



تقييم بعض التراكيب الوراثية والمستحضر الاحيائي النانوي والمبيدات الكيميائية

في مكافحة بعض الفايروسات المشخصة بتقانة **Next Generation**

Sequencing في نبات الباميا

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

رسالة تقدم بها

مريم هاشم موسى الحلو

بإشراف

أ.د. عدنان عبد الجليل لهوف

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿وَقُلْ رَبِّ زِدْنِي عِلْمًا﴾

صدق الله العلي العظيم

سورة طه آية 114

الاهداء

الى من قاد قلوب البشرية وعقولهم الى مرفا الامان ،معلم البشرية الاول
محمد (ص).

الى من ابصرت بها طريق حياتي ..واستمدت منها قوتي واعتزازي بذاتي
..الى الكفاح الذي لايتوقف ،الى الشامخة التي علمتني معنى الاصرار وان
لاشي مستحيل في الحياة مع قوة الايمان والتخطيط السليم ،الى ينبوع
العطاء المتفاني مدى عمري ..الى والدتي الغالية امد الله في عمرها
وجزاها الله عني خير الجزاء .

الى من شرفني بحكل اسمه الى من بذل الغالي والنفيس في سبيل وصولي
لدرجة علمية عالية والذي ادامه الله لنا وحفظه

الى السند والعضد والساعد والى الذين هم ملاذي ورمز فخري واعتزازي
فانا منهم وهم مني ...اخي واخواتي الاعزاء ازف لكم الاهداء حبا ورفعة
وكرامة .

اليكم جميعا اهدى ثمرة جهدي

مريم

الشكر والامتنان

اشكر الله رب العالمين الذي خلق وهدى وسدد الخطى فخرج هذا العمل بعونه وتوفيقه نحمده حمدا كثيرا في المبتدى والمنتهى .

فانني اتقدم بالشكر الجزيل والعرفان بالجميل لكل من مد يد العون والمساعدة وفي مقدمتهم استاذي ومشرفي أ.د. عدنان عبد الجليل لهوف اذ كانت لملاحظاته القيمة وتوجيهاته السديدة واخلاقه الطيبة ومعاملته الكريمة الاثر الكبير في وصول البحث الى هذه الصورة فله عظيم شكري وتقديري وجزاه الله عني خير الجزاء .

كما اتقدم بالشكر والعرفان لكل من ساهم وساعد على انجاح واطماف هذه الدراسة واخص بالذكر أ.د. رراء غازي عبد المحسن و.م.د. مشتاق طالب محمد علي من قسم وقاية النبات في كليتنا لتزويدهم لي بالعامل الاحيائي والمبيدات الكيمائية و .م.د. محمد هادي لنصائحة القيمة في تغذية النبات و .م.م. علي عبد الرحيم لتزويده لنا بالمادة الكيمائية للزنك كما اود ان اشكر د. عبد احمدي من دائرة البستنة/ وزارة الزراعة العراقية لتزويدي بعينات بذور التراكيب الوراثية لنبات الباميا كما اتقدم بخالص شكري وامتناني الى الطلبة والزملاء من الدراسات العليا.

كما اتقدم بوافر التقدير والاحترام الي عمادة كلية الزراعة /جامعة كربلاء/وقسم وقاية النبات في تقديم العون لي خلال فترة انجاز الدراسة. وكذلك اتقدم بشكري الي رئيس قسم الدراسات العليا في كليتنا المتمثلة بالاستاذ المساعد الدكتور محمود ناصر حسين والعاملين معه على مساعدتهم لي في تقديم رسالتي هذه.

وأخيراً، أود أن أعتنم هذه الفرصة لأعبر عن عظيم امتناني لكل من قدم لي المساعدة، مهما كانت بسيطة، فكل كلمة كانت لها أثر ودعم في رحلتي العلمية.

الباحثة

بسم الله الرحمن الرحيم

أقرار المشرف

أشهد أن إعداد هذه الرسالة الموسومة (تقييم بعض التراكيب الوراثية والمستحضر الاحيائي النانوي والمبيدات الكيميائية في مكافحة بعض الفايروسات المشخصة بتقانة Next Generation Sequencing في نبات الباميا) قد جرت تحت إشرافي في قسم وقاية النبات / كلية الزراعة / جامعة كربلاء، وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير علوم في الزراعة / وقاية نبات.


التوقيع:

اسم المشرف د عدنان عبد الجليل الهوف

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: كلية الزراعة - جامعة كربلاء

التاريخ: 2024 / 10 / 24

توصية رئيس قسم وقاية النبات

بناء على التوصيات اشرح هذه الرسالة للمناقشة


التوقيع:

الاسم: د. علي عبد الحسين كريم

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: كلية الزراعة / جامعة كربلاء

التاريخ: 2024 / /

إقرار لجنة المناقشة

نشهد باننا اعضاء لجنة المناقشة، اطلعنا على الرسالة الموسومة (تقييم بعض التراكيب الوراثية والمستحضر الاحيائي النانوي والمبيدات الكيميائية في مكافحة بعض الفايروسات المشخصة بتقانة Next Generation Sequencing في نبات الباميا) وقد ناقشنا الطالبة مريم هاشم موسى في محتوياتها وفيما له علاقة بها ووجدنا انها جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير علوم في الزراعة/ وقاية النبات.


رئيس اللجنة

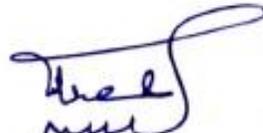
أ.د. عقيل نزال بربر

2024/ /


عضواً ومشرفاً

أ.د. عدنان عبد الجليل لهوف

2024/10/21


عضواً

أ.م.د. علي عبد الحسين // أ.م.د. وسام عدنان راضي

2024/ /


عضواً

2024/ /

صدقت الرسالة من قبل مجلس كلية الزراعة - جامعة كربلاء



أ.د. صباح غازي شريف

العميد وكالة

2024/10/27

بسم الله الرحمن الرحيم

إقرار المقوم اللغوي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة (تقييم بعض التراكيب الوراثية والمستحضر الاحيائي النانوي والمبيدات الكيميائية في مكافحة بعض الفايروسات المشخصة بتقانة Next Generation Sequencing في نبات الباميا) قد تم تقويمها لغوياً وبعد أخذ الطالب بالتصحيحات اللازمة أصبحت جاهزة للمناقشة.

التوقيع:

الاسم:

المرتبة العلمية:

العنوان:

التاريخ: / / 2024

بسم الله الرحمن الرحيم

إقرار المقوم العلمي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة (تقييم بعض التراكيب الوراثية والمستحضر الاحيائي النانوي والمبيدات الكيميائية في مكافحة بعض الفايروسات المشخصة بتقانة Next Generation Sequencing في نبات الباميا) قد اطلعت عليها وقومتها علمياً واجد انها صالحة للمناقشة.

التوقيع:

الاسم:

المرتبة العلمية:

العنوان:

التاريخ: / / 2024

بسم الله الرحمن الرحيم

إقرار المقوم الاحصائي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة (تقييم بعض التراكيب الوراثية والمستحضر الاحيائي النانوي والمبيدات الكيميائية في مكافحة بعض الفايروسات المشخصة بتقانة Next Generation Sequencing في نبات الباميا) قد اطلعت عليها وقومتها احصائياً وأجد أنّها صالحة للمناقشة.

التوقيع:

الاسم:

المرتبة العلمية:

العنوان:

التاريخ: / / 2024

الخلاصة

هدفت هذه الدراسة الى تحديد مجتمع الفايروسات (Virome) التي تصيب محصول الباميا Okra مع تقييم بعض برنامج للمكافحة المتكاملة في البيت البلاستيكي في كلية الزراعة ضدها يشتمل على بعض تراكيب الوراثة ومستحضر أحيائي نانوي و بعض المبيدات الكيميائية .

بعد جمع العينات النباتية المصابة لمحصول الباميا استعملت تقنية الجيل التالي لتحديد التسلسل Next Generation Sequencing بطريقة Metatranscriptomics من اجل التشخيص والتوصيف الجزيئي الكامل للفايروسات التي تصيب نبات الباميا. كما استعمل العامل الاحيائي *Trichoderma koningiopsis* في تصنيع المستحضر الاحيائي النانوي لمادة اوكسيد الزنك ZnO التي استعملت بجانب بعض تراكيب وراثية (عبير هجين و H-5) و بعض مبيدات حشرية (كونان واكتارا) في برنامج ادارة متكاملة للفايروسات وحشرات الذبابة البيضاء التي تصيب محصول الباميا.

أثبتت نتائج تحليل بيانات تقنية الجيل التالي لتحديد التسلسل وجود العديد من الفايروسات والتوابع الفايروسية بجانب احد الفايروسات الفطرية اذ شملت الفايروس (CLCuGeV) Cotton leaf curl Gezira virus من خلال تواجد العديد من المتجاورات المتداخلة المشابهة للتسلسل المرجعي لجينوم الفايروس في العينات النباتية كما بلغت نسبة تغطية تسلسلات القراءات الخام لجينوم الفايروس الكامل 100% بينما كانت نسبة التشابه معه قد بلغت 97.7% وبعده نسخ للفايروس X 413.7. لذلك وثق الجين (CLCUGUV) رقم التسلسل PP837748.1. كما أوضحت النتائج ايضا وجود التوابع الفايروسية Cotton leaf curl Gezira alphasatellite و Okra Cotton leaf curl Gezira betasatellite (CLCuGB) من خلال وجود العديد من المتجاورات المتداخلة الشبيه لجينوم هذه التوابع اذ بلغت نسب التغطية 100% وتراوحت نسب التشابه بين 93% الى 100%. وقد وثقت الجينومات الثلاث لهذه التوابع في بنك الجينات بالاسماء ارقام التسلسل Cotton leaf curl Gezira alphasatellite isolate Okra/Iraq-1 (PP837749.1) و Okra/Iraq-1 (PP837750.1) و عزلتين للتابع Okra leaf curl alphasatellite isolate Iraq-1+2 (PP779765.1) و (PP839930.1) على التوالي علما ان التابع الاخير يسجل لأول مرة في العراق. أظهرت النتائج ايضا وجود الفايروس *Cotton bunchy top virus* (CBTV) اذ بلغت التغطية والتشابه مع الجينوم المرجعي لهذا الفايروس 85.4% و 97.3% على التوالي وبمعدل عدد نسخ بلغ 12.1 X. وقد تم ايداع

الجينوم الكامل لهذا الفيروس في بنك الجينات NCBI-GenBank باسم Cotton bunchy top virus isolate Iraq-1 رقم التسلسل PP680224.1 ويعد هذا التسجيل الاول في العراق لهذا الفيروس.

يضاف الى مجموعة الفيروسات التي تم تشخيصها في هذه الدراسة تشخيص الفيروس الفطري (Mycoviruses) *Erysiphe necator-associated virus* (EnVS) عن طريق الحصول على عدة متجاورات متداخلة تتشابه مع جزء من الجينوم المرجعي لهذا الفيروس وان العزلة العراقية ذات نسبة تشابه عالية بالقواعد النايتروجينية بلغت 93.48% مع النوع EnVS-1 لذلك تم توثيق جين RdRp الخاص بالعزلة العراقية في بنك الجينات بالاسم Erysiphe necator associated virus 1 isolate Iraq-1 ورقم التسلسل PP352232.1.

كما نجحت عملية تصنيع مستحضر احيائي نانوي ولاول مرة في العراق باستعمال العامل الاحيائي *Trichoderma koningiopsis* وجسيمات أكسيد الزنك ZnO النانوية التي كانت باحجام نانوي مختلفة والتي تم تحميلها على سطح ابواغ العامل الاحيائي واستعملت في التجربة الحقلية بنجاح.

واخيراً أكدت نتائج التجربة الحقلية ان اسلوب المكافحة المتكاملة له الافضلية في خفض اعداد حشرة الذبابة البيضاء ونسبة شدة الاصابة بالفيروسات المرافقة اذ كان افضل هذه المعاملات التكاملية هي تلك التي شملت زراعة التركيب الوراثي Hort-5 و تطبيق المبيد كونان مع تطبيق العامل الاحيائي لوحده اوالمستحضر الاحيائي النانوي لوحده من خلال خفض شدة الاصابة الى 31.0% و33.3% على التوالي واعداد حشرة الذبابة البيضاء الى معدل 9.8 و 8.5 حشرة على التوالي تلتهما معاملة زراعة التركيب الوراثي Hort-5 و تطبيق المبيد اكتارا و تطبيق المستحضر الاحيائي النانوي بنسبة شدة اصابة 33.3% ومعدل اعداد الحشرة بلغ 9.4 مقارنة مع المعاملات التي زرعت فيها التراكيب الوراثية فقط اذ كانت نسبة شدة الاصابة واعداد حشرة الذبابة البيضاء للتركيب الوراثي Hort-5 قد بلغت 50.7% و 12.1 حشرة على التوالي بينما بلغت في معاملة التركيب الوراثي عبير 73.3% و16.4 حشرة على التوالي.

قائمة المحتويات

الصفحة	العنوان
أ - ب	الخلاصة
ت - ح	قائمة المحتويات
ث	قائمة الجداول
ج - ح	قائمة الأشكال

الصفحة	العنوان	التسلسل
1	المقدمة Introduction	1
5	استعراض المراجع Literature review	2
5	نبات الباميا Okra	1-2
6	الفايروسات النباتية التي تصيب محصول الباميا	2-2
6	فايروس Cotton leaf curl Gezira virus وتوابعه و alphasatellite و betasatellite	1-2-2
10	تشخيص أفايروسات النباتية	3-2
11	التقنيات الجزيئية في تشخيص الفايروسات النباتية	1-3-2
11	تحديد تسلسل الاحماض النووية DNA و RNA	1-1-3-2
17	المكافحة او الادارة المتكاملة لفايروسات النبات Integratet Pest Management/Control	4-2
18	الأصناف المقاومة او المتحملة	1-4-2
21	المكافحة الكيميائية للحشرات الناقلة	2-4-2
23	دور المركبات النانوية Nanoparticles في مقاومة الامراض النباتية	3-4-2
26	تطبيق المكافحة المتكاملة ضد الإصابات الفايروسية النباتية	5-4-2
29	المواد وطرائق العمل Materials and methods	3
29	المواد Materials	1-3
29	الأجهزة والمعدات المستعملة في هذه الدراسة	1-1-3
30	المواد والمبيدات الكيميائية والبذور والمبيدات الكيميائية	2-1-3
30	طرائق العمل Methods	2-3
30	جمع العينات النباتية المصابة	1-2-3
32	التشخيص باستعمال تقنية الجيل التالي لتحديد التسلسل sequencing Generation Next(NGS)	2-2-3
35	تصنيع المستحضر الاحيائي النانوي لمادة أوكسيد الزنك ZnO	3-2-3

36	تقييم كفاءة برنامج مكافحة متكاملة في حماية نباتات الباميا من الإصابة بحشرة الذبابة البيضاء ومايرافقها من فايروسات	4-2-3
36	تحضير الحقل للزراعة	1-4-2-3
37	تطبيق المبيدات الحشرية	2-4-2-3
38	تطبيق العامل الاحيائي والمستحضر النانوي	3-4-2-3
38	تحديد نسبة وشدة الإصابة الفايروسية مع تعداد حشرة الذبابة البيضاء	4-4-2-3
39	التحليل الاحصائي	5-4-2-3
40	Results and Discussion النتائج والمناقشة	4
40	تقييم بيانات تقنية الجيل التالي لتحديد التسلسل	1-4
42	التشخيص والتوصيف الجزيئي وتحديد الجينوم الكامل للفايروسات وتوابعها المرافقة لنبات الباميا	2-4
42	فايروس Cotton leaf curl Gezira virus وتوابعه الثلاث	1-2-4
55	فايروس Cotton bunchy top virus	2-2-4
58	الفايروس Erysiphe necator-associated virus	3-2-4
62	تشخيص مادة أكسيد الزنك ZnO النانوية المصنعة	3-4
71	تقييم كفاءة برنامج مكافحة متكاملة في حماية نباتات الباميا من الإصابة بحشرة الذبابة البيضاء ومايرافقها من فايروسات	4-4
77	الاستنتاجات والتوصيات	5
77	Conclusions الاستنتاجات	1-5
78	التوصيات Recommendations	2-5
79	References المصادر	6
79	المصادر العربية	1-6
80	المصادر الأجنبية	2-6

قائمة الجداول

الصفحة	عنوان الجدول	لرقم الجدول
29	الأجهزة والمعدات المستعملة في الدراسة	1
30	المواد الكيميائية المستعملة	2
30	البنور والمبيدات الكيميائية المستعملة في التجربة الحقلية	3
37	المعاملات المستعملة في التجربة الحقلية	4
39	مقياس شدة الإصابة	5
59	تحليل التشابه للقواعد النايتروجينية بين العزلة العراقية من فايروسات Erysiphe necator associated virus 1 isolate Iraq-1 والفايروسات المناظرة	6

60	تحليل التشابه للاحماض الامينية لجين RdRp للعزلة العراقية من فايروسات Erysiphe necator associated virus 1 isolate Iraq-1 والفايروسات المناظرة	7
72	معدلات نسب الإصابة وشدة الإصابة الفايروسية ومعدل عدد حشرة الذبابة البيضاء على نباتات الباميا في التجربة الحقلية	8

قائمة الاشكال

رقم الشكل	عنوان الشكل	الصفحة
1	شكل الجسيمة الفايروسية الكاملة لانواع الجنس Begomovirus التي تشمل فايروس CLCuGV.	7
2	التنظيم الجينومي لأنواع فايروسات الجنس Begomovirus	8
3	أبرز الاعراض المرضية التي يسببها فايروس CLCuGV	9
4	مخطط توضيحي لطريقة Sanger Sequencing	13
5	مخطط توضيحي لطريقة تحديد التسلسل بالتوليف او التجميع Sequencing-by-Synthesis	16
6	مخطط توضيحي لكلا تقنيات التسلسل من الجيل الثالث	17
7	عينات من أوراق نبات الباميا التي ظهرت عليها اعراض الإصابة الفايروسية	31
8	جودة المقروءات الخام للعينات الثلاث باستعمال برنامج FastQC	41
9	القراءات الخام المشابه للجينوم المرجعي للفايروس CLCuGeV	42
10	التنظيم الجينومي للعزلة العراقية للفايروس Cotton leaf curl Gezira virus isolate Okra/Iraq-1	43
11	نسب التشابه بين جينوم العزلة العراقية للفايروس Cotton leaf curl Gezira virus isolate Okra/Iraq-1	44
12	العلاقة الوراثية بين العزلة العراقية للفايروس Cotton leaf curl Gezira virus isolate Okra/Iraq-1	45
13	القراءات الخام المشابه للجينوم المرجعي للتابع الفايروسي CLCuGA	46
14	التنظيم الجينومي للعزلة العراقية للتابع الفايروسي Cotton leaf curl Gezira alphasatellite isolate Okra/Iraq-1	47
15	نسب التشابه بين جينوم العزلة العراقية للتابع الفايروسي Cotton leaf curl Gezira alphasatellite isolate Okra/Iraq-1	47
16	العلاقة الوراثية بين العزلة العراقية للتابع الفايروسي Cotton leaf curl Gezira alphasatellite isolate Okra/Iraq-1	48

49	القراءات الخام المشابه للجينوم المرجعي للتابع الفايروسي CLCuGB	17
50	التنظيم الجينومي للعزلة العراقية للتابع الفايروسي Cotton leaf curl Gezira betasatellite isolate Okra/Iraq-1	18
50	نسب التشابه بين جينوم العزلة العراقية للتابع الفايروسي Cotton leaf curl Gezira betasatellite isolate Okra/Iraq-1	19
51	العلاقة الوراثية بين العزلة العراقية للتابع الفايروسي Cotton leaf curl Gezira betasatellite isolate Okra/Iraq-1	20
52	القراءات الخام المشابه للجينوم المرجعي للتابع الفايروسي OLCuA	21
52	التنظيم الجينومي للعزلة العراقية للتابع الفايروسي Okra leaf curl alphasatellite isolate Iraq-1	22
53	نسب التشابه بين جينوم العزلة العراقية للتابع الفايروسي Okra leaf curl alphasatellite isolate Iraq-1	23
54	العلاقة الوراثية بين العزلة العراقية للتابع الفايروسي Okra leaf curl alphasatellite isolate Iraq-1	24
56	القراءات الخام المشابه للفايروس CBTV	25
56	التنظيم الجينومي للعزلة العراقية من فايروس Cotton bunchy top virus isolate Iraq-1	26
57	نسب التشابه بين جينوم العزلة العراقية للفايروس Cotton bunchy top virus isolate Iraq-1	27
58	العلاقة الوراثية بين العزلة العراقية من فايروس isolate Iraq-1 Cotton bunchy top virus	28
60	نسبة التشابه بين تسلسل بروتين RdRp من فايروس Erysiphe necator associated virus 1 isolate Iraq-1	29
61	العلاقة الوراثية بين البروتين RdRp لفايروس العزلة العراقية Erysiphe necator associated virus 1 isolate Iraq -1	30
64	اختبار التحليل الطيفي لاشعة المرئية وفوق البنفسجية لمادة أو أكسيد الزنك المصنعة	31
66	تحديد خصائص مادة أو أكسيد الزنك ZnO النانوية بالمجهر الالكتروني النافذ	32
67	تحديد خصائص مادة أو أكسيد الزنك ZnO النانوية باستعمال اختبار الطاقة المشتتة لاشعة السينية الطيفي	33
70	تحميل جسيمات أو أكسيد الزنك النانوية على ابواغ العامل الاحيائي T.koningiopsis	34

1: المقدمة

Introduction

يعد نبات الباميا (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) Okra الذي يعود الى العائلة الخبازية Malvaceae واحد من المحاصيل الشائعة في العالم (Appiah وآخرون، 2020). ويعتقد ان نشأت هذا النبات كانت في قارة افريقيا ومنها انتقل الى بقية انحاء العالم اذ يزرع حالياً على مدار العام من اجل الحصول على قرونه الخضراء الصالحة للاكل والتي تستعمل إما مطبوخة أو مجففة أو معلبة أو مجمدة وذلك لانها غنية بالمعادن والكريبوهيدرات والألياف والبروتينات والدهون والفينولات والفيتامينات A و B و C (Gemede وآخرون، 2015). بالإضافة الى قيمة نبات الباميا الغذائية فهو ذو قيمة طبية وصناعية كبيرة اذ يستخلص من سيقانه والقرون الناضجة الألياف التي تستعمل في صناعة الورق بالإضافة الى المواد الطبية المختلفة (Bawa و Badrie، 2016; Iwu، 2016).

يتعرض هذا المحصول موسمياً للإصابة بالعديد من الفايروسات خصوصاً تلك التي تسبب امراض الفسيفساء واصفرار العروق وتجعد الأوراق التي تسبب خسائر فادحة في إنتاجه (Ganesh وآخرون، 2022). مثل فايروس *Okra yellow vein mosaic virus* (Appiah وآخرون، 2020) و *Okra enation leaf curl virus* (Serfraz وآخرون، 2014) و *Radish leaf curl virus* (Kumar وآخرون، 2012) و *cotton leaf curl alabad virus* (Venkataravanappa وآخرون، 2012) بالإضافة الى التوابع الفايروسية الفا (alphasatellite) وبيتا (betasatellite) (Akhtar وآخرون، 2014) وغيرها علماً ان اغلب هذه الفايروسات تنتقل بواسطة حشرة الذبابة البيضاء والمن (Nagendran وآخرون، 2017).

بصورة عامة ان عملية التشخيص السريع والدقيق وتحديد الكثافة للمسببات المرضية النباتية التي تشمل الفايروسات في الحقل هو امر مهم جداً في سرعة اتخاذ القرار الملائم في الوقت المناسب للمكافحة وبالرغم من النجاحات التي تحققت من استعمال العديد من طرق التشخيص مثل المجهر الالكتروني والطرق المصلية (السيرولوجية) مثل Direct ELISA و Sandwich ELISA وكذلك الطرق التي تعتمد على تسلسل القواعد النايتروجينية للاحماض النووية الخاصة بالفايروسات مثل طرائق Southern blot و Northern blot و PCR و RT-PCR و real-time PCR (Mokili وآخرون، 2012)، الا ان لها قيود تسبب عدم كفاءتها في تشخيص جميع أنواع الفايروسات فمثلاً تستلزم هذه الطرق المعرفة المسبقة بطبيعة الفايروسات من حيث التسلسل الكامل او الجزئي لجينومه وأيضاً طبيعة الغلاف البروتيني الخاص به والتي تتوفر فقط للفايروسات المعروفة والمشخصة سابقاً كما ان لها قدرات محدودة على اكتشاف الفايروسات المكتشفة حديثاً واكتشاف

الفايروسات الجديدة (Jeong و Lee، 2022). بالإضافة الى ان اغلب هذه الطرق التشخيصية تحتاج وقت طويل نسبيا وخبرة في تنفيذها وتفسير نتائجها كما ان بعضها يتطلب مستلزمات وأجهزة عالية الثمن قد لا تتوفر في اغلب المختبرات التشخيصية (Lipkin و Kapoor، 2001). لذلك تم تطوير العديد من التقنيات التي تغلبت على معظم هذه القيود مثل تقنية Metatranscriptomics التي احد الطرائق الحديثة المختلفة التابعة لتقنية الجيل التالي لتحديد التسلسل (NGS) Next-generation sequencing. تمتاز هذه التقنية بانها تحدد التعبير الجيني للفايروسات سواء كانت ذات جينوم DNA او RNA من خلال تحديد التسلسل المتوازي لشظايا mRNA التي تنتجها جميع الفايروسات النشطة المتواجدة ضمن بيئة واحدة ويمكن استعمال هذه الطريقة في دراسة تنوع الجينات النشطة للفايروسات داخل مجتمع، ولتحديد مستويات تعبيرها ورصد كيفية تغير هذه المستويات في ظروف مختلفة سواء كانت احيائية او غير احيائية (Rashid و اخرون، 2022). جدير بالإشارة الى ان عملية تحديد مجتمع الفايروسات تعني التشخيص الكامل لجميع الفايروسات بانواعها المتعددة وكثافتها المختلفة المتواجدة سواء في نظام بيئي معين او مصاحبة لكائن حي مثل الانسان او الحيوان او النباتات تسمى Virome (Zhang و اخرون، 2006؛ Pantaleo و Chiumenti، 2018). طبقت طريقة Metatranscriptomics بنجاح في تشخيص مجتمعات الفايروسات (Virome) سواء تلك المعروفة والمسجلة سابقاً وكذلك التسجيل لأول مرة للعديد من الفايروسات النباتية الجديدة التي تصيب العديد من العوائل النباتية (Matsumura و اخرون، 2017؛ Czotter و اخرون، 2018؛ Jo و اخرون، 2018؛ Wright و اخرون، 2020؛ Jeong و Lee، 2022).

ان الفايروسات الممرضة للنباتات حالها كحال بقية الفايروسات هي اجبارية التطفل تعتمد بشكل مباشر وكامل على خلايا العائل المصاب الذي يستلزم تواجدها بداخل الخلايا المصابة وبدون وجود فواصل بينهما كما لا توجد مادة او مييد كيميائي فعال ضدها او طريقة مباشرة لمكافحتها مما جعلها من المسببات المرضية الصعبة المكافحة، لذلك أصبح الأسلوب الأمثل في حال تعذر وجود الأصناف المقاومة هو تطوير برنامج للمكافحة المتكاملة يتضمن تطبيق عدد من طرق المقاومة الفعالة التي يجب ان تعمل بشكل متناغم وتكاملي في منع الإصابة قبل حدوثها وكذلك تقليل مصادر الإصابة والحد من انتشارها وتقوية النباتات من اجل تقليل تاثير الإصابة عليها (Czosnek، 2007؛ مكوك و اخرون، 2008). ويوجد العديد من الطرق التي يمكن انتخابها ضمن برنامج تكاملي لادارة او مكافحة الفايروسات النباتية مثل عملية زراعة الأصناف المقاومة التي تعد أفضل وسيلة لمقاومة المسببات المرضية التي تشمل الفايروسات (Agrios، 2005) ولكن هذا النوع من الأصناف صعب الحصول عليه مع العلم ان اصناف الباميا عالية المقاومة للفايروسات النباتية غير موجودة

حاليا في العراق. وبالرغم من ذلك وجدا ان زراعة اصناف متوسطة المقاومة او متحملة وبالتكامل مع وسائل مقاومة أخرى قد حقق نجاح وفاعلية ضد العديد من مسببات الامراض النباتية (Ritchie واخرون، 2018). فمثلا ذكر Scortichini (2022) ان استراتيجيات المكافحة المتكاملة للأفات استفادت بشكل كبير من زراعة اصناف مقاومة / متحملة بجانب التطبيق الأكثر فعالية لعوامل المقاومة الاحيائية اذ نجح هذا النوع من التكامل في مقاومة العديد من مسببات الامراض النباتية.

