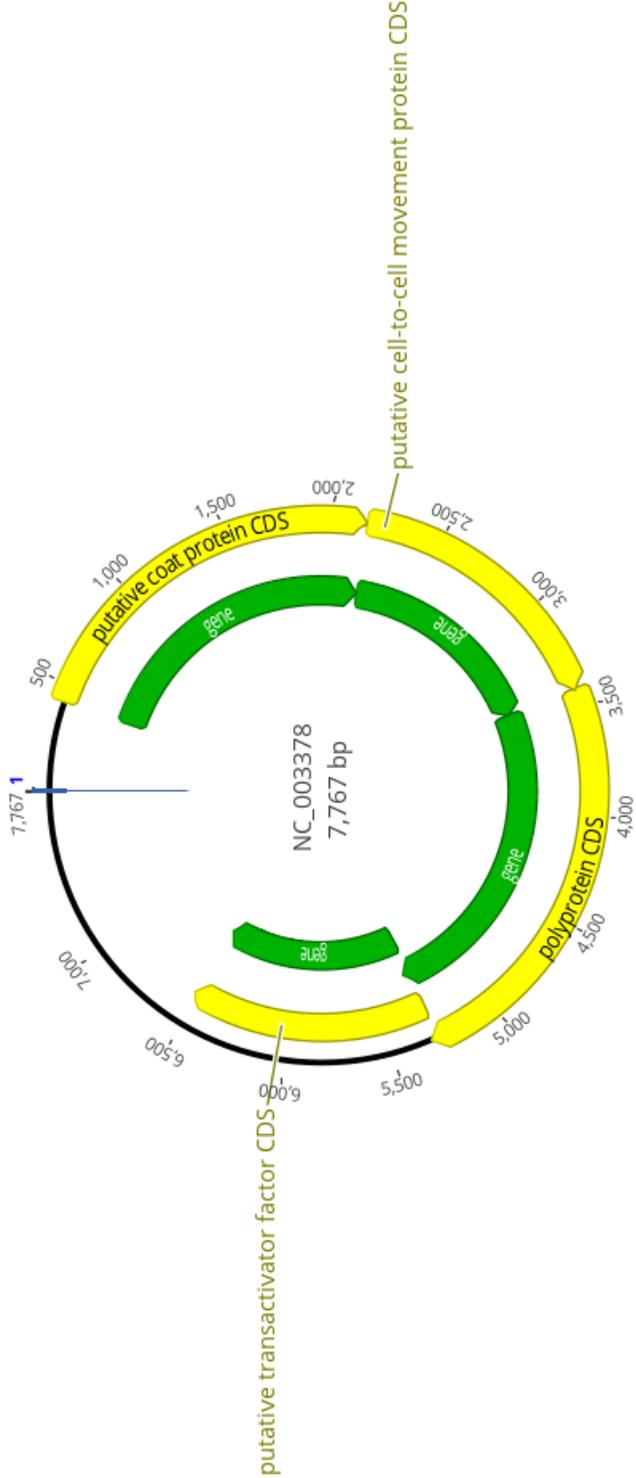
كما أكدت نتائج تحليل التشابه باستعمال تسلسل الجينوم المرجعي للفايروس TVCV ذو الرمز NC_003378. هذا التشخيص وذلك بتحقيقه نسبة تشابه 87.4% مع نسبة تغطية 98.1% بمعدل تغطية X 2825 (بمعنى أن كل قاعدة نايتروجينية من تسلسل جينوم الفايروس قد تم تكرارها أو تغطيتها 2825 مرة من المقروءات الخام) (شكل 25).



شكل (25): تغطية المقروءات الخام للتسلسل المرجعي لجينوم الفايروس TVCVV ذو الرمز NC_0033378.1

لذلك فقد تم التجميع النهائي لتسلسل جينوم TVCVV المشخص في هذه الدراسة والذي تم ايداعه ضمن بيانات بنك الجينات تحت الرمز ON6843229.1 (ملحق 4) وكان ذو شريط DNA مزدوج طوله 7760 قاعدة نايتروجينية تتضمن أربعة أطر قراءة مفتوحة open reading frames أي جينات تشفر المناطق المحفوظة النموذجية لجينوم أنواع الجنس *Solendovirus*، إذ يشفر الأطار الأول للغلاف البروتيني (Putative coat protein) والأطار الثاني لبروتين الحركة (Putative cell-to-cell movement protein) و الأطار الثالث للبروتين المتعدد (Polyprotein) التي تشمل بروتين Aspartic protease وأنزيم النسخ

العكسي reverse transcriptase وبروتين RNase H وأخيراً الاطار الرابع الذي يشفر لبروتين عامل Trans-activator factor. ويشتمل تسلسل الجينوم هذا وبروتيناته المفترضة على السمات الكاملة الموجودة في أعضاء الفايروسات الداخلية من جنس لجينوم أنواع الجنس *Solendovirus* والتي يتم تمثيلها في الجينوم المرجعي للفايروس TVCV ذو الرمز NC_003378.1 (شكل 26).



شكل (26): خريطة الجينوم التمثولوجية للفايروس الداخلي *Tobacco vein clearing virus*. اللون الأخضر يمثل مواقع الجينات المحافضة بينما اللون الأصفر يمثل البروتينات التي تشفر لها هذه الجينات

ولغرض زيادة مصداقية هذا التشخيص فقد أجريت عملية تحليل نسبة التشابه (BLASTp) بين تسلسل الاحماض الامينية للبروتينات الأربعة الرئيسية للسلافة العراقية للفايروس TVCV المشخص في هذه الدراسة مع التسلسلات العالمية لنفس البروتينات. اذ أظهر تسلسل الاحماض الامينية للغلاف البروتيني (Coat protein) للفايروس المحلي نسبة تغطية 100% و اعلى نسبة تشابه بلغت 63.40% لنفس البروتين الخاص بالفايروس TVCV ذو الرمز NP_569139.1 بينما انخفضت نسب التغطية والتشابه مع نفس البروتين التابع لفايروسات أخرى (جدول 15).

جدول (15): تحليل التشابه بين تسلسل الاحماض الامينية لبروتين الغلاف البروتيني للسلافة العراقية للفايروس TVCV مع تسلسلات الأحماض الأمينية الأخرى ذات الصلة في جميع أنحاء العالم

رمز السلافة	نسبة تغطية التسلسل (%)	نسبة التشابه (%)	مجموع درجات التشابه	اسم الفايروس	أسم البروتين
NP_569139.1	100	63.40	431	<i>Tobacco vein clearing virus</i>	putative coat protein
AWA81913.1	68	40.70	192	<i>Sweet potato vein clearing virus</i>	coat protein
YP_004300272.1	68	39.69	184	<i>Sweet potato vein clearing virus</i>	coat protein
AFL90606.1	39	31.68	65.9	<i>Blueberry red ringspot virus</i>	coat protein
AFL90601.1	39	31.68	65.9	<i>Blueberry red ringspot virus</i>	coat protein
AFL90605.1	39	31.68	65.9	<i>Blueberry red ringspot virus</i>	coat protein
AFL90598.1	39	31.68	65.5	<i>Blueberry red ringspot virus</i>	coat protein
AFL90602.2	39	31.68	66.6	<i>Blueberry red ringspot virus</i>	coat protein
AFL90603.2	39	31.68	66.2	<i>Blueberry red ringspot virus</i>	coat protein
AGI44295.1	38	30.77	63.5	<i>Blueberry red ringspot virus</i>	coat protein

DAF42456.1	83	30.12	141	<i>Bacopamonneri virus 3</i>	TPA: coat protein
QZH55166.1	80	29.56	97.8	<i>chicory mosaic cavemo virus</i>	coat protein
YP_004347414.1	66	28.63	91.7	<i>Sweet potato collusive virus</i>	coat protein protein
YP_010087806.1	48	27.98	90.9	<i>Epiphyllum virus 4</i>	coat protein
AFK73388.1	58	27.66	66.2	<i>Blueberry red ringspot virus</i>	capsid protein

كما أظهر تسلسل الأحماض الأمينية لبروتين الحركة Putative movement protein الخاص بالفايروس المحلي نسبة تغطية 93% و أعلى نسبة تشابه بلغت 75.89% لنفس البروتين الخاص بنفس الفايروس TVCV ذو الرمز NP_569140.1 وأيضا قلت نسب التغطية والتشابه مع نفس البروتين التابع لفايروسات أخرى (جدول 16).

جدول (16): تحليل التشابه بين تسلسل الأحماض الأمينية لبروتين الحركة للفايروس TVCV السلالة العراقية مع تسلسلات الأحماض الأمينية الأخرى ذات الصلة في جميع أنحاء العالم

رمز السلالة	نسبة تغطية التسلسل (%)	نسبة التشابه (%)	مجموع درجات التشابه	اسم الفايروس	أسم البروتين
NP_569140.1	93	75.89	507	<i>Tobacco vein clearing virus</i>	putative movement protein
AWA81914.1	93	41.27	251	<i>Sweet potato vein clearing virus</i>	movement protein
YP_004300273.1	93	40.51	244	<i>Sweet potato vein clearing virus</i>	movement protein
DAF42457.1	93	33.67	171	<i>Bacopa monneri virus 3</i>	TPA: movement protein
AGT42087.1	50	32.72	80.1	<i>Cauliflower mosaic virus</i>	movement protein

BCW03857.1	56	31.33	81.3	<i>Cauliflower mosaic virus</i>	movement protein
YP_009165746.1	41	31.07	82.8	<i>Atractylodes mild mottle virus</i>	ORF1 movement protein
AGT42150.1	56	30.80	80.9	<i>Cauliflower mosaic virus</i>	movement protein
AHA91306.1	56	30.40	80.9	<i>Cauliflower mosaic virus</i>	movement protein
AHA91293.1	56	30.40	80.5	<i>Cauliflower mosaic virus</i>	movement protein
CAH59634.1	48	30.29	79.7	<i>Carnation etched ring virus</i>	movement protein
AII00786.1	50	29.95	80.1	<i>Cauliflower mosaic virus</i>	movement protein
AII80282.1	50	29.95	80.1	<i>Cauliflower mosaic virus</i>	movement protein
BAO53438.1	50	29.95	80.1	<i>Cauliflower mosaic virus</i>	movement protein
YP_006607888.1	49	29.67	81.3	<i>Soybean Putnam virus</i>	movement protein

يضاف الى ذلك فقد أظهرت نتائج التحليل ان تسلسلات الاحماض الامينية للبروتين المتعدد Polyprotein و بروتين عامل Trans-activator factor الخاص بنفس الفايروس نسب تغطية 100 و 96% و نسب تشابه 82.83 و 64.00 % على التوالي مع تسلسلات الاحماض الامينية للبروتينات المناظرة للفايروس ذات الرموز NP_569141.1 و NP_569142.1 على التوالي جدول (17 و 18).

جدول (17): تحليل التشابه بين تسلسل الاحماض الامينية للـ Polyprotein لفايروس TVCV السلالة العراقية مع تسلسلات الأحماض الأمينية الأخرى ذات الصلة في جميع أنحاء العالم

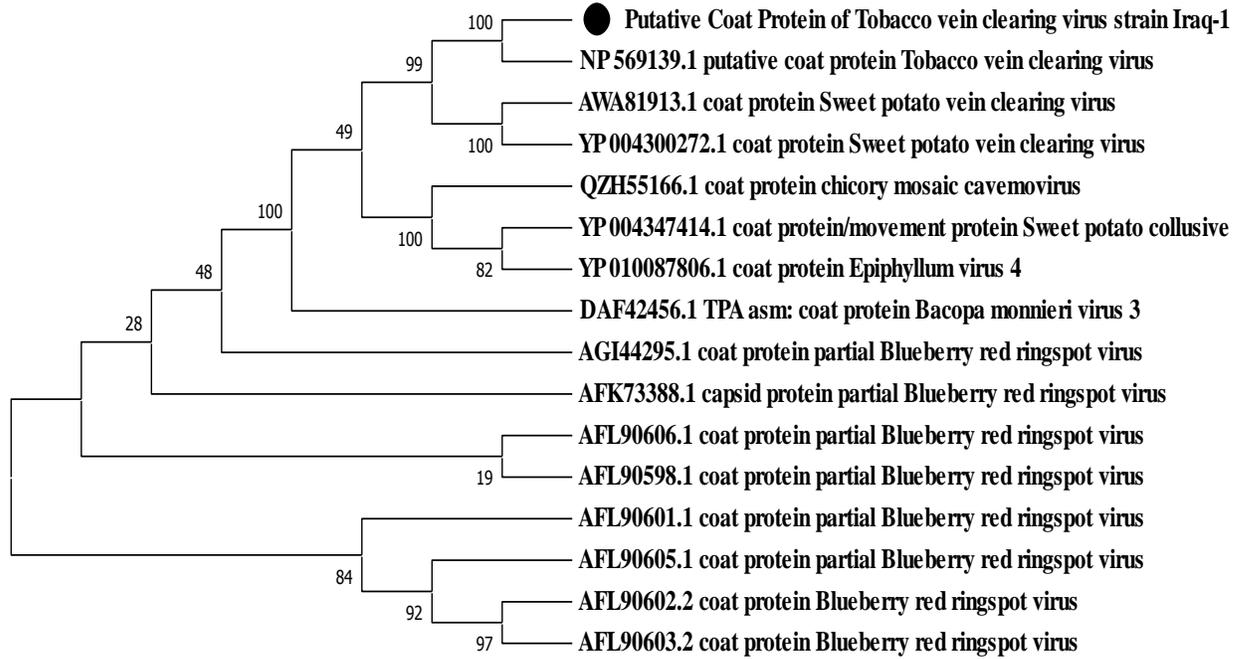
رمز السلالة	نسبة تغطية التسلسل (%)	نسبة التشابه (%)	مجموع درجات التشابه	اسم الفايروس	أسم البروتين
NP_569141.1	100	82.83	939	<i>Tobacco vein clearing virus</i>	polyprotein
AWA81915.1	99	60.79	721	<i>Sweet potato vein clearing virus</i>	replicase
YP_004300274.1	99	60.63	721	<i>Sweet potato vein clearing virus</i>	replicase
DAF42458.1	98	53.26	588	<i>Bacopa monnieri virus 3</i>	TPA: replicase
QZH55167.1	99	41.77	399	<i>chicory mosaic cavemovirus</i>	replicase
YP_004347415.1	98	41.07	391	<i>Sweet potato collusive virus</i>	replicase
NP_056848.1	98	40.90	392	<i>Cassava vein mosaic virus</i>	aspartic protease /reverse transcriptase
YP_010087807.1	98	38.59	380	<i>Epiphyllum virus 4</i>	replicase
ALF37644.1	98	34.00	296	<i>Strawberry vein banding virus</i>	putative reverse transcriptase
UCJ01210.1	98	34.00	295	<i>Strawberry vein banding virus</i>	putative reverse transcriptase
CCG14716.1	98	34.00	295	<i>Strawberry vein banding virus</i>	ORF V protein
UCJ01189.1	98	34.00	295	<i>Strawberry vein banding virus</i>	putative reverse transcriptase