يوجد العديد من أنواع الجنس *Trichoderma spp.* المعروفة بقدراتها العالية في مقاومة العديد من مسببات المرضة للنبات من خلال سهولة التغلغل في جذور النباتات وتكوين علاقة تعايشية (Endophytic symbionts) من غير ان تسبب اي ضرر للنباتات بل على العكس يعمل على التطفل والمنافسة وافراز بعض المضادات الاحيائية والانزيمات المؤثرة على مسببات الممرضة للنباتات بالإضافة تحفيزه المقاومة الجهازية في النباتات و تعزيز نموه وتطوره (ابو عرقوب، 2002; Harman، 2004 و 2006; Lahuf واخرون، 2019) كما وجدا ان لها القدرة على تغيير التعبير الجيني بشكل صحيح للنباتات المختلفة، ونتيجة لذلك التأثير على فسيولوجيا النبات بشكل إيجابي (Harman واخرون، 2012). وقد استعملت عدة أنواع من الجنس *Trichoderma spp* سواء بشكل مباشر او منتجاتها الايضية الثانوية بنجاح في تحفيز المقاومة الجهازية ضد عدة فايروسات مثل *Tomato mosaic virus (TMV)* و *(PMV)* و *Pepper mosaic virus* في عوائل الطماطة (حمدي واخرون، 2015; Vitti واخرون، 2016).

كما اوضحت تقنية النانو Nanotechnology التي تعنى بدراسة الجسيمات والمواد التي تكون احجامها على المقياس النانوي (1 إلى 100 نانوميتر) في بُعد واحد يسمى بالصفائح او الرقائق النانوية أو بُعدين تسمى بالاسلاك او الانابيب النانوية أو ثلاث تدعى بالجسيمات او النقط النانوية (عبد الله، 2014; جابر، 2020)، من الطرق المهمة التي تستعمل على نطاق واسع في العديد من مجالات الحياة ومنها مقاومة الامراض النباتية وذلك بسبب ما تمتلكه من خصائص تضادية فريدة فعالة فضلا عن سهولة تصنيعها والحصول عليها (Khan و Rizvi، 2017; جابر، 2020). مؤخراً تم تصنيع العديد من الجسيمات النانوية باستعمال الفطريات ومنها أنواع من الفطر *Trichoderma spp.* ضمن ما يعرف بالطريقة الخضراء (Green synthesis) اذ تم استعمال هذه الجسيمات النانوية بنجاح في العديد من المجالات الزراعية التي تشمل مقاومة الافاءات (Baharulolum واخرون، 2021; Alghuthaymi واخرون، 2022).

وبالرغم من العدد الكبير من الأنواع الفايروسية التي تهاجم محصول الباميا الا ان معرفتنا بانواعها المنتشرة في البيئة العراقية محدودة. لذلك فان التعرف عليها يمكن ان يزودنا برؤى جديدة حول تنوعها والعلاقة الوراثية

بينها وبين العزلات والسلالات العالمية من اجل اختيار الاسلوب الامثل في مكافحتها والذي يستند على تقييم وتطوير برنامج للمكافحة المتكاملة ضدها. لذلك هدفت هذه الدراسة الى تحديد مجتمع الفايروسات (Virome) التي تصيب محصول الباميا مع تقييم برنامج للمكافحة المتكاملة باستعمال تركيبين وراثيين (H-5 وعبير هجين) والمستحضر الاحيائي النانوي لمادة اوكسيد الزنك (ZnNPS) والمبيدين الكيميائيين (كونان واكتارا).

محاور الدراسة

- (1) الجمع العشوائي لعينات من نباتات الباميا التي تظهر عليها اعراض الإصابة الفايروسية والمتمثلة بالتقرم ، اصفرار العروق، الفسيفساء ، التبرقش، التلف او تجعد الأوراق من حقول الباميا.
- (2) ارسال عينات أوراق مصابة الى احد الشركات العالمية المتخصصة لتطبيق تقنية Metatranscriptomics.
- (3) تحليل البيانات المستلمة باستعمال طرق وأدوات وبرامج المعلوماتية الحيوية لغرض تشخيص (Diagnosis) و/او اكتشاف (Discovery) الفايروسات وتوابعها المرافقة لنباتات الباميا مع إمكانية تحديد وتوصيف الجينوم الكامل (Full genome annotation) لها وتحديد كمياتها ومدى انتشارها.
- (4) إجراء تحليل التقارب الوراثي (Phylogenetic Analyses) وإعادة التركيب (Recombination) والتباين (Single nucleotide polymorphisms) او/ و Deletion-insertion polymorphisms و Short tandem repeat) للفايروسات وتوابعها التي يتم تشخيصها واكتشافها في هذه الدراسة.
- (5) تصنيع المستحضر الاحيائي النانوية باستعمال الفطر *Trichoderma koningiopsis* ومركب أوكسيد الزنك.
- (6) تطبيق أسلوب مكافحة متكاملة ضد الفايروسات المنتشرة في احد الحقول الموبوء باستعمال بعض التراكيب الوراثية و بعض المبيدات الحشرية و المستحضر الاحيائي النانوية، وتقييم تأثيرها على نسبة وشدة الإصابة الفايروسية.
- (7) إمكانية تطبيق تقنية Whole-exome sequencing للمقارنة بين التركيبين الوراثيين الحساس والمقاوم او المتحمل للإصابة الفايروسية من نبات الباميا المستعملة في التجربة الحقلية لغرض تحديد جينات المقاومة وقياس مستوى تعبيرها الجيني (Gene expression) بالإضافة الى تحديد تأثير الإصابة الفايروسية على جينوم البلاستيدات الخضراء والميتوكوندريا لكلا التركيبين الوراثيين.

2: استعراض المراجع

Literature review

1-2: نبات الباميا Okra

يعود نبات الباميا *Abelmoschus esculentus* L. إلى العائلة الخبازية Malvaceae وهو من محاصيل الخضر الصيفية المهمة وتسمى بعدة أسماء إنكليزية منها Okra (Naveed وآخرون، 2009). يعتقد ان نبات الباميا قد نشأ في مناطق غرب إفريقيا تحديدا في دول اثيوبيا واريتريا والسودان ومصر، وتُزرع حالياً في مناطق عديدة من العالم بما في ذلك أمريكا الجنوبية وآسيا والشرق الأوسط (Oppong-Sekyere وآخرون، 2012).

ثمار الباميا غنية بالفيتامينات مثل الرايبوفلافين والثيامين بالإضافة الى فيتامين C و A والمعادن مثل الفسفور والمغنيسيوم والكالسيوم. وتحتوي أيضاً على ألياف غذائية مهالكرطانية لصحة الجهاز الهضمي. أظهرت دراسات أن الباميا قد تساهم في خفض مستويات السكر في الدم وتحسين وظائف الكلى (Amin وآخرون، 2009).

تزرع الباميا من الجل الحصول على قرونها الخضراء التي تُستهلك مطبوخة في العديد من الوصفات الغذائية العالمية. تُستخدم أيضاً في بعض الصناعات الغذائية لصناعة الصلصات والمعلبات. كما تدخل ثمار هذا النبات او بعض اجزاءه الخضرية في بعض الصناعات كمادة أولية فمثلا المادة الهلامية المستخرجة من القرينات والسيقان والجذور تستعمل كمادة لاصقة للأوراق كما تستعمل اليافه في الصناعات الورقية (Deeplata و Rao، 2013).

ويبرز عدد قليل من الدول كأكبر منتجين ومصدرين لهذه الثمرة. وفقاً للإحصائيات العالمية الزراعية، يقدر الإنتاج السنوي للباميا عالمياً 11232655.35 طن. وتعد الهند أكبر منتج للباميا في العالم بنسبة 61%، تليها نيجيريا ومالي وباكستان. وفي العراق يعد محصول الباميا من محاصيل الخضر المهمة اذ يزرع مرتين في الموسم من كل عام ويحتل العراق المرتبة السابعة عالمياً بكمية إنتاج بلغت 88843 طن اذ يشارك بنسبة 0.79% من الإنتاج العالمي (FAOSTAT، 2022).

ان محصول الياميا كبقية المحاصيل الزراعية الأخرى يتعرض الى مهاجمة العديد من الافات الزراعية طول موسم النمو من مرحلة البذار الى مرحلة الحصاد اذ تسبب اضراراً مباشرة على النباتات خصوصا في انتاج وجودة ثمار البامية. وتوجد في الوقت الحاضر العديد من الافات الحشرية مثل المن والذبابة البيضاء والترس

التي تسبب موسمياً خسائر اقتصادية كبيرة (Anitha و Nandihalli، 2008). ابرز أنواع هذه الافاءت الحشرية هو الذبابة البيضاء *Bemisia tabaci* Gennadius التي تسبب أضراراً اقتصادية تتمثل بأمتصاص العصارة النباتية مما يؤدي لأصفرار وتجعد الاوراق وصغر حجمها وضعف النبات بشكل عام بالإضافة الى تلف ثمار الباميا عن طريق تغذيتها على عصارة اللحاء، ومن ثم تلويث الأوراق والثمار بالندوة العسلية التي تسبب تكوين العفن السخامي (Oliveira وآخرون، 2001) إلى جانب التسبب في نقل العديد من مسببات الامراض الفايروسية المهمة اقتصادياً مما يؤدي إلى خسائر كبيرة في المحصول خاصة عندما يحدث ذلك في المراحل الأولى من نمو المحصول (الخراعي، 2021). اذ أظهرت النباتات المصابة بهذه الحشرة والفايروسات المرافقة انخفاضاً في ارتفاع النبات يصل الى نسبة 24.9% ، انخفاض في طول الجذربنسبة 15.5% ، و في عدد الثمار يصل الى 32.1% لكل نبات (Sheikh وآخرون، 2013).

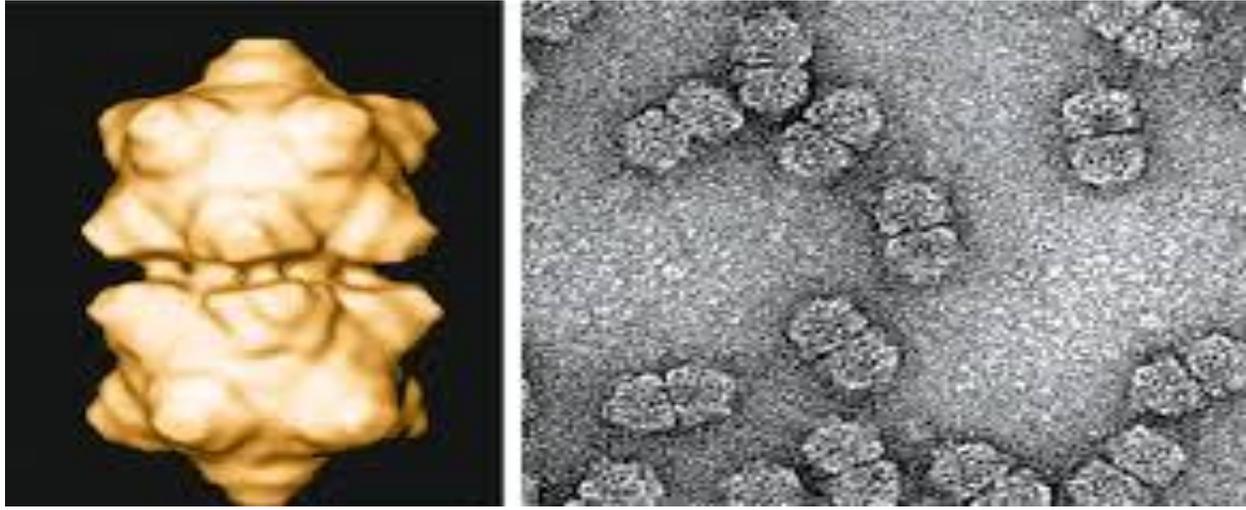
2-2: الفايروسات النباتية التي تصيب محصول الباميا

تصيب العديد من الفايروسات محصول الباميا (*A. esculentus*)، مما يؤثر بشكل كبير على محصوله وجودته. ومن أبرز الفايروسات ما يلي:

1-2-2: فايروس *Cotton leaf curl Gezira virus* (CLCuGV) وتوابعه *alphasatellite* و *betasatellite*

يُعرف هذا الفايروس أيضاً باسم فايروس *African cotton leaf curl begomovirus* وهو نوع متميز يعود أصله إلى منطقة الساحل والمناطق المجاورة في أفريقيا التي اكتشف فيها لأول مرة على نبات القطن، و تم تحديد تسلسل الجينوم الكامل لأول مرة من نباتات القطن المصابة التي تم جمعها في وادي مدني، ولاية الجزيرة (Gezira)، الواقعة بين النيل الأزرق والأبيض في مركز شرق السودان (Brown و Idris، 2002). ولازال يشكل تهديداً خطيراً لإنتاج القطن مسبباً فقدان الغلة في جميع مناطق زراعة القطن المتضررة في أفريقيا. من الصعب تقييم الخسائر، لكن التقديرات تتراوح إلى 20% عندما تحدث الإصابة في وقت مبكر من موسم النمو و/أو مع الأصناف شديدة الحساسية. كما اكدت وسائل التشخيص الجزيئي الحديثة ان هذا الفايروس ذو انتشار عالمي على مختلف المحاصيل التي شملت القطن، الطماطة، الخيار والباميا و الكوسا والبابايا و *Hibiscus spp* بالإضافة الى العديد من النباتات البرية التي تعود الى مختلف العوائل النباتية مثل *Corchorus fascicularis* و *Lavatera cretica* و *Malva spp.* و *Sida spp* (Brown، 1992) ; Idris وآخرون، 2014 ; Gambley وآخرون، 2020). لقد سجل هذا الفايروس في قارة افريقيا في العديد من الدول التي تقع فوق خط الاستواء شملت دول بنين وبوركينا فاسو والكاميرون وتشاد وكوت ديفوار ومصر

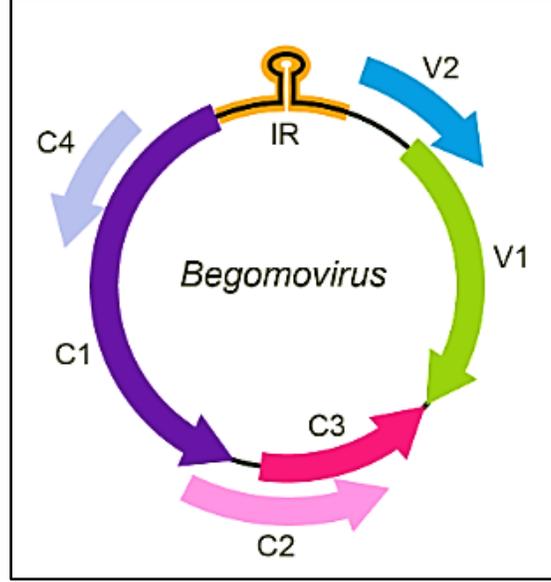
والنيجر ونيجيريا والسودان وتوغو ودول أفريقية أخرى (Brown, 1994; Leke وآخرون، 2015). وحالياً وجداً ان انتشار هذا الفايروس قد اصبح خارج الدول الافريقية مثل في بعض دول الجزيرة العربية عُمان والامارات العربية والمملكة العربية السعودية على محاصيل الباميا والطماطة (Idris وآخرون، 2014). ان هذا النوع يمتلك جينوم احادي (Monopartite) بحجم 2.8 الف قاعدة نايتروجينية موجود في جسيمات ثنائية توأمية (Bigeminate virions) بحجم 38 X 22 نانوميتر (شكل 1) (Cohen وآخرون، 1983). تحتوي الجسيمة الكاملة للفايروس على شريط حلقي مفرد من DNA (sDNA) (Medina-Hernández وآخرون ، 2019).



شكل (1): جسيمات الفايروس الكاملة لانواع الجنس (*Begomovirus*) التي تشمل فايروس CLCuGV. (اليمن) الجسيمات المنقاة من احد الأنواع التابعة للجنس (*Begomovirus*) والتي تظهر وحدات فرعية نموذجية شبه متساوية القياس. (اليسار) نموذج ثلاثي الابعاد كامل لجميع الوحدات الفرعية ضمن جسيمات متعددة السطوح توضح التناظر الاساسي (Brown ، وآخرون 2015)

يقوم شريط الجينوم (شكل 2) بتشفير كل من بروتين الغلاف Coat protein (ORF AV1/V1) الذي يغلف لبجينوم بالجسيمة الكاملة للفايروس ويمكن أن يشارك في حركة الفيروس، وبروتين الحركة Movement protein (ORF AV2/V2)، والذي أيضاً يساعد في حركة الفيروس. يقوم الجينوم أيضاً بتشفير البروتين المرتبط بالنسخ المتمائل Replication-associated protein (ORF AC1/C1)، والبروتين المنشط النسخي Transcriptional activator protein (ORF AC2/C2)، والبروتين المعزز للنسخ المتمائل

الوراثية بين الجينات (IR) Intergenic region (Hanley-Bowdoin وآخرون، 2000).
و بروتين ORF AC4/C4 بالإضافة الى المنطقة
(ORF AC3/C3) Replication enhancer protein



شكل (2): التنظيم الجينومي لأنواع فايروسات الجنس *Begomovirus* (ICTV، 2022) التي تشمل فايروس (CLCuGV) يُشار إلى قالب القراءة المفتوح (open reading frame) بالوان مختلفة على أنها مشفرة أما على الشريط الموجب (V) أو على الشريط التكميلي السالب (C)، ويشار إلى مواقع الجينات المشفرة للبروتينات المقابلة بأحرف وأرقام مختلفة.

صنف الفايروس مؤخراً من قبل اللجنة الدولية لتسمية و تصنيف الفايروسات (International Committee on Taxonomy of Viruses) كما هو مبين في أدناه (ICTV، 2022).

Monodnaviria Realm:

Kingdom: *Shotokuvirae*

Phylum: *Cressdnaviricota*

Repensiviricetes Class:

Order: *Geplafuvirales*

Family: *Geminiviridae*

Genus: *Begomonovirus*

Species: Cotton leaf curl Gezira virus

تظهر الأعراض النموذجية (شكل 3) للإصابة بفيروس CLCuGV بهيئة تجعدًا للأوراق لأعلى أو لأسفل، مصحوبًا بتغيير لون الأوراق والفسيفساء. بالإضافة إلى ذلك، تظهر الأوراق سماكة في العروق، وهي خاصية قد تعتمد على نوع الصنف. تظهر النباتات المصابة في مراحل النمو المبكرة قصر في السلاميات وتقزمًا كبيرًا للنبات (Idris، 1990).



شكل (3): أبرز الاعراض المرضية التي يسببها فايروس CLCuGV في احد الحقول الموبوءة اثناء فترة الدراسة

يملك فايروس CLCuGV عادة على الأقل احد التوابع نوع *alphasatellite* و *betasatellite* ويمكن ان يمتلكهما سوياً وجينوم كل واحد منهما يكون حلقي ذو شريط مفرد نوع *ssDNA* بنصف حجم جينوم الفايروس تقريباً. اذ يحتوي جينوم التابع *alphasatellite* على منطقة غنية بالادنين *adenine rich region* وكذلك منطقة محافظة للتابع *satellite conserved region (SCR)* ويشفر لبروتين واحد هو البروتين المرتبط بالتضاعف *replication-associated protein (Rep protein)* المسؤول عن بدء التكرار الدائري (*rolling-circle replication initiator*)، مما يجعلها قادرة على التكاثر المستقل، على الرغم من أنها تعتمد على الفايروس المساعد في التغليف والانتشار (Hulo وآخرون، 2011). أظهرت الدراسات أن التوابع *alphasatellite* قد تؤثر على النمط الظاهري للأعراض المرضية للإصابة بالفايروس المساعد عن طريق تعديل الوظيفة الجينية للنبات المضيف أو الفايروس المساعد أو التوابع الأخرى. تشير الأدلة إلى أن التوابع *alphasatellite* قد تساهم في تكيف المضيف (Varma و Singh، 2024). يعود التابع *alphasatellite* إلى الجنس *Colecusatellite* الذي يعود إلى تحت العائلة *Geminialphaspecies* التابعة

الى عائلة Alphasatellitidae (ICTV، 2022). ويوجد حالياً تابعين نوع alphasatellite ترافق الفايروس Okra leaf curl alphasatellite و Cotton leaf curl Gezira alphasatellite هما CLCuGV (Villegas واخرون، 2019).

يتضمن جينوم التابع betasatellite أيضا على منطقة غنية بالادينين adenine rich region وكذلك منطقة محافظة للتابع (SCR) satellite conserved region ويشفر لبروتين واحد هو beta-C1 (Hulo واخرون، 2011). يعتمد بشكل كامل على الفايروس المساعد لاجل التكاثر والحركة بين الخلايا والمسافات البعيدة داخل النبات بالإضافة الى التغليف والانتشار و بالمقابل فهو اساسي لتحديد مدى الامراضية للفايروس المساعد و ضروري لتطور الاعراض المرضية كما يمتاز هذا النوع من التوابع بان لديه القدرة على التكاثر بمساعدة عدة أنواع من فايروسات *Begovirusom* (Zhou، 2013). تعود أنواع هذا التابع الى جنس *Betasatellite* وعائلة *Toleucusatellitidae* (ICTV، 2022). يوجد نوع واحد من هذا التابع هو Cotton leaf curl Gezira betasatellite يرافق الإصابة بالفايروس CLCuGV (Villegas واخرون، 2019). أنّ وسيلة النقل الوحيدة المعروفة لحد الان لهذا الفايروس اسوة بانواع الجنس (*Begomonovirus*) هي بواسطة حشرة الذبابة البيضاء (*Bemisia tabaci*) اذ يوجد العديد من الأنواع المبهمة (cryptic species) والانماط الفرعية التي تنقل هذه الفايروسات بالطريقة الباقية / الثابتة الدورانية (A persistent-circulative manner). يمكن للفايروس ان يكتسب من قبل الحشرة خلال فترة زمنية بين 30 دقيقة الى عدة ساعات. فترة الحضانة تمتد ما بين 6 الى 10 ساعات قبل ان يحصل الانتقال الذي يستمر ما بين 7 إلى 10 أيام من الحشرة الى النباتات غير المصابة و احيانا تبقى الحشرة قادرة على نقل الفايروس طول فترة حياتها (Rosell واخرون، 1999 ; الكرطاني، 2023).

2-3: تشخيص الفايروسات النباتية

يُعد الاكتشاف المبكر والتشخيص الدقيق للفايروس خطوة حاسمة لمنع الانتشار المحتمل للإصابة وتقليل الخسائر. لذلك تطبيق أساليب التشخيص الحساسة والدقيقة والمتخصصة أمراً أساسياً لإدارة أمراض النبات المتسببه عن الفايروسات (Scortichini، 2022). لقد كانت الطريقة التقليدية في الكشف عن الإصابة الفايروسية هي عن طريق تحديد أبرز الأعراض والعلامات المرضية والتي كثيراً ما تكون واضحة ومميزة بعد حدوث ضرر كبير بالفعل للمحصول المصاب، ويمكن للشخص المدرب فحص عدد النباتات في الحقل من اجل تحديد النباتات المصابة (Li واخرون، 2022). الا ان هذه الطريقة تكون غير ناجحة في حالة الإصابة

ببعض الفايروسات التي لا تسبب ظهور أعراض واضحة بالإضافة الى وجود سلالات أو فايروسات نباتية مختلفة تسبب ظهور أعراض متشابهة على العائل نفسه، وفي بعض الأحيان تظهر أعراض مرضية مشابهة لأعراض الإصابة ألفايروسية ولكنها تكون ناتجة عن اختلاف الظروف البيئية أو نقص بعض العناصر الغذائية الخ (Awasthi،2020). لهذا تم تطوير العديد من الطرق والتقنيات لتشخيص الفايروسات النبات ، مثالها النباتات الكاشفة، والفحص بالمجهر الالكتروني، والطرق المصلية و التقنيات الجزيئية التي تشمل تحديد تسلسل الاحماض النووية والتي تعد الاحداث (Webster وآخرون،2004). لذلك سوف يتم الإسهاب في مراجعة التقنيات الجزيئية في تشخيص الفايروسات النباتية بوصفها ذات علاقة بدراستنا هذه.

2-3-1: التقنيات الجزيئية في تشخيص الفايروسات النباتية

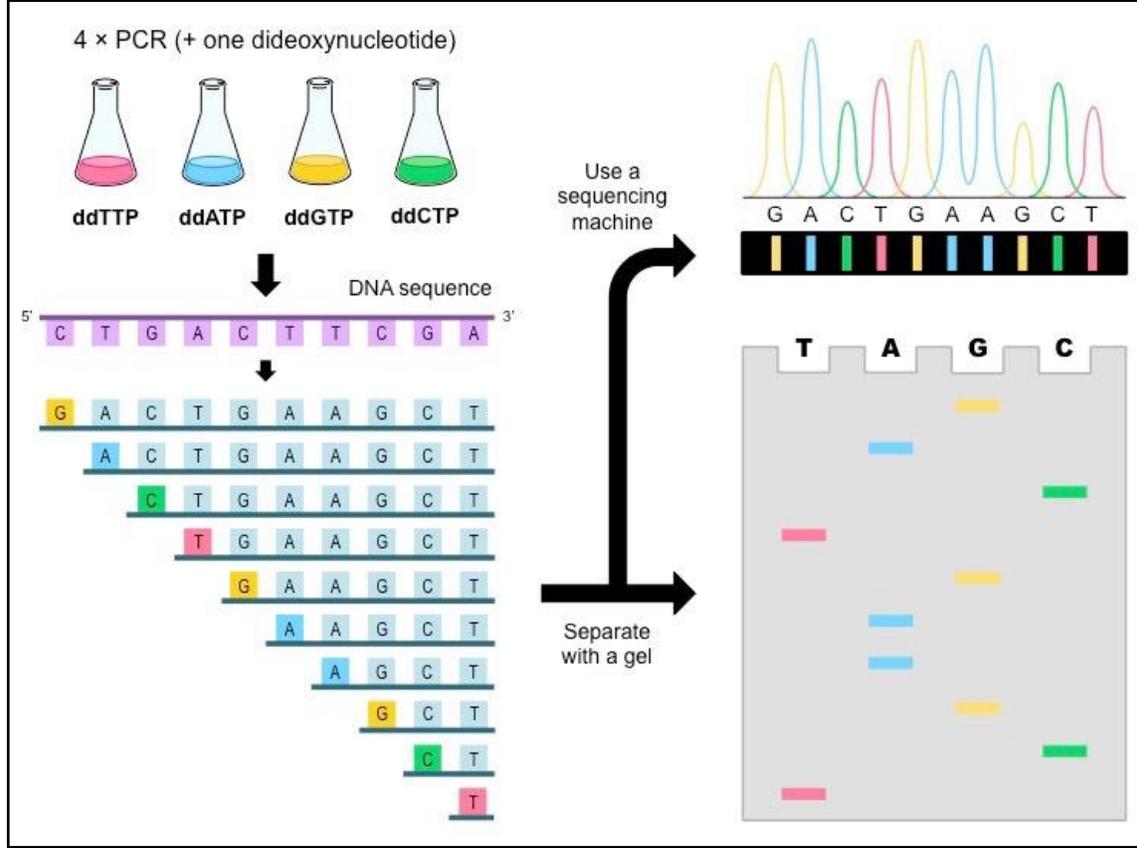
إنّ أساس عمل تقنيات التشخيص الجزيئي هي الأحماض النووي للمسببات المرضية بصورة عامة ومن ضمنها الفايروسات، اذ يمكنها استهداف أي منطقة أو جين في الجينوم الذي يمثل 90-95% من الجسيمة الكاملة للفايروس. وحالياً يمكن تطبيق التقنيات الجزيئية بديلاً ناجحاً عن الطرق المصلية في تشخيص العديد من الأمراض النباتية ألفايروسية وذلك عندما تتوفر المعلومات الوراثية للفايروسات وموخرًا تم تطوير هذا التقنيات من اجل تطبيقها حتى وان لم تتوفر هذه المعلومات (Hadidi،2019). أنّ استعمال الطرق الجزيئية في الوقت الحاضر أصبح بشكل شائع بسبب الدقة والحساسية العالية وحالياً تتوفر العديد من التقنيات التشخيص الجزيئي للفايروسات (Ju وآخرون،2014):

2-3-1-1: تحديد تسلسل الأحماض النووية DNA و RNA

بعد الجهود الحثيثة من قبل عدد كبير من العلماء حول اكتشاف الحمض النووي وبنيته الإجمالية والتي تكلفت بالنجاح في العام 1953 من قبل العالمان Watson و Crick ، اصبح من الضروري تحديد التفاصيل الدقيقة وأنماط الهيكل لهذا المركب الحيوي العجيب اذ يقن علماء الحياة مباشرة بعد هذا الاكتشاف العظيم أنّ 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).

أولاً: طريقة الجيل الأول First generation sequencing

أنّ أول من وضع الحجر الأساس في مجال تحديد تسلسل الاحماض النووية هما العالمان Sanger و Coulson اذ نجحا في العام 1975 ولأول مرة التاريخ في تحديد تسلسل عاثي بكتيريا الإشريكية القولونية (*E. Coli bacteriophage*) بعد تطويرهم طريقة خاصة أطلقوا عليها تسمية إنهاء السلسلة (Chain-termination) والتي عرفت لاحقاً بطريقة (Sanger Sequencing) (شكل 4) وتتضمن عدة خطوات تشمل تنقية وتمسخ الحمض النووي المستخلص ثم يقسم بالتساوي ويوزع على أربعة أنابيب في كل أنبوبة انزيم النسخ (Taq polymerase) للحمض 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، اذا ارتبطت فانها تعمل على ايقاف بناء امتداد خيط DNA في هذه النقطة. وهذا يؤدي الى انتاج قطع من الـ DNA بطوال مختلفة وأنّ نوعاً واحداً فقط من ddNTP تمت اضافته في كل انبوبة لذلك اصبح معروفاً 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. ولقد تم عدّ هذه التقنية هي الجيل الأول ضمن تقنيات تحديد تسلسل القواعد النايتروجينية للاحماض النووية بوصفها أول الاختراعات المستعملة في هذا المجال وكانت الوحيدة المعروفة لمدة 30 سنة تقريباً (Chain و Heather، 2016). وبالرغم من 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 أخرى.



شكل (4): مخطط توضيحي لطريقة Sanger Sequencing (Marquis-Hrabe وآخرون، 2023)

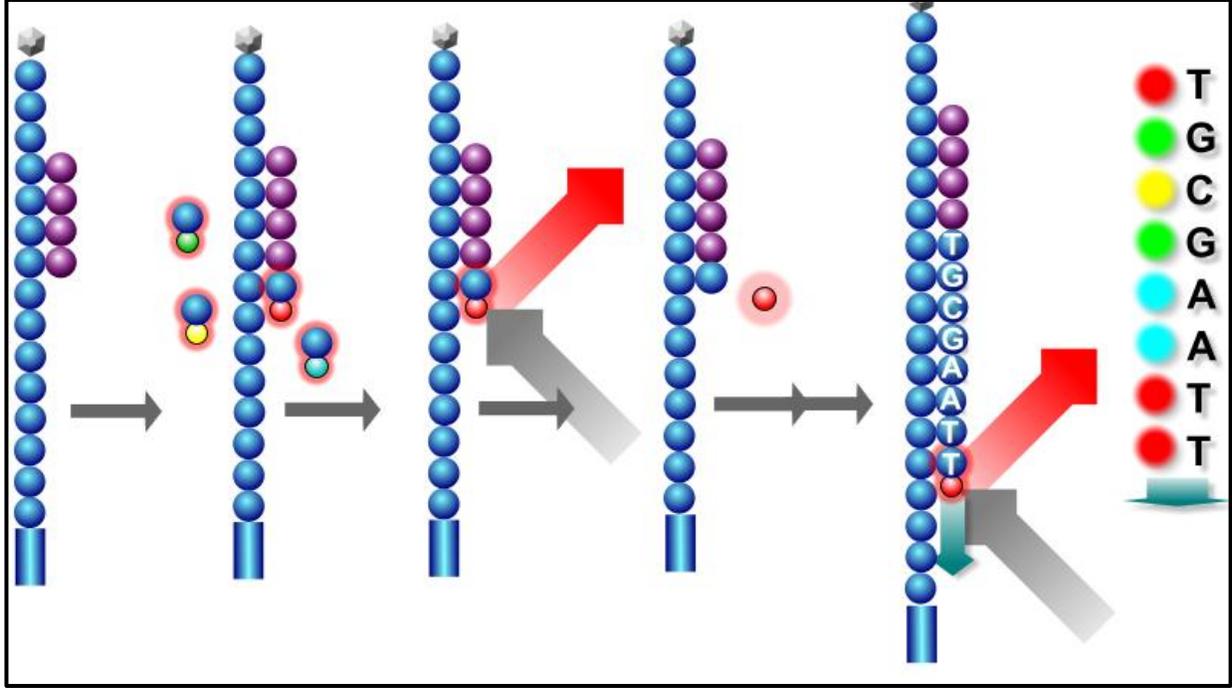
ثانياً : طرق الجيل الثاني Second generation sequencing

يوجد في الوقت الحاضر العديد من التقنيات المستعملة ضمن الجيل الثاني التي تسمى تسلسل الجيل التالي (Next generation sequencing (NGS)، ويشار إليه أيضاً بطرق التوازي على نطاق واسع High throughput sequencing ، او التسلسل ذو الإنتاجية العالية Massively parallel sequencing ، أو التسلسل العميق Deep sequencing . إذ أنّها سببت الزيادة وبشكل كبير جداً 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 وآخرون، 2014؛ Mahon و Lehman، 2019). إذ يتم اعتماد تقنية تسلسل الجيل القادم (NGS) على نطاق واسع، وهي طريقة لمعرفة التسلسل الملايين الأجزاء من الحامض النووي ، ولها قدرة على تحليل عدة جينات أو مناطق جينية باستعمال اختبار واحد مقارنة بالطرائق التقليدية ، فقد تطور استعمال NGS كما هو الحال مع أية تقنية جديدة (Yohe وآخرون ، 2017). إذ أتاح ظهور تسلسل الجيل القادم (NGS) تحديد الطفرات ورسم خرائط لها بسهولة في

مدة قصيرة ، وبتكلفة منخفضة نسبيا . يعد تحديد الطفرات الجينية والجينات التي تكمن وراء التغيرات المظهرية أمراً ضرورياً ، لفهم مجموعة واسعة من الوظائف الاحيائية. وأنّ لها اهمية بتسهيل أساليب تحرير الجينوم، واحداث الطفرات للعديد من المحاصيل المهمة جعلت تقنيات NGS إجراءات رسم الخرائط، والتسلسل أكثر جدوى وأصبحت أداة أساسية لعلماء وراثه المحاصيل لتحديد وتوصيف الاختلافات الجينية المرتبطة بالسمات المهمة اقتصاديا. فقد تم تطوير العديد من الأساليب الجينية المتقدمة عالية الإنتاجية والقائمة على NGS وتطبيقها في محاصيل مختلفة. وأنها ساعدت في تحديد الاختلافات الوظيفية التي تحدث في الجينات (Sahu وآخرون ، 2020) . من المعروف أن الفايروسات تسبب خسائر كبيرة في غلة، وجودة المحاصيل المختلفة ، ومن ثم فإن الكشف عن الفايروسات، وتشخيصها هو أمر ضروريا لتحسين انتاج المحاصيل وله أهمية كبيرة فيما يتعلق بالأمن الغذائي العالمي. على الرغم من أن اعتماد التقنيات الجزيئية مثل RT-PCR قد زاد من سرعة تشخيص الفايروسات ودقته، لكنها تسمح فقط باكتشاف الفايروسات المعروفة ، التي يحددها الباحث اعتمادا على الأعراض. لذلك، لا يمكن كشف الفايروسات غير المعروفة وتشخيصها، وأيضا هذه الاختبارات تكون بطيئة ومكلفة، ولذلك تم تطوير طرائق للكشف عن فايروسات متعددة في أن واحدٍ من هذه الطرائق هي NGS ، التي تعتمد على استخلاص الجينوم الكامل ، فأصبح الآن محورًا رئيساً في هذا المجال ؛ لأن هذه التقنية لاتسمح بالتحيز والفرصيات وايضا تم تطوير بروتوكولات NGS القادرة على تشخيص العديد من الفايروسات المعروفة وغير المعروفة الموجودة في النباتات المصابة ، فربما تكون أعراض الأمراض غائبة أو غير محددة أو تسببها فايروسات متعددة و خلال هذه التقنية تم تشخيص فايروسات جديدة لم تكن معروفة سابقا هي فايروسات *Cytorhabdovirus* (Pecman وآخرون ، 2017 و Raza و Shahid ، 2020). تتصف هذه التقنية بالحصول على تشخيص سريع وغير مكلف وموثوق به لأي عدوى فايروسية معينة ومن ثم معرفة طريقة مكافحة هذه العوامل الممرضة في كل مكان والسيطرة عليها. أحدثت التطورات الأخيرة في تقنيات تسلسل الجيل التالي NGS والمعلوماتية الاحيائية تغييرا جذريا في البحث عن مسببات الأمراض الفايروسية وتشخيصها (Massart وآخرون ، 2014) . وهذا يسלט الضوء على أهمية ضمان اختبار أفضل التطورات العلمية والتشخيصية وتقييمها وتنفيذها باستمرار في أثناء تطورها (Whattam وآخرون ، 2021) ، من المهم أن نفهم علم الجينوم الفايروسي فإن تقدم تقنيات NGS أنسب منصة لتسلسل السريع الفايروسات النبات ، مما يكون لدينا فهم أفضل لتكاثر الفايروسات ومسببات الأمراض. من ناحية أخرى ، تلعب قواعد البيانات الاحيائية s Japan والمختبر الأوروبي للبيولوجيا الجزيئية (EMBL) European Molecular Biology Laboratory دورا مهما في استرداد البيانات وتحليلها و (Raza و Shahid ، 2020) أما في العراق فقد استخدمت تقنية NGS بنجاح في تشخيص فايروسات اصفار و تجعد اوراق الطماطة Tomato

Yellow Leaf Curl Virus السلالة المعتدلة وتابعه بيتا وفايروس تجعد اوراق الطماطة وتابعه بيتا Tomato Leaf Curl betasatellite (عباس،2022).

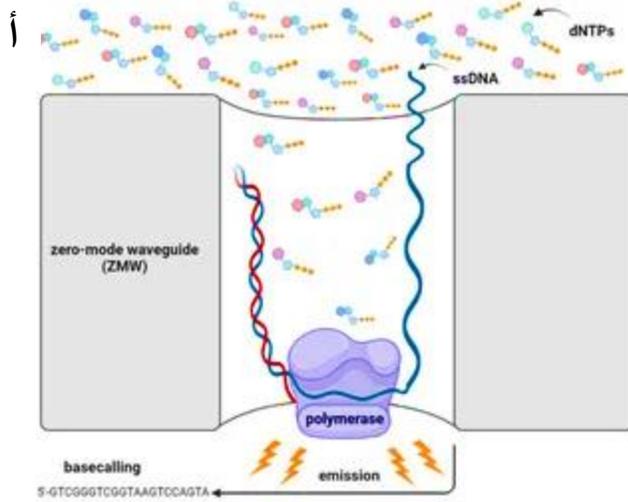
ويوجد حالياً العديد من الشركات المتخصصة التي تستعمل طرق تسلسل الجيل التالي مثل Ion PGM Sequencing و Pyrosequencing و SOLiD Sequencing و Illumina، علماً أنّ الأساليب المتبعة تختلف بين هذه الشركات والتي بتطور و يتحسن اداؤها باستمرار وفيما يلي نظرة عامة على تقنية شركة Illumina التي تعد الأكثر انتشاراً وقد استعملت في دراستنا الحالية. اذ تستعمل هذه الشركة طريقة تحديد التسلسل بالتوليف او التجميع (SBS) Sequencing-by-Synthesis (شكل 5) اذ يتم تثبيت شظايا الحمض النووي سواء كانت الـ DNA او الـ RNA المقطعة بوساطة 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 باسمات او صبغات فلورية مشعة ذات ألوان 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 النايروجينية التي تشمل المناطق المشفرة (الجينات) والمناطق غير المشفرة لجينوم الكائن الحي. وأيضاً 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 اعتماداً على نشاط وكثافة إنتاج الـ mRNA المسؤولة عن إنتاج البروتينات والتي من خلالها يتم تحديد أي من الجينات النشطة واي منها غير النشط اعتماداً على الظروف أو البيئة التي تعيش بها تلك الكائنات (Thorburn، 2016; Rubio و اخرون، 2020).



شكل (5): مخطط توضيحي لطريقة تحديد التسلسل بالتوليف او التجميع Sequencing-by-Synthesis
(www. Illumina.com)

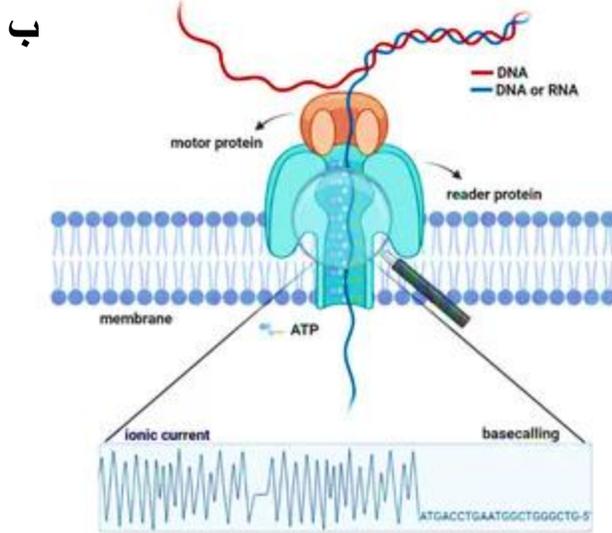
ثالثاً : طرق الجيل الثالث Third generation sequencing

تُعد هذه الطرق الاحداث في مجال تحديد تسلسل القواعد النايتروجينية للأحماض النووية ومبدأ عملها يعتمد على تحديد تسلسل الجزيئة المفردة (SMS) Single molecule sequencing او التسلسل اللحظي Real-time sequencing وتمتاز بقدرتها على تحديد تسلسل الجزيئات المفردة من الاحماض النووية الـDNA و الـRNA، مما يلغي الحاجة إلى تضخيم الحمض النووي بواسطة طريقة الـPCR المشتركة بين جميع التقنيات السابق وأيضا سرعتها تكون عالية اذ تحتاج اقل من يوم مع إنتاج لتسلسلات او قراءات مفردة بمعدل طول بين 5000 إلى 15000 وبعضها يتجاوز 100.000 قاعدة نايتروجينية و 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 (شكل 6) (Athanasopoulou وآخرون، 2022).



الشكل (6): مخطط توضيحي لكلا تقنيات التسلسل من الجيل الثالث.

(أ) تسلسل PacBio. تعتمد الطريقة على تسلسل الحمض النووي عن طريق التوليف. يتم ربط الحمض النووي المفرد الذي تقطعت به السيل بالبوليميراز المستقر، الذي يحفز دمج dNTPs في حبلا الحمض النووي التكميلي المركب حديثاً. يحدث التفاعل في أدلة موجية ذات وضع صفري (ZMWs) مصممة خصيصاً والتي تمكن من مراقبة الضوء المنبعث. بعد ذلك، تتم ترجمة الإشارة إلى تسلسل النيوكليوتيدات، وهو إجراء يعرف باسم الاتصال الأساسي.



(ب) تسلسل النانواكسفورد. تعتمد الطريقة على توجيه الحمض النووي المفرد أو جزيء الحمض النووي الريبسي (RNA) إلى ثقب النانو، وهو بروتين قارئ يكتشف التغيرات في التيار الكهربائي، والتي تحدث أثناء مرور الحمض النووي / الحمض النووي الريبسي (RNA).

(www.nanoporetech.com)

4-2: المكافحة و الإدارة المتكاملة لفايروسات النبات Integratet Pest

Management/Control

تعد المكافحة المتكاملة للآفات نهجاً شاملاً يهدف إلى إدارة الآفات بطرق مستدامة وفعالة مع تقليل الأضرار البيئية والصحية والتركيز على مبدأ أن الآفات هي جزء من النظام البيئي، وبالتالي يجب إدارتها بطرق تراعي التوازن البيئي.. يجمع هذا النظام بين مختلف الاستراتيجيات والممارسات لتحقيق سيطرة متكاملة على الآفات، مما يساهم في الحفاظ على توازن النظام البيئي ويقلل من الاعتماد المفرط على المبيدات الكيميائية (Radcliffe واخرون، 2009; Falkenberg واخرون، 2022).

تعود أسباب الاهتمام المتزايد بنهج مكافحة المتكاملة للأفات، بما في ذلك مسببات الأمراض النباتية، إلى كونه أسلوبًا مستدامًا يجمع بين الطرائق الزراعية والفيزيائية والأحيائية، مع إمكانية استخدام الطرق الكيميائية بتركيزات مثالية وبطريقة صحيحة كخيار أخير واختيار غير الضارة منها والمتخصصه (التميمي، 2019). وأشار Lamichhane وآخرون (2017) إلى أن الإدارة الفعالة لمسببات الأمراض تتطلب تطوير عدة أساليب رئيسية يمكن تلخيصها في: معالجة البذور لتعزيز الإنبات وتقوية نمو البادرات، اتباع أفضل الممارسات الزراعية، تطوير أصناف نباتية مقاومة أو متحملة لتأثير المسببات المرضية، والتطبيقات العلاجية باستخدام منتجات فعالة في الوقت المناسب، سواء كانت عوامل أحيائية أو مبيدات أحيائية أو كيميائية. وعند ممارسة هذا الأسلوب يتبع المزارعون الذين يدركون احتمالية الإصابة بالأفات نهجًا من أربعة مستويات. تتضمن هذه المستويات تحديد المستوى الاقتصادي الحرج للأفات، المراقبة المستمرة والتشخيص الدقيق للأفة، تطبيق أساليب مختلفة لمنع انتشار الآفة، وأخيرًا اختيار الأسلوب الأمثل للبدء بالمكافحة (Deguine وآخرون، 2021). وتشتمل أساليب مكافحة المتكاملة على تطبيق العديد من الطرق المختلفة أبرزها .

1-4-2: الأصناف المقاومة او المتحملة

يُعد زراعة الأصناف المقاومة او المتحملة ركناً أساسياً في اي أسلوب ادارة او مكافحة فعالة ضد الأفات وخصوصا اذ ما تكاملت مع أساليب مقاومة أخرى مثل تطبيق بعض العوامل الاحيائية او المراقبة المستمرة لكثافة الافة وتطبيق الاساليب الزراعية التي تقلل من الظروف الملائمة لإنتشار المسببات المرضية وهذه بالنتيجة سوف تقلل من استعمال المبيدات الكيميائية بشكل كبير. لقد طورت العديد من النباتات نظاماً دفاعياً معقداً يستند آلية تأثير جين واحد يسمى بالجين المقاوم (Resistant gene) او مجموعة من الجينات (Quantitative trait loci) التي تشترك مع بعضها في مقاومة الأفات (Andolfo ، وآخرون 2021). يتم تحفيز عمل الجين المقاوم عن طريق القيام بمجموعة متنوعة من التغييرات التي تحدث عند حدوث الإصابة ويمكن أن تنقل بسرعة هذه الإشارة والاستجابة لتحفيز مجموعة متنوعة من الجينات المختلطة للعمل سوية ضد الافة وتعد استراتيجية تربية الأصناف المقاومة من أهم الاستراتيجيات المتبعة لضمان جودة المنتج وكميته (Saddique ، وآخرون 2022).

تعد الأصناف المقاومة والمتحملة ضرورية للسيطرة على فايروسات النبات من خلال توفير المقاومة الجينية للفايروسات وناقلاتها. وتركز برامج التربية على دمج عوامل مقاومة متعددة في المواد الوراثية النخبوية لمكافحة الأمراض الفايروسية الناشئة. اذ تتيح الخرائط الجينية ذات العلامات الجزيئية المرتبطة بجينات مقاومة الفيروسات الاختيار بمساعدة الواسمات للأنماط الجينية المتفوقة. بالإضافة إلى ذلك، تساعد معرفة الجينات

الفايروسية والجينومات في تطوير نباتات مقاومة فعالة. وبشكل عام، تلعب التربية من أجل المقاومة والتحمل دورًا حيويًا في إدارة فايروسات النبات بفعالية (Boiteux وآخرون، 2012؛ Rosa و Falk، 2014).

وقد أشار Paudel وآخرون (2018) إلى أن الأصناف المقاومة على تقييد تكاثر وتراكم الفايروسات أو حركتها بين الخلايا أو جهازياً، بينما تسمح الأصناف المتحملة للفايروسات بالتراكم دون خسارة كبيرة في قوة المضيف. ويتضمن التحمل توازناً مستقرًا بين الفايروس والمضيف، إذ يستفيد كلاهما. إذ تشمل آليات التحمل موازنة استجابات دفاع النبات والدفاعات المضادة للفايروسات، وقمع الترجمة، ومسارات تحلل البروتين، واستراتيجيات التوهين الذاتي الفايروسي كما بالإضافة إلى تكوين مضادات الأكسدة والتحمل مع النواقل مثل حشرة الذبابة البيضاء. وعموماً تمنع الأصناف المقاومة انتشار الفايروسات، بينما تستوعب الأصناف المتحملة وجود الفايروس دون عواقب وخيمة. وعموماً تقدم هذه الأصناف حلولاً مستدامة وصادقة للبيئة لمكافحة الفايروسات في الزراعة. ومع ذلك، يمكن أن تكون فعالية هذه الأصناف محدودة بسبب خصوصية آليات المقاومة وتنوع الفايروسات. لذلك يعد إجراء مزيد من الأبحاث في تعزيز مقاومة النبات من خلال الأساليب الجينية والجزئية أمرًا بالغ الأهمية لتحسين فعالية الأصناف المقاومة والمتحملة في مقاومة الإصابة الفايروسية (Anikina وآخرون، 2023).

وهناك أمثلة عديدة على وجود الجينات المقاومة في الباميا مثل الجين R الموجود في صنف «Sabz Pari»، الذي يقوم بترميز آليات الدفاع التي تعيق هجوم فايروسات النبات مثل فايروس *Okra yellow vein mosaic virus (OYVMV)*. تلعب هذه الجينات دورًا مهمًا في حماية النبات من خلال بدء إشارات الدفاع، وتحفيز الآليات المستحثة، وتحفيز إنتاج المركبات المضادة للميكروبات. يساعد وجود جينات المقاومة هذه في صد هجمات الفايروسات وتقليل شدة العدوى الفايروسية في نباتات البامية، مما يساهم في نهاية المطاف في قدرة النبات على مكافحة الفايروسات النباتية بشكل فعال (Umar وآخرون، 2023).

كما تعمل جينات مقاومة أخرى في الباميا، مثل تلك الموجودة في النمط الجيني BCO-1، على مكافحة فايروسات النبات مثل *Yellow vein mosaic virus (YVMV)* و *Enation leaf curl virus (ELCV)* من خلال امتلاك خصائص مضادة للأكسدة. هذه الخصائص تجعل النمط الجيني مقاومًا للفايروس YVMV ومعرضًا بشكل معتدل للفايروس ELCV. تُعزى المقاومة إلى قدرة النمط الجيني على ردع الفايروسات، ربما من خلال آليات تمنع الفايروسات من إنشاء عدوى ناجحة. يمكن استعمال هذه المقاومة في برامج التربية لتطوير أصناف الباميا ذات المقاومة المزدوجة ضد مسببات الأمراض الفايروسية هذه (Jamir وآخرون، 2020).

كما تحارب جينات المقاومة في الباميا، وتحديداً في الأنواع البرية مثل *Abelmoschus angulosus* ، فايروسات النبات مثل فايروس Okra yellow vein mosaic virus (OYVMV) عن طريق إطلاق آلية إسكات الجينات استجابةً لعدوى الفايروس. في حالة OYVMV ، يمنح جينان متحان رئيسيان في *A. angulosus* مقاومة للفايروس. إذ تسمح آلية المقاومة هذه للنبات بصد الفيروس بشكل فعال، مما يجعله سمة قيمة لبرامج التربية التي تهدف إلى إدخال جينات المقاومة هذه إلى أنواع البامية الاقتصادية المزروعة مثل *A. esculentus* من خلال التهجين الواسع والاختيار بمساعدة الواسمات الجزيئية (Wasala واخرون، 2019).

بالإضافة إلى ما ذكر تُعد التراكيب أو الاصناف الوراثية النباتية المقاومة للآفات الحشرية الناقلة للفايروسات جزءاً لا يتجزأ من الإدارة والمكافحة الناجحة للفايروسات الممرضة المنقولة بواسطة هذه الحشرات، إلا أن هنالك صعوبات عديدة مرتبطة بتربية النباتات لمقاومة العديد من الحشرات، إذ أن الحشرات الناقلة للفايروسات متعددة كما أن دورات التكاثر الطويلة والصفات الوراثية المرتبطة بعدد من الجينات، جعلت التقدم في هذا المجال بطيئاً (Brzozowski و اخرون، 2020). وبالرغم من ذلك توجد هنالك امثلة ناجحة ضمن هذا المجال فمثلاً كشفت دراسة قام بها Dhankhar واخرون (2005) ان المقاومة لفايروس Yellow vein mosaic virus (YVMV) في الباميا يتم التحكم فيها من خلال جينين مهمين متكاملين. وإن أبرز الجينات لمقاومة الحشرات الناقلة للفايروسات في الباميا هما جينان سائدان متكاملان في التهجينات الحساسة وجينان سائدان مكرران في التهجينات المقاومة.

كما وجدنا في ثلاثة أنماط وراثية للباميا، وهي AE 64 و AE 65 و AE 66 ، انها محصنة ضد فايروس Okra yellow vein mosaic virus (YVMV) الذي ينتقل عن طريق حشرة الذبابة البيضاء. إذ اظهرت هذه الأنماط الجينية مقاومة فعالة، مما يجعلها مرشحة واعدة لبرامج التربية التي تهدف إلى تطوير المقاومة ضد الحشرات الناقلة للفايروسات في البامية. بالإضافة إلى ذلك، فإن التركيبات الهجينة المحددة مثل AE 64 × AE 65 و AE 64 × AE 66 و AE 65 × AE 64 و AE 65 × AE 66 لم تظهر أيضاً أي أعراض للإصابة الفايروسية مما يشير إلى أن هذه الأنماط الجينية والهجينة تمتلك جينات تمنح مقاومة للحشرات الناقلة للفايروسات في الباميا (Soberwell Rynjah واخرون، 2018).