ARO77050.1	98	33.85	295	<i>Strawberry vein banding virus</i>	ORFV protein
UCJ01196.1	98	33.85	295	<i>Strawberry vein banding virus</i>	putative reverse transcriptase
NP_043933.1	98	33.59	296	<i>Strawberry vein banding virus</i>	hypothetical protein

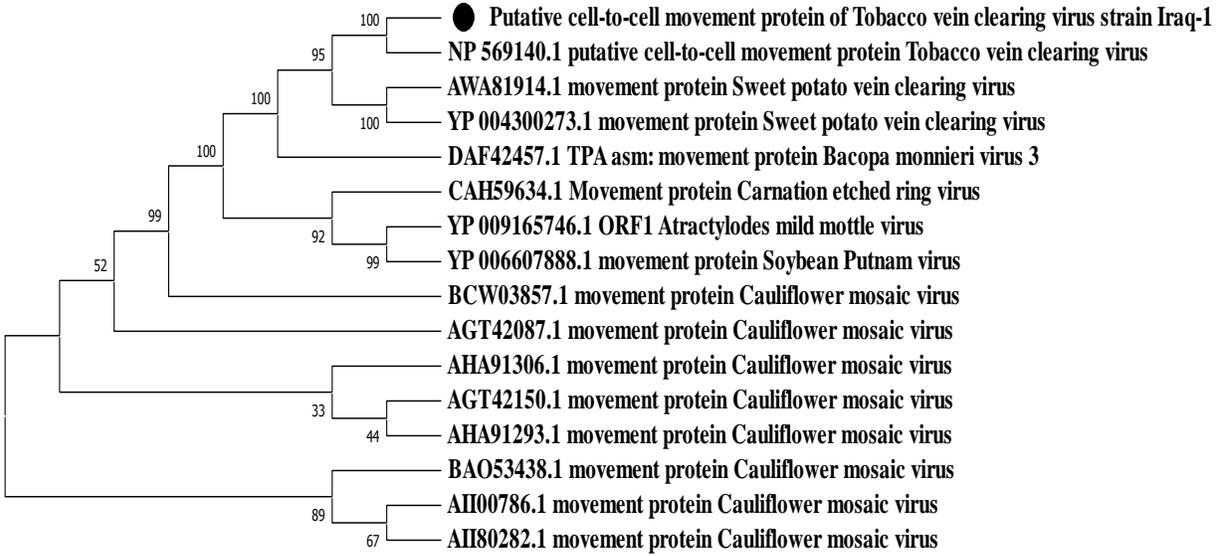
جدول (18): تحليل التشابه بين تسلسل الاحماض الامينية لبروتين عامل Trans-activator factor للفايروس TVCV التابع للسلالة العراقية مع تسلسلات الأحماض الأمينية الأخرى ذات الصلة في جميع أنحاء العالم

رمز السلالة	نسبة تغطية التسلسل (%)	نسبة التشابه (%)	مجموع درجات التشابه	اسم الفايروس	أسم البروتين
NP_569142.1	96	64.00	434	<i>Tobacco vein clearing virus</i>	putative Trans-activator factor
AWA81917.1	55	48.46	209	<i>Sweet potato vein clearing virus</i>	putative inclusion body protein
YP_004300276.1	55	46.70	204	<i>Sweet potato vein clearing virus</i>	putative inclusion body protein
DAF42459.1	65	29.63	114	<i>Bacopa monnieri virus 3</i>	TPA: putative inclusion body protein
QZH55168.1	61	26.04	64.3	<i>Chicory mosaic cavemo virus</i>	putative Trans-activator factor

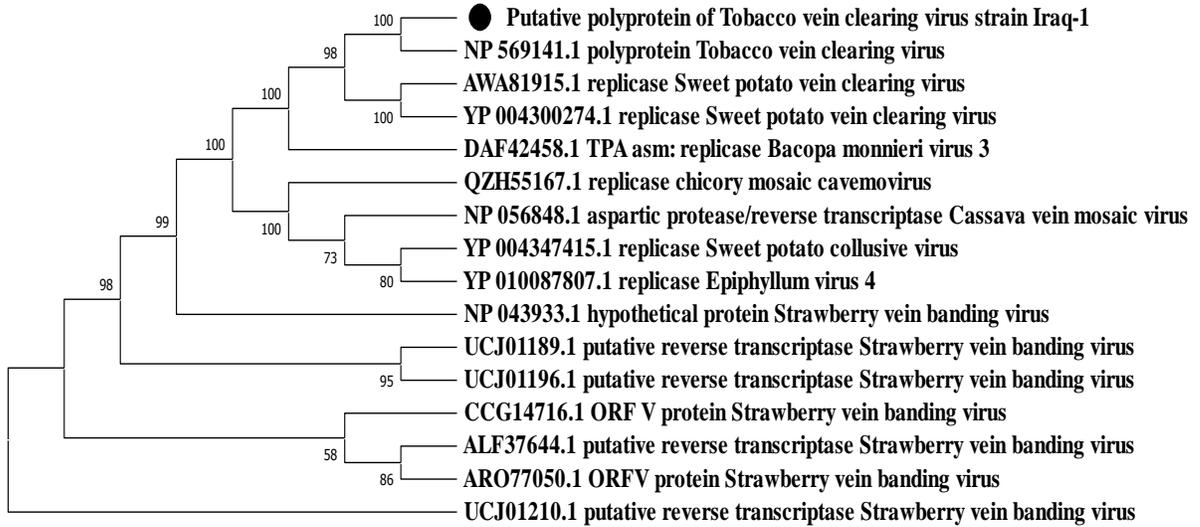
لقد تم تأكيد نتائج هذه التحاليل بواسطة التحليل الوراثي (Phylogenetic analysis) الذي أشار بوضوح إلى العلاقة الوثيقة بين جميع البروتينات المذكورة أعلاه التابعة للسلالة العراقية من فايروس TVCV مع البروتينات المناظرة التي تعود إلى نفس الفايروس TVCV (الأشكال 27 و 28 و 29 و 30 على التوالي).



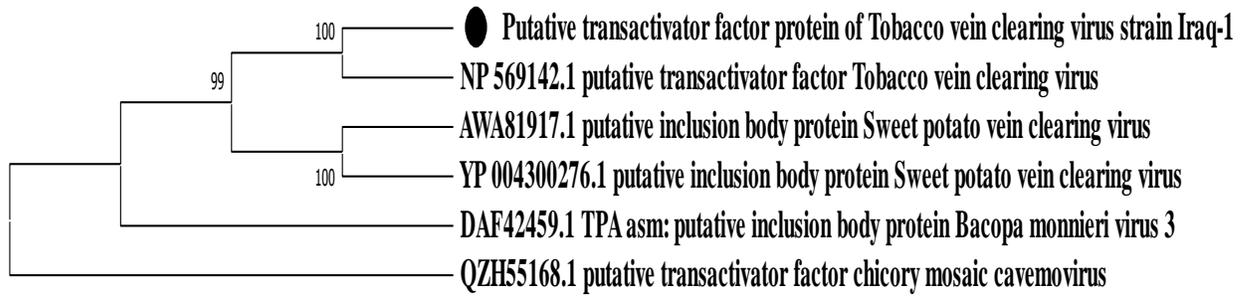
شكل (27): الشجرة الوراثية لبروتين الغلاف البروتيني للفايروس TVCV السلالة العراقية (محددة بنقطة ذات لون اسود) مع التسلسلات العالمية لنفس البروتين التابع للعديد من الفايروسات والتي تشمل الفايروس TVCV.



شكل (28): الشجرة الوراثية لبروتين الحركة للفايروس TVCV السلالة العراقية (محددة بنقطة ذات لون اسود) مع التسلسلات العالمية لنفس البروتين التابع للعديد من الفايروسات والتي من ضمنها الفايروس TVCV .



شكل (29): الشجرة الوراثية للبروتين المتعدد التابع للفايروس TVCV السلالة العراقية (محددة بنقطة ذات لون اسود) والتسلسلات العالمية لنفس البروتين التابع للعديد من الفايروسات والتي تشمل الفايروس TVCV .



شكل (30): الشجرة الوراثية لبروتين عامل **Trans-activator** للسلسلة العراقية من فايروس **TVCV** (محددة بنقطة ذات لون اسود) مع التسلسلات العالمية لنفس البروتين التابع للعديد من الفايروسات والتي تشمل الفايروس **TVCV** .

ومن الجدير بالذكر أن تسلسل كل منطقة جينية تشفر لبروتين معين كانت إما مقطوعة أو تحتوي على بعض التحولات الإطارية (frameshifts) والتي يمكن اعتبارها بالتالي معيبة من الناحية الانتقالية ومن جانب اخر فقد تم تحديد المناطق غير المشفرة non-coding intergenic region في المسودة الكاملة للجينوم والتي كانت بعدد 2276 قاعدة نايتروجينية تقع على كلا طرفي الجينوم.

بالرغم من التسجيل السابق لاندماج الحمض النووي للفايروس **TVCV** مع جينوم عدد من أنواع التبغ (Jakowitsch وآخرون، 1999 و Lockhart وآخرون ، 2000) ، الا انه لم يسجل مدمجاً مع عوائل نباتية أخرى، ولكن اشارت دراستنا هذه الى ان جينوم هذا الفايروس مرتبط بجينوم عائل نباتي جديد غير معروف سابقاً وهو الطماطة *S. lycopersicum* وبالتالي، هذا هو التقرير الأول في العراق عن اندماج جينوم هذا الفايروس الداخلي مع جينوم نبات الطماطة *S. lycopersicum* المزروعة في العراق.

1-3-2-2-4: التحقق من وجود جينوم الفايروس الداخلي **TVCV** في جينومات *S. lycopersicum* العالمية

لغرض التحقق فيما إذا كان جينوم الفايروس الداخلي **TVCV** مدمجاً في جينومات نباتات الطماطة *S. lycopersicum* في جميع أنحاء العالم، تم اجراء تحليل التشابه (BLASTn) باستعمال جينوم السلالة العراقية للفايروس **TVCV** وتسلسل الجينوم المرجعي لنفس الفايروس. لقد تم الحصول على نتائج مهمة (الجدول 19) في الكشفت عن تحديد تسلسل جينوم هذا الفايروس في جميع الكروموسومات الاثني عشر لنبات الطماطة العالمية. وتؤكد هذه النتيجة تشخيصنا للفايروس **TVCV** في نبات الطماطة المزروعة في

العراق. وبالرغم من اكتشاف وتشخيص فايروس TVCV في العديد من جينومات عائل الطماعة، إلا أنه لم يتم الإبلاغ عنها وتسجيلها في جميع أنحاء العالم. قد يعود سبب ذلك على الأرجح الى ان TVCV هو من الفايروسات الداخلية المنشأ والتي لا يمكن تحديدها وتشخيصها إلا من خلال إجراء تحليل التشابه (BLAST analysis) مع بيانات الفايروسات حصراً.

تقدم نتائج الدراسة الحالية دليلاً إضافياً على الغزو المكثف للفايروسات الداخلية العكسية Endogenous pararetroviruses (EPRVs) الممثلة بالفايروس TVCV في جينومات نباتات العائلة الباذنجانية. وبالتالي يمكن أن تؤثر عملية اندماج التسلسلات الفايروسية في جينوم المضيف على نتائج الكشف وتشخيص الفايروسات باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل PCR التقليدي، التي يمكن ان تنتهي بنتائج مسح مبالغة فيها مقارنة مما في الواقع مما يستوجب اجراء اكثر من طريقة لتأكيد تشخيص الإصابة الفايروسية.