2-4-2: المكافحة الكيميائية للحشرات الناقلة

تلعب المبيدات دوراً حيوياً في إدارة الآفات الزراعية والأمراض التي تصيب النباتات، بما في ذلك الفايروسات التي تنتقل عبر الحشرات. وتعد الحشرات الناقلة للفايروسات من أخطر التحديات التي تواجه

الإنتاج الزراعي، إذ يمكن أن تتسبب في خسائر كبيرة في المحاصيل وتؤثر على الأمن الغذائي بالإضافة إلى نقلها للفايروسات التي تسبب هي الأخرى خسائر كبيرة على المحاصيل. وتعد حشرات الذبابة البيضاء، والمن، والترس، من أبرز الناقلات التي تنقل الفيروسات النباتية إلى المحاصيل (Pimentel، 2009). وتستعمل المبيدات الكيميائية ضد ناقلات الفايروسات النباتية منذ فترة طويلة. ولغرض التطبيق الأمثل لهذه المبيدات من المستحسن دائماً معرفة العلاقة الكاملة بين الناقل والفايروس والتي تشير إلى ما إذا كانت من فئة غير باقية أو شبه الباقية أو الباقية (Chandi، 2021). إذ اثبتت المبيدات الكيميائية نجاحها في السيطرة وبفعالية على الفايروسات النباتية التي تنتقل بالطريقة الباقية (التكاثرية) وشبه الباقية (المتداولة) بالمبيدات الحشرية إذ وجد Perring وآخرون (1999) أنه من بين النجاحات في السيطرة على انتشار الفايروسات باستعمال المبيدات الحشرية، كانت هنالك نسبة عالية (94 من 119 حالة) ضد الفايروسات التي تنتقل بشكل شبه الباقية (Semi-persistent) أو الباقية (Persistent). وبالرغم من أن العديد من المبيدات الحشرية الجهازية وغير الجهازية اثبتت كفاءتها في السيطرة على الناقلات الحشرية إلا أن استعمال المبيدات الحشرية ليس فكرة جيدة فيما يتعلق بإدارة أو مكافحة النواقل التي تنقل الفايروسات النباتية بالطريقة غير الباقية (Non-persistent). وذلك لأن هذه الفايروسات تحتاج وقت قصير لاكتسابها من قبل الحشرات الناقلة إذ حتى وإن كانت المبيدات فعالة ضدها يكفي بقاء عدد قليل من الحشرة التي يمكنها اكتساب الفايروس بسرعة ونشره في الحقل أضف إلى ذلك هناك العديد من المبيدات الكيميائية تكون غير متخصصة لذلك فهي تؤثر على الأعداء الحيوية للحشرات الناقلة ونتيجة لذلك، سيزداد عدد ناقلات الفايروسات ويسبب في حدوث أضرار جسيمة (Feres و Moreno، 2009). ويمكن استعمال مواد كيميائية مختلفة إدارة ومكافحة الناقلات الحشرية مثل المواد الكيميائية من أصل نباتي، ومضادات التغذية، طارد الحشرات والفيرومونات والطعم والزيوت المعدنية والمبيدات الحشرية (West و Mordue، 1992).

إن من أبرز النواقل الحشرية للفايروسات النباتية هي حشرة الذبابة البيضاء التي تسمى أيضاً حشرة الذبابة البيضاء الفضية والذبابة البيضاء البطاطا الحلوة واسمها العلمي هو *Bemisia tabaci* Gennadius التي تعود إلى العائلة Aleyrodidae التي تعود إلى رتبة Hemiptera (Navas-Castillo وآخرون، 2011؛ سلمان، 2021). تمتاز بدورة حياتها القصيرة نسبياً اعتماداً على الظروف البيئية السائدة كما أن لديهم عدة أجيال سنوياً (مكوك وآخرون، 2008). وتستغرق دورة حياتها التي تشمل البيضة، الحورية الزاحفة، طور الحورية الثاني، طور الحورية الثالث، العذراء والحشرة الكاملة عادة فترة ثلاثة أسابيع وتعيش فيها الإناث فترة زمنية أطول بمعدل يبلغ 20 يوماً تقريباً بينما يكون في الذكور تسعة أيام (القاسم، 1998).

تعد حشرة الذبابة البيضاء من الآفات الرئيسية المهمة للمحاصيل في الحقول المفتوحة في جميع أنحاء المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية. ويرجع ذلك في جزء كبير منه إلى القائمة الطويلة والمتنوعة من الفيروسات النباتية المدمرة التي تنقلها. اذ ظهرت على مدار العشرين عامًا الماضية العديد من الفيروسات التي تنتقل عن طريق حشرة الذبابة البيضاء كتهديد عالمي لإنتاج المحاصيل في مجموعة واسعة من المحاصيل ويرجع هذا الظهور في جزء كبير منه إلى حركة النباتات وأجزاء النبات التي توزع كل من النواقل والفيروسات إلى مواقع جديدة. لذلك أصبحت الأمراض التي تسببها الفيروسات المنقولة بالذبابة البيضاء مقيدة لإنتاج الحقول المفتوحة لمجموعة واسعة من المحاصيل، مثل مرض موزائيك الفاصوليا الذهبية في الفاصوليا، ومرض تجعد واصفرار أوراق الطماطة في الطماطة ، ومرض موزائيك الكسافا ، ومرض تجعد أوراق القطن في القطن (Paredes-Montero وآخرون، 2019). التي ينتج عنها خسائر اقتصادية في الحاصل تتراوح بين 50 - 90 % اعتماد على نوع المحصول والظروف البيئية (Al-ani وآخرون ، 2011). وقد أشار Mugerwa وآخرون (2018) إلى أن هذه الحشرة مسؤولة عن نقل العديد من الفيروسات النباتية التي تقدر أعدادها بأكثر من 111 فيروس يعود 90 % منها إلى جنس *Begomovirus* و 6% إلى جنس *Crinivirus* والـ 4% الباقية تعود إلى الأجناس *Torradovirus* و *Ipomovirus* و *Carlavirus*.

تتمثل الإستراتيجية الرئيسية للحد من انتشار النباتات المصابة بالفيروسات في حالة عدم وجود الأصناف المقاومة هي استعمال المبيدات الحشرية لتقليل أعداد الناقلات. ومع ذلك ، بسبب المخاوف بشأن تأثير المبيدات الحشرية على الحشرات الملقحة بالإضافة إلى الطلب المتزايد من قبل المستهلكين في ضرورة تقليل استعمال المبيدات الكيميائية، اضعف قدرة حشرة الذبابة البيضاء على تطوير مقاومة للعديد من المبيدات الحشرية التي تستعمل ضدها، دعا إلى ضرورة التطوير المستمر ونشر استراتيجيات لا تعتمد على المبيدات الحشرية لوحدها (King وآخرون، 2018). اذ يمكن أن تصبح المقاومة الكيميائية باستعمال المبيدات الحشرية جنبًا إلى جنب مع استراتيجيات مكافحة المتكاملة الأخرى للآفات وسيلة فعالة لزيادة غلة المحاصيل المنتجة في الحقول المفتوحة على الرغم من وجود الفيروسات المنقولة بالذبابة البيضاء (Fiallo-Olivé ، 2020).

وكثيراً ما تتم إدارة أو مكافحة حشرة الذبابة البيضاء حالياً خلال تطبيقات متعددة لمجموعة واسعة من المبيدات الحشرية، وذلك من أجل تقليل أعدادها والحد من انتشار الفيروسات (Sani وآخرون، 2020). يتطلب الاستعمال الأمثل لهذه المبيدات عدة اعتبارات منها اختيار المبيد المناسب وتوقيت استعماله الذي يجب ان يكون مستنداً إلى نتائج الكشف الميداني لتجمعات الحشرة ووصولها إلى المستوى الحرج مع ضرورة استعمال المبيدات الحشرية في تناوب اذ يتم استعمال مبيدات حشرية ذات أنماط تأثير مختلفة بحيث يتم منع أو تأخير تطوير مقاومة ضد أي مبيد حشري من قبل الحشرة (الخرجي، 2021).

تشمل مبيدات الآفات الأكثر شيوعًا لمكافحة حشرة الذبابة البيضاء، مبيدات neonicotinoids ، abamectin ، (thiamethoxam ، nitenpyram ، acetamiprid ، imidacloprid) ، cyantraniliprole ، و sulfoxaflor . من بين هذه المبيدات، وجد أن pyriproxyfen غير ضار بالطفيلي *Encarsia formosa*، وهو أمر بالغ الأهمية لمكافحة حشرة الذبابة البيضاء. بالإضافة إلى ذلك، أبرزت الدراسة أن pyriproxyfen cyantraniliprole كانا الأقل سمية لـ *E. formosa*، مما يشير إلى ملاءمتها المحتملة لبرامج الإدارة المتكاملة للآفات (Wang وآخرون، 2019).

3-4-2: دور المركبات النانوية Nanoparticles في مقاومة الأمراض النباتية

تُعد تقنية النانوتكنولوجي Nanotechnology واحدة من العلوم المبتكرة الحديثة التي لديها إمكانات هائلة لإحداث ثورة في مجالات الحياة المختلفة ومنها الزراعة والمجالات المرتبطة بها (Coles و Frewer 2013). اشتقت تسمية هذه التقنية من الكلمة اليونانية نانوس Nanos التي تعني القزم أو الشيء الصغير جدا واستعملت كوحدة رياضية تساوي جزء واحد من مليار جزء أي في حالة تجزئة المتر الواحد الى مليار جزء فان الجزء الواحد يساوي نانوميتر. وتسمى المادة بالنانوية عندما يكون أحد ابعادها الثلاث (الطول-العرض-الارتفاع) بمقياس 1-100 نانوميتر علما انه إذا كان بعد واحد بمقياس نانوي تسمى المادة بهذه الحالة بالرقيقة النانوية وإذا كان بعدان ضمن المقياس النانوي تسمى عندئذ بالسلك أو الانابيب النانوية اما إذا كانت جميع الابعاد الثلاث بمقياس نانوي (عبد الله، 2014). حالياً تسمى هذه التقنية عند استعمالها في المجال الغذائي والزراعي بالزراعة النانوية (Nanoagriculture) اذ ان لديها إمكانات هائلة لتحسين إنتاجية المحاصيل الحقلية المختلفة (Grue`re وآخرون، 2011)، وبالتالي زيادة إنتاج الغذاء العالمي وتحسين نوعيته (Biswal وآخرون 2012)، وتقليل الفقد في الموارد الطبيعية (Prasad وآخرون، 2014). كما يتم استعمالها وبنجاح في حماية النباتات من المسببات المرضية المختلفة التي تشمل الفايروسات (Pe´rez-de-Luque و Hermosin، 2013).

وتقدم تقنية النانو نهجًا واعدًا لمكافحة مسببات الأمراض النباتية من خلال تعزيز فعالية مبيدات الآفات ومبيدات الفطريات. اذ يمكن استعمال الجسيمات النانوية المنتجة إما بشكل مباشر أو كناقلات لعوامل مكافحة الأمراض هذه مثل المبيدات وذلك من خلال تحسين قابلية الذوبان ومدة الصلاحية وتقليل السمية، اذ يمكن لتقنية النانو أن تجعل المواد الكيميائية الزراعية أكثر ملاءمة للبيئة. بالإضافة إلى ذلك، فإن الجمع بين تقنية النانو والتشخيص الجزيئي يتيح الكشف السريع والدقيق لأمراض النبات، مما يؤدي إلى علاجات أكثر

استهدافًا. بشكل عام، تُظهر تقنية النانو إمكانات كبيرة في السيطرة المستدامة على الأمراض النباتية (Ray وآخرون، 2023).

أشار Vijayreddy وآخرون (2023) إلى أن تقنية النانو تقدم حلولاً للسيطرة على مسببات الأمراض بشكل مباشر وفعال. إذ يتم تصنيع الجسيمات النانوية مثل الفضة والنحاس وأكسيد الزنك واستعمالها بنجاح لمكافحة أمراض النبات دون الحاجة إلى مبيدات الآفات السامة. كما تتيح هذه التقنية الكشف السريع عن مسببات الأمراض ومكافحة الآفات القائمة على أجهزة الاستشعار الحيوية وتحسين إدارة التربة. وقد تلعب تقنية النانو دورًا مهمًا في تقليل خسائر المحاصيل (20-40%) التي تسببها الأمراض والآفات، مما يوفر بديلاً أكثر أمانًا واستدامة للطرق الكيميائية التقليدية.

كما تقدم تقنية النانو حلولاً واعدة للحد من سمية مبيدات الآفات، ومعالجة المخاوف البيئية والصحية. يتمثل أحد التطبيقات المهمة في تطوير مبيدات الآفات المغلفة بالنانو، والتي تستعمل الكبسولات النانوية والمستحلبات النانوية والمذيلات والنانوجيل لتعزيز فعالية مبيدات الآفات مع تقليل تأثيرها البيئي. إذ تحمي هذه الكبسولات النانوية، خاصة تلك التي تحتوي على غلاف أساسي، مكون مبيد الآفات النشط وتسمح بالتوصيل المستهدف، مما يقلل من التسرب والتصريف إلى المسطحات المائية وخفض الجرعات المطلوبة من المكونات النشطة (Kumar وآخرون، 2024). بالإضافة إلى ذلك، تعمل المواد النانوية كمواد ماصة فعالة ومحفزات ضوئية لإزالة مبيدات الآفات من مصادر المياه المختلفة، والاستفادة من خصائصها الفيزيائية الكيميائية الممتازة ووظائفها القابلة للضبط لتحقيق كفاءة إزالة أعلى مقارنة بالطرق التقليدية (Sahithya وآخرون، 2022). لذلك تقدم المواد النانوية المهندسة، المعززة من خلال وظائف السطح والمسامية وقدرات الاستهداف المحددة، حلولاً مستدامة لإزالة المواد السامة الثابتة مثل الكلور العضوي والفسفات العضوي، والتي يصعب التخلص منها باستخدام الطرق التقليدية (Rani وآخرون، 2021). علاوة على ذلك، أظهرت المعالجة الحيوية النانوية، التي تجمع بين تقنية النانو وتقنيات المعالجة الحيوية، إمكانات كبيرة في اكتشاف مبيدات الآفات الخطرة وتدهورها وإزالتها من المواقع الملوثة، مما يجعلها نهجًا عالي الكفاءة لتنظيف البيئة بشكل عام، لا يؤدي دمج تقنية النانو في إدارة مبيدات الآفات إلى تقليل السمية فحسب، بل يعزز أيضًا استدامة وفعالية الممارسات الزراعية وجهود المعالجة البيئية (Das و Thakur، 2022).

وكمثال على هذا التعاون الناجح بين تقنية النانو والمبيدات الكيميائية ما قام به Ditta (2012) من تطوير وإنتاج الانابيب النانوية الطينية التي تعمل كحوامل للمبيدات الآفات إذ وجد أنها تمتاز بالتكلفة المنخفضة والإطالة في إطلاق المبيد مع تحقيق تلامس أفضل مع النباتات وهذه الخصائص بطبيعة الحال سوف تقلل من كمية المبيدات المرشوشة بنسبة 70-80% وبذلك التقليل من كلفة المبيدات وتأثيراتها السلبية،

تشمل طرق إنتاج الجسيمات النانوية مجموعة متنوعة من التقنيات الكيميائية والاحيائية، كل منها مصمم لتحقيق خصائص ووظائف الجسيمات المحددة كيميائياً، تتضمن إحدى الطرق الكيميائية الشائعة إذابة هيدروكسي بروبيل ميثيل سلولوز أسيتات سكسينات في مذيب عضوي، متبوعاً بالخلط بالماء لترسيب الجسيمات النانوية، مما يؤدي إلى مرحلة سائلة مختلطة وجسيمات نانوية مترسبة. بالإضافة إلى ذلك، يمكن تصنيع الجسيمات النانوية عن طريق تشتيت مسحوق أكسيد المعدن في خليط سائل أساسي وخافض للتوتر السطحي، متبوعاً بالطحن وإضافة الفاعل بالسطح الدوري لتحقيق حجم الجسيمات المطلوب (Thakur وآخرون، 2022). أن هذه السياقات تصف في المقام الأول الطرق الكيميائية، إلا أن الطرق الاحيائية تتضمن عادةً استعمال الكائنات الحية الدقيقة أو المستخلصات النباتية أو الإنزيمات لتقليل أيونات المعادن إلى جسيمات نانوية، والاستفادة من العمليات الكيميائية الحيوية الطبيعية. أن هذا النهج، المعروف باسم التوليف الأخضر، يلغي الحاجة إلى المواد الكيميائية السامة والعمليات الفيزيائية القاسية المستعملة عادةً في طرق إنتاج الجسيمات النانوية التقليدية، مما يجعلها أكثر ملاءمة للبيئة والإنسان مقارنةً بنظيراتها الكيميائية (Abuzeid وآخرون، 2023). يوفر التوليف الميكروبي باستخدام البكتيريا والفطريات والطحالب أيضاً بديلاً صديقاً للبيئة، إذ يستفاد من عمليات التمثيل الغذائي الطبيعية لهذه الكائنات لإنتاج الجسيمات النانوية (Sukul و Kar، 2023). أن طريقة التوليف الأخضر ليست فقط فعالة من حيث التكلفة وقابلة للتطوير ولكنها تعمل أيضاً في ظل الظروف المحيطة، مما يجعلها موفرة للطاقة (Chaurasia وآخرون، 2023). أظهرت الجسيمات النانوية المُصنَّعة باللون الأخضر إمكانات كبيرة في العديد من التطبيقات، بما في ذلك العلاجات الطبية للسرطان والسكري والالتهابات الميكروبية، نظراً لتوافقها الحيوي وفعاليتها (Barretto و Majithia، 2023). بشكل عام، يمثل التوليف الأخضر نهجاً واعداً ومستداماً لإنتاج الجسيمات النانوية، بما يتماشى مع أهداف الكيمياء الخضراء وتكنولوجيا النانو لإنشاء مواد أكثر أماناً وصديقة للبيئة (Chaurasia وآخرون، 2023).

توجد هنالك امثلة ناجحة عديدة حول استعمال الاحياء المجهرية التي تشمل الفطريات في انتاج الجسيمات النانوية المختلفة فمثلا تمكن Sumanth وجماعته (2020) من تصنيع جسيمات أكسيد الزنك النانوية (ZnO NPs) باستخدام مستخلصات الفطر الداخلي *Xylaria acuta*، باستخدام طريقة الاحتراق باستخدام مركب سداسي نترات الزنك. إذ اشارت النتائج إلى أن جسيمات ZnO NPs المُصنَّعة احيائيا هي في الغالب سداسية الشكل، ويتراوح حجمها من 34-55 نانومتر، وتظهر خصائص قوية مضادة للحياة المجهرية، من البكتيريا الشائعة ايجابية الجرام وسالبة الجرام بالإضافة الى نشاطها المضاد ضد الفطريات المسببة للأمراض النباتية والفطريات الملوثة للاغذية مما يجعلها مرشحة وواعدة لعوامل جديدة مضادة للحياة المجهرية.

كما انتجت جسيمات الفضة النانوية (AgNPs)، بأحجام صغيرة تتراوح بين 10 إلى 15 نانومتر، باستعمال احد أنواع الجنس *Trichoderma* الذي يعد واحداً من اهم العوامل الاحيائية المستعملة في مجال المقاومة الاحيائية لمسببات الامراض النباتية وهو الفطر يسمى *T. atroviride* الذي تم اختياره من بين عشرة أنواع من الفطريات الداخلية، باعتباره الأكثر فعالية في إنتاج هذه الجسيمات النانوية. بالإضافة إلى ذلك، قارنت الدراسة التأثيرات المضادة للميكروبات لهذه الجسيمات النانوية المنتجة بشكل طبيعي مقابل تلك المركبة كيميائياً، ووجدت أن جسيمات الفضة النانوية الفطرية (المولدة بالفطريات) كانت فعالة في تثبيط نمو العديد من البكتيريا والفطريات المسببة للأمراض بتركيز 100 جزء في المليون (Abdel-Azeem وآخرون، 2020).

2-4-5: تطبيق مكافحة المتكاملة ضد الإصابات الفايروسية النباتية

أشار Riyaz و Kathiravan (2019) الى أنّ الاعتماد على طريقة واحدة في إدارة الامراض الفايروسية قد تكون معرضة بشدة للفشل، لذلك فان الدمج مع أكثر من طريقة واحد لإدارة المرض قد يسهم كل منها في التأثير على وجود المسبب و تطوره و من ثمّ تقليل او منع الاصابة الفيروسية بشكل كبير أكثر مما لو كانت تلك المعاملات كل منها منفذ بشكل مستقل. لقد استعمل أسلوب مكافحة المتكاملة على نطاق واسع ضد الامراض الفايروسية النباتية، اذ اشتملت في المقام الأول على مزيج من مقاومة النبات المضيف للفايروس وتطبيق تدابير الصحة النباتية لحماية النباتات قبل الزراعة وبعدها (Rubio وآخرون، 2020). وهناك فعاليات عدة يمكن خلالها تقليل او منع الاصابة بالفايروسات التي تصيب العديد من العوائل النباتية منها زراعة الاصناف المقاومة او المتحملة و ازالة بقايا النباتات المصابة و التخلص من الادغال التي قد تكون مأوى للفايروس خصوصاً عند غياب العائل الرئيس (Radouane وآخرون، 2021). اضافة الى ذلك فان عدم الزراعة الكثيفة و الاهتمام بنظافة العمال و الادوات تعد من النقاط المهمة التي تمنع انتقال الاصابة الفيروسية من و الى النباتات. يدرك المختصون في مجال أمراض النبات من الصعب السيطرة على العدوى الفيروسية بشكل مباشر بسبب عدم وجود مبيدات كيميائية ضدها لذلك فان زراعة البذور الخالية من الاصابة و مكافحة الحشرات الناقلة للفايروس تعد من العمليات المهمة في خلاص النباتات من الاصابة بالفايروسات (Rahman وآخرون، 2020). وقد اكد Maluta و آخرون (2021) أن هنالك أساليب للمكافحة غير مباشرة للفايروس مثل استعمال المبيدات الحشرية لغرض التقليل او منع تواجد الحشرات الناقلة منها قد اثبتت نجاحا جيد في السيطرة على الامراض الفايروسية بالرغم من ان تلك المبيدات لها محاذير في استعمالها المفرط بسبب تأثيراتها البيئية و الصحية للإنسان و الحيوان.

توجد هنالك دراسات عديدة حول استعمال أسلوب مكافحة المتكاملة في السيطرة على الفايروسات النباتية فمثلا اثبت أسلوب الإدارة المتكاملة فعاليته ضد فايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطم الصفراء (TYLCV) وناقله الذبابة البيضاء في نباتات الطماطم باستخدام مجموعة من طرق مكافحة المختلفة، بدلاً من الاعتماد على تكتيك واحد. اذ اختبر مقاومة أصناف مختلفة من الطماطم بالإضافة الى استعمال المبيدات الحشرية والنشارة المعدنية العاكسة (metallic reflective mulch) بشكل مفرد و تكاملي ضد على حشرة الذبابة البيضاء ونسبة وشدة الإصابة الفايروسية وإنتاجية الطماطم على مدى ثلاث سنوات. اذ وجد أن تطبيق النشارة العاكسة لوحدها تقلل بشكل كبير من أعداد حشرة الذبابة البيضاء وأعراض الفايروس، والتي أدت إلى ارتفاع محصول الطماطم القابلة للتسويق في معظم سنوات الدراسة كما ساعدت تطبيق المبيدات الحشرية لوحدها مثل Imidacloprid و cyantraniliprole في تقليل أعداد حشرة الذبابة البيضاء وزيادة المحاصيل بشكل طفيف، لكنها لم تؤثر بشكل كبير على شدة أعراض الإصابة الفايروس مقارنة بالنباتات غير المعالجة. اما استعمال أصناف الطماطم المقاومة للفايروسات لوحدها فقد قللت باستمرار من الإصابة بالفايروس ولكنها لم تؤثر على أعداد حشرة الذبابة البيضاء، ولكن أدى التكامل بين النشارة العاكسة والمبيدات الحشرية وأصناف الطماطم المقاومة للفايروس إلى توفير أعلى زيادة في محصول الطماطم القابل للتسويق، مما يدل على أن الإدارة المتكاملة كان أكثر فعالية من التكتيكات الفردية (Riley و Srinivasan، 2019).

أظهرت نتائج دراسته أخرى حول مقاومة فايروس موزايك الخيار فعالية ست معاملات مختلفة للإدارة المتكاملة للفايروس في ظل الظروف الميدانية. وتضمنت هذه المعاملات التكاملية مزيجاً من شتلات الشباك (Netting Seedling)، والفخاخ الصفراء اللزجة (Sticky yellow trap)، ونشارة البوليثلين (Polythene mulch)، وزراعة الذرة كمحصول حاجز، المبيد الحشري Imidacloprid و النيم الحيوي على فترات مختلفة. وقد قللت جميع المعاملات بشكل كبير نسبة حدوث الإصابة بالفايروس مقارنة بالمجموعة الضابطة اذ انخفض معدل الإصابة بالمرض بنسب تراوحت من 35.71% إلى 76.97%، مع زيادة الإنتاج بنسب من 0.37 إلى 6.40 طن للهكتار. وكانت المعاملات الأكثر فاعلية هما المعاملة الأولى التي شملت التكامل بين الشتلات الشبكية، والمصيدة الصفراء اللزجة، ونشارة البوليثلين، و النيم الحيوي. بالإضافة الى المعاملة الثانية التي كانت تشبه المعاملة الأولى ولكن بإضافة استعمال المبيد الحشري Imidacloprid. وقد خلصت الدراسة إلى أن معاملات الإدارة المتكاملة، وخاصة الأولى والثانية، فعالة في الحد من حدوث الإصابة بفايروس موزايك الخيار مع زيادة المحصول الخياروبهذا يمكن التوصية بهذه المعاملات لإدارة فايروس موزايك الخيار في بنغلاديش (Rahman وآخرون، 2020).

كما وجد الكّرطاني (2023) أنّ هناك تأثير معنوي لمعاملة التكامل بين التركيب الوراثي SAMA و تطبيق المبيدات الحشرية ضد حشرة الذبابة البيضاء و تطبيق العناصر الغذائية كانت الأفضل في خفض معدل نسبة الإصابة الفايروسية على محصول الشجر إلى 25% ونسبة شدة الإصابة إلى 20%. مقارنة بمعاملة المقارنة التي كانت فيها نسبة الإصابة وشدتها الأعلى بمقدار 80% و 38% على التوالي. كما أظهرت النتائج تفوق المعاملة الأفضل هذه بأعطائها أعلى معدل إنتاج بلغ 97.05 كغم و اقل معدل لكمية الثمار المريضة بلغ 1.55 كغم وبفارق معنوي عن بقية المعاملات.

and methods

3:المواد وطرائق العمل

Material

Materials

3-1: المواد

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

الجدول (1): الأجهزة والمعدات المستعملة

ت	الجهاز	الشركة المصنعة	الدولة
1	جهاز التقطير Water Distiller	Memmert	Germany
2	الميزان الحساس (Precision Balance)	Denver Instrument	USA
3	أدوات زجاجية مختلفة (Glassy tools)	Boeco	Germany
4	ثلاجة (Refrigerator)	Concord	Lebanon
5	ثلاجة -35 م° (Deep-Freeze)	LabTech	South Korea
6	انابيب بلاستيكية صغيرة (Eppendorf tubes)	ExtraGene	Taiwan
7	هزاز كهربائي (Vortex)	Heidolph	Germany
8	جهاز الطرد المركزي المبر Cooling centrifuge	Labortechnik	Germany

China	Zhangjiagang	ورق سيلوفين معدني (Aluminum foil)	9
China	شركة نهار الاوراد	مرشحة ظهرية سعة 20 لتر	10
South Korea	LabTech	جهاز المؤسدة (Autoclave)	11
France	Gilson	ماصات دقيقة مختلفة الأحجام) (Micropipettes)	12
England	BDH	القطن و الشاش (Cotton ,muselin)	13
France	Gilson	ملاحق خاصة بالماصة الدقيقة Micropipette tips	14

3-1-2: المواد والمبيدات الكيميائية والبذور والمبيدات الكيميائية

الجدول (2): المواد الكيميائية المستعملة

المنشأ	الشركة المصنعة	المادة	ت
India	Loba Chemie pvt Ltd	نترات الزنك المائية (Zn(NO ₃) ₂ .6H ₂ O)	1
India	Alpha Chemika	كحول ايثانول 98%	2
Germany	Qiagen	RNA Protect tissue Reagent	3

جدول (3): البذور والمبيدات الكيميائية المستعملة في التجربة الحقلية

المنشأ	الشركة المصنعة	المادة	ت
العراق	دائرة البستنة / وزارة الزراعة العراقية	بذور الباميا من التركيب الوراثي رقم خمسة (Hort-5)	1
		بذور الباميا من التركيب الوراثي عبير	2
China	Green River	مبيد الحشرات كونان 24% Thiamethoxam	3
Switzerland	Syngenta	مبيد الحشرات اكتارا 24% Thiamethoxam	4

3-2: طرائق العمل

3-2-1: جمع العينات النباتية المصابة

جمعت العديد من العينات الورقية لنبات الباميا والتي ظهرت عليه أعراض الإصابة الفيروسية المتمثلة بالتقرم ، اصفرار العروق، الفسيفساء ، التبرقش والتنخر (شكل 7) من عدة حقول لمحصول الباميا المنتشرة في ناحية اليوسفية، قضاء المحمودية، محافظة بغداد بالإضافة الى العينات التي جمعت من البيوت البلاستيكية في كلية الزراعة/ جامعة كربلاء/ محافظة كربلاء.





شكل (7): عينات من أوراق نبات الباميا التي ظهرت عليها اعراض الإصابة الفايروسية

2-2-3: التشخيص باستعمال تقنية الجيل التالي لتحديد التسلسل Generation sequencing (NGS)Next

أرسلت ثلاث انابيب مختبرية تحتوي على اوراق نباتية مصابة محفوظة في المحلول الحافظ (RNA protect Tissue Reagent) الى شركة Macrogen Inc. (سيئول، كوريا الجنوبية) لغرض تحديد تسلسل القواعد النيتروجينية باستعمال تقنية الجيل التالي (NGS) بطريقة (Metatranscriptomics) وشملت عملية تحديد تسلسل القواعد النيتروجينية بهذه التقنية وتحليل البيانات التي تم الحصول عليها من الشركة باستعمال برامج المعلوماتية الحيوية بالخطوات الآتية:

أ) أعداد المكتبات الجينومية وتحديد التسلسل عالي الإنتاجية

تم إعداد مكتبات التسلسل الجينومية (Sequencing libraries) باستعمال العدة (TruSeq Nano Kit) عن طريق تجزئة عشوائية من الحمض النووي RNA وتحديد تسلسل القواعد النيتروجينية لكلا

الاتجاهين (Paired-end) للعينات النباتية باستعمال جهاز NextSeq 1000 & 2000 على منصة Illumina اذ تنتج قراءات باطوال محددة مقدارها 150 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 المقروآت ذات النوعية المنخفضة (أقل من Q30) باستعمال البرامج المتخصصة مثل برنامج (Trimmomatic) (Bolger وآخرون، 2014). ولغرض التأكد من جودة المقروآت بعد تطبيق عملية التشذيب استعمل برنامج (FastQC) (Andrews، 2010) الذي يعطينا تقريراً مفصلاً عن جودة البيانات لغرض إزالة ذات النوعية الرديئة وتحديد الأفضل من اجل استعمالها في التحليلات النهائية.

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

بغرض تجميع المقروآت المتسلسلة (Clean reads) في تسلسلات المتجاورات المتداخلة او المقروآت المتجمعة (Contigs) تم استعمال برامج متخصصة لتحقيق هذا الهدف شملت برنامج SPAdes (Bankevich وآخرون، 2012) وبرنامج Velvet (Zerbino و Birney، 2008) وقد استعملت المعايير الافتراضية المتفق عليها في هذه البرامج. وتم حفظ نتائج عمل هذين البرنامجين بما يخص المقروآت المتسلسلة الأطول في ملفات من نوع FASTA لغرض استعمالها في خطوات التحليل اللاحقة.

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

لغرض إيجاد مناطق التشابه والاختلاف بين تسلسلات القواعد النايتروجينية والبروتينات استعمل برنامج (BLAST) Basic Local Alignment Search Tool (Camacho وآخرون، 2009) الذي يقارن بين تسلسلات القواعد النايتروجينية (BLASTn) أو تسلسلات الاحماض الامينية (BLASTp) مع جميع التسلسلات المحفوظة في قواعد البيانات وحساب الدلالة الإحصائية لها. ولجعل عملية المقارنة اسرع وادق واكثر تخصصية استعمل هذا البرنامج في مقارنة التسلسلات الأطول التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة مع قاعدة بيانات تسلسلات جميع الفايروسات النباتية المعروفة والمحفوطة في NCBI-Genbank التي تم

الحصول عليها من الموقع <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi/#/virus?> حفظت مخرجات هذه العملية في ملف اكسل وتمت مراجعتها وتنظيمها يدوياً والتخلص من نسب المقروءات ذات نسب تشابه منخفضة .

و) محاذاة المقروءات مع الجينوم المرجعي لفايروسات النبات المشخصة

بعد تحديد اهم الفايروسات النباتية 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 وغير المكررة والمعرفة بشكل جيد لجميع جينومات وبروتينات الكائنات الحية المعروفة. استعمل برنامج Bowtie2 (Langmead و Salzberg، 2012) في اجراء المحاذاة (Alignment) بين المقروءات المتسلسلة (Clean reads) والجينومات المرجعية لفايروسات النبات المشخصة، من اجل تعيين المقروءات المتسلسلة وتجميعها بهدف انشاء او توليد أطول تسلسلات متفق عليها (Consensus sequence) مشابه لتسلسل الجينوم الفايروسي المرجعي.

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 وأيضاً لتحديد العلاقة الوراثية بينهما إذ تم تنزيل التسلسلات المماثلة واجرّيت عملية المقارنة بينهما باستعمال برنامج (ClustalW) الموجود ضمن برامج منصة MEGA (الإصدار العاشر) إذ تم تشغيلها من اجل بناء أشجار النشوء والتطور التي تطبق نهج او طريقة الإنضمام إلى الجوار (neighbor-joining) (Kumar و اخرون، 2018).

وتم استعمال برنامج Seqence Demacration Tool.

ح) دراسة التباين الوراثي وإعادة التشكيل بين سلالات فايروسات النبات المحلية

لغرض دراسة مدى التباين الوراثي (Single nucleotide polymorphisms (SNP) وكذلك إعادة التشكيل Recombination breakpoint analysis بين سلالات فايروس النبات المحلية المشخصة في هذه الدراسة والسلالات العالمية استعملت طريقة البصمة الوراثية بواسطة تحليل نسبة التشابه بين تسلسلات القواعد النايتروجينية

للتسلسل المتفق عليه (Consensus sequences) لكل فايروس مشخص مع تسلسل السلالات المحلية والعالمية المشابه وذلك باستعمال منصة برنامج Geneious prime 2023.2. بالإضافة الى ما سبق فقد تم الاعتماد على المعادلات الواردة في Sims واخرون (2014) في احتساب تغطية او عمق تسلسل الجينوم (Sequencing coverage or depth) حسب المعادلة الآتية :

مجموع القراءات المشابه لتسلسل جينوم الفايروس X طول القراءة

حساب عدد نسخ الفايروس =

الحجم الكلي لجينوم الفايروس

أيضا احتساب النسبة المئوية لتغطية جينوم الفايروس حسب المعادلة الآتية:

مجموع عدد القواعد النايروجينية لجينوم الفايروس المغطاة بقراءات

100X

تسلسل

لتغطية جينوم الفايروس =

المجموع الكلي لعدد القواعد النايروجينية لجينوم الفايروس

3-2-3: تصنيع المستحضر الاحيائي النانوي لمادة أكسيد الزنك ZnO

لغرض تصنيع مستحضر احيائي نانوي لمادة أكسيد الزنك ZnO استعمل العامل الاحيائي *Trichoderma koningiopsis* الذي تم الحصول عليه من أ.د. رجاء غازي عبد المحسن في قسم وقاية النبات / كلية الزراعة/ جامعة كربلاء علما ان قد تم تشخيص مظهرها وجزئياً مسبقاً (دخيل، 2021) وذلك باتباع طريقة Samanta واخرون (2017) مع اجراء بعض التعديلات الطفيفة وشملت طريقة العمل الخطوات التالية:

1- تم تلقيح وسط مرق سكرورز البطاطا المعقم باقراص (0.5 سم) مأخوذة من اطراف مزارع نقيه من فطر *T. koningiopsis* وحضنت تحت ظروف الرج (140 دورة في الدقيقة) عند درجة حرارة 28 ± 1 مئوية لمدة 10 أيام.

2- بعد ذلك تم فصل الكتلة الحيوية من خلال منخل قياسي سعة 300 مل وتم غسل الكتلة الحيوية الناتجة ثلاث مرات جيداً بماء مقطر ومعقم.

3- تم تعليق حوالي 20 غم من الكتلة الحيوية الرطبة المغسولة في قوارير Erlenmeyer سعة 250 مل تحتوي على 100 مل من محلول نترات الزنك المائية تركيز 1 ملي مولاري.

4- تم إجراء الاختزال الحيوي داخل الخلايا بوساطة الكتلة الحيوية لتخليق ZnONPs بعد تحضين تحت ظروف الرج (140 دورة في الدقيقة) عند درجة حرارة 28 ± 1 مئوية لمدة أسبوع.

5- تمت عملية مراقبة يومية لخليط التفاعل ومتابعة ظهور راسب أبيض كريمي في خليط التفاعل والذي يؤكد تخليق الجسيمات النانوية لاوكسيد الزنك ZnONPs داخل الخلايا.

6- لغرض التأكد من من تخليق المادة النانوية لاوكسيد الزنك ZnONPs كان لابد من إخراجها من داخل خلايا العامل الاحيائي وذلك بتكسير الخلايا باستعمال الموجات فوق الصوتية (200 هرتز لمدة 20 دقيقة مع تشغيل نبض لمدة 5 دقائق).

7- تم تمرير الخليط الناتج عبر طبقتين من الشاش وقسم الى عينتين متساويتين، العينة الاولى تم تنقيتها بالترشيح بمحفنة 0.45 ميكرومتر بعدها أجريت عملية طرد مركزي بسرعة 10000 دورة في الدقيقة لمدة 10 دقائق لتجميع الجسيمات النانوية، بينما العينة الثانية تركت بدون تنقية لغرض المقارنة.

8- أجريت في مركز فوتون العلمي عمليات قياس أطياف امتصاص الأشعة فوق البنفسجية والمرئية (UV-Vis) بين نطاقات الطول الموجي 200-800 نانومتر، اختبار الطاقة المشتتة للأشعة السينية الطيفي Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX)، والمجهر الإلكتروني النافذ Transmission Electron Microscopy (TEM).

ولغرض تحميل الجسيمات النانوية لاوكسيد الزنك ZnONPs على ابواغ العامل الاحيائي *T. koningiopsis* اتبعت الخطوات التالية:

1- بعد اجراء عملية تكسير الخلايا باستعمال الموجات فوق الصوتية خلطت الجسيمات النانوية المتكونة مع الالبواغ الفطرية للعامل الاحيائي *T. koningiopsis* وذلك بتحريك أو رج المعلق لضمان التوزيع الموحد للجسيمات النانوية على سطح الالبواغ، مع تطبيق الموجات فوق الصوتية لمرّة ثانية على الخليط من اجل تحسين تشتت وربط الجسيمات النانوية بالالبواغ.

2- حضن الخليط على درجة حرارة 28 ± 1 مئوية لمدة 24 ساعة للسماح للالبواغ والجسيمات النانوية بالتفاعل، مع اجراء تحريض لطيف للخليط خلال فترة الحضن من اجل تحسين التفاعل بين الالبواغ والجسيمات النانوية.

3- لغرض التاكيد من تحميل جسيمات الزنك النانوية على سطوع ابواغ العامل الاحيائي فحصت العينات باستعمال المجهر الإلكتروني النافذ.

3-2-4:تقييم كفاءة برنامج مكافحة متكاملة في حماية نباتات الباميا من الإصابة بحشرة الذبابة البيضاء ومايرافقها من فايروسات

3-2-4-1: تحضير الحقل للزراعة

أجريت هذه التجربة الحقلية في تاريخ 1-3-2024 في احد البيوت البلاستيكية المؤبوه التابعة لكلية الزراعة/جامعة كربلاء والذي ظهرت فيها الإصابة بحشرة الذبابة البيضاء والفايروسات المرافقة في المواسم السابقة. أجريت عملية حراثة للتربة وتنعيمها وتسويتها. وقد تم زراعة بذور تراكيب وراثية من الباميا تم الحصول عليها من دائرة البستنة/وزارة الزراعة/العراق تمت عملية استنباطها وتربيتها في هذه الدائرة وشملت التراكيب Hort-5 وعبير. وأجريت عمليات خدمة المحصول بصورة مستمرة من الري وعمليات التعشيب كلما دعت الحاجة بالإضافة الى إضافة السماد NPK وحمض الدبالية (Humic acid) كل 10 ايام. و صممت هذه التجربة الحقلية كتجربة عاملية بتصميم القطاعات العشوائية الكاملة (Completely Random Block Design) اذ شملت على ثلاثة تكرارات تحتوي كل واحد منها على 18 مكرارات بمساحة 1 م. وقد نفذت المعاملات المذكوره في الجدول (4).

الجدول (4): المعاملات المستعملة في التجربة الحقلية

ت	التراكيب الوراثية	المبيدات الكيميائية	المستحضر الاحيائي
1	Hort-5	عدم تطبيق	عدم التطبيق
2	Hort-5	مبيد الحشرات كونان	عدم التطبيق
3	Hort-5	مبيد الحشرات اكتارا	عدم التطبيق
4	Hort-5	عدم تطبيق	العامل الاحيائي <i>T. koningiopsis</i>
5	Hort-5	مبيد الحشرات كونان	العامل الاحيائي <i>T. koningiopsis</i>
6	Hort-5	مبيد الحشرات اكتارا	العامل الاحيائي <i>T. koningiopsis</i>
7	Hort-5	عدم تطبيق	المستحضر الاحيائي النانوي
8	Hort-5	مبيد الحشرات كونان	المستحضر الاحيائي النانوي
9	Hort-5	مبيد الحشرات اكتارا	المستحضر الاحيائي النانوي
10	عبير	عدم تطبيق	عدم التطبيق
11	عبير	مبيد الحشرات كونان	عدم التطبيق
12	عبير	مبيد الحشرات اكتارا	عدم التطبيق
13	عبير	عدم تطبيق	العامل الاحيائي <i>T. koningiopsis</i>
14	عبير	مبيد الحشرات كونان	العامل الاحيائي <i>T. koningiopsis</i>
15	عبير	مبيد الحشرات اكتارا	العامل الاحيائي <i>T. koningiopsis</i>
16	عبير	عدم تطبيق	المستحضر الاحيائي النانوي
17	عبير	مبيد الحشرات كونان	المستحضر الاحيائي النانوي
18	عبير	مبيد الحشرات اكتارا	المستحضر الاحيائي النانوي

2-4-2-3: تطبيق المبيدات الحشرية

أ- استعمل المبيد الحشري اكتارا (Thiamethoxam 24%) بعد مرور شهر على الزراعة رشاً على المجموع الخضري للنبات وبمعدل استخدام 1غم/2 لتر ماء على المكررات المطلوب معاملتها ضمن التجربة الحقلية .

ب - استعمال المبيد الحشري كونان (Thiametheoxam 10%) بعد مرور شهر على الزراعة وبمعدل استعمال 1.5غم / لتر ماء رشاً على المجموع الخضري للنباتات على المكدرات المطلوب معاملتها ضمن التجربة الحقلية.

3-4-2-3: تطبيق العامل الاحيائي والمستحضر النانوي

تم تحضير معلق أبواغ العامل الأحيائي *T. koningiopsis* بتركيز 1×10^6 باستخدام مستعمرات نقية بعمر أسبوع. تم خلط المستعمرات مع ماء مقطر معقم (20 مل/طبق)، ثم جمع العالق وتمريه عبر طبقتين من الشاش للتخلص من الغزل الفطري وبقايا الوسط الزرع. بعد ذلك، تم حساب عدد الأبواغ في المعلق وتخفيفها بالماء المقطر المعقم للوصول إلى التركيز المطلوب، مع مراعاة المزج الجيد للمعلق باستخدام محرض نظيف لضمان توزيع الأبواغ بالتساوي. وتمت إضافة 5 مل من معلق الأبواغ إلى المجموع الجذري للنباتات ضمن المكدرات المطلوبة في التجربة الحقلية.

أما بالنسبة للمستحضر الاحيائي النانوي فقد تم استعماله بعد التأكد من تكون المادة النانوية ZnONPs في الوسط وبعد احتساب تركيز الابواغ وتخفيف المعلق ليصبح بتركيز بتركيز 1×10^6 . بعد ذلك، تمت إضافة 5 مل من المستحضر الاحيائي النانوي إلى المجموع الجذري للنباتات ضمن المكدرات المطلوبة في التجربة الحقلية.

3-4-2-4: تحديد نسبة وشدة الإصابة الفايروسية مع تعداد حشرة الذبابة البيضاء

بعد مرور شهر من الزراعة حسبت نسبة وشدة الإصابة الفايروسية المتمثلة بظهور الاعراض المميزة من أصفرار وموزائيك وتبرقش وتجعد للأوراق وتقرم للنباتات وبواقع تسعة نباتات في كل معاملة اختيرت عشوائياً. وقد تم احتساب نسبة الإصابة الفايروسية بحسب المعادلة ادناه:

$$\text{نسبة الإصابة (\%)} = \frac{\text{عدد النباتات التي تظهر عليها اعراض الإصابة الفايروسية}}{\text{العدد الكلي للنباتات}} \times 100$$

أما شدة الإصابة فقد تم تقديرها بحسب مقياس شدة الإصابة المذكور في الجدول (5) وتقدير نسبة شدة الإصابة باستعمال معادلة Mckinney (1923) والتي وردت مع مقياس شدة الإصابة في الكرطاني (2023) وهي:

$$\% \text{ شدة الإصابة} = \frac{\text{مجموع (درجة المرض} \times \text{عدد النباتات المصابة في كل درجة)}}{100}$$

عدد الكلي للنباتات x أعلى درجة المرض

الجدول (5) : مقياس شدة الإصابة

الدرجة	مقياس شدة الإصابة
0	النباتات سليمة (بدون اعراض مرضية 0%)
1	ظهور اصفرار وموزائيك خفيف على الأوراق خصوصا العلوية وتكون نسبتها 1-10% من أوراق النبات
2	ظهور اصفرار وموزائيك متوسط مع تجعد خفيف على الأوراق خصوصا العلوية وتكون نسبتها 11-25% من اوراق النبات
3	ظهور اصفرار وموزائيك او تبرقش اخضر واصفر مع تجعد الأوراق وتكون نسبتها 26-50% من أوراق النبات
4	اصفرار وموزائيك او تبرقش اخضر واصفر وتجعد واسع مع اعراض خفيفة لتقرم النبات وتكون نسبتها 51-70% من النبات
5	اصفرار وموزائيك او تبرقش اخضر واصفر شديد وتجعد شديد مع تقرم النبات وتكون نسبتها 71-100% من النبات يصاحبها انتاج ثمار اصغر حجما وتشوهها مع تكسر الوانها او تبرقشها

كما تم مراقبة واحتساب اعداد حشرة الذبابة البيضاء (*Bemisia tabaci*) على نفس النباتات التي يتم فحص معدل اعدادها على الاوراق وبواقع ثلاثة مستويات للنبات الواحد (سفلي ، وسطي ، علوي) وأعتد على تواجد الحشرة البالغة في اخذ نتائج القراءات (الخزاعي، 2021). كما ذكره (محمد الكرطاني، 2023).

Statistical

5-4-2-3 التحليل الاحصائي

analysis

أستعملت طريقة التجارب العاملية بتصمم القطاعات الكاملة العشوائية Randomized Complete Block Design في التجربة الحقلية بينما تم تحديد الفروقات المعنوية بين متوسطات المعاملات باستعمال

اختبار اقل فرق معنوية (L.S.D) Least significant difference كما تم تطبيق اختبار الارتباط Correlation وذلك باستعمال برنامج GenStat الإصدار العاشر .

Results and Discussion

4- النتائج والمناقشة

1-4: تقييم بيانات تقنية الجيل التالي لتحديد التسلسل Next Generation sequencing (NGS)

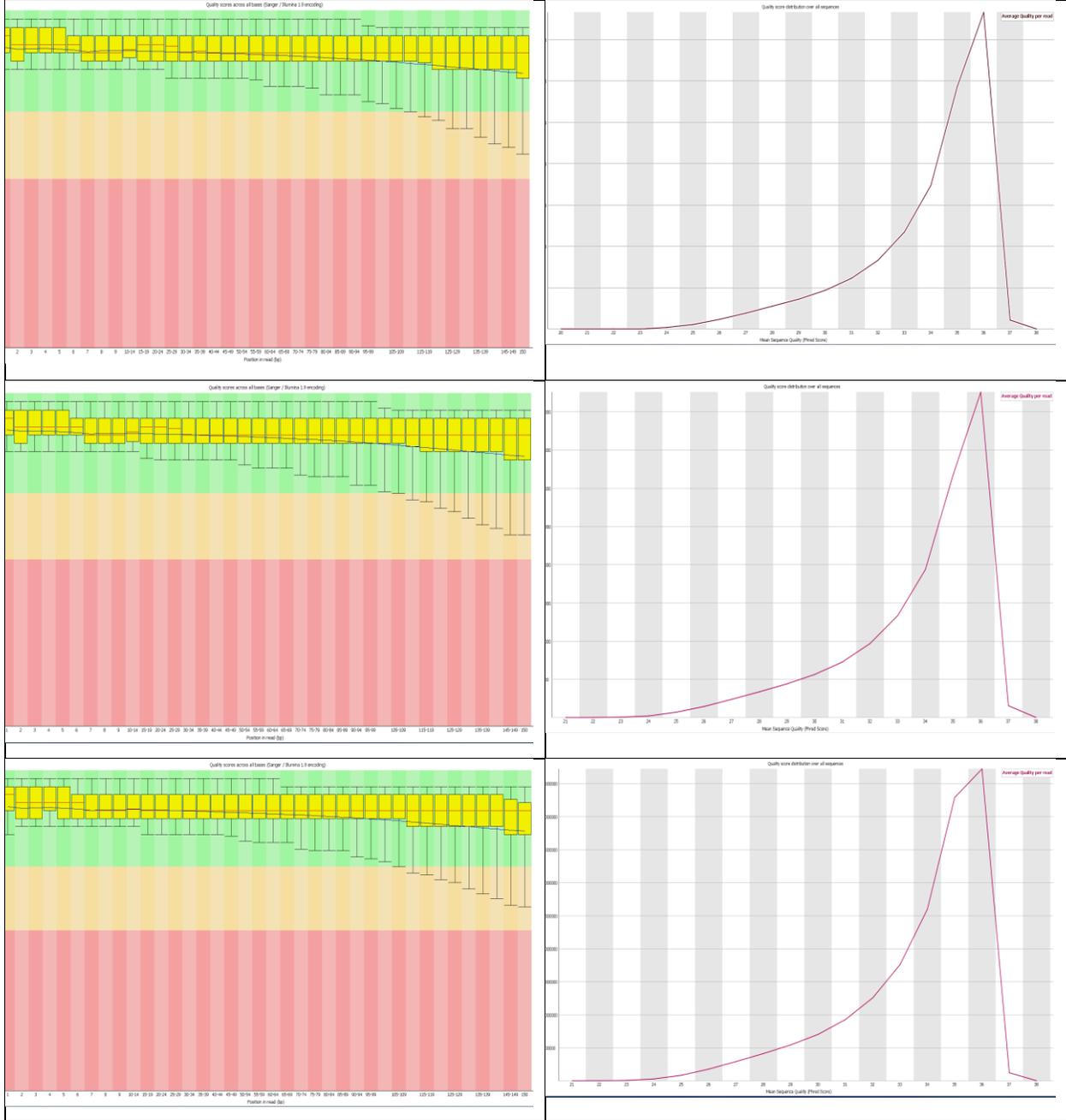
أظهرت تقارير استخلاص الحامض النووي RNA الكامل من العينات الثلاث للاوراق النباتية المصابة المرسله الى شركة Macrogen Inc. ان التراكيز للعينات الأولى والثانية والثالثة كانت 161.5 و 211.7 و 77.7 نانوغرم/ مايكروليتر على التوالي وبنقاوة تراوحت من 1.6 الى 2.1 بينما كانت سلامة الحامض النووي RNA كانت هي 5.2 و 5.8 و 6.9 على التوالي.

ان هذه النتيجة انعكست على تحليل جودة المقروءات (Raw reads) المستلمة لبيانات التسلسلات باستعمال برنامج FastQC. إذ كانت صالحة للتحليل بادوات وبرامج المعلوماتية الحيوية؛ حيث تم الحصول من العينات الثلاث على 25,461,526 و 28,781.862 و 35,855,946 سلسلة مقروءات مزدوجة النهايات (Paired ends reads) على التوالي با طول (150) زوج قاعدي لكل مقروءة التي تم إنشاؤها عن طريق تحديد تسلسل مكتبات الـRNA للحصول على بيانات طريقة الـMetatranscriptomics التي هي أحد طرق تقنية الجيل التالي لتحديد التسلسل.

وقد تبين أن مقروءات جميع العينات كانت ذات جودة عالية (شكل 8) تتراوح بين من 36 الى 39 درجة، التي تعني بحسب مقياس جودة المقروءات المعروف بـ Phred quality score إن نسبة دقة التسلسل اكثر من (99.9%) أي احتمال وجود تسلسل غير صحيحة ضمن تسلسل المقروءات هو (1 في 10000) علماً أن المعدلات الموصى بها تبدأ من (30) درجة فما فوق لإجراء عملية التحليل والدراسة للمقروءات الخام. كما اثبت التحليل تساوي أطوال المقروءات الخام، وعدم وجود القواعد النايتروجينية غير المعروفة (N) مع عدم وجود التسلسلات المضافة (Adapters) وأن نسبة قواعد الكوانين والسائتوسين (%GC) للعينه الأولى 44.4% والعيه الثانيه 45% بينما العينه الثالثه كانت 44.7% (Mrozek وآخرون، 2021).

أظهرت النتائج ايضا نجاح عملية المحاذاة (Alignment) التي تمت بمقارنة مقروءات العينات الثلاث مع جينوم نبات الباميا (GCA_035048815.1) وحذف المقروءات الشبيهه (Mohammed و Lahuf، 2023)، وتجميع المقروءات غير الشبيهه للعينات الثلاثه كل على حدى باستعمال طريقة التجميع

DeNovo assembly بهيأة متجاورات متداخلة (Contigs) التي أظهرت نتائج مقارنتها مع البيانات الخاصة بالفايروسات النباتية المحفوظة في بنك الجينات GenBank (Lahuf و Salman، 2022)، وجود العديد من المتجاورات المتداخلة الشبيه بالعديد من الفايروسات النباتية التي تعود لعوائل مختلفة. لغرض زيادة مصداقية ودقة النتائج هذه؛ فقد تم اعتماد المتجاورات المتداخلة ذات الحجم 250 فما فوق زوج قاعدي المشابه لتسلسلات الفايروسات النباتية وإهمال ما دون ذلك، وإن كانت مشابه لأحد تسلسلات الفايروسات.



شكل (8): جودة المقروءات الخام للعينات الثلاث باستعمال برنامج FastQC

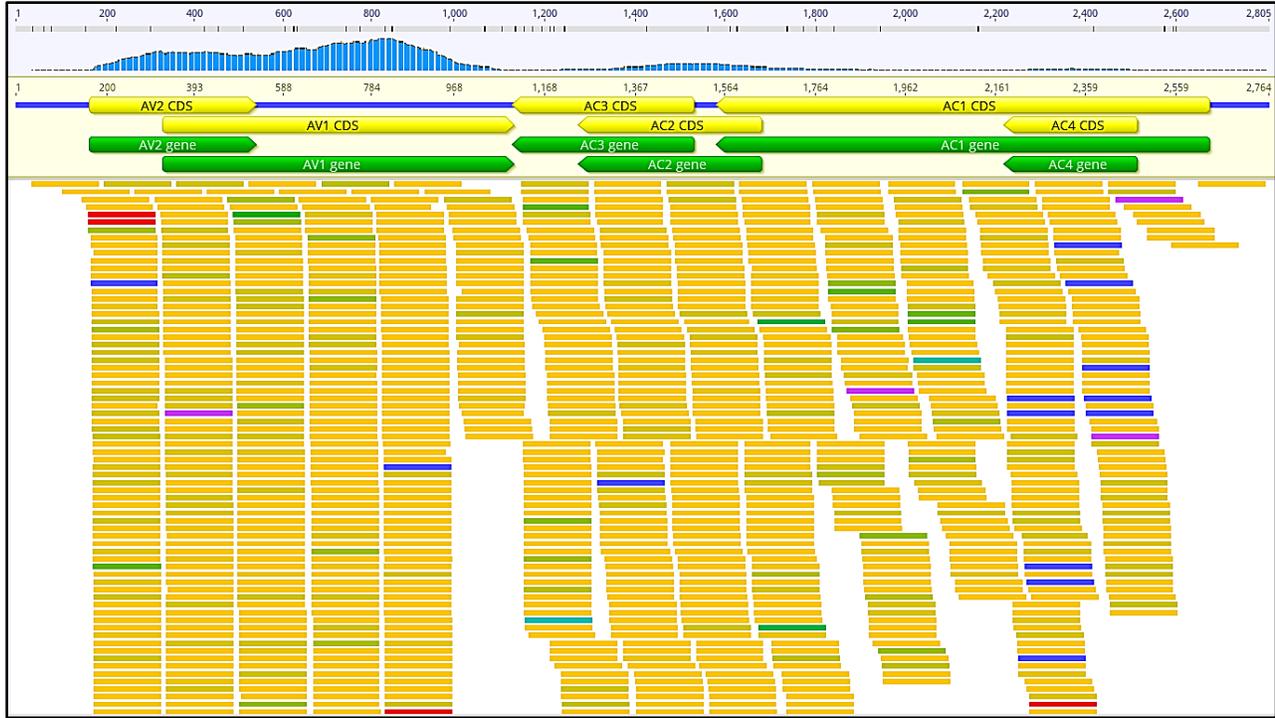
لغرض تأكيد التشخيص الاولي للفايروسات النباتية التي تم تحديدها من عملية المقارنة الأولى، طبقت عملية التجميع القائم على المرجع الجينومي للفايروسات (Reference-based assembly) بالإعتماد على التسلسلات النموذجية او المرجعية (Reference genome) لجينومات الفايروسات وتوابعها المشخصة في عملية المقارنة الأولى (سلمان، 2021).