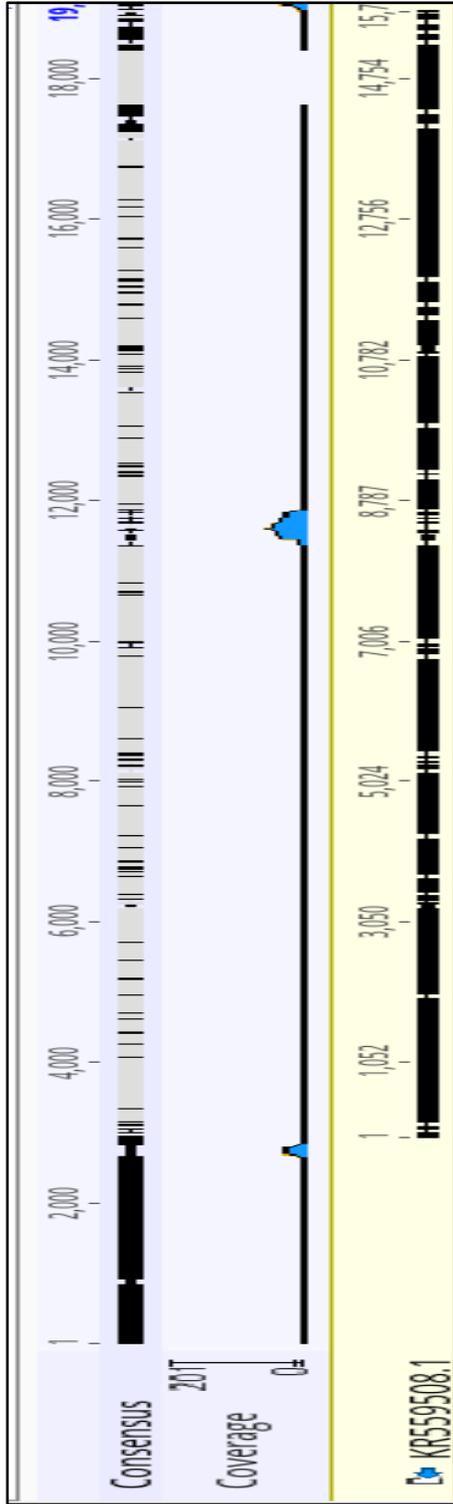
لقد تم سابقاً اكتشاف العلاقات التطورية المعقدة بين العديد من الفايروسات النباتية المختلفة مع عوائلها النباتية عن طريق الفايروسات الذاتية الداخلية (Endogenous viral elements) (Katzourakis و Gifford، 2010). ومعظم هذه الفايروسات تكون معطلة وظيفياً في عوائلها النباتية، ولكن البعض منها يتم تفعيلها مما يؤدي الى اكتساب ذلك العائل النباتي وظائف معينة قد تكون مفيدة له (Holmes، 2011) ويتم ذلك عن طريق إدخال او اندماج العنصر الفايروسي في الجين أو بالقرب منه مما يؤدي الى تعديل نشاط ووظيفة الجين المصاب عبر مجموعة متنوعة من الآليات مثل تحفيز إسكات الجين وإضافة أشكال التنظيمية الجديدة للنسخ (Kashino-Fujii وآخرون، 2018)، ومن جانب اخر بعض من هذه الفايروسات الداخلية لها القدرة على التفعيل كنتيجة لتعرض العائل النباتي لظروف اجهاد بيئية مما يؤدي الى أحداث الإصابة لعوائلها ، حيث تم توثيق هذه العملية في ثلاثة فايروسات داخلية وهي *Petunia vein clearing virus* و *Banana streak virus* و *Tobacco vein clearing virus* (Geering وآخرون، 2014) و (Alisawi، 2019).

جدول (19): تحليل التشابه لجينوم السلالة العراقية من الفايروس TVCV مع الجينومات العالمية ذي الصلة لنبات الطماطة

رمز التسجيل	مجموع درجات التشابه	نسبة تغطية التسلسل (%)	نسبة التشابه (%)	رقم الكروموسوم لنبات الطماطة <i>S. lycopersicum</i>
OU640345.1	6975	96	92.80	Genome assembly, chromosome: 2
OU640353.1	8299	97	91.78	Genome assembly, chromosome: 10
OU640352.1	7998	99	91.29	Genome assembly, chromosome: 9
OU640350.1	7969	97	91.19	Genome assembly, chromosome: 7
OU640355.1	7908	97	91.09	Genome assembly, chromosome: 12
OU640347.1	7332	97	90.72	Genome assembly, chromosome: 4
OU640351.1	7812	98	90.67	Genome assembly, chromosome: 8
OU640348.1	7055	97	90.53	Genome assembly, chromosome: 5
OU640344.1	7714	97	90.35	Genome assembly, chromosome: 1
OU640346.1	7581	97	90.18	Genome assembly, chromosome: 3
OU640354.1	7513	98	89.82	Genome assembly, chromosome: 11
OU640349.1	8475	97	89.43	Genome assembly, chromosome: 6

3-4: التشخيص الجزيئي لحشرة الذبابة البيضاء *Bemisia tabaci*

بينت نتائج التحليل ان هنالك 748 من المتجاورات المتداخلة التي تتشابه مع الجينوم المرجعي لمایتوكوندریا حشرة الذبابة البيضاء وكانت احدى هذه المتجاورات تغطي الجينوم بأكمله (شكل 31) والتي استعمل تسلسلها في برنامج MITOS المتخصص بتحديد وتفسير و شرح جينومات مایتوكوندریا أعضاء مجموعة الـ Metazoan من المملكة الحيوانية التي تشمل الحشرات وجود حشرة *Bemisia tabaci* (شكل 32 أ)

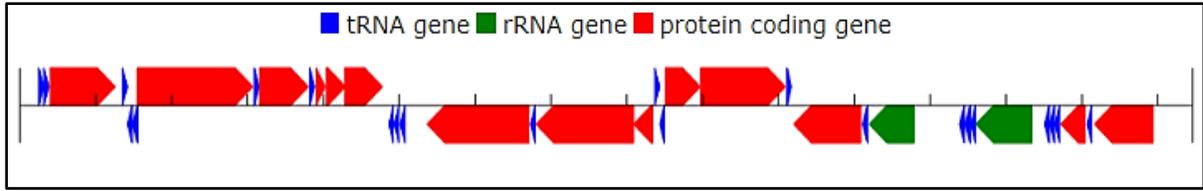


شكل (31): تغطية المتجاورات المتداخلة للتسلسل المرجعي لجينوم ماييتوكوندرريا حشرة الذبابة البيضاء *Bemisia tabaci* ذات الرمز KR559508.1

لقد بلغ طول تسلسل جينوم الماييتوكوندرريا للذبابة البيضاء *B. tabaci* التذي تم الحصول عليه في هذه الدراسة 15,456 قاعدة نايتروجينية تحتوي على 14 جين مشفر للبروتينات Protein-coding genes (PCGs) والتي شملت (Cox1) cytochrome c oxidase subunit I، (Cox2) subunit II، (Cox3) cytochrome c oxidase subunit III، (Cob) cytochrome b،

NADH dehydrogenase subunit 2 ، (Nad1) NADH dehydrogenase subunit 1
 NADH dehydrogenase subunit ،(Nad3) NADH dehydrogenase subunit 3،(Nad2)
 NADH dehydrogenase ، (Nad4L) NADH dehydrogenase subunit 4L ،(Nad4) 4
 subunit 5 (Nad5) و (Nad6) NADH dehydrogenase subunit 6. بالإضافة الى وجود جينين
 للحامض النووي الرايبوسومي Ribosomal RNA genes للوحدة الكبيرة والصغيرة هما rRNA L
 و rRNA S و 22 جين من الحامض النووي الناقل Transfer RNA (شكل 31 ب).

MITOS WebServer					
Downloads:			Jobid: Bemisia tabaci mitochondrial genome (B.tabaci)		
BED file					
GFF file					
TBL file					
Gene Order file					
FAS file					
FAA file					
Raw data:					
protein plot					
ncRNA plot					
raw data					
Misc:					
Job settings					
Name	Start	Stop	Strand	Length	Structure
trnI(atac)	251	313	+	63	svg ps
trnM(atg)	315	383	+	69	svg ps
nad2-0	399	1256	+	858	
trnW(tga)	1351	1418	+	68	svg ps
trnY(tac)	1417	1479	-	63	svg ps
trnC(tgc)	1478	1551	-	74	svg ps
cox1	1548	3071	+	1524	
trnL2(tta)	3091	3155	+	65	svg ps
cox2	3162	3803	+	642	
trnK(aaa)	3820	3887	+	68	svg ps
atp8	3904	4026	+	123	
nad6-1	4039	4293	+	255	
atp6	4286	4780	+	495	
trnS1(aga)	4865	4923	-	59	svg ps
trnE(gaa)	4934	4996	-	63	svg ps
trnF(ttc)	5012	5078	-	67	svg ps
nad5	5368	6711	-	1344	
trnH(cac)	6730	6794	-	65	svg ps
nad4	6804	8090	-	1287	
nad4l	8090	8341	-	252	
trnI(aca)	8370	8434	+	65	svg ps
trnP(cca)	8435	8496	-	62	svg ps
nad6-0	8507	8971	+	465	
cob	8978	10093	+	1116	
trnS2(tca)	10114	10171	+	58	svg ps
nad1	10201	11082	-	882	
trnL1(cta)	11107	11174	-	68	svg ps
rrnL	11197	11787	-	591	svg ps
trnV(gta)	12385	12452	-	68	svg ps
trnD(gac)	12456	12528	-	73	svg ps
trnQ(caa)	12534	12597	-	64	svg ps
rrnS	12602	13337	-	736	svg ps
trnN(aac)	13507	13570	-	64	svg ps
trnR(cga)	13571	13639	-	69	svg ps
trnA(gca)	13643	13707	-	65	svg ps
nad3	13722	14045	-	324	
trnG(gga)	14068	14131	-	64	svg ps
cox3	14166	14939	-	774	



شكل (32): المسودة الأولية لجينوم الميتوكوندريا لحشرة الذبابة البيضاء *B. tabaci* المرافقة لنباتات الطماطة المصابة. (أ) جدول بالجينات التي تم تحديدها في مسودة جينوم الميتوكوندريا لحشرة الذبابة البيضاء، (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. لقد أظهر تحليل مقدار التشابه الذي تضمن مقارنة التسلسل الكامل لمسودة الجينوم الأولية لحشرة الذبابة البيضاء التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة مع ما متوفر من جينومات للميتوكوندريا حشرة الذبابة البيضاء في بنك الجينات GenBank ان الحشرة هي نوع *B. tabaci* وذلك تحقيق نسب تشابه بلغ اكثر من 92 % مع العديد من السلالات العالمية كان اعلاها مع تلك من نوع *Bemisia tabaci* clone MEAM1 (جدول 20) وهذه النتيجة تم تاكيدها في تحليل و النشوء والتطور الذي أوضح مدى العلاقة الوراثية الوثيقة 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).

جدول (20): مقارنة مسودة جينوم عضية المايكوندريا لحشرة الذبابة البيضاء المرافقة لنباتات الطماطة المصابة مع العزلات والسلالات العالمية لذات الحشرة

اسم النوع	مجموع درجات التشابه	تغطية التسلسل (%)	نسبة التشابه (%)	رمز السلالة
<i>Bemisia tabaci</i>	25294	100	99.51	KY951450.1
<i>Bemisia tabaci</i>	25289	100	99.50	KY951452.1
<i>Bemisia tabaci</i> clone MEAM1	25257	100	99.46	KR559508.1
<i>Bemisia tabaci</i> isolate 153_1	25124	99	99.39	MH186145.1
<i>Bemisia tabaci</i>	25086	100	99.31	KY951449.1
<i>Bemisia tabaci</i>	24136	99	97.74	KU877168.1
<i>Bemisia tabaci</i> strain MED ASL	15223	99	92.51	MH205754.1
<i>Bemisia tabaci</i> strain MED Q2	15167	99	92.40	MH205753.1

MH714535.1	92.39	99	15151	<i>Bemisia tabaci</i> strain MED Q1
KY951447.1	92.39	99	15145	<i>Bemisia tabaci</i>
MH047295.1	92.38	99	15139	<i>Bemisia tabaci</i> isolate 154_1_MED_pilon
OU815654.1	92.34	99	15119	<i>Bemisia tabaci</i>
MH205752.1	92.34	99	15117	<i>Bemisia tabaci</i> strain MED Q1
MH186144.1	92.32	99	15106	<i>Bemisia tabaci</i> isolate 154_2
JQ906700.1	92.32	99	15106	<i>Bemisia tabaci</i>



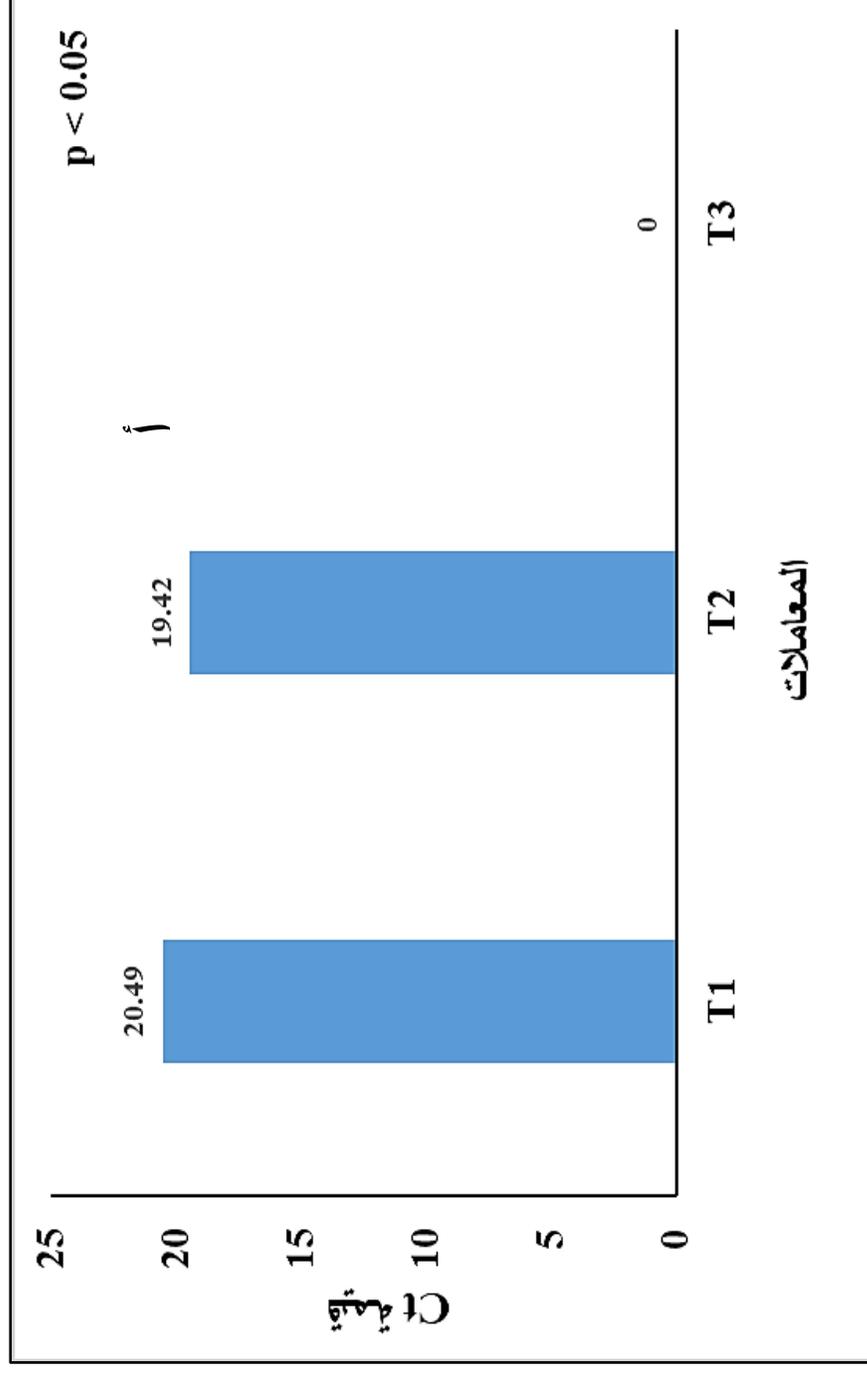
شكل (33): العلاقة الوراثية بين حشرة الذبابة البيضاء *B.tabaci* المحلية (المشار إليه بنقطة ذات لون اسود) والسلالات العالمية الأخرى التابعة للحشرة نفسها.

تعد مسودة جينوم المايوتوكوندرريا لحشرة الذبابة البيضاء التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة هي الثانية على مستوى العراق بعد تسجيل الأولى من قبل سلمان (2021) 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 و الخزاعي، 2021). كما اكدت نتائج هذه الدراسة انتماء الحشرة المدروسة الى النوع المعقد من ذبابة القطن البيضاء *B. tabaci* تحديداً

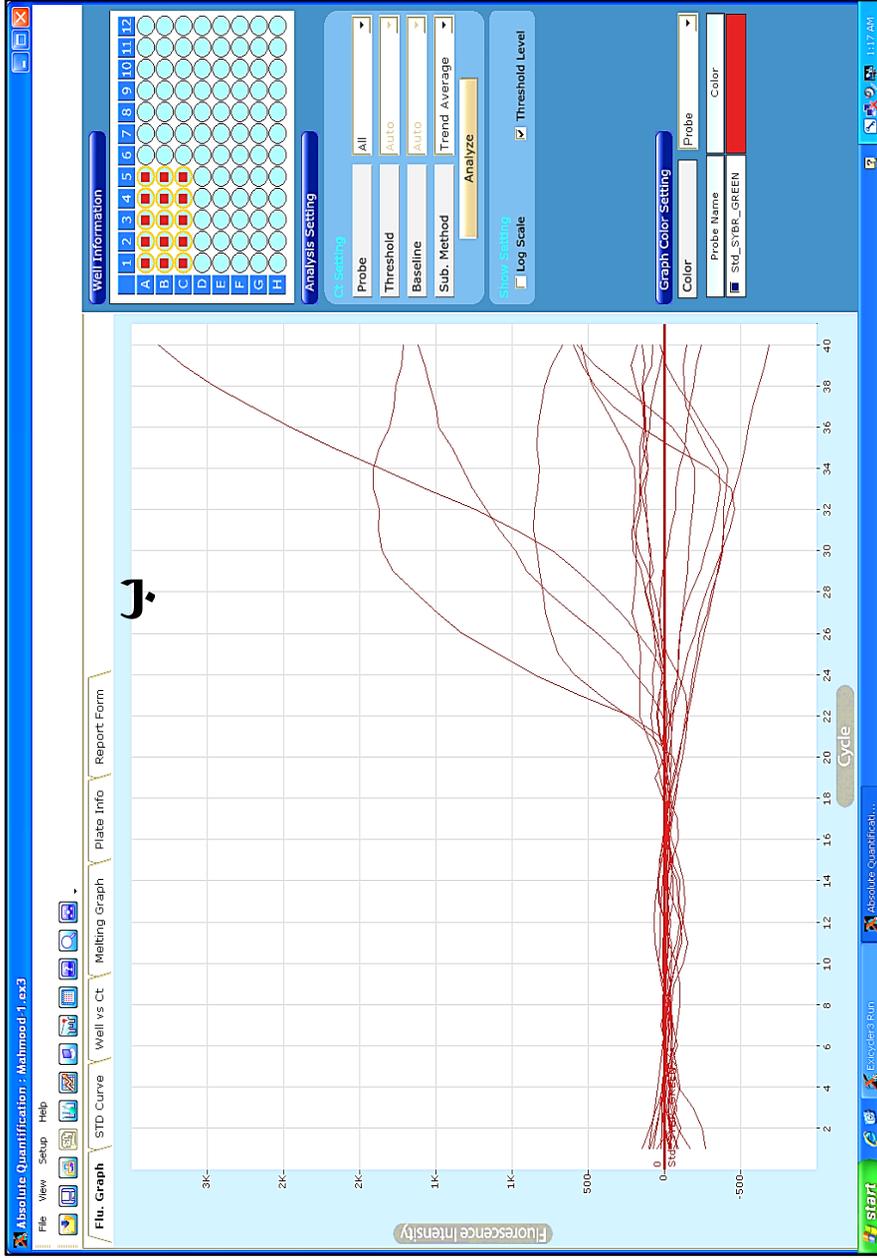
للمجموعة الجينية Middle East-Asia Minor¹ وهذا يتوافق مع ما وجده كل من Kareem و اخرون (2020) والخزاعي (2021) مع العلم أن هذا النوع يعد الأكثر انتشاراً على مستوى العالم (Li و اخرون، 2005 و Mugerwa و اخرون، 2018). وتعد هذه النتيجة ذات أهمية في تحديد الأنواع الجينية التابعة لحشرة الذبابة البيضاء المنتشرة في البيئة العراقية المسؤولة عن نقل فايروسات من اجل إيجاد الوسائل الكفوءة في مقاومتها مستقبلاً.

4-4: تقييم انتقال فايروس TYLCV عن طريق البذور

أظهرت نتائج التشخيص الجزيئي باستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل اللحظي Real Time-PCR ان البادرات النامية من البذور المعقمة والبذور غير المعقمة كانت مصابة بالفايروس TYLCV (شكل 34 أ و ب) بالرغم من عدم وجود فرق معنوي في تركيز الفايروس في بادرات المجموعتين، الا ان بادرات مجموعة البذور غير المعقمة (T2) حققت اعلى تركيز من الفايروس وذلك باكتشافه في معدل دورة التضاعف الابر 19.42 بينما اكتشف في بادرات مجموعة البذور المعقمة (T1) في معدل الدورات 20.49، بالمقابل كان هنالك فرق معنوي لهاتين المجموعتين مع معاملة المقارنة (T3) التي لم يكتشف فيها الفايروس. أن هذه النتيجة تتوافق مع ما وجده Kil و اخرون (2016) و Kil و اخرون (2017) الذين استنتجوا من دراستهم ان فايروس TYLCV يمكن ان ينتقل عن طريق البذور Seed-Borne. وبالرغم من اتباع طريقة عمل Tabein و اخرون (2021) بحذافيرها في تعقيمهم للبذور الا ما تحقق من نتائج في دراستنا هذه تختلف عن ما وجدوه من عدم اكتشافهم الفايروس في بادرات البذور المعقمة بينما اكتشف في البذور غير المعقمة وقد عزوه الى سبب تلوث هذه البذور ببقايا جينوم الفايروس. ربما قد يعود سبب التناقض بين نتائج دراستنا مع نتائج دراستهم الى اختلاف سلالة الفايروس المدروسه من قبلهم اذ كانت *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* بينما في دراستنا كانت السلالة هي *Tomato yellow leaf curl virus-Mild*. وهذا الطرح يتوافق مع نتيجة Kil و اخرون (2020) الذين وجدوا ان سلالة الفايروس *Tomato leaf curl New Delhi virus* يمكنها ان تنتقل بواسطة البذور وتسبب إصابة لنباتي الطماطة و القرع. وبالرغم من ذلك هنالك حاجة ملحة الى اجراء المزيد من الدراسات المتعلقة بإمكانية انتقال سلالات فايروس TYLCV وتوابعها المختلفة بواسطة بذور الطماطة وعوائل نباتية أخرى.



شكل (34): التشخيص الجزيئي لفايروس TYLCV-Mid في البادرات النابتة من البذور المعقمة (T1) وغير المعقمة (T2) ومعاملة المقارنة (T3). (أ) أن الأرقام المذكورة في قمة الشريط البياني هي معدل ارقام الدورات التي اكتشف فيها الفايروس. علما ان هذا المعدل كلما قل يدل على زيادة تركيز الفايروس المكتشف في العينات النباتية. (ب) أحد صور النتائج التي تم الحصول عليها في جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل اللحظي ExicyclerTM 96.



شكل (34): التشخيص الجزيئي لفايروس TYLVCV-Mid في البادرات الثابتة من البذور المعقمة (T1) وغير المعقمة (T2) ومعاملة المقارنة (T3). (أ) أن الأرقام المذكورة في قمة الشريط البياني هي معدل ارقام الدورات التي اكتشف فيها الفايروس. علما ان هذا المعدل كلما قل يدل على زيادة تركيز الفايروس المكتشف في العينات النباتية. (ب) أحد صور النتائج التي تم الحصول عليها في جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل

لقد اقتصررت معظم طرق التشخيص الجزيئي السابقة في العراق للكشف عن الفايروسات عموماً وفايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطة خصوصاً على تسلسل جزئي من جينوم الفايروس مثل تسلسل جين الغلاف البروتيني (Al-Kuwaiti، 2013؛ كريم، 2016؛ و التميمي، 2020). إلا ان هذه الطرق لا تعطينا فكرة عن

وجود أنواع او سلالات مختلفة تعود لنفس الجنس او اجناس أخرى في حالة الإصابة المعقدة. ولكن هذه العقبات في العقدين الأخيرين اصبح بالإمكان التغلب عليها باستعمال تقنية الجيل التالي لتحديد التسلسل (NGS) التي تعطينا الامكانية العالية في تحديد جميع الأنواع والسلالات ونسب توأجدها في العينات المصابة كما تمنحنا القدرة على تحديد الجينوم الكامل للفايروسات والذي يمكننا من تشخيص الفايروسات الى مستوى السلالة. فمثلاً تمكن العابدي (2021) من تحديد الجينوم الكامل للسلالة المعتدلة للفايروس TYLCV-Najaf ولأول مرة في محافظة النجف الاشراف بواسطة استعمال هذه التقنية التي ساعدتنا أيضا في تشخيص وتحديد الجينوم الكامل لنفس السلالة ومعرفة انها السلالة السائدة من فايروسات *Begomoviruses* في المناطق التي شملتها الدراسة ولأول مرة في محافظة كربلاء والتي لم يكن باستطاعتنا من تشخيصها باستعمال وسائل التشخيص الجزيئي التقليدية السابقة. أن اتباع هذه التقنية سوف يمكننا من تحديد التوزيع الجغرافي للسلالات الشائعة لهذا الفايروس ومعرفة مدى انتشار كل سلالة في كل منطقة زراعية وبالتالي إمكانية البحث عن الجينات المقاومة في الأصناف النباتية لجميع هذه السلالات الشائعة وأيضا وضع الية ناجعة لمكافحة الناقل المشترك بينهم. جدير بالإشارة الى أن سبب عدم نجاح معظم البادئات المستعملة في هذه الدراسة في التشخيص الجزيئي لفايروسات *Begomovirus* باستعمال تقنية ال-PCR قد يعود الى إن هذه البادئات يمكنها الالتحام مع التسلسلات المحافظة فقط واي تغيير في هذه التسلسلات يسبب فشل عملية التضخيم لذا يمكننا التأكيد على أهمية استعمال تقنية تسلسل الجيل التالي (NGS) في التغلب على هذه المعوقات المرافقة لتطبيق تقنية ال-PCR والتقنيات الجزيئية الأخرى.

في معظم الاحيان تقترن التوابع نوع الفا وبيتا مع فايروسات عائلة *Geminiviruses* التي تشمل سلالات فايروس TYLCV والاقتران هذا يشتمل على تضاعفها وحركتها داخل النبات ومساهمتها في استحداث الاعراض المرضية بالإضافة الى كبح عملية الاسكات الجيني (Gene Silencing) التي يطورها النبات ضد الإصابة بالفايروسات (Amin واخرون، 2011 و Zhou، 2013). لذلك يمكننا ان نعزوا سبب شدة اعراض الإصابة بالسلالة المعتدلة TYLCV-Mld Karbala-1 الى وجود التابع *Cotton leaf curl Gezira betasatellite isolate Karbala* وهذا الطرح يتوافق مع ما وجدته الباحثون Hu واخرون (2020) في حالة الإصابة بالفايروس *Tomato yellow leaf curl china virus* (TYLCCNV) التي اقترنت مع التابع *Tomato Yellow Leaf Curl China betasatellite* (TYLCCNB) ، اذ لوحظ ان الإصابة بالفايروس لوحده في نبات الطماطة والتبغ تفشل في التسبب بأي اعراض مرضية ظاهرة (Cui واخرون، 2004) بينما اقتران الإصابة بالفايروس TYLCCNV مع التابع TYLCCNB ينتج

عنهما إصابة معقدة تسبب ظهور اعراض مرضية واضحة مثل التقزم وتجعد الأوراق وموزائيك أصفر مع تشويه السيقان (Li وآخرون، 2022).