2-4: التشخيص والتوصيف الجزيئي وتحديد الجينوم الكامل للفايروسات وتوابعها المرافقة لنبات الباميا

1-2-4: *Gezira leaf* فايروس *curl Cotton virus* وتوابعه الثلاث

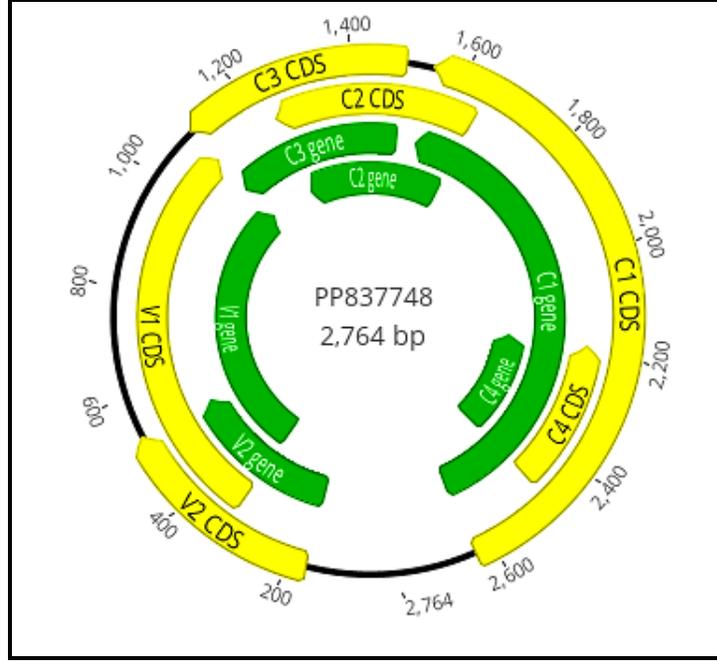
اولاً: فايروس *Cotton leaf curl Gezira virus* (CLCuGeV)

أظهرت نتائج التحليل المعلوماتية الحيوية وجود فايروس *Cotton leaf curl Gezira virus* (CLCuGeV) الذي يعود إلى الجنس *Begomovirus* التابع لعائلة *Geminiviridae*؛ وذلك خلال تواجد العديد من المتجاورات المتداخلة (Contigs) المشابهة للتسلسل المرجعي لجينوم الفايروس في العينات الثلاث. فمثلاً في العينة الاولي بلغت نسبة تغطية تسلسلات القراءات الخام لجينوم الفايروس الكامل 100% بينما كانت نسبة التشابه 97.7% (شكل 9) وبلغت نسبة التواجد 0.07% (7,624 قراءة). كما أظهرت النتائج إن عدد نسخ الفايروس قد بلغت $413.7 \times$.



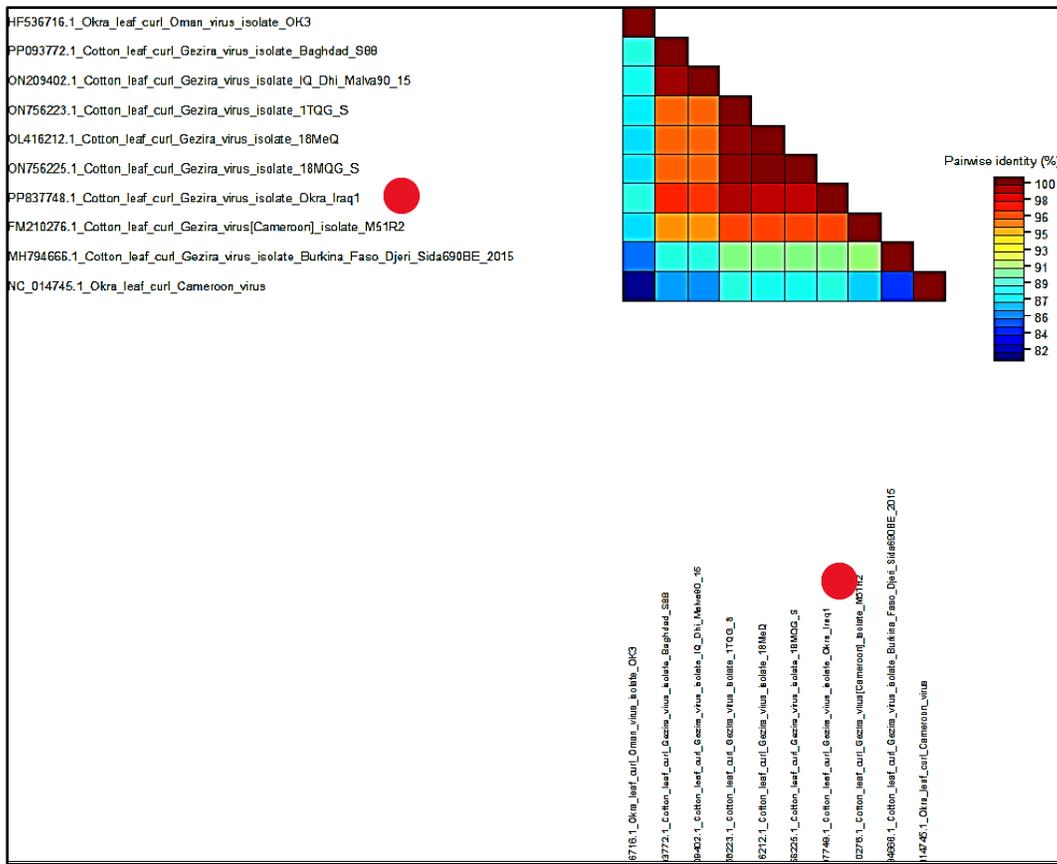
الشكل (9): القراءات الخام المشابه للجينوم المرجعي للفايروس CLCuGeV

كما لوحظ أن تسلسلات القراءات الخام المشابه لهذا الفايروس التي تم تجميعها كانت بطول 2764 قاعدة نايتروجينية وذات تنظيم جيني مطابق لجينوم هذا الفايروس الذي يضم ستة جينات رئيسية شملت Pre-coat ،Coat protein ،V1،V2،C1،C2،C3 وC4 التي تشفر لستة بروتينات رئيسية للفايروس شملت Replication ،Transcription activator protein ،Replication-associated protein ،enhancer protein و C4 protein على التوالي شكل (10). وقد تم ارسال تسلسل الجينوم الكامل الى بنك الجينات التابع للمركز الدولي لمعلومات التكنولوجيا الحيوية NCBI من اجل الحصول على رقم خاص بالعزلة العراقية التي كانت بالاسم Cotton leaf curl Gezira virus isolate Okra/Iraq-1 وهو PP837748.1 (ملحق 1).

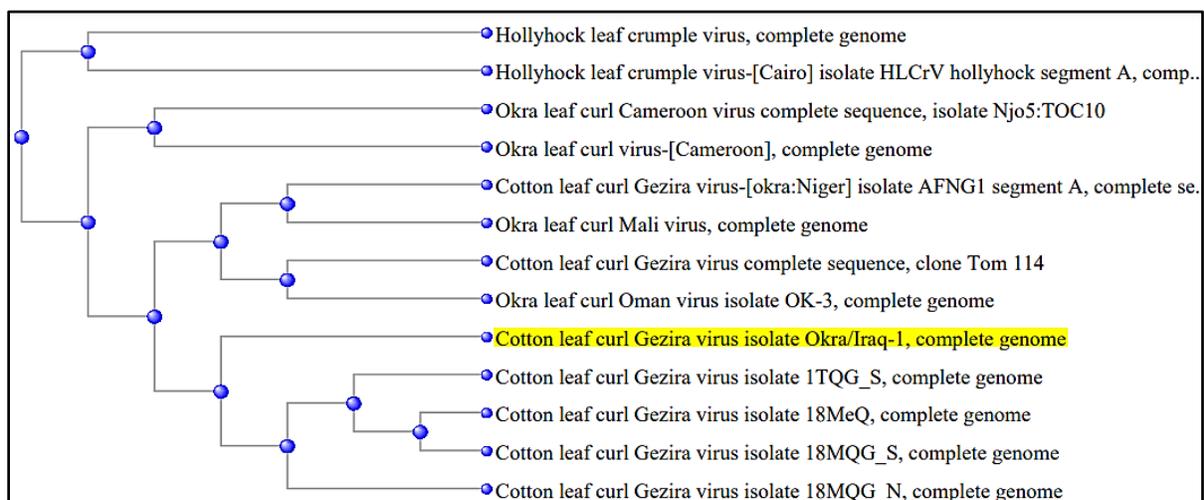


شكل (10): التنظيم الجينومي للعزلة العراقية للفايروس (CLCUGV)

لقد تم تأكيد هذا التشخيص عن طريق نتائج تحليل نسب التشابه (شكل 11) وتحليل القرابة الوراثية (شكل 12) لتسلسل الجينوم الكامل للفايروس (CLCUGV) التي أظهرت بإنها تتشابه بنسبة عالية (> 95%) مع العديد من العزلات والسلالات العالمية لنفس الفايروس خصوصا تلك المنتشرة في المملكة العربية السعودية (ON756223.1، OL416212.1، و ON756225.1) إذ كانت نسب التشابه بينهما تتراوح بين 98.84% و 99.02%، وكان تجمعها ضمن فرع واحد في الشجرة الوراثية؛ وهذا يثبت أن كل منهم ربما يكون له تطور متقارب وان لها سلفا مشتركا واحد. وبالرغم من وجود عزلتين عراقيتين لنفس الفايروس هما Cotton leaf curl Gezira و (PP093772.1) leaf curl Gezira virus isolate Baghdad S88 (ON209402.1) virus isolate IQ:Dhi:Malva-90:15 (Shahmohammadi, وآخرون، 2023)، إلا ان نسب التشابه بينهم كانت اقل إذ تراوحت بين 95.91% و 95.69% هلى التوالي وهذا قد يشير الى ان مصادر عزلات فايروس Cotton leaf curl Gezira virus الداخلة الى العراق هي مصادر متنوعة وليست من جهة واحدة. وأن سبب توزيع عزلات وسلالات هذا الفايروس على مناطق جغرافية متنوعة في منطقة الشرق الأوسط تم بطرق مختلفة مثل: نقل المواد النباتية وما إلى ذلك. ويضاف ايضا عدم تطبيق إجراءات الحجر الزراعي او تطبيقها بشكل ضعيف مع زيادة استيراد المنتجات الزراعية من دول الجوار ومساهمتها في نقل أنواع جديدة من الفايروسات الى داخل القطر (الكرطاني، 2023).



الشكل (11):نسب التشابه بين جينوم العزلة العراقية للفايروس (CLCUGV) (محدد بنقطة حمراء) مع نظائرها من السلالات والعزلات العالمية.



الشكل (12): العلاقة الوراثية بين العزلة العراقية للفايروس Cotton leaf curl Gezira virus isolate (المضلة باللون الاصفر) مع السلالات والعزلات العالمية الأخرى التابعة لنفس الفايروس Okra/Iraq-1 والفايروسات الأخرى القريبة وراثياً.

جدير بالذكر أن عزلة هذا الفايروس المدروسة كانت تتشابه مع العديد من العزلات والسلالات العالمية المعزولة من نباتات العائلة الخبازية عموماً ونباتات الباميا خصوصاً، مما قد يشير إلى وجود خصوصية في التفاعل بين هذا الفايروس والنباتات التي تعود إلى العائلة الخبازية، التي تشمل نبات الباميا. هذه النتيجة تدعمها دراسات سابقة حول تكيف الفايروسات مع مضيفاتها والتي أكدت على تفضيل الفايروسات لنباتات معينة داخل العائلات النباتية (Hančinský وآخرون، 2020). إن هذه الحقيقة تحتاج إلى إجراء المزيد من الدراسات والبحوث للتوصل إلى الصورة الكاملة لهذه العلاقة المعقدة. على سبيل المثال، دراسات تتعلق بالتفاعلات الجزيئية بين الفايروس ومضيفه، وكذلك دراسات إيكولوجية لتحديد نطاق انتشار الفايروس والمضيفات المحتملة.

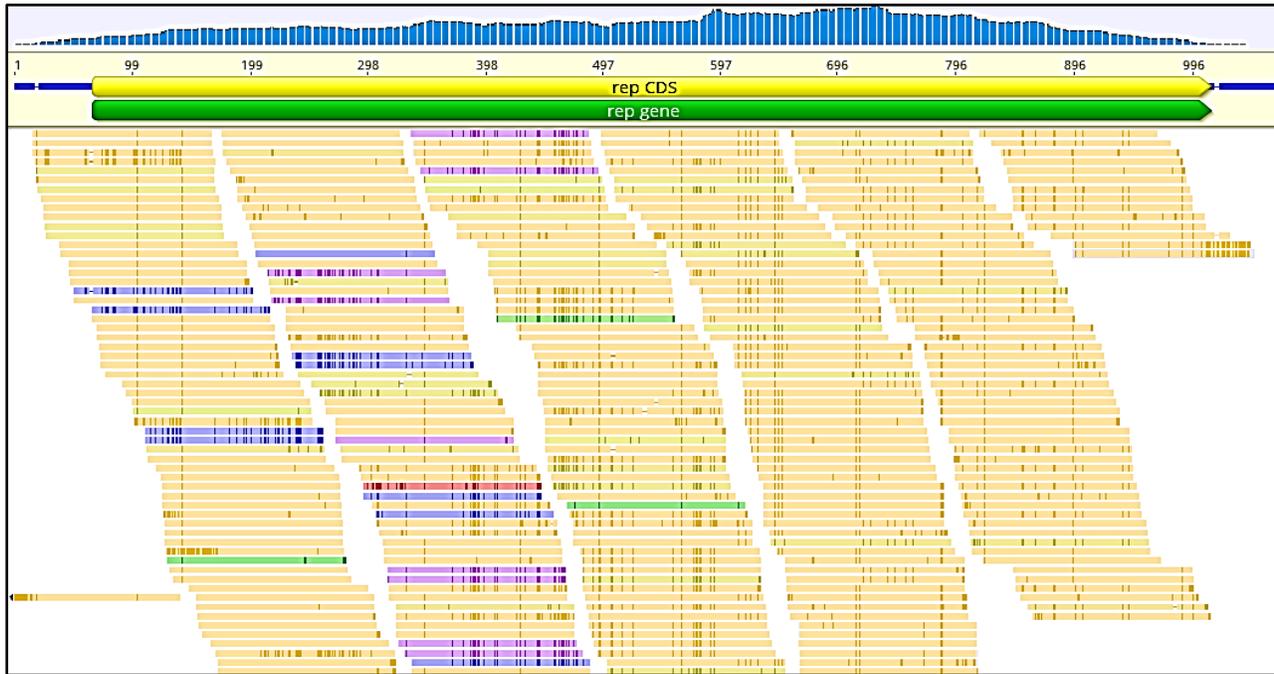
ثانياً: التابع Cotton leaf curl Gezira alphasatellite (CLCuGA)

كما أوضحت النتائج أيضاً وجود التابع الفايروسي Cotton leaf curl Gezira alphasatellite (CLCuGA) الذي يعود إلى الجنس *Colecusatellite* الذي يتبع عائلة *Alphasatellitida*. إذ وجدت العديد من المتجاورات المتداخلة (Contigs) المشابهة لتسلسل المرجعي لجينوم هذا التابع الفايروسي في جميع العينات الثلاث. وبلغت نسبة تغطية تسلسلات القراءات الخام للجينوم الكامل لهذا التابع الفايروسي 100% وكانت نسبة التشابه 100% (شكل 13).

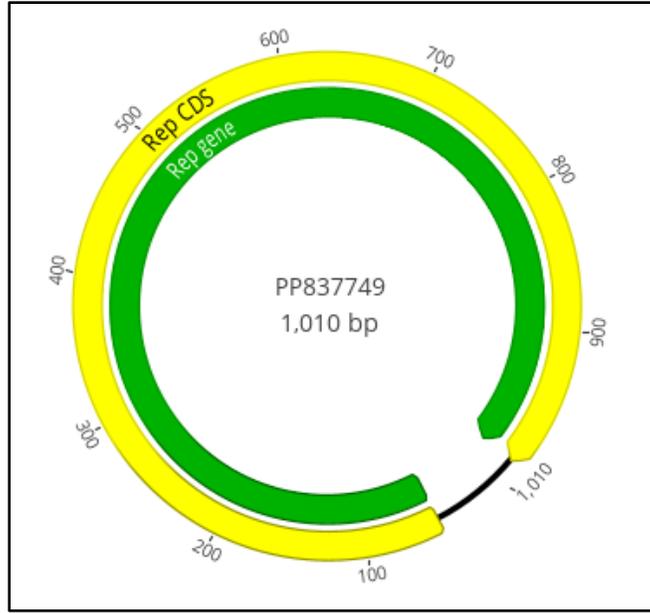
يضاف إلى ذلك فإن تسلسلات القراءات الخام المشابهة للجينوم المرجعي لهذا التابع الفايروسي التي تم تجميعها كانت بطول 1010 قاعدة نايتروجينية ولها نفس التنظيم الجينومي من خلال احتوائها على جين واحد فقط وهو Rep الذي يشفر لبروتين Replication-associated protein شكل (14). وقد تم حفظ هذا التابع الفايروسي في بنك الجينات تحت الاسم Cotton leaf curl Gezira alphasatellite isolate Okra/Iraq-1 وبالرقم PP837749.1 (ملحق 2). كما يُلاحظ من الشكل أعلاه، أن عدد القراءات الخام المشابهة للجينوم كان أعلى في منطقة الجين الوحيد لهذا الفايروس التابع، مما يشير إلى نشاط التعبير الجيني وفعالته في النبات المصاب.

واظهرت نتائج تحاليل نسب التشابه (شكل 15) والقربية الوراثية (شكل 16) لتسلسل الجينوم الكامل لهذا التابع الفايروسي بأنه ذو نسبة تشابه عالية (> 96%) وقربية وراثية مع العديد من العزلات والسلالات العالمية لنفس

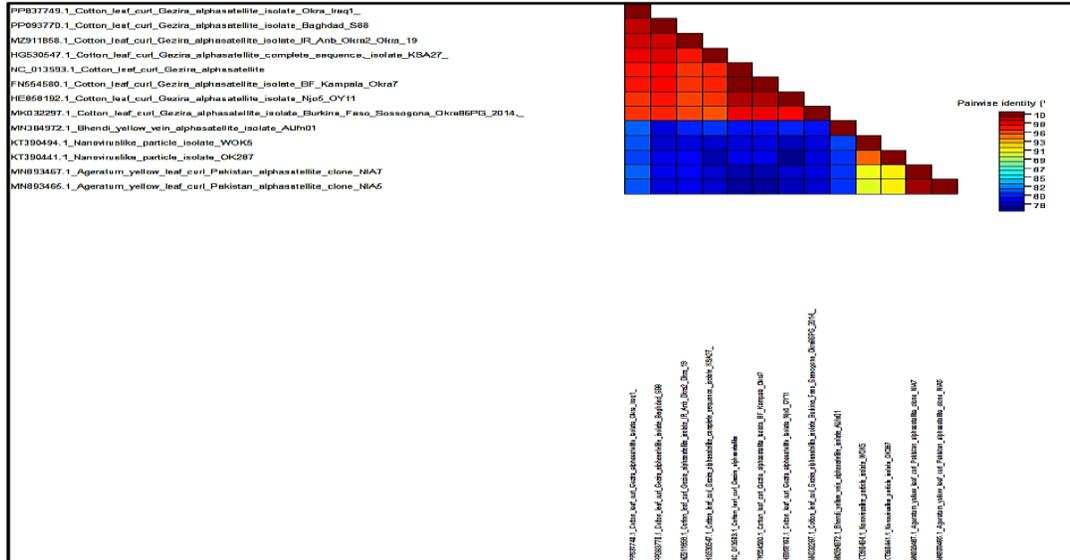
التابع خصوصاً العزلة العراقية (PP093770.1) والعزلة الايرانية (MZ911858.1) والعزلة السعودية (HG530547.1) و بنسب تشابه بلغت 98.52% و 98.22% و 97.53% على التوالي، مع ملاحظة ان العزلة المشخصة في هذه الدراسة كانت اقرب وراثيا للعزلة الايرانية الا ان تجمعها جميعا كان ضمن فرع واحد في الشجرة الوراثية مما يشير الى السلف المشترك الواحد بينهم. جديرا بالذكر الى ان هذه العزلة المشخصة في هذه الدراسة كانت تتشابه وتتقارب وراثياً مع العديد من العزلات والسلالات العالمية للتابع الفايروسي CLCuGA المعزولة من نبات الباميا في مختلف دول العالم.



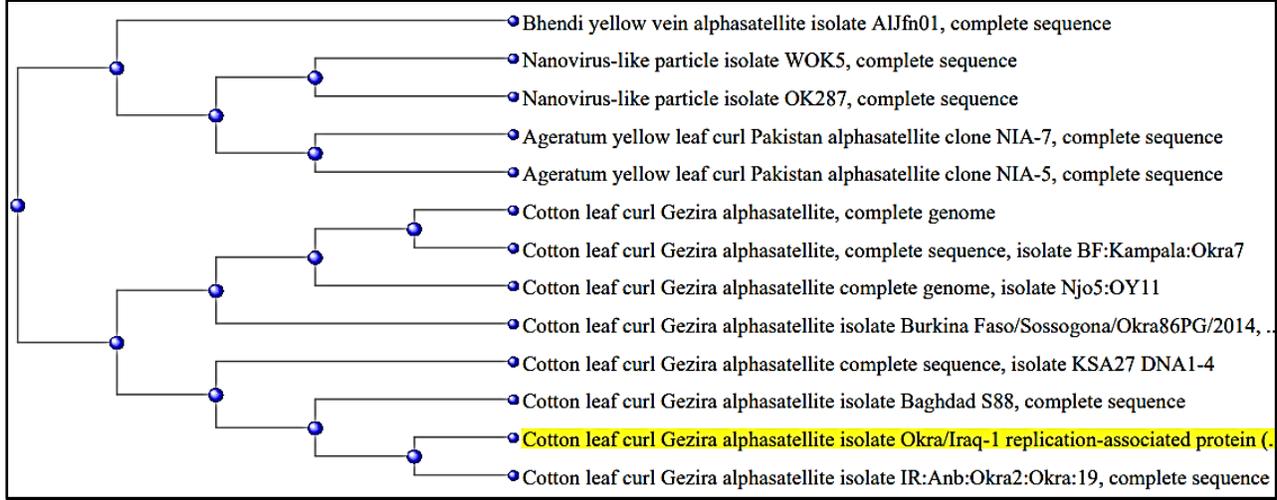
الشكل (13):القراءات الخام المشابه للجينوم المرجعي للتابع الفايروسي CLCuGA



شكل (14): التنظيم الجينومي للعزلة العراقية للتابع الفايروسي Cotton leaf curl Gezira alphasatellite isolate Okra/Iraq-1



الشكل (15): نسب التشابه بين جينوم العزلة العراقية للتابع الفايروسي Cotton leaf curl Gezira alphasatellite isolate Okra/Iraq-1 (محدد بنقطة حمراء) مع نظائرها من السلالات والعزلات العالمية.



الشكل (16): العلاقة الوراثية بين العزلة العراقية للتابع الفايروسي Cotton leaf curl Gezira alphasatellite isolate Okra/Iraq-1 (المضللة باللون الاصفر) مع السلالات والعزلات العالمية الأخرى التابعة لنفس التابع.

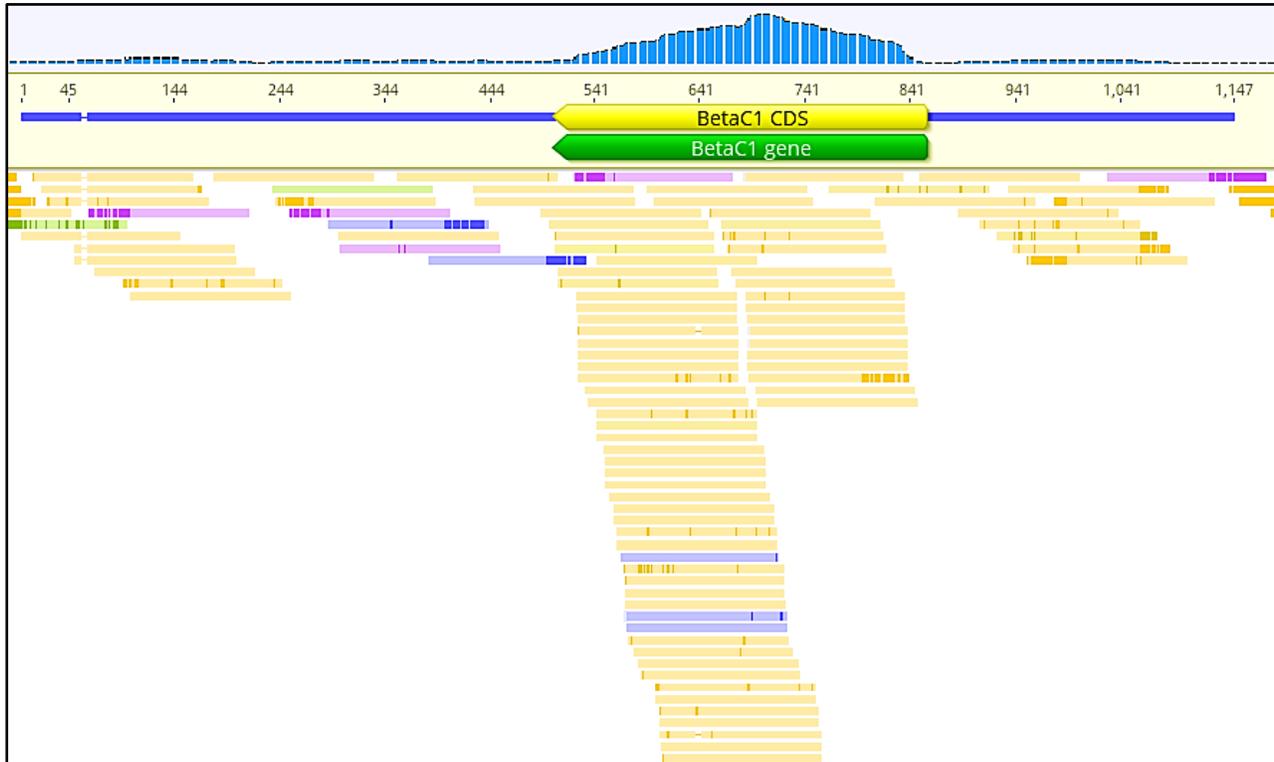
ثالثاً: التابع Cotton leaf curl Gezira betasatellite (CLCuGB)

اثبتت النتائج ايضا وجود التابع الفايروسي Cotton leaf curl Gezira betasatellite (CLCuGB) الذي ينتمي الى الجنس *Betasatellite* من عائلة *Tolecusatellitidae*. اذ بلغت نسبة تغطية تسلسلات القراءات الخام للجينوم الكامل لهذا التابع 100% وكانت نسبة التشابه 98.4% (شكل 17).