لقد أوضحت نتائج القرابة الوراثية بين السلالة العراقية لفايروس TYLCV-Mld Karbala-1 والتابع *Tobacco vein clearing virus* والسلالات المنتشرة في الدول المجاورة او في منطقة الشرق الأوسط مما يشير الى ان السبب الرئيس في انتقال هذه السلالات من تلك الدول الى العراق هو عن طريق تبادل المستلزمات او السلعة الزراعية التجارية لا سيما ضعف او عدم وجود الية الفحص والمراقبة الفعالة لتلك السلع كذلك عدم تطبيق الحجر الزراعي الفعال في بلدنا (Al-Kuwaiti، 2013) وهذا قد سمح وسوف يسمح في انتشار العديد من الأنواع والسلالات الفايروسية التي قد يكون البعض منها خطيرا بسبب خسائر اقتصادية كبيرة في المستقبل.

تعتمد معظم فايروسات *Begomoviruses* 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 (Feres و Racciah، 2015). فمثلا وجد نوع واحد يعود الى الجنس الاول وهو *B. tabaci* قدرته على اكتساب الفايروسات اثناء التغذية على انسجة النباتات المصابة، وقد اكتسب هذا النوع أهميته بكونه أفة حشرية وناقل للعديد ابرزها *Tomato yellow leaf curl virus* التي تصيب سلالاته المختلفة العديد من المحاصيل والفواكه والخضروات ونباتات الزينة مسببة لها خسائر اقتصادية سنوية كبيرة في العديد من المناطق التي تشمل البيئات الاستوائية وشبه الاستوائية والقاحلة والمتوسطة (Navas-Castillo وآخرون، 2011). الا أن طرق انتقال العديد من فايروسات النبات لا يزال موضوع خصب بسبب الاكتشاف المستمر لطرق انتقال جديدة لها لم تكن معروفة سابقا فمثلا تم التشخيص ولأول مرة لفايروس جديد اسمه *Pepper whitefly-borne vein yellows virus* والذي يعود الى جنس *Polerovirus* المعروف عن أنواعها أنها تنتقل بواسطة حشرة المن *Myzus persicae* ولكنه وجد ان هذا الفايروس الجديد ينتقل بواسطة حشرة الذبابة البيضاء المعروف عن قدرتها العالية على نقل العديد من فايروسات النبات ذات الجينوم نوع الـ DNA و RNA (Ghosh وآخرون، 2019). وهذا يفرض علينا الايمان بالنتيجة التي حصلنا عليها والمتعلقة بإمكانية انتقال فايروس TYLCV عن طريق البذور.

5: الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations

Conclusions

1-5: الاستنتاجات

- 1- تطوير طريقة سريعة وسهلة وقليلة التكاليف لاستخلاص الـDNA من النباتات المصابة بالفايروسات.
- 2- أثبتت تقنية الـNGS كفاءتها في تشخيص عدد من الفايروسات النباتية واحد التوابع التي تعود الى الجنس *Begomovirus* فضلاً عن احد الفايروسات الداخلية في عملية واحدة وبدون الحاجة الى استعمال بادئات متخصصة مما يعطيها الأفضلية على طريقة الـPCR التقليدية.
- 3- لقد كانت السلالة الفايروسية *Tomato yellow leaf curl virus – Mild* (TYLCV-Mld) هي السائدة والوحيدة بين سلالات هذا الفايروس المسببه لمرض تجعد واصفرار أوراق الطماطة في المزارع الصحراوية في محافظة كربلاء،العراق.
- 4- التسجيل والحصول ولأول مرة في العراق على مسودة الجينوم الكامل (Whole genome) للتابع بيتا satDNA β نوع *Cotton leaf curl Gezira betasatellite* المرافق لسلالة الفايروس -TYLCV Mld والذي قد يكون هو السبب في زيادة شدة اعراض الإصابة بالرغم من ان سلالة الفايروس كانت السلالة المعتدلة.
- 5- التسجيل والحصول ولأول مرة في العراق على مسودة الجينوم الكامل لسلالة الفايروس *Tomato leaf curl Palampur virus* الذي تصيب محصول الطماطة.
- 6- التسجيل لأول مرة في العراق للفايروس الداخلي *Tobacco vein clearing virus* مدمج مع جينوم نبات الطماطة علماً ان هذا الفايروس الداخلي معروف عالمياً انه مدمج فقط مع أنواع من نبات التبغ مما يشير الى ان تسجيلنا هذا قد يكون الأول على مستوى العالم.
- 7- اثبتت نتائج دراستنا ان فايروس TYLCV يمكن ان ينتقل عن طريق البذور.

Recommendations

2-5: التوصيات

- 1- استعمال طريقة الاستخلاص المبتكرة في هذه الدراسة في استخلاص الـDNA من النباتات المريضة لتقييم مدى اصابتها بالفايروسات ذات الجينوم نوع الـDNA وأيضا إمكانية تطبيقها في حالة الإصابة بالفطريات او البكتريا او الديدان الثعبانية.
- 2- تطبيق تقنية الـNGS باستعمال الأسلوب المتبع في هذه الدراسة في التشخيص وتحديد الخصائص الجزيئية للفايروسات التي تصيب النبات المنتشرة في البيئة العراقية.
- 3- الاستمرار بالتحري عن الأنواع الأخرى التابعة للجنس *Begomovirus* وتوابعها في مزارع الطماطة وغيرها من المحاصيل المهمة في محافظة كربلاء والمحافظات المجاورة باستعمال نفس الأسلوب المتبع في هذه الدراسة.
- 4- التحري عن تأثير العلاقة بين سلالة TYLCV-Mid و التابع بيتا β satDNA في زيادة نسبة وشدة الإصابة مع ضرورة الكشف عن حدوث وتأثير هذا التابع في مزارع الطماطة في المحافظات الأخرى والعوائل النباتية الأخرى في العراق وذلك من اجل الفهم الكامل لوبائيات TYLCD.
- 5- دراسة إمكانية تأثير نوع سلالات فايروس TYLCV في عملية الانتقال عن طريق البذور وضرورة اجراء مسح للبذور المستوردة والمحلية قبل زراعتها للتأكد من خلوها من هذه الفايروسات.

ملحق (1): اثبات تسجيل الجينوم الكامل لسلسلة الفايروس *Tomato yellow leaf curl virus – Mild* strain TYLCV-Mld Karbala-1 في المركز الدولي لمعلومات التقانات الاحيائية ضمن بيانات الـ GenBank

 **National Library of Medicine**
National Center for Biotechnology Information

Nucleotide

GenBank ▾

Send to: ▾

Tomato yellow leaf curl virus - Mild strain TYLCV-Mld Karbala-1, complete genome

GenBank: ON254272.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS ON254272 2729 bp DNA linear VRL 21-MAY-2022
DEFINITION Tomato yellow leaf curl virus - Mild strain TYLCV-Mld Karbala-1,
complete genome.
ACCESSION ON254272
VERSION ON254272.1
KEYWORDS .
SOURCE Tomato yellow leaf curl virus - Mild
ORGANISM [Tomato yellow leaf curl virus - Mild](#)
Viruses; Monodnaviria; Shotokuvirae; Cressdnaviricota;
Repensiviricetes; Geplafuvirales; Geminiviridae; Begomovirus.
REFERENCE 1 (bases 1 to 2729)
AUTHORS Lahuf,A.A. and Abbas,M.O.
TITLE Complete genome of Tomato yellow leaf curl virus-Mild [Iraq:
Karbala]
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 2729)
AUTHORS Lahuf,A.A. and Abbas,M.O.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (15-APR-2022) Plant protection, University of Kerbala,
Shabanat street, Karbala, Karbala 00561, Iraq
COMMENT ##Assembly-Data-START##

ملحق (2): اثبات تسجيل الجينوم الكامل للتابع *Cotton leaf curl Gezira betasatellite isolate* في المركز الدولي لمعلومات التقانات الاحيائية ضمن بيانات الـ GenBank

Nucleotide

Nucleotide

Advanced

GenBank

Send to

Cotton leaf curl Gezira betasatellite isolate Karbala, complete sequence

GenBank: ON206651.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS ON206651 1356 bp DNA linear VRL 21-MAY-2022
DEFINITION Cotton leaf curl Gezira betasatellite isolate Karbala, complete
sequence.
ACCESSION ON206651
VERSION ON206651.1
KEYWORDS .
SOURCE Cotton leaf curl Gezira betasatellite
ORGANISM [Cotton leaf curl Gezira betasatellite](#)
Viruses; Tolecusatellitidae; Betasatellite.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1356)
AUTHORS Lahuf,A.A. and Abbas,M.O.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (10-APR-2022) Plant protection, University of Kerbala,
Shabanat street, Karbala, Karbala 00561, Iraq
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1356
/organism="Cotton leaf curl Gezira betasatellite"
/mol_type="genomic DNA"
/isolate="Karbala"
/host="Tomato"
/db_xref="taxon:304222"
/country="Iraq"

ملحق (3): اثبات إيداع قطعتي الجينوم الكامل بالاسمين Tomato leaf curl Palampur virus و segment A و segment B في المركز الدولي لمعلومات التقانات الاحيائية ضمن بيانات الـ GenBank



Nucleotide

Nucleotide

Advanced

GenBank

Send to

Tomato leaf curl Palampur virus segment A, complete sequence

GenBank: ON254271.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

LOCUS ON254271 2756 bp DNA linear VRL 21-MAY-2022
DEFINITION Tomato leaf curl Palampur virus segment A, complete sequence.
ACCESSION ON254271
VERSION ON254271.1
KEYWORDS .
SOURCE Tomato leaf curl Palampur virus
ORGANISM [Tomato leaf curl Palampur virus](#)
Viruses; Monodnaviria; Shotokuvirae; Cressdnaviricota;
Repensiviricetes; Geplafuvirales; Geminiviridae; Begomovirus.
REFERENCE 1 (bases 1 to 2756)
AUTHORS Lahuf,A.A. and Abbas,M.O.
TITLE First complete sequences of tomato leaf curl Palampur virus strain
Karbala-1 segment DNA-A infecting tomato crop in Iraq
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 2756)
AUTHORS Lahuf,A.A. and Abbas,M.O.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (15-APR-2022) Plant protection, University of Kerbala,



Nucleotide

Nucleotide

Advanced

GenBank

Send to

Tomato leaf curl Palampur virus segment B, complete sequence

GenBank: ON254270.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS ON254270 2720 bp DNA linear VRL 21-MAY-2022
DEFINITION Tomato leaf curl Palampur virus segment B, complete sequence.
ACCESSION ON254270
VERSION ON254270.1
KEYWORDS .
SOURCE Tomato leaf curl Palampur virus
ORGANISM [Tomato leaf curl Palampur virus](#)
Viruses; Monodnaviria; Shotokuvirae; Cressdnaviricota;
Repensiviricetes; Geplafuvirales; Geminiviridae; Begomovirus.
REFERENCE 1 (bases 1 to 2720)
AUTHORS Lahuf,A.A. and Abbas,M.O.
TITLE First complete sequence of tomato leaf curl Palampur virus segment
DNA-B infecting tomato crop in Iraq

ملحق (4): اثبات إيداع الجينوم الكامل *Tobacco vein clearing virus isolate Iraq-1* في المركز الدولي لمعلومات التقانات الاحيائية ضمن بيانات الـ GenBank



Nucleotide

Nucleotide

Advanced

GenBank

Send to:

Tobacco vein clearing virus isolate Iraq-1, partial genome

GenBank: ON684329.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

LOCUS ON684329 7760 bp DNA linear VRL 18-SEP-2022
DEFINITION Tobacco vein clearing virus isolate Iraq-1, partial genome.
ACCESSION ON684329
VERSION ON684329.1
KEYWORDS .
SOURCE Tobacco vein clearing virus
ORGANISM [Tobacco vein clearing virus](#)
Viruses; Riboviria; Pararnavirae; Artverviricota; Revtraviricetes;
Ortervirales; Caulimoviridae; Solendovirus.
REFERENCE 1 (bases 1 to 7760)
AUTHORS Lahuf,A.A. and Abbas,M.O.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (02-JUN-2022) Plant Protection, University of Kerbala,
Shabanat Street, Karbala, Karbala 00561, Iraq
COMMENT ##Assembly-Data-START##
Assembly Method :: SPAdes v. V3.15.4.
Sequencing Technology :: Illumina
##Assembly-Data-END##
FEATURES
Location/Qualifiers
source 1169..7760
/organism="Tobacco vein clearing virus"
/proviral
/mol_type="genomic DNA"
/isolate="Iraq-1"
/host="Solanum lycopersicum (tomato)"

المصادر العربية

- التميمي، سهير قاسم (2020). التشخيص الجزيئي لبعض عزلات فايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطة واختبار استجابة بعض التراكيب الوراثية للطماطة في مقاومته. أطروحة دكتوراه، كلية الزراعة-جامعة الكوفة، العراق.
- الجبوري، عفاف اركان عليوي (2014) التشخيص الجزيئي لفايروس تجعد و اصفرار اوراق الطماطة (TYLCV) باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) مع برنامج وقائي من الإصابة بالفايروس. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة الكوفة.
- الخزاعي، ضرغام عبد العزيز عبد (2021). العزل والتشخيص الجزيئي للذبابة البيضاء *Bemisia tabaci* (Gens) (Hemiptera: Aleyrodidae) مع تقييم كفاءة بعض المبيدات الحشرية مختبرياً وحقلياً في محافظة كربلاء. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة كربلاء، العراق.
- سلمان، محمد داود (2021). التشخيص الجزيئي لفايروسات النبات المنقولة بواسطة بعض الحشرات المنتشرة على عدد من العوائل النباتية في محافظة كربلاء باستعمال تقنية الجيل التالي. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة كربلاء، العراق .
- العابدي، علي حسن عطية (2021). تحديد الجينوم الكامل لفايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطة- السلالة المعتدلة TYLCV-Mild والفايروسات الداخلية المرافقة لنبات الطماطة في العراق باستعمال تقانة الجيل الجديد. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة الكوفة، العراق.
- عباس، زينب مسلم (2017). التشخيص الجزيئي لفايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطة والحشرة الناقلة ومقاومته باستعمال بعض التراكيب الوراثية لنبات الطماطة. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة كربلاء، العراق.
- كريم، مالك حسن (2016). التشخيص المناعي والجزيئي لفايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطة *tomato yellow leaf curl virus* وتقييم استجابة بعض أصناف الطماطة للاصابة. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة كربلاء، العراق.
- مكوك، خالد محي الدين وجابر إبراهيم فجلة و صفاء غسان قمري (2008). الامراض الفيروسية للمحاصيل الزراعية المهمة في المنطقة العربية. دارة النهضة العربية، بيروت، لبنان .
- المولى، عبد الكريم قاسم جر (2013). استخدام الطرائق الحيوية والجزيئية وتحليل التتابع الجيني في دراسة فايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطة في العراق وسبل مكافحته. أطروحة دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة البصرة، العراق.

المصادر الاجنبية

- Accotto, G.P.; Navas-Castillo, J.; Noris, E.; Moriones, E. and Louro, D. (2000). Typing of *Tomato yellow leaf curl viruses* in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 106: 179– 86.
- 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.
- Ajlan, A.M., Ghanem, G.A.M., Abdulsalam, K.S., 2007. *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) in Saudi Arabia: identification, partial characterization and virus– vector relationship. *Arab. J. Biotech.* 10, 179–192.
- Al-Abdallat, A.M.; Al-Debei, H.; Akash, M. ;Misbeh, S. and Kvarnhede, A. (2011). Complete Nucleotide Sequences and Construction of Infectious Clones of two jordanian isolates of *Tomato Yellow Leaf Curl Virus*. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 7(2): 273-283.
- Al-ani, R. A.; Adhab, M. A.; Hamad, S. A. H. and 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.
- Al-Ani, R.A.; Adhab, M.A. and Hamad, S.A. (2011). Evaluation of the efficiency of different techniques for extraction and purification of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). *Journal of Baghdad for Science* 8: 447–452.
- Ali, I.; Malik, A.H. and Mansoor, S. (2010). First report of *Tomato leaf curl Palampur virus* on bitter gourd in Pakistan. *Plant Disease*, 94(2):276.
- Alisawi, O. N. (2019). Virus integration and tandem repeats in the genomes of *Petunia*. Ph. D. dissertation. University of Leicester. UK. 216 pp.
- Al-Jubouri, A.A.; Al- Fadhal, F. A. and Samaka, H. M. (2014). Detection of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) and its strains on *Tomato* plants and

host rang determine by Polymerase Chain Reaction. Kufa Journal for Agricultural Sciences, 7(4):99-117.

- Al-Kuwaiti, N.; Otto, B.; Collins, C.; Seal, S. and Maruthi, M. (2013). Molecular characterization and first complete genome sequence of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) infecting tomato in Iraq. *New Disease Report*, 27:17.
- Amin, I., Ahmed, N., Kamal, H., & Mansoor, S. (2021). *Geminiviruses* and their interaction with host proteins. In *Plant Virus-Host Interaction* (pp. 191-229). Academic Press.
- Amin, I.; Hussain, K. ; Akbergenov, R. ; Yadav, J. S. ; Qazi, J. ; Mansoor, S. and Briddon, R. W. (2011). Suppressors of RNA silencing encoded by the components of the cotton leaf curl begomovirus-betasatellite complex. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24(8): 973-983.
- 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/>.
- Anfoka, G. ; Abhary, M. ; Haj Ahmad, F. ; Hussein,A.F. ; Rezk, A. ; Akad, F. ; Abou-Jawdah, Y. ; ,Lapidot, M. ; Vidavski, F. ; Nakhla, M.K. ; Sobh, H. ;Atamian, H. ; Cohen, L. ; Sobol, I. ; Mazyad, H. ;Maxwell, D.P. and Czosnek, H. (2008). Survey of *tomato yellow leaf curl* disease-associated viruses in the eastern.
- Awasthi, L.P. (2020). *Applied plant virology advances, detection, and antiviral strategies*. Academic Press is an imprint of Elsevier, London, UK.
- Bananej, K. A.; Kheyr-Pour. G. H. Salekdeh and Ahoonmanesh, A. (2004). Complete nucleotide sequence of Iranian *Tomato yellow leaf curl virus* isolate: further evidence for natural recombination amongst *Begomoviruses*. *Archive of Virology*, 149: 1435-1443.

- 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. (2014). Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. *Viruses*, 6, 106-136.
- Basak J. (2016). *Tomato yellow leaf curl virus*: a serious threat to tomato plants worldwide. *J Plant Pathol Microbiol.* 7:346.
- Batista, J. G.; Nery, F., Melo, F.; Malheiros, M. F.; Rezende, D. V.; Boiteux, L. S.; Fonseca, M.; de Miranda, B. and Pereira-Carvalho, R. C. (2022). Complete genome sequence of a novel bipartite *begomovirus* infecting the legume weed *Macroptilium erythroloma*. *Archives of virology*, 167(7), 1597–1602.
- Bernt, M.; Donath, A.; Ju`hling, F.; Externbrink, F.; Florentz, C.; Fritsch, G. Pu`tz, J. et al. (2013). MITOS: Improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69:313–319.
- 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.
- Briddon, R. W., & Stanley, J. (2006). Subviral agents associated with plant single-stranded DNA viruses. *Virology*, 344(1), 198–210.
- Briddon, R.W.; Patil, B.L.; Bagewadi, B.; Nawaz-ul-Rehman, M.S. and Fauquet, C.M. (2010). Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite *begomoviruses*. *BMC Evolutionary Biology*, 10: 97.

- Brown, J.K.; Zerbini, F.M.; Navas-Castillo, J.; Moriones, E.; Ramos-Sobrinho, R.; Silva, J.C.; Fiallo-Olivé, E.; Briddon, R.W.; Hernández-Zepeda, C.; Idris, A.; Malathi, V.G.; Martin, D.P.; Rivera-Bustamante, R. Ueda, S. and Varsani, A. (2015). Revision of *Begomovirus* taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Archive Virology*, 160(6):1593-619.
- Camacho, C.; Coulouris, G.; Avagyan, V.; Ma, N.; Papadopoulos, J.; Bealer, K. and Madden, T. L. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC bioinformatics*, 10: 421.
- 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.
- 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.
- Chiu, C.W.; Li, Y.R.; Lin, C.Y.; Yeh, H.H. and Liu, M.J. (2022). Translation initiation landscape profiling reveals hidden open-reading frames required for the pathogenesis of *Tomato yellow leaf curl Thailand virus*. *Plant Cell*. 34:1804–21.
- Cohen, S. and Harpaz, I. (1964). Periodic, rather than continual acquisition of a new tomato virus by its vector, the tobacco whitefly (*Bemisia tabaci* Gennadius). *Entomol Exp Appl.*, 7:155–66.
- Cui, X.; Tao, X.; Xie, Y.; Fauquet, C. and Zhou, X. A. (2004). DNA β associated with *Tomato yellow leaf curl China virus* is required for symptom induction. *Journal of Virology*, 78:13966–74.

- Das, S.; Roy, A.; Ghosh, R.; Paul, S.; Acharyya, S.; and Ghosh, S.K.; (2008). Sequence variability and phylogenetic relationship of betasatellite isolates associated with *yellow vein mosaic* disease of mesta in India. *Virus Genes*, 37:414–424.
- 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.
- Devendran, R.; Namgial, T.; Reddy, K.K.; Kumar, M.; Zarreen, F. and Chakraborty, S.; (2022). Insights into the multifunctional roles of *geminivirus*-encoded proteins in pathogenesis. *Arch Virol.*, 167:307–26
- Díaz-Pendón, J.A. (2019). *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus*, a *Begomovirus* species evolving by mutation and recombination: a challenge for virus control. *Viruses* 11: 45.
- Dry, I. B.; Krake, L. R.; Rigden, J. E. and Rezaian, M. A. (1997). A novel subviral agent associated with a *geminivirus*: the first report of a DNA satellite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(13): 7088–7093.
- 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.
- EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health) (2014). Scientific opinion on the pest categorization of *Tomato yellow leaf curl virus* and related viruses causing *tomato yellow leaf curl* disease in Europe. *EFSA Journal*,12(10):3850.
- 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.

- Fereres, A. and Raccach, B. (2015). Plant Virus Transmission by Insects. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Ferro, C. G.; Zerbini, F. M.; Navas-Castillo, J. and Fiallo-Olivé, E. (2021). Revealing the Complexity of *Sweepovirus*-Deltasatellite-Plant Host Interactions: Expanded Natural and Experimental Helper Virus Range and Effect Dependence on Virus-Host Combination. *Microorganisms*, 9(5): 1018.
- Fiallo-Olivé, E. et al. (2019). Recurrent speciation of a *Tomato yellow leaf curl geminivirus* in Portugal by recombination. *Sci. Rep.*, 9: 1332
- Fiallo-Olivé, E.; Lett, J.M.; Martin, D.P.; Roumagnac, P.; Varsani, A. Zerbini, F.M. et al. (2021). ICTV virus taxonomy profile: *Geminiviridae* *J Gen Virol.*, 102:001696.
- Fiallo-Olivé, E.; Martínez-Zubiaur, Y.; Moriones, E. and Navas-Castillo, J. (2012). A novel class of DNA satellites associated with New World *begomoviruses*. *Virology*, 426(1): 1–6.
- 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.
- Gaikwad, K. A.; Sharma, A. Cheema, D. S. (2011). Molecular detection and characterization of leaf curl virus infecting tomato in Punjab, India. *Acta Horticulture*, 153-156.
- Ge, L. (2007). Genetic structure and population variability of *Tomato yellow leaf curl China virus*. *J. Virol.*, 81:5902–5907.
- Geering, A.D.; Maumus, F.; Copetti, D.; Choisne, N.; Zwickl, D. J. and Zytnicki, M.; (2014). Endogenous florendoviruses are major components of plant genomes and hallmarks of virus evolution. *Nature Communications*, 5(1):5269.

- Ghosh, S., Kanakala, S., Lebedev, G., Kontsedalov, S., Silverman, D., Alon, T., ... & Ghanim, M. (2019). Transmission of a new polerovirus infecting pepper by the whitefly *Bemisia tabaci*. *Journal of virology*, 93(15), e00488-19.
- Glick, M.; Levy, Y. and Gafni, Y. (2009). The Viral Etiology of *Tomato Yellow Leaf Curl* Disease – A Review. *Plant Protection Sciences*, 3: 81–97.
- Gong, P.; Tan, H.; Zhao, S.; Li, H.; Liu, H.; Ma, Y. et al. (2021). *Geminiviruses* encode additional small proteins with specific subcellular localizations and virulence function. *Nat Commun.* 12:4278.
- Gong, P.; Zhao, S.; Liu, H.; Chang, Z.; Li, F. and Zhou, X. (2022). *Tomato yellow leaf curl virus* V3 protein traffics along microfilaments to plasmodesmata to promote virus cell-to-cell movement. *Sci China Life Sci.* 65:1046–9.
- 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.
- Green, M.R. and Sambrook, J. (2019). Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocol*. Feb 1; 2019(2).
- Guevara-Rivera, E. A.; Rodríguez-Negrete, E. A.; Aréchiga-Carvajal, E. T.; Leyva-López, N. E. and Méndez-Lozano, J. (2022). From Metagenomics to Discovery of New Viral Species: Galium Leaf Distortion Virus, a Monopartite *Begomovirus* Endemic in Mexico. *Frontiers in microbiology*, 13: 843035.
- Guo, Y.; Jia, M.; Li, S. and Li, F. (2022). *Geminiviruses* boost active DNA demethylation for counter-defense. *Trends Microbiol.*
- Hadidi, A. (2019). Next-generation sequencing and CRISPR/Cas13 editing in viroid research and molecular diagnostics. *Viruses*, 11: 120.
- Hames, B. D., & Hooper, N. M. (2005). *Biochemistry*. Garland Science.