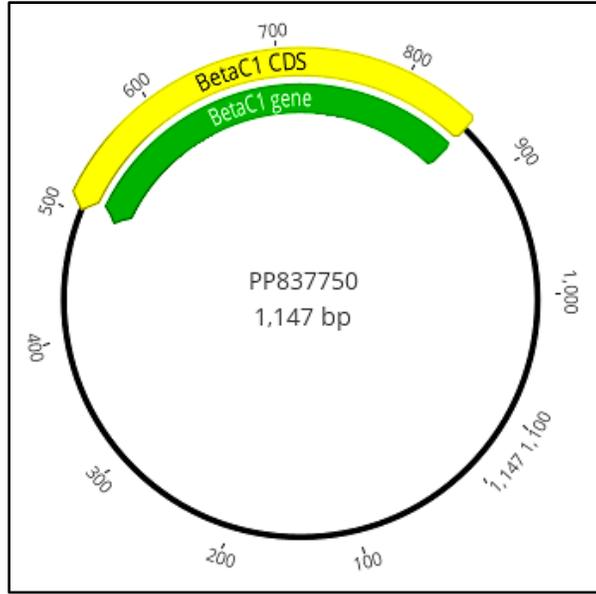
كما أن هذه التسلسلات الخام المشابهة للجينوم المرجعي لهذا التابع التي تم تجميعها بطول 1147 قاعدة نايتروجينية وتمتلك نفس التنظيم الجينومي من خلال احتوائها على جين واحد فقط وهو BetaC1 المشفر لبروتين BetaC1 protein، كما هو موضح في الشكل (18). ولغرض توثيق هذا التشخيص، تم حفظ تسلسل الجينوم الكامل لهذا التابع الفيروسي في بنك الجينات تحت الاسم Cotton leaf curl Gezira betasatellite isolate Okra/Iraq-1 وبالرقم PP837750.1 (ملحق 3). وجدير بالذكر أن التعبير الجيني للجين الوحيد لهذا الفيروس التابع كان عالياً نسبياً، كما يتضح من وجود العديد من القراءات الخام المشابهة، مما يشير إلى دوره الفعال في دورة النشاط المسببة للإصابة الفيروسية.

واظهرت نتائج تحاليل نسب التشابه (شكل 19) والقراية الوراثية (شكل 20) لتسلسل الجينوم الكامل لهذا التابع الفايروسي بأنه ذو نسبة تشابه عالية (> 96%) وقراية وراثية مع العديد من العزلات والسلالات العالمية لنفس التابع ولكن كان الاكثر تشابهاً وتقارباً وراثياً من العزلات المحلية (PP093771.1) و (ON206651.1)

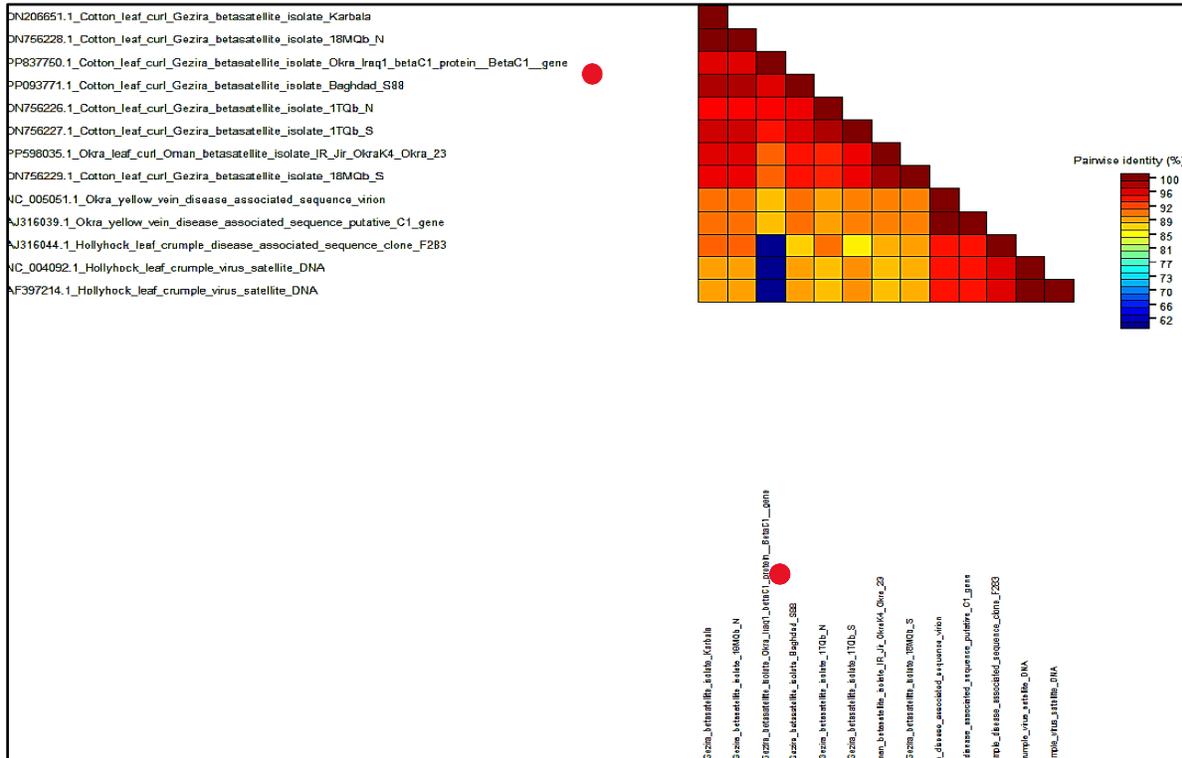
والعزلات السعودية (ON756228.1) و (ON756226.1) اذ بلغت نسب التشابه بينهما 99.50% ،
 98.63% ، 98.63% و 97.00% على التوالي. علما ان العزلة المشخصة في هذه الدراسة والعزلات اعلاه
 كانت متجمعة ضمن فرع واحد في الشجرة الوراثية مما يشير الى اشتراكهم بسلف واحد بينهم. جديرا بالذكر
 الى ان هذه العزلة المشخصة في هذه الدراسة كانت تتشابه وتتقارب وراثياً مع العديد من العزلات والسلالات
 العالمية للتابع الفايروسي CLCuGB المعزولة ايضاً من نبات الباميا في مختلف دول العالم.



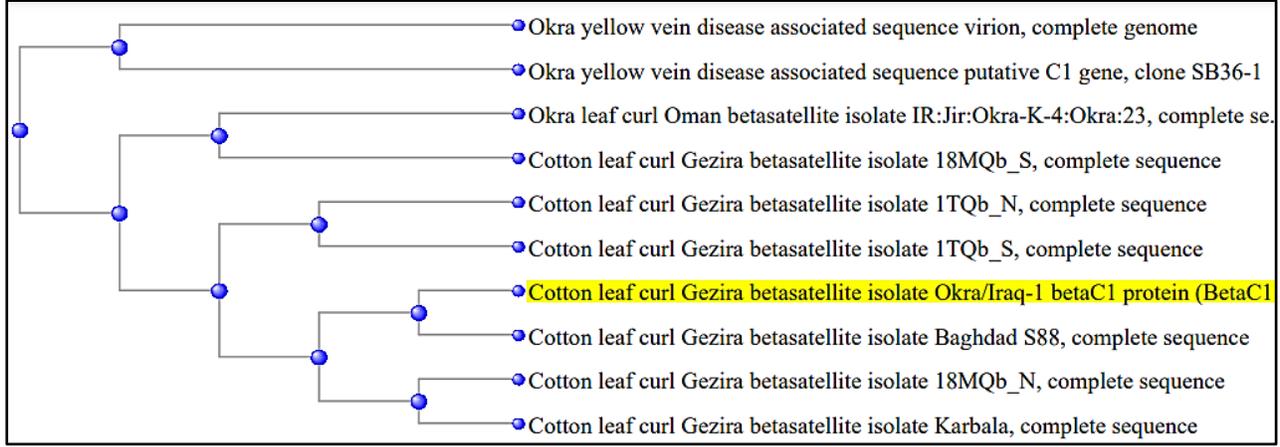
الشكل (17):القراءات الخام المشابه للجينوم المرجعي للتابع الفايروسي CLCuGB



شكل (18): التنظيم الجينومي للعزلة العراقية للتابع الفايروسي Cotton leaf curl Gezira betasatellite isolate Okra/Iraq-1



الشكل (19):نسب التشابه بين جينوم العزلة العراقية للتابع الفايروسي Cotton leaf curl Gezira betasatellite isolate Okra/Iraq-1 (محدد بنقطة حمراء) مع نظائرها من السلالات والعزلات العالمية.

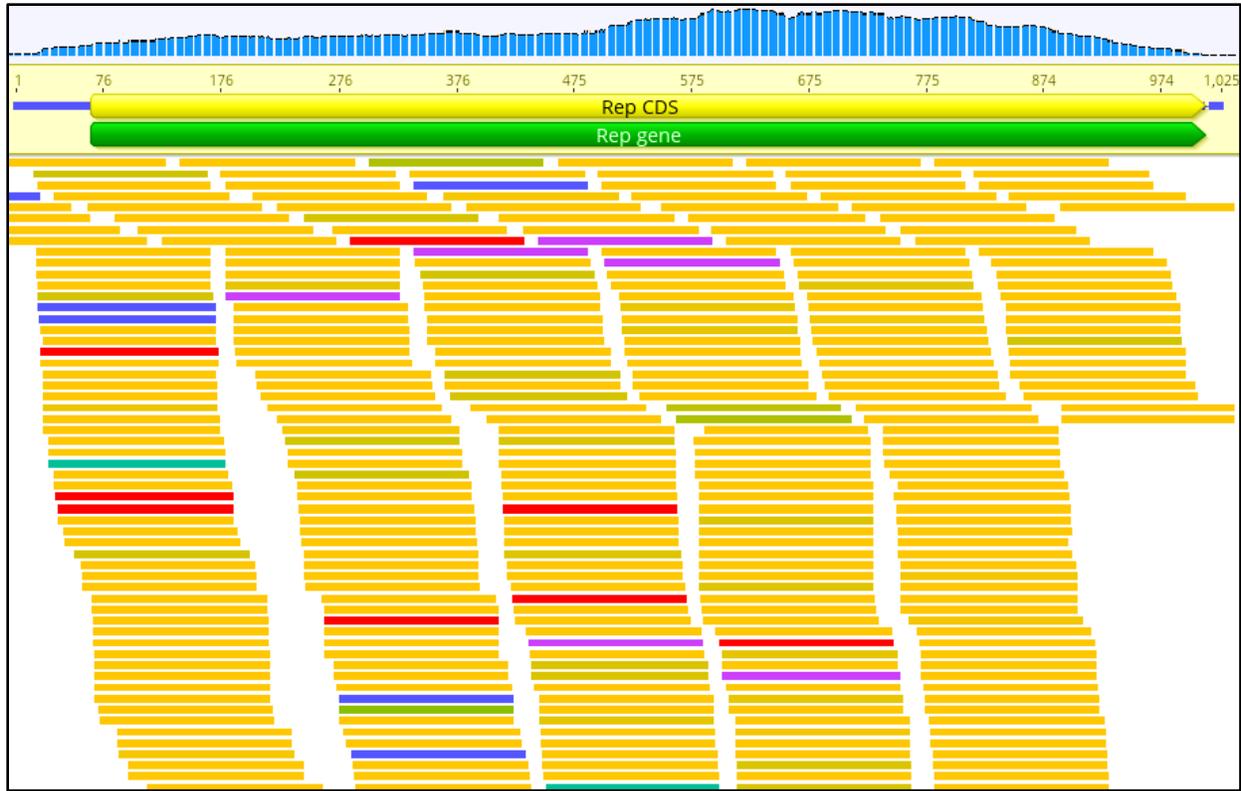


الشكل (20): العلاقة الوراثية بين العزلة العراقية للتابع الفايروسي Cotton leaf curl Gezira betasatellite isolate Okra/Iraq-1 (المضللة باللون الاصفر) مع السلالات والعزلات العالمية الأخرى التابعة لنفس التابع.

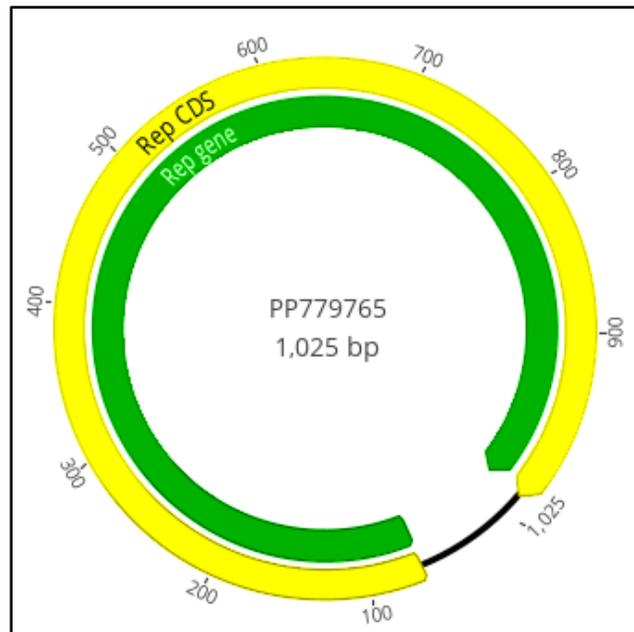
رابعاً: التابع (OLCuA) Okra leaf curl alphasatellite

اظهرت النتائج ايضا انه بالاضافة الى التابعين الفايروسيين CLCuGA و CLCuGB المشخصة في هذه الدراسة شخص تابع ثالث هو Okra leaf curl alphasatellite (OLCuA) الذي يعود إلى عائلة Alphasatellitida. اذ وجدت العديد من المتجاورات المتداخلة التي تشبه تسلسل الجينوم المرجعي لهذا التابع الفايروسي في العينات النباتية المصابة، حيث بلغت نسبة تغطية تسلسلات القراءات الخام للجينوم الكامل لهذا التابع الفايروسي 100% وكانت نسبة التشابه 93% (شكل 21).

واظهر جميع التسلسلات الخام المشابهة للجينوم المرجعي لهذا التابع انها بطول 1025 قاعدة نايتروجينية وتمتلك تنظيم جينومي مشابه للجينوم المرجعي من خلال احتوائها على جين Rep الذي يشفر لبروتين protein replication-associated protein، كما هو موضح في الشكل (22). وبناء على هذا التشخيص فقد تم توثيقه في بنك الجينات عزلتين من هذا التابع الفايروسي تحت الاسمين Okra leaf curl alphasatellite isolate Iraq-1+2 (PP779765.1) و (PP839930.1) على التوالي (ملحق 4). وكما هو الحال مع التوابع الفايروسية CLCuGA و CLCuGB فقد كان هذا التابع بحالة نشطة من خلال التعبير الجيني العالي نسبياً لجينه الوحيد، اذ وجدت العديد من القراءات الخام المشابهة له.

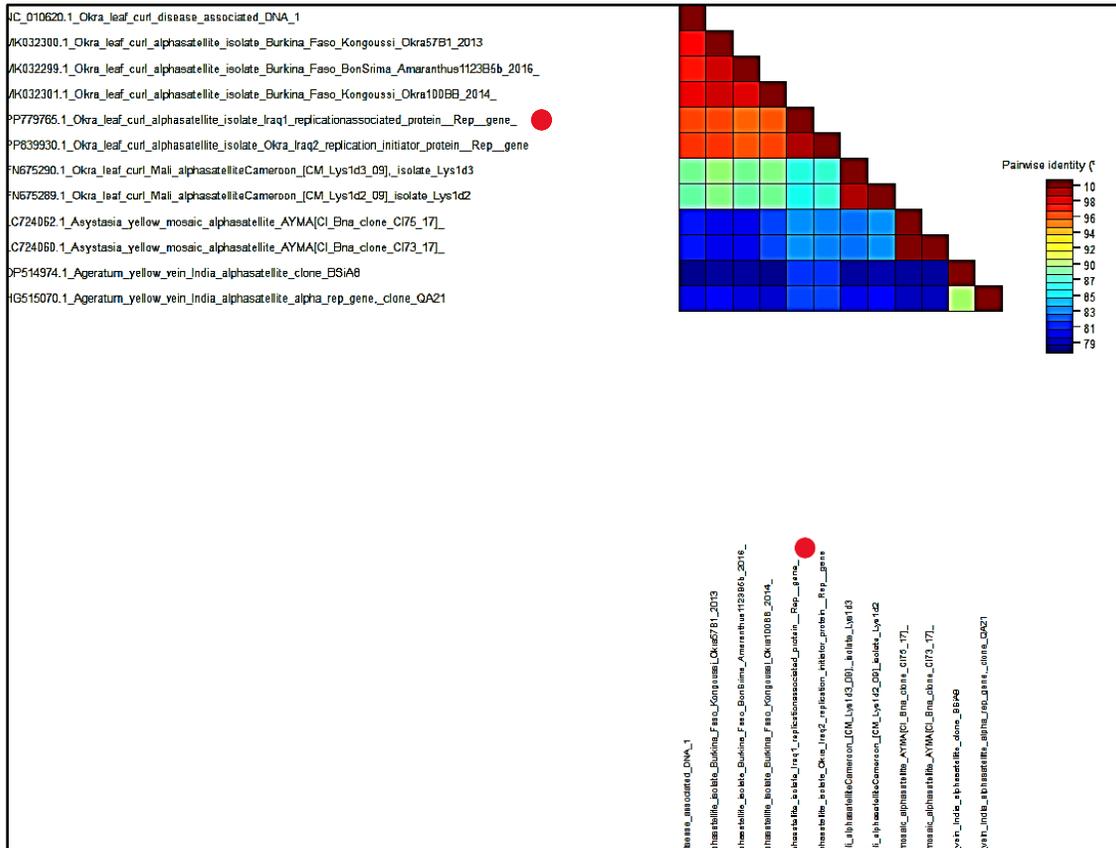


الشكل (21): القراءات الخام المشابه للجينوم المرجعي للتابع الفايروسي OLCuA

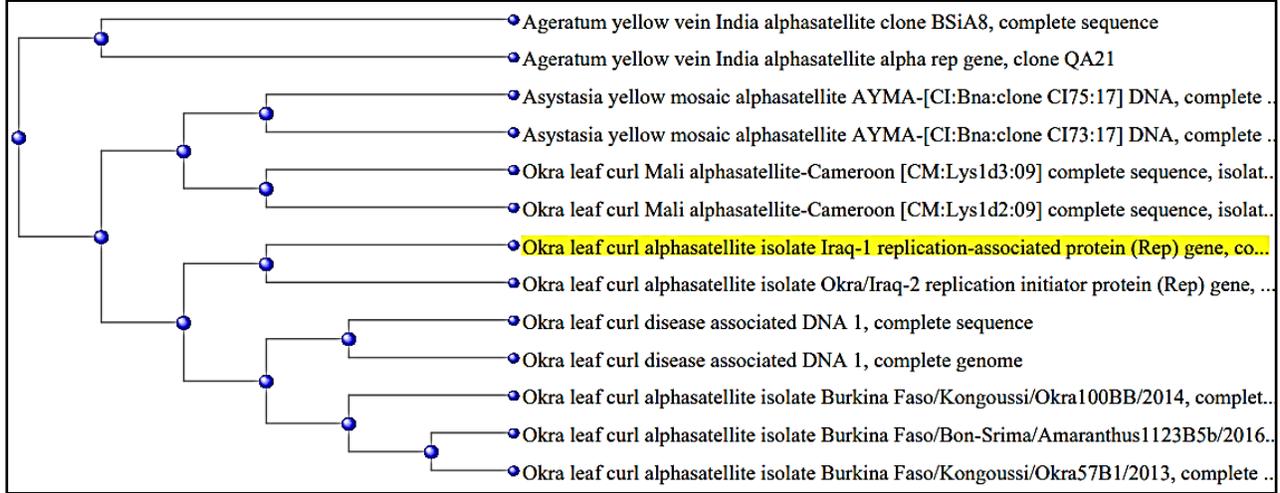


شكل (22): التنظيم الجينومي للعزلة العراقية للتابع الفايروسي Okra leaf curl alphatellite isolate Iraq-1

لقد كان التسلسل الجينوم الكامل لهذا التابع الفايروسي ذو نسبة تشابه عالية (96% >) (شكل 23) وقرابة وراثية مع العديد من العزلات والسلالات العالمية لنفس التابع مع تشابه وتقارب وراثي أكثر للعزلات الإفريقية خصوصاً تلك التي من السودان (FJ868830.2) و مالي (NC_010620.1) إذ بلغت نسب التشابه بينهما 97.43% و 96.63% على التوالي وكانت العزلتين العراقيتين والعزلات الإفريقية من السودان و مالي بوركينا فاسو ضمن فرع واحد في الشجرة الوراثية (شكل 24) مما يشير إلى اشتراكهم بسلف واحد بينهم. علماً أن معظم العزلات العالمية الشبيهة بالعزلة المشخصة في هذه الدراسة معزولة من نبات البامباي.



الشكل (23):نسب التشابه بين جينوم العزلة العراقية للتابع الفايروسي Okra leaf curl alphasatellite isolate Iraq-1 (محدد بنقطة حمراء) مع نظائرها من السلالات والعزلات العالمية.



الشكل (24): العلاقة الوراثية بين العزلة العراقية للتابع الفايروسي Okra leaf curl alphasatellite isolate Iraq-1 (المضلة باللون الاصفر) مع السلالات والعزلات العالمية الأخرى التابعة لنفس التابع.

مؤخراً في العراق تم تشخيص الفايروس Cotton leaf curl Gezira virus على نبات الخباز بدون اي من توابعه من قبل Shahmohammadi وجماعته (2023). كما ان هنالك تسلسل لجينوم الفايروس Cotton leaf curl Gezira virus مع توابعه CLCuGA و CLCuGB فقط موثقة في بنك الجينات اشارت الى تشخيصهم على محصول الباميا في العراق (عمل غير منشور). ان نتيجة الاصابة المعقدة بين Cotton leaf curl Gezira virus مع توابعه CLCuGA و CLCuGB تتوافق مع نتائج دراسات سابقة لهذا الفايروس مع التابعين CLCuGA و CLCuGB التي سجلت على نبات الباميا ايضا في الولايات المتحدة الامريكية من قبل Villegas وجماعته (2019). بالاضافة الى تسجيله مع نفس التوابع على بعض المحاصيل ونبات الزينة في ايران (Salari واخرون، 2023). وبالرغم منذ ذلك فانه في دراستنا هذه فقد تم التشخيص لأول مرة في العراق للاصابة المعقدة التي تشمل فايروس Cotton leaf curl Gezira virus مع ثلاثة توابع هي CLCuA و CLCuGB و OLCuA.

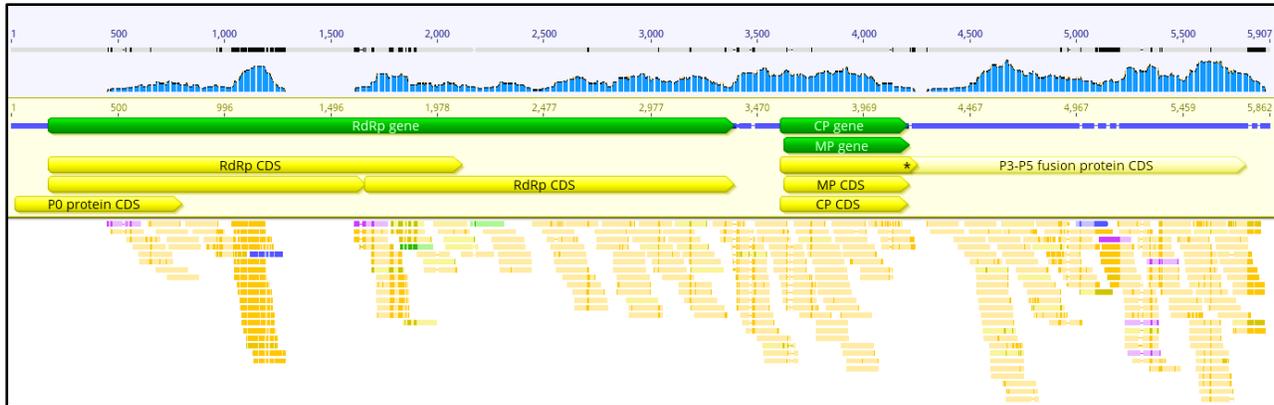
تمثل الأمراض التي تسببها فايروسات تعود الى الجنس Begomovirus مشكلة متزايدة لإنتاج الباميا في آسيا. فمثلا في سريلانكا، تعرضت زراعة الباميا لتهديد كبير من قبل عدة انواع من هذا الجنس. كما يعرف عن ان الغالبية العظمى من امراض محصول الباميا التي تسببها فايروسات من جنس Begomovirus تكون اصابتها معقدة تشمل احد انواع الفايروسات مع واحد او اثنين من التوابع خصوصاً نوع Betasatellite (Emmanuel واخرون، 2020). ان التوابع نوع Betasatellite تساهم في زيادة شدة الاعراض المرضية التي تظهر على النباتات المصابة كما يمكن أن تسبب الاصابة بالفايروس مع اكثر من تابع فايروسي على

الإنتاجية للنبات المصاب. اذ غالباً ما يقوم التابع الفايروسي بتشفير بروتين يتداخل مع آليات الدفاع في النبات أو/و يعزز تكاثر وحركة الفايروس المساعد اي ان كل تابع يكون له دور معزز للاصابة مما يسبب في زيادة التركيز او الكثافة للجسيمات الفايروسية وشدة الأعراض المرضية (Hull،2014). هناك حاجة إلى اجراء المزيد من الدراسات لمعرفة العلاقة المعقدة بين الفايروسات وتوابعها خصوصاً اذا كانت الاصابة المشتركة باحد الفايروسات واكثر من تابعين فايروسيين كما وجد في دراستنا هذه.

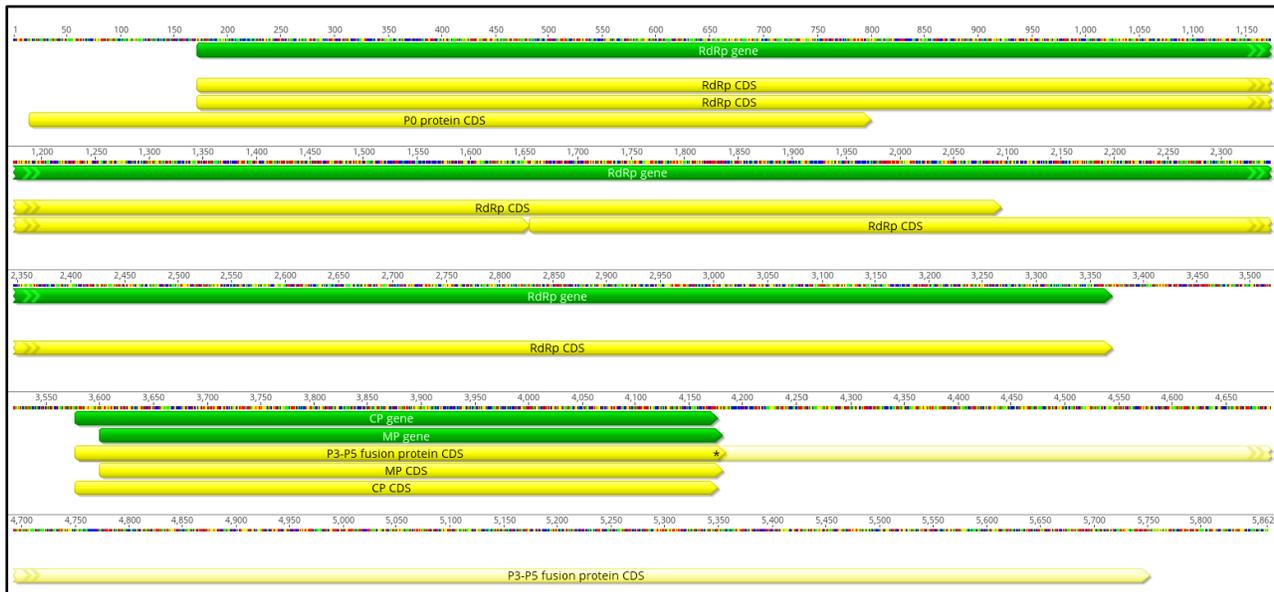
2-2-4: فايروس *Cotton bunchy top virus* (CBTV)

أظهرت النتائج إن هنالك العديد من المتجاورات المتداخلة التي تتشابه مع عدة جينات من جينوم الفايروس *Cotton bunchy top virus*، الذي يعود إلى الجنس *Polerovirus* التابع لعائلة *Solemoviridae*. وقد تم تأكيد هذا التشخيص من خلال وجود العديد من تسلسلات القراءات الخام المشابه لجينوم الفايروس النموذجي حيث بلغت نسبة تغطية جينوم الفايروس بتسلسلات القراءات الخام 85.4 % بينما بلغت نسبة التشابه بين هذه التسلسلات وتسلسل جينوم الفايروس 97.3 % (شكل 25). ومن ناحية أخرى فقد بلغ معدل عدد النسخ الكاملة للفايروس X 12.1. كما وجد انه عند تجميع هذه القراءات الخام المشابه لجينوم الفايروس امتلاكها تنظيماً جينياً مطابقاً لجينوم هذا الفايروس المرجعي من حيث احتوائه على ستة جينات مشفرة لستة بروتينات تشمل P0 protein، RNA-dependent RNA polymerase، P1 protein، P3-P5 fusion protein، Coat protein و Movement protein (الشكل 26).