- Hanley-Bowdoin, L., Settlage, S. B., Orozco, B. M., Nagar, S., & Robertson, D. (2000). Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 35(2), 105-140.
- Hanley-Bowdoin, L.; Settlage, S. B.; Orozco, B. M.; Nagar, S. and Robertson, D. (2000). *Geminiviruses*: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 35(2): 105–140.
- Hanssen, I. M. and Lapidot, M. (2012). Major Tomato Viruses in the Mediterranean Basin. *Advances in Virus Research*, 84:31-66.
- Harper G.; R. Hull.; B. Lockhart and Olszewski N. (2002). Viral sequences integrated into plant genomes. *Annual Review of Phytopathology*, 40(1): 119-136.
- Hassan, I.; Orílio, A. F.; Fiallo-Olivé, E.; Briddon, R. W. and Navas-Castillo, J. (2016). Infectivity, effects on helper viruses and whitefly transmission of the deltasatellites associated with *sweepoviruses* (genus *Begomovirus*, family *Geminiviridae*). *Scientific reports*, 6: 30204.
- He, Y. Z.; Wang, Y. M.; Yin, T. Y.; Fiallo-Olivé, E.; Liu, Y. Q.; Hanley-Bowdoin, L. and Wang, X. W. (2020). A plant DNA virus replicates in the salivary glands of its insect vector via recruitment of host DNA synthesis machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(29), 16928–16937.
- Heather, J. M. and Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107 (1): 1-8.
- Hesketh, E.L.; Saunders, K.; Fisher, C. et al. (2018). The 3.3 Å structure of a plant *geminivirus* using cryo-EM. *Nature Communications*, 9: 2369.

- Heslop-Harrison, J.S. (2000). Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes. *Plant Cell*. 2000, 12: 617-635.
- Heydarnejad, J.; Hesari, M.; Massumi, H. and Varsani A. (2013). Incidence and natural hosts of *Tomato leaf curl Palampur virus* in Iran. *Australasian Plant Pathology*, 42: 195-203.
- Holmes, E.C. (2011). The evolution of endogenous viral elements. *Cell Host and Microbe*, 10(4):368–77.
- <https://ictv.global/report/chapter/geminiviridae/geminiviridae/begomovirus>
- <https://phytopatholres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s42483-022-00133-1>
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128216293000245>
- Hu, T.; Song, Y.; Wang, Y. and Zhou, X. (2020). Functional analysis of a novel β V1 gene identified in a *geminivirus* betasatellite. *Sci China Life Sci*. 63:688–696.
- Hull, R. (2014). *Plant Virology*. 5th Edition, Academic Press, London, UK.
- ICTV. (2021). *Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses*. The online report of the ICTV. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report.
- Idris, A. M.; Shahid, M. S.; Briddon, R. W.; Khan, A. J.; Zhu, J. K. and Brown, J. K. (2011). An unusual alphasatellite associated with monopartite *begomoviruses* attenuates symptoms and reduces betasatellite accumulation. *The Journal of general virology*, 92(Pt 3): 706–717.
- Idris, A.; S. Smith. and Brown, J. K. (2001). Ingestion, transmission persistence of *chino del tomato virus* (CDTV), a new world biotypes' of the whitefly vector *Bemisia tabaci* (Genn.). *Annals of Applied Biology*, 193:145-154.

- Illumina. (2021). Illumina Sequencing Methods. at: <https://www.illumina.com/techniques/sequencing.html> (Accessed on 6th of August 2022).
- Ilyas, M.; Qazi, J.; Mansoor, S. and Briddon, R. W. (2009). Molecular characterisation and infectivity of a "*Legumovirus*" (genus *Begomovirus*: family *Geminiviridae*) infecting the leguminous weed *Rhynchosia minima* in Pakistan. *Virus research*, 145(2): 279–284.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (2021).
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). (2021). Error! Hyperlink reference not valid..org/taxonomy/. Retrieved 26 September 2021.
- Jakowitsch, J.; Mette, M. F.; van der Winden, J.; Matzke, M.A. and Matzke, A.J.M.. (1999). Integrated pararetroviral sequences define a unique class of dispersed repetitive DNA in plants. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96:13241-13264.
- 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.
- Kapoor, A. and Lipkin, W.I. (2001). Virus discovery in the 21st century. In: eLS. Wiley.
- 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.,
- Kashino-Fujii, M.; Yokosho, K.; Yamaji, N.; Yamane, M.; Saisho, D. Sato K., et al. (2018). Retrotransposon insertion and DNA methylation regulate aluminum tolerance in European barley accessions. *Plant Physiology*, 178(2):716–727.

- Katzourakis A. and Gifford, R.J. (2010). Endogenous viral elements in animal genomes. *PLOS Genetics*, 6(11): e1001191.
- Khan, A. J.; Idris, N. A. ; Al-Saady, M. S.; Al-Mahruki, A. M. and Al- Subhi, J. K. B. (2008). A divergent isolate of *tomato yellow leaf curl virus* from Oman with an associated DNA beta satellite: an evolutionary link between Asian and the Middle Eastern virus-satellite complexes. *Virus Genes*, 36: 169-176.
- Kil, E. J.; Park, J.; Choi, E. Y.; Byun, H. S.; Lee, K. Y.; An, C.G.; Lee, J. H.; Lee, G. S.; Choi, H.-S. Kim, C. S. et al. (2017). Seed transmission of *Tomato yellow leaf curl virus in sweet pepper* (*Capsicum annuum*). *European Journal Plant. Pathology*, 150: 759–764.
- Kil, E. J.; Vo, T.; Fadhila, C.; Ho, P. T.; Lal, A.; Troiano, E.; Parrella, G. and Lee, S. (2020). Seed Transmission of *Tomato leaf curl New Delhi virus* from Zucchini Squash in Italy. *Plants*, 9(5), 563.
- Kil, E.J.; Kim, S.; Lee, Y.J.; Byuan, H.S.; Park, J.; Seo, H.; Kim, C.S.; Shim, J.K.; Lee, J.H.; Kim, J.K. et al. (2016). *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV-IL): A seed transmissible *geminivirus* in tomatoes. *Scientific Report*, 6: 19013.
- King, M. (2010). *RT-PCR Protocols Second Edition*. Humana Press, Totowa, NJ, USA.
- Köklü, G.; Rojas, A.; and Kvarnheden, A. (2006). Molecular identification and the complete nucleotide sequence of a *tomato yellow leaf curl virus* isolate from Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 88: 61-66.
- 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.
- Kosakovsky, P. S.L.; Posada, D.; Gravenor, M.B.; Woelk, C.H. and Frost, S.D.W. (2006). Automated phylogenetic detection of recombination using a genetic algorithm. *Molecular Biology and Evolution*, 23: 1891–1901.

- Kulshreshtha, A.; Roshan, P.; Sharma, D. and Hallan, V. (2017). Molecular characterization of a new *begomovirus* infecting *Mirabilis jalapa* in northern India. *Archive Virology*, 162(7):2163–2167.
- Kumar, J.; Kumar, A.; Roy, J.K.; Tuli, R. and Khan, J.A. (2010). Identification and molecular characterization of *begomovirus* and associated satellite DNA molecules infecting *Cyamopsis tetragonoloba*. *Virus Genes* 41(1):118–125.
- Kumar, R.; Palicherla, S.R.; Mandal, B. and Kadiri, S. (2018). PCR based detection of betasatellite associated with the *begomoviruses* using improved universal primers. *Australas Plant Pathol.* 47(1):115–118.
- 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.
- Kumar, Y.; Hallan, V. and Zaidi A.A. (2008). Molecular characterization of a distinct bipartite *begomovirus* species infecting tomato in India. *Virus Genes*, 37(3):425-431.
- Kumar, Y.; Hallan, V.; and Zaidi, A.A. (2011). First report of ageratum enation virus infecting *Crassocephalum crepidioides* (Benth.) S. Moore and *Ageratum conyzoides* L. in India. *Journal of General Plant Pathology*, 77(3):214–216.
- 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.
- Lahuf, A. A.; Jaafar, O. H. and Hameed, Z. L. (2019). A simple, rapid, safe and low-cost method to extract DNA from phytopathogenic fungi. *Asian J Agric & Biol.* 7(2):197-203.

- 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.
- Leeks, A.; West, S. A. and Ghoul, M. (2021). The evolution of cheating in viruses. *Nature communications*, 12(1): 6928.
- Lefeuvre, P. and Moriones, E. (2015). Recombination as a motor of host switches and virus emergence: *geminiviruses* as case studies. *Curr. Opin. Virol.*, 10: 14–19.
- Lefeuvre, P.; Martin, D. P.; Harkins, G.; Lemey, P.; Gray, A. J.; Meredith, S.; Lakay, F.; Monjane, A.; Lett, J. M.; Varsani, A. and Heydarnejad, J. (2010). The spread of *tomato yellow leaf curl virus* from the Middle East to the world. *PLoS pathogens*, 6(10): e1001164.
- Li, F., Qiao, R., Yang, X., Gong, P., & Zhou, X. (2022). Occurrence, distribution, and management of tomato yellow leaf curl virus in China. *Phytopathology Research*, 4(1), 1-12.
- Li, F.; Qiao, R.; Wang, Z.; Yang, X. and Zhou, X. (2022a). Occurrence and distribution of *geminiviruses* in China. *Sci China Life Sci.* 2022.
- Li, F.; Qiao, R.; Yang, X.; Pan Gong,P.; and Zhou, X. (2022b). Occurrence, distribution, and management of *tomato yellow leaf curl virus in China*. *Phytopathology Research* 4: 28
- 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.

- Lipkin, W.I. and Firth, C. (2013). Viral surveillance and discovery. *Curr Opin Virol* 3:199–204.
- Lockhart, B.E. J.; Menke, G.; Dahal. and N.E. Olszewski. (2000). Characterization and genomic analysis of tobacco vein clearing virus, a plant pararetrovirus that is transmitted vertically and related to sequences integrated in the host genome. *Journal of General Virology*, 81(6):1579–1585.
- 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.
- Lozano, G.; Trenado, H. P.; Fiallo-Olive, E.; Chirinos, D.; Geraud-Pouey, F. Briddon, R. W. et al. (2016). Characterization of non-coding DNA satellites associated with *sweepoviruses* (Genus *Begomovirus*, *Geminiviridae*)-definition of a distinct class of *begomovirus*-associated satellites. *Front. Microbiology*, 7: 162.
- Luna, A.P.; Morilla, G.; Voinnet, O. and Bejarano ER. (2012). Functional analysis of gene silencing suppressors *from tomato yellow leaf curl disease viruses*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 25:1294–306.
- Mahon, C. R. and Lehman, D. C. (2019). *Textbook of diagnostic microbiology*, Sixth edition. Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, USA.
- Manmohan, D.; Abhishek, S.; and Gurpreet, K. (2020). First report of *tomato leaf curl Palampur virus* infecting muskmelon in India. *Journal of Plant Pathology*, 102 (4): 1367-1367.
- Mansoor, S.; Briddon, R. W.; Zafar, Y. and Stanley, J. (2003). Geminivirus disease complexes: an emerging threat. *Trends in plant science*, 8(3): 128–134.
- Manzanilla-Lopez, R.H.; Clark, I.M.; Atkins, S.D.; Hirsch, P.R. and Kerry, B.R. (2008). Rapid and reliable DNA extraction and PCR fingerprinting

methods to discriminate multiple biotypes of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* isolated from plant rhizospheres. *Letters in Applied Microbiology*, 48 :71–76.

- Marchant, W.G.; Gautam, S.; Hutton, S.F. and Srinivasan, R. (2020). *Tomato Yellow Leaf Curl Virus*-Resistant and -Susceptible Tomato Genotypes Similarly Impact the Virus Population Genetics. *Frontiers in Plant Science*, 11: 599697.
- Mardis, E.R. (2008). The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet* 3: 133-141.
- Martin, D.P.; Murrell, B.; Golden, M.; Khoosal, A. and Muhire, B. (2015) RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution*, 1:vev003.
- Marwal, A.; Sahu, A.; Sharma, P. and Gaur, R. K. (2013). Molecular characterizations of two *begomoviruses* infecting *Vinca rosea* and *Raphanus sativus* in India. *Virologica Sinica*, 28(1): 53–56.
- Mohammed, D.; Adhab, M. & Al-Kuwaiti, N. (2021). Molecular characterization of viruses associated to leaf curl disease complex on zucchini squash in Iraq reveals Deng primer set could distinguish between New and Old World *Begomoviruses*. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 93.
- Mokili, J.L.; Rohwer, F. and Dutilh, B.E. (2012). Metagenomics and future perspectives in virus discovery. *Curr Opin Virol* 2:63–77.
- Monci, F. (2002) A natural recombinant between the *geminiviruses* *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. *Virology*, 303: 317–326.

- Mubin, M. Akhtar, S.; Amin, I.; Briddon, R.W. and Mansoor, S. (2012). *Xanthium strumarium*: a weed host of components of *begomovirus*-betasatellite complexes affecting crops. *Virus Genes*, 44:112–119.
- Mugerwa, H.; Seal, S.; Wang, H.-L.; Patel, M.V.; Kabaalu, R.; Omongo, C.A.; Alicai, T.; Tairo, F.; Ndunguru, J. and Sseruwagi, P. (2018). African ancestry of New World, *Bemisia tabaci*-whitefly species. *Scientific Reports*, 8(1): 2734.
- Muhire, B.M.; Varsani, A. and Martin, D.P.(2014) SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PLoSOne*, 9:e108277.
- 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.
- Navas-Castillo, J.; Fiallo-Olivé, E. and Sánchez-Campos, S. (2011). Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annual Review Phytopathology*, 49:219-48. doi: 10.1146/annurev-phyto-072910-095235. PMID: 21568700.
- Navot, N., Pichersky, E.; Zeidan, M.; Zamir, D. and Czosnek, H. (1991). *Tomato yellow leaf curl virus*: A whitefly-transmitted *geminivirus* with a single genomic component. *Virology*, 185(1):151-161,
- Padmanabhan, C.; Zheng, Y.; Shamimuzzaman, M.; Wilson, J. R.; Gilliard, A.; Fei, Z. and Ling, K. S. (2022). The *tomato yellow leaf curl virus* C4 protein alters the expression of plant developmental genes correlating to leaf upward cupping phenotype in tomato. *PloS one*, 17(5): e0257936.
- Panno, S. (2018). The nucleotide sequence of a recombinant *Tomato yellow leaf curl virus* strain frequently detected in Sicily isolated from tomato plants carrying the Ty-1 resistance gene. *Arch. Virol.*, 163: 795–797.

- Papayiannis, L.C.; Katis, N.I.; Idris, A.M. and Brown, J.K. (2011). Identification of weed hosts of *Tomato yellow leaf curl virus* in Cyprus. *Plant Disease*, 95:120–5. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-10-0346>.
- Paprotka, T.; Metzler, V. and Jeske, H. (2010). The first DNA 1-like alpha satellites in association with New World *begomoviruses* in natural infections. *Virology*, 404(2): 148–157.
- 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.
- Pérez-Padilla, V.; Fortes, I.M.; Romero-Rodríguez, B.; Arroyo-Mateos, M.; Castillo, A.G.; Moyano, C, et al. (2020). Revisiting seed transmission of the type strain of *tomato yellow leaf curl virus* in tomato plants. *Phytopathology*, 110:121–9.
- Peter, K. A.; Gildow, F.; Palukaitis, P. and Gray, S. M. (2009). The C terminus of the Polerovirus P5 readthrough domain limits virus infection to the phloem. *Journal of Virology*, 83: 5419-5429.
- Peter, K.A.; Liang, D.L.; Palukaitis, P.; Gray, S.M. (2008). Small deletions in the *potato leafroll virus* readthrough protein affect particle morphology, aphid transmission, virus movement and accumulation. *Journal of General Virology*, 89: 2037–2045.
- Prasad, A.; Sharma, N.; Hari-Gowthem, G.; Muthamilarasan, M. and Prasad, M. (2020). *Tomato yellow leaf curl virus*: impact, challenges, and management. *Trends Plant Sci.*, 25:897–911.
- Richert-Pöggeler, K.R. ; Noreen, F.; Schwarzacher, T.; Harper, G. and Hohn, T. (2003). Induction of infectious *Petunia vein clearing (pararetro) virus* from endogenous provirus in *petunia*. *EMBO Journal*, 22: 4836-45.

- 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.
- 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.
- Romay, G.; Chirinos, D.; Geraud-Pouey, F. and Desbiez, C. (2010). Association of an atypical alphasatellite with a bipartite New World *begomovirus*. *Archives of virology*, 155(11): 1843–1847.
- Roossinck, M. J.; Sleat, D. and Palukaitis, P. (1992). Satellite RNAs of plant viruses: structures and biological effects. *Microbiological reviews*, 56(2): 265–279.
- Rosario, K.; Padilla-Rodriguez, M.; Kraberger, S.; Stainton, D.; Martin, D. P.; Breitbart, M. and Varsani, A. (2013). Discovery of a novel mastrevirus and alphasatellite-like circular DNA in dragonflies (Ephemeroptera) from Puerto Rico. *Virus research*, 171(1): 231–237.
- Rosas-Diaz, T.; Macho, A.P.; Beuzon, C.R.; Lozano-Duran, R. and Bejarano, E.R. (2016). The C2 protein from the *geminivirus tomato yellow leaf curl Sardinia virus* decreases sensitivity to jasmonates and suppresses jasmonate-mediated defences.
- Rubio, L.; Galipienso, L. and Ferriol, I. (2020). Detection of plant viruses and disease management: relevance of genetic diversity and evolution. *Frontiers Plant in Science*, 11:1092.
- 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.
- Sattar, M.N. (2012). Diversity and Interactions of *Begomoviruses* and their associated DNA-Satellites. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- Saunders, K.; Bedford, I. D.; Briddon, R. W.; Markham, P. G.; Wong, S. M. and Stanley, J. (2000). A unique virus complex causes Ageratum yellow vein disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12): 6890–6895.
- Saunders, K.; Bedford, I.D.; Yahara, T. and Stanley, J. (2003). Aetiology: the earliest recorded plant virus disease. *Nature*, 422:831.
- Saxena, S. and Tiwari, A. K. (2017) *Begomoviruses: Occurrence and Management in Asia and Africa*. Springer Nature, Singapore.
- Schmidt T. and J.Heslop-Harrison. 1998. Genomes, genes and junk: the large-scale organization of plant chromosomes. *Trends in Plant Science*, 3: 195-9.
- Smith, L.; Sanders, J.; Kaiser, R. et al. (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, 321: 674–679.
- Staginnus, C.; Gregor, G.; M.F.Mette; C.H. Teo; E.G. Borroto-Fernandez; M.L.d.C. Machado; M. Matzke and Schwarzacher T.(2007). Endogenous pararetroviral. sequences in tomato (*Solanum lycopersicum*) and related species.(Research article)(Clinical report). *BMC Plant Biology*, (7): 24-40.
- Tabein, S.; Miozzi, L.; Matić, S.; Accotto, G.P.; Noris, E. (2021). No Evidence for Seed Transmission of *Tomato Yellow Leaf Curl Sardinia Virus* in Tomato. *Cells*, 10: 1673.

- Thorburn, F. (2016). The use of next generation sequencing in the diagnosis and typing of viral infections. PhD thesis, University of Glasgow, Scotland, UK.
- Trenado, H. P.; Orílio, A. F.; Márquez-Martín, B.; Moriones, E. and Navas-Castillo, J. (2011). *Sweepoviruses* cause disease in sweet potato and related *Ipomoea* spp.: fulfilling Koch's postulates for a divergent group in the genus *begomovirus*. PloS one, 6 (11): e27329.
- 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.
- van der Want, J. P. H. and Dijkstra, J. (2006). A history of plant virology. Archives of Virology 151:1467-1498.
- van Regenmortel, H. V.; Bishop, D. H. L.; Fauquet, C. M.; Mayo, M. A.; Maniloff, J. and Calisher, C. H. (1997). Guidelines to the demarcation of virus species. Archives of virology 142: 1505–15018.
- 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.
- Voelkerding, K.V.; Dames, S.A. and Durtschi, J.D. (2009). Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. Clin. Chem. 55: 641-658.
- Wang, A. and Zhou, X. (2016). Current Research Topics in Plant Virology. Springer International Publishing, The Netherland.
- Wang, B.; Yang, X.; Wang, Y.; Xie, Y. and Zhou, X. (2018). *Tomato yellow leaf curl virus* V2 interacts with host histone deacetylase 6 to suppress methylation-mediated transcriptional gene silencing in plants. J Virol., 92:e00036-e118.
- Wang, J.; Yu, W.; Yang, Y.; Li, X.; Chen, T.; Liu, T.; Ma, N.; Yang, X.; Liu, R. and Zhang, B. (2015). Genome-wide analysis of tomato long non-coding

RNAs and identification as endogenous target mimic for microRNA in response to TYLCV infection. *Sci Rep.* 5: 16946

- Wang, L.; Ding, Y.; He, L.; Zhang, G.; Zhu, J.K. and Lozano-Duran, R. (2020). A virus-encoded protein suppresses methylation of the viral genome through its interaction with AGO4 in the Cajal body. *Elife.* 9:e55542.
- Watson, J.D. and Crick, F.H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 25:(171):4356.
- Weaver, S.; Shank, S.D.; Spielman, S.J.; Li, M.; Muse, S.V. and Kosakovsky, P.S.L. (2018). Datamonkey 2.0: A modern web application for characterizing selective and other evolutionary processes. *Molecular Biology and Evolution*, 35:773–7.
- Webster, C. G.; Wylie, J. S. and Jones, M. G. K. (2004). Diagnosis of plant viral pathogens. *Current Science*, 86: 1604-1607.
- Wei, J.; He, Y.Z.; Guo, Q.; Guo, T.; Liu, Y.Q.; Zhou, X.P. et al. (2017). Vector development and vitellogenin determine the transovarial transmission of *begomoviruses*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 114:6746–6751.
- 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*.
- Wu, J.B.; Dai, F.M. and Zhou, X.P. (2006). First report of *tomato yellow leaf curl virus* in China. *Plant Disease*, 90:1359.
- Wu, M.; Wei, H.; Tan, H.; Pan, S.; Liu, Q.; Bejarano, E.R. et al. (2021). Plant DNA polymerases alpha and delta mediate replication of *geminiviruses*. *Nat Commun.*,12:2780.
- Xiao T. and Zhou W. (2020). The third-generation sequencing: the advanced approach to genetic diseases. *Translational Pediatrics*, 9: 163–173.

- Yang, X. (2017). Molecular variation of *Tomato yellow leaf curl virus* in the insect vector *Bemisia tabaci*. *Sci. Rep.*, 7:16427.
- Yassin, A. M. & Nour, M. A. (1965). *Tomato leaf curl* disease in the Sudan and their relation to *tobacco leaf curl*. *Ann. Appl. Biol.* 56, 207–217.
- Zhang, Y.J.; Zhang, S.; Liu, X.Z.; Wen, H.A. and Wang, M. (2010). A simple method of genomic DNA extraction suitable for analysis of bulk fungal strains. *Letters in Applied Microbiology*, 51: 114–118.
- Zhao, S.; Gong, P.; Ren, Y.; Liu, H.; Li, H.; Li, F. et al. (2022). The novel C5 protein from *tomato yellow leaf curl virus* is a virulence factor and suppressor of gene silencing. *Stress Biol.* 2022.
- Zhou X. (2013). Advances in understanding *begomovirus* satellites. *Annual review of phytopathology* 51: 357–381.

The aim of the current study was to identify the plant viruses belong to *Begomovirus* genus that infect a number of plant hosts in Karbala Province using the new molecular techniques.

Different viral symptomatic plant samples were collected from tomato plants of Karbala Province, okra plants from Babylon Province, and potato plants from Baghdad and Babylon Provinces in the growing season of 2021-2022. The DNA was extracted from these samples using a commercial kit and a developed extraction method. The Polymerase Chain Reaction (PCR) test was applied using specific primers that detect different species of *Begomovirus* genus in addition to Realtime-PCR (RT-PCR). Furthermore, the Next Generation Sequencing (NGS) technique, type Metagenomics was utilized to identify *Begomoviruses* accompanying with the infected plants.

The results showed that the new developed extraction method succeeded in extraction the total genomic DNA from TYLCV infected plants. The extraction method exploiting sodium hypochlorite (NaOCl) alone or followed by DNA precipitation process were better than using the distilled water alone or with DNA precipitation. However, the commercial extraction kit provided the highest concentration and purity of DNA extracted from same infected plants. Additionally, the primer pair (PBL1v2040-F and PAR1c496-R) succeed in amplification and detection of some *Begomovirus* species. On the other hand, the rest of primers did not success in detection of the *Begomoviruses*.

Although, the DNA samples of potato and okra plants failed in accomplishment of the NGS sequences, the tomato DNA samples success by obtaining 52,606,000 paired ends reads with length of 151 nt that were produced for the Metagenomics data. The results of NGS data proved existing several contigs that were similar or identical to the reference sequence of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). They covered completely the full length of the viral genome and their consensus sequence

size was 2729 nt. The genome produced was a single circular strand of monopartite DNA comprising the main six genes coding the main proteins of the TYLCV in addition to the non-coding intergenic region. Furthermore, the phylogenetic analysis confirmed the genetic relationship of the identified viral strain with many of global TYLCV mild strains particularly the *Tomato yellow leaf curl virus* isolate TYLCV-Najaf (MT583814.1). This full genome was deposited in the NCBI-GenBank data with name *Tomato yellow leaf curl virus* - Mild strain Karbala-1 under accession number ON254272.1. Moreover, the recombination and reassortment processes were not found in the genome of the TYLCV-Mild Karbala-1 identified in this study. The results also evidenced that this strain was the predominant TYLCV strain in the surveyed tomato fields. This identification is the first record in Karbala Province, Iraq.

Nevertheless, there was no raw reads or contigs similar to the Alpha or Delta satellites, it was discovered 12,712 raw reads and 9 contigs that were comparable and covered completely the full genome of the Beta satellite Cotton leaf curl Gezira betasatellite isolate Al-Ain (KM279620.1) with similarity percentage reached to 94.99%. This identification was confirmed through phylogenetic analysis. Thus, full genome of the Beta satellite obtained was saved in the NCBI-GenBank database under name *Cotton leaf curl Gezira* betasatellite isolate Karbala with accession number ON206651.1, which is considered also the first report to this satellite in Iraq.

As well as, the results revealed a numerous contigs that were similar to the Segment A and segment B of *Tomato leaf curl palampur virus* (ToLCPaLV) that was a single bipartite genome. These related contigs had genes organization identical to genome of ToLCPaLV by containing analogous six genes in the segment A and two genes in the segment B besides the intergenic regions in both

segments. Although, this virus was identified previously on zucchini, datura and cucumber plants, this is first report of it infecting tomato plants in Iraq.

It was also found in this study the full genome of the endogenous pararetrovirus *Tobacco vein clearing virus* in the host genome of tomato (*Solanum lycopersicum*) with similarity percentage 87.4% and covered percentage 98.1%. This identification was confirmed through the phylogenetic analysis. Consequently, the consensus double strands DNA 7760 nt genome sequence was deposited in the NCBI-Genbank under accession number ON684329 with the same name.

In addition, the draft genome of the whitefly mitochondria was determined. This genome comprised 14 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 Karbala Province, Iraq is *Bemisia tabaci* MEAM1. As well as, the results of RT-PCR confirmed that the seedlings growing from the sterilized and non-sterilized TYLCV infected tomato seeds were infected by same virus. This can refer to possibility of transmission of the TYLCV via seeds.



**The Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and Scientific Research
Karbala University, College of Agriculture
Plant Protection Department**

**Application of Next-generation sequencing in identification
of *Begomovirus* species in Karbala Province on tomato
plant**

**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**

**Provided by
Mahmood Othman Abass Al-jnaby**

**Supervised by
Professor Dr. Adnan Abdaljeleel Lahuf**