سجل الجينوم الكامل لفايروس CBTV، الذي كان بطول 5862 قاعدة نايتروجينية ضمن قاعدة بيانات بنك الجينات NCBI-GenBank تحت الاسم Cotton bunchy top virus isolate Iraq-1 و تحت الرقم الخاص PP680224.1 (ملحق 5).

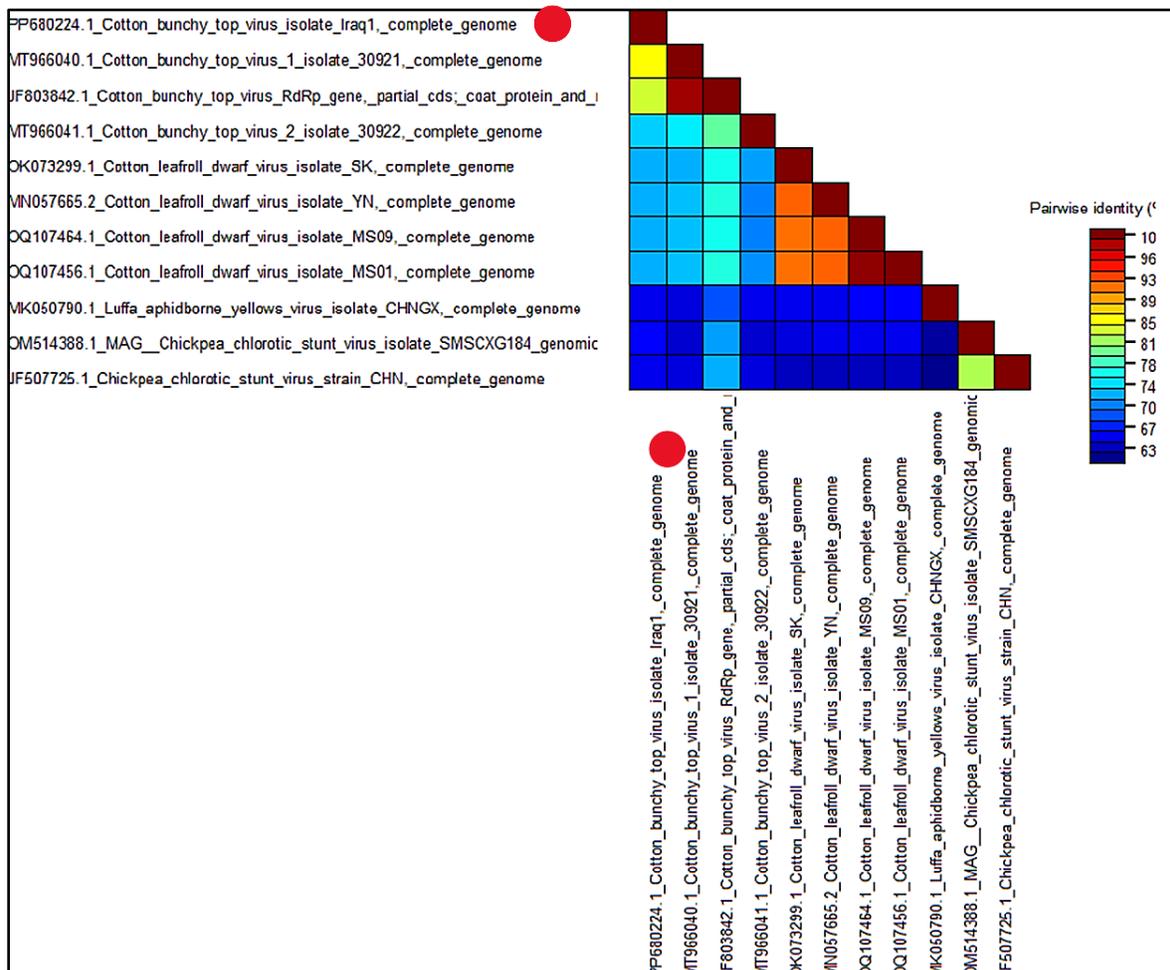


الشكل (25): القراءات الخام المشابه للفايروس CBTV

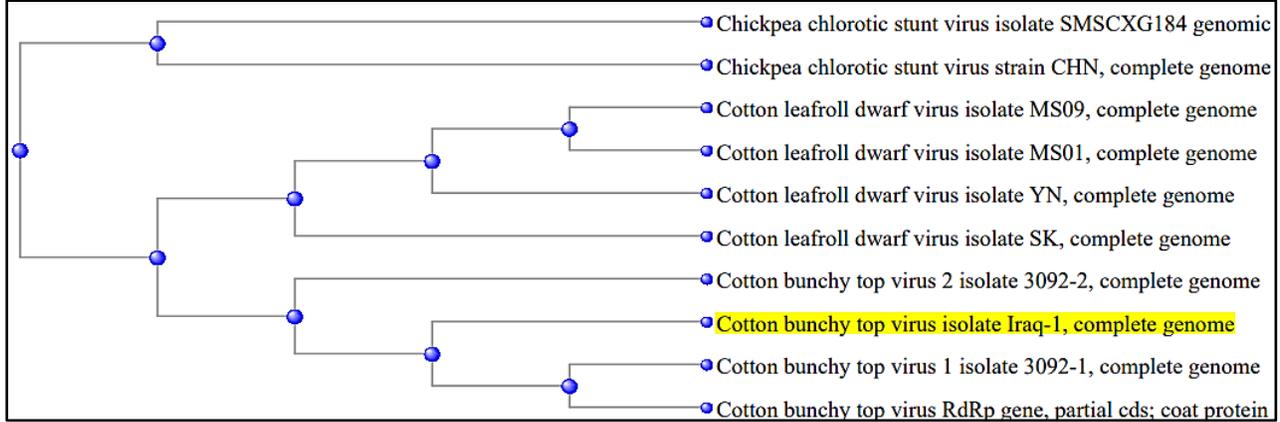


شكل (26): التنظيم الجينومي للعزلة العراقية من فايروس Cotton bunchy top virus isolate Iraq-1

أكدت نتائج تحليل نسب التشابه (شكل 27)، و تحليل النشوء والتطور لهذه العزلة العراقية من فايروس Cotton bunchy top virus isolate Iraq-1 مدى القرابة الوراثية بينها وبين عدد من العزلات والسلالات العالمية المناظرة لها خصوصا تلك المنتشرة في استراليا (MT966040.1 و MT966041.1 و JF803842.1)؛ اذ كانت ضمن مجموع تفرع واحدة مما يشير إلى مدى التشابه الكبير بينهما الناتج عن انهما من ذوي سلف مشترك واحد (شكل 28).



الشكل (27):نسب التشابه بين جينوم العزلة العراقية للفايروس Cotton bunchy top virus isolate Iraq-1 (محدد بنقطة حمراء) مع نظائرها من السلالات والعزلات العالمية.



الشكل (28): العلاقة الوراثية بين العزلة العراقية من فايروس Cotton bunchy top isolate Iraq-1 virus (مضللة باللون الاصفر) مع نظائرها من السلالات والعزلات العالمية.

ان فايروس CBTV هو المسبب لمرض القمة العنقودية على القطن (Cotton bunchy top disease) الذي ينتج عنه سنويا خسائر اقتصادية متقطعة ولكن كبيرة على محصول القطن في استراليا. لقد تم اكتشاف هذا الفايروس لأول مرة من قبل Ellis وجماعته في العام 2013 في حقول القطن الاسترالية ولاحقاً في العام 2022 اكتشف Sharman وجماعته ان هنالك نوعين لهذا الفايروس هما CBTV-1 و CBTV-2 منتشرة في حقول القطن في استراليا. علماً ان العزلة العراقية من هذا الفايروس كانت الاقرب وراثيا والاكثر تشابها من النوع الاول CBTV-1. كما وجد في نفس الدراسة اعلاه ان هذا الفايروس يمكنه ان يصيب تجريبياً بجانب القطن 16 عائل نباتي اخر اغلبها تعود الى العائلة الخبازية ولكن لم يكن نبات الباميا احدهما بالرغم من انه ينتمي الى نفس العائلة. الا اننا في دراستنا هذه شخصنا فايروس CBTV لأول مرة خارج استراليا وعلى عائل جديد هو نبات الباميا. جدير بالاشارة الى الحاجة الماسة الى اجراء المزيد من الدراسات لمعرفة المدى العائلي لهذا الفايروس ومدى انتشاره في العراق التي ربما دخله عن طريق ضعف اجراءات الحجر الزراعي على المنتجات الزراعية المستوردة من استراليا.

3-2-4: الفايروس Erysiphe necator-associated virus (EnVS)

يضاف إلى مجموعة الفايروسات النباتية وتوابعها التي تم تشخيصها في هذه الدراسة تشخيص احد الفايروسات الفطرية (Mycoviruses) وهو الفايروس Erysiphe necator-associated virus 1 وذلك عن طريق الحصول على عدة متجاورات متداخلة تتشابه مع جزء من جينوم هذا الفايروس. وبالرغم من عدم اكتشاف اي من المتجاورات التي تشبه الفطر *Erysiphe necator* الذي يعد احد مسببات مرض البياض الدقيقي على عدة عوائل نباتية الا ان نتائج التحليل (جدول 6) اثبتت ان العزلة العراقية من هذا الفايروس ذات

نسبة تشابه عالية بالقواعد النايتروجينية انحصرت بين 80.38 الى 93.48% مع عدة انواع من هذا الفايروس شملت EnVS-1 ، EnVS-3 ، EnVS-4 و EnVS-5 وكان الاقرب للنوع EnVS-1 بنسبة تشابه 93.48% وتغطية بلغت 100%.

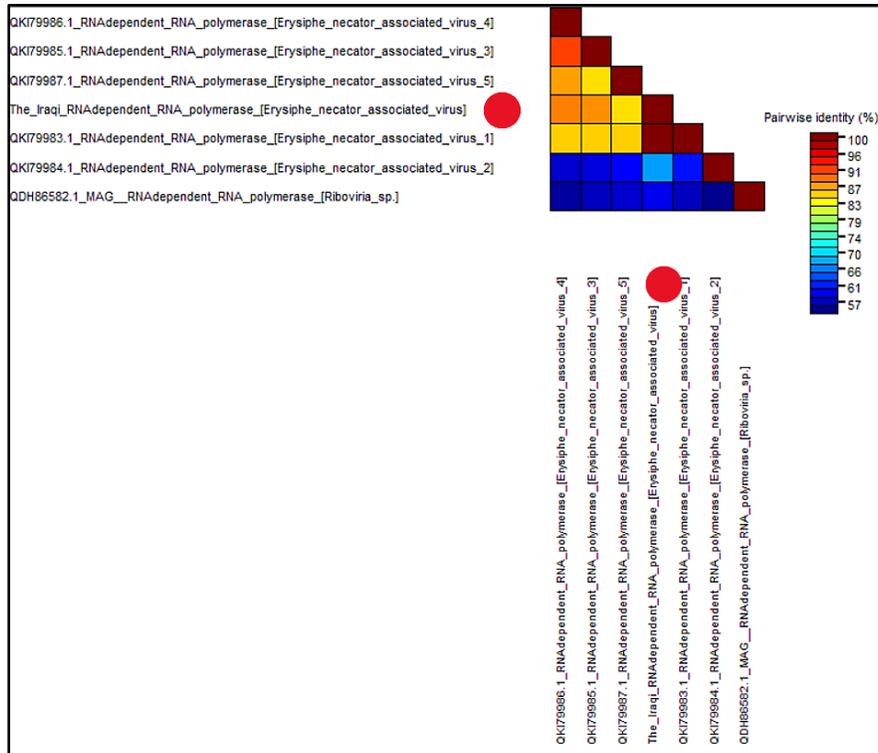
جدول (6): تحليل التشابه للقواعد النايتروجينية بين العزلة العراقية من فايروسات *Erysiphe necator* associated virus 1 isolate Iraq-1 والفايروسات المناظرة

اسم العزلة	نسبة التشابه	نسبة التغطية	رقم الحفظ في بنك الجينات
Erysiphe necator associated virus 1 isolate PMS13_DN222, complete genome	93.48%	100%	MN611681.1
Erysiphe necator associated virus 4 isolate PMS4_DN1011, complete genome	84.13%	100%	MN611684.1
Erysiphe necator associated virus 3 isolate PMS2_97, complete genome	81.53%	100%	MN611683.1
Erysiphe necator associated virus 5 isolate PMS5_DN3225, complete genome	80.38%	100%	MN611685.1

بالإضافة إلى ذلك، تم فحص العزلة العراقية من هذا الفايروس بشكل أعمق لاكتشاف إطارات القراءة المفتوحة (ORFs)، وكشف الفحص عن إطار قراءة مفتوح واسع لجين بوليميراز الحمض النووي الريبي المعتمد على الحمض النووي الريبي RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) الذي يشفر بروتين يتكون من 209 حامض أميني. وكشفت عمليات البحث المقارنة في قاعدة بيانات NCBI باستخدام برنامج BLASTx أظهرت تشابهات في التسلسل تتراوح بين 84.77% و 100% مع نفس الجين RdRp لفيروسات الأنواع الخمسة وهي EnVS 1, EnVS 4, EnVS 5, EnVS 3 و EnVS 1 وكان الاقرب كذلك للنوع EnVS 1 بنسب تشابه وتغطية بلغت 100% (جدول 7 وشكل 29). لذلك تم توثيق جين RdRp الخاص بالعزلة العراقية في بنك الجينات بالاسم Erysiphe necator associated virus 1 isolate Iraq-1 تحت الرمز PP352232.1 (ملحق 6)

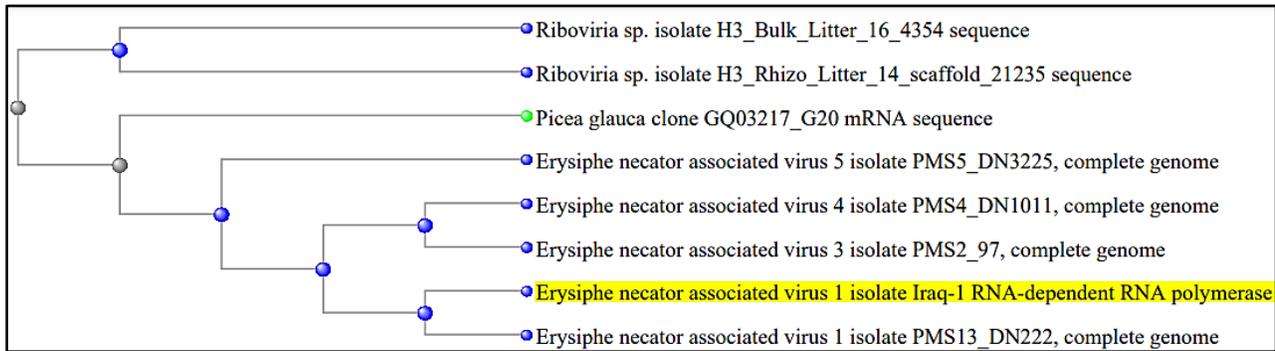
جدول (7): تحليل التشابه للاحماض الامينية لجين RdRp للعزلة العراقية من فايروسات Erysiphe necator associated virus 1 isolate Iraq-1 والفايروسات المناظرة

اسم العزلة	نسبة التشابه	نسبة التغطية	رقم الحفظ في بنك الجينات
RNA-dependent RNA polymerase [Erysiphe necator associated virus 1]	100.00%	100%	QKI79983.1
RNA-dependent RNA polymerase [Erysiphe necator associated virus 5]	84.91%	100%	QKI79987.1
RNA-dependent RNA polymerase [Erysiphe necator associated virus 4]	84.91%	100%	QKI79986.1
RNA-dependent RNA polymerase [Erysiphe necator associated virus 3]	84.77%	100%	QKI79985.1



الشكل (29): نسبة التشابه بين تسلسل بروتين RdRp من فايروس *Erysiphe necator* associated virus 1 isolate Iraq-1 (المشار إليه بنقطة حمراء) مقارنةً مع تسلسلات البروتين المماثلة لفيروسات ذات صلة أخرى

كما بينت نتائج تحليل القرابة الوراثية التي تمت بمقارنة تسلسل الأحماض الأمينية لبروتين RdRp المفترض من العزلة العراقية من فايروس *Erysiphe necator* associated virus 1 isolate Iraq-1 مع تسلسلات مشابهة من خمسة فايروسات أخرى مرتبطة بـ *Erysiphe necator* تم اكتشافها في GenBank. إذ تم إنشاء شجرة تطورية (الشكل 30) أظهرت العلاقة القوية بين EnVS العراقي والفايروس EnVS-1 (QKI79986.1). وضمن تلك المجموعة، تم تصنيفها أيضاً مع أنواع أخرى من الفايروسات المرتبط بـ *Erysiphe necator* 5، 3، و4 (QKI79987.1، QKI79985.1، و QKI79986.1 على التوالي). تشير هذه النتيجة بقوة إلى أن الفايروس الفطري العراقي ينتمي إلى النوع الفيروسي المرتبط بـ *Erysiphe necator*.



الشكل (30): العلاقة الوراثية بين بروتين RdRp لفايروس العزلة العراقية *Erysiphe necator* associated virus 1 isolate Iraq-1 (مضللة باللون الاصفر) مقارنةً مع تسلسلات البروتين المماثلة لفيروسات ذات صلة أخرى

بالرغم كم عدم تشخيص الفطر *E. necator* في دراستنا هذه كفطر مرتبط بمحصول الباميا، تم الكشف عن EnVS 1 بشكل مستقل عن عائله الفطري، مما يشير إلى وجود اختلاف محتمل في النتائج المتعارف عليها فيما يخص هذا الفايروس الفطري. ومع ذلك، أظهرت دراسة قام بها Nerva وجماعته (2017) اثبتوا فيها قدرة الفايروسات الفطرية على التكاثُر داخل الخلايا النباتية، خاصة تلك المصنفة تحت عائلي *Partitiviridae* و *Totiviridae*. إذ انها قادرة على التكاثُر داخل الخلايا النباتية دون أي تغييرات في تسلسل القواعد النايتروجينية أو إشارات للتكيف مع العائل. ان هذا التطور والتكيف لهذا الفايروسات الفطرية يحمل عواقب تطويرية كبيرة تحتاج اجراء المزيد من الدراسات لفهم الصور الاشمل عن هذه العلاقات المعقدة.

لقد احدثت تقنية تسلسل الجيل التالي NGS ولا تزال تغييراً جذرياً في التشخيص الدقيق والسريع وغير المكلف نسبياً لمسببات الممرضة للنباتات التي تشمل الفايروسات وتوابعها (Barba وآخرون ، 2014). إذ انها تعتمد على استخلاص الجينوم الكامل ولا تسمح بالتحيز. وهي قادرة على تشخيص العديد من الفايروسات المعروفة وغير المعروفة المرافقة للنباتات المصابة وغيرها من العوامل الأخرى، حتى في حالة الإصابة الكامنة غير المصحوبة بظهور الاعراض المرضية او تلك الناتجة عن الإصابة المعقدة بأكثر من فايروس (الياسري، 2023). مثلما حصل في دراستنا هذه إذ تم تشخيص فايروسين وثلاثة توابع فايروسية بجانب احد الفايروسات الفطرية بعملية تشخيص واحدة.

ان الاستمرار بتطبيق هذه التقنية في مجال تشخيص المسببات الممرضة للنباتات سوف يعود بما لا يقبل الشك بالفائدة بتحديد أنواع واجناس المسببات الممرضة سواء المتوطنة او الغازية وتحديد المدى العائلي لها مما يسمح بالتفكير الصحيح في تربية التراكيب الوراثية المقاومة للمسببات المرضية المتواجد في البيئة العراقية بالإضافة إلى اتخاذ الأساليب الانجح في الحد من تأثيرها ومقاومتها مقاومة فعالة (الكرطاني ، 2023).

3-4: تشخيص مادة أكسيد الزنك ZnO النانوية المصنعة

أولاً: التحليل الطيفي للأشعة المرئية وفوق البنفسجية (UV-Vis)

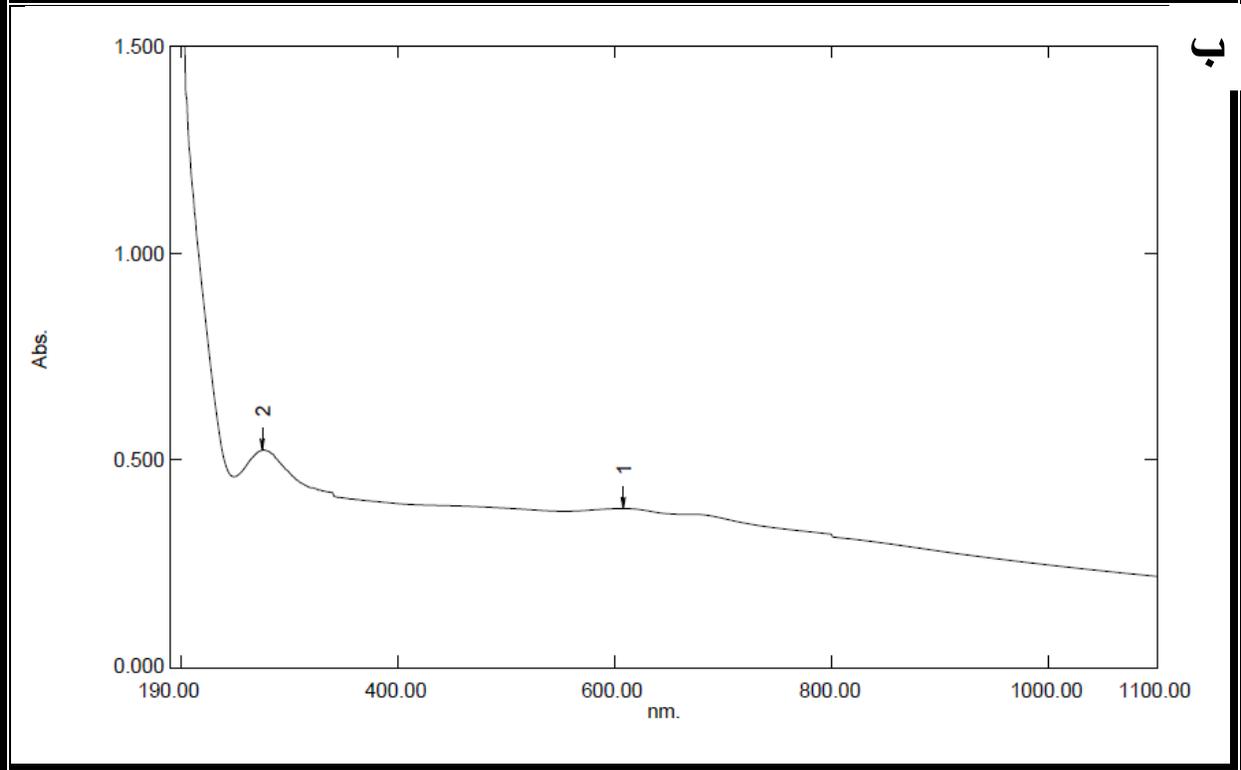
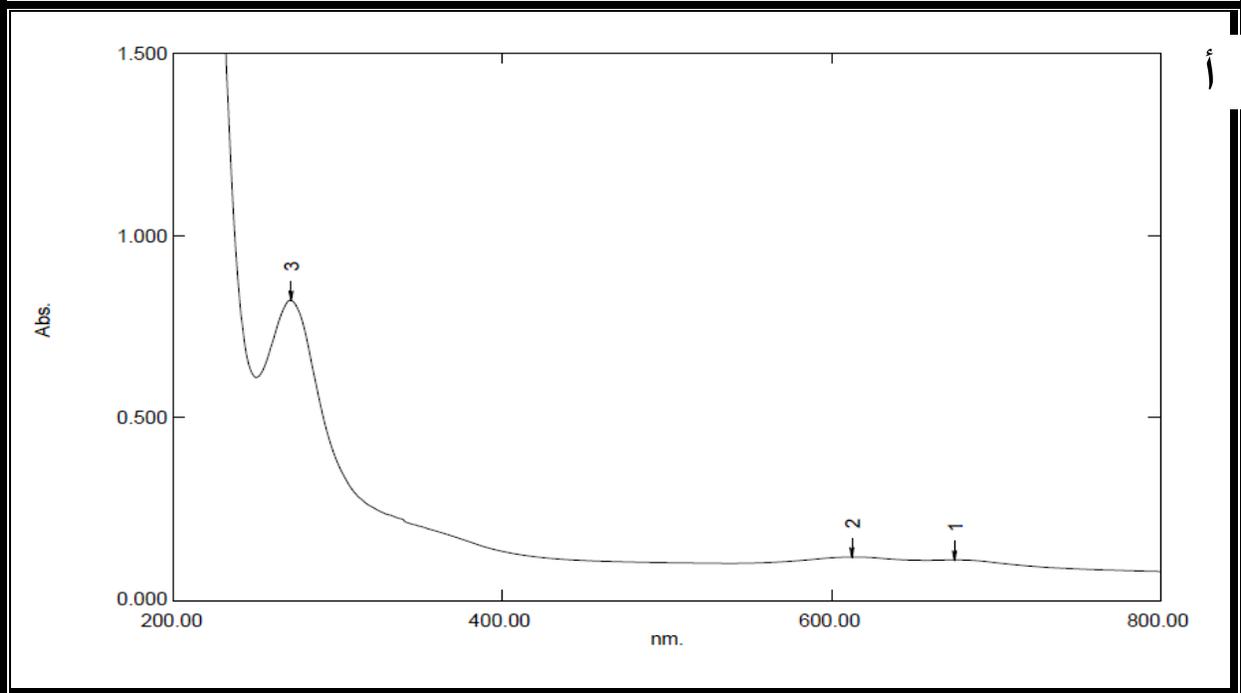
أظهرت نتائج صناعة مادة أكسيد الزنك النانوية (ZnO nanoparticles) باستخدام مطياف الأشعة فوق البنفسجية المرئية (UV-Vis) ان ذروة الامتصاص الأقوى للعينة الأولى مقدارها 0.822 عند الطول الموجي 271.00 نانومتر (شكل 31 أ) ، وهذا يشير الى وجود امتصاص قوي في هذا النطاق الطيفي، مما يدل على تفاعل الجسيمات النانوية مع الضوء عند هذا الطول الموجي بينما بلغت في العينة الثانية 0.524 عند الطول الموجي 275.00 نانومتر (شكل 31 ب). وهذا بدوره يعكس امتصاصاً أكبر للعينة الأولى مقارنة بالعينة الثانية، وقد يكون ذلك ناتجاً عن تركيز أعلى للجسيمات النانوية أو تفاعل مختلف للسطح.

جدير بالإشارة الى ان من المعروف أن جسيمات أكسيد الزنك النانوية تظهر عادةً ذروة امتصاص قوية في نطاق 350-380 نانومتر نتيجة للانتقالات الإلكترونية ضمن نطاق الطاقة العريض (Bandgap transitions). ومع ذلك، عدم ظهور هذه الذروة في العينتين المدروستين اعلاه قد يُعزى إلى عدة أسباب منها ان حجم الجسيمات النانوية المتكونة يمكن أن يكون أصغر بكثير، مما يؤدي إلى تأثيرات الحبس الكمي (quantum confinement effects) التي تسبب انزياحاً في طيف الامتصاص نحو الأطوال الموجية الأقصر. كذلك احتمالية وجود التأثيرات السطحية التي قد تؤثر مع الكواشف أو البيئة المحيطة على الطيف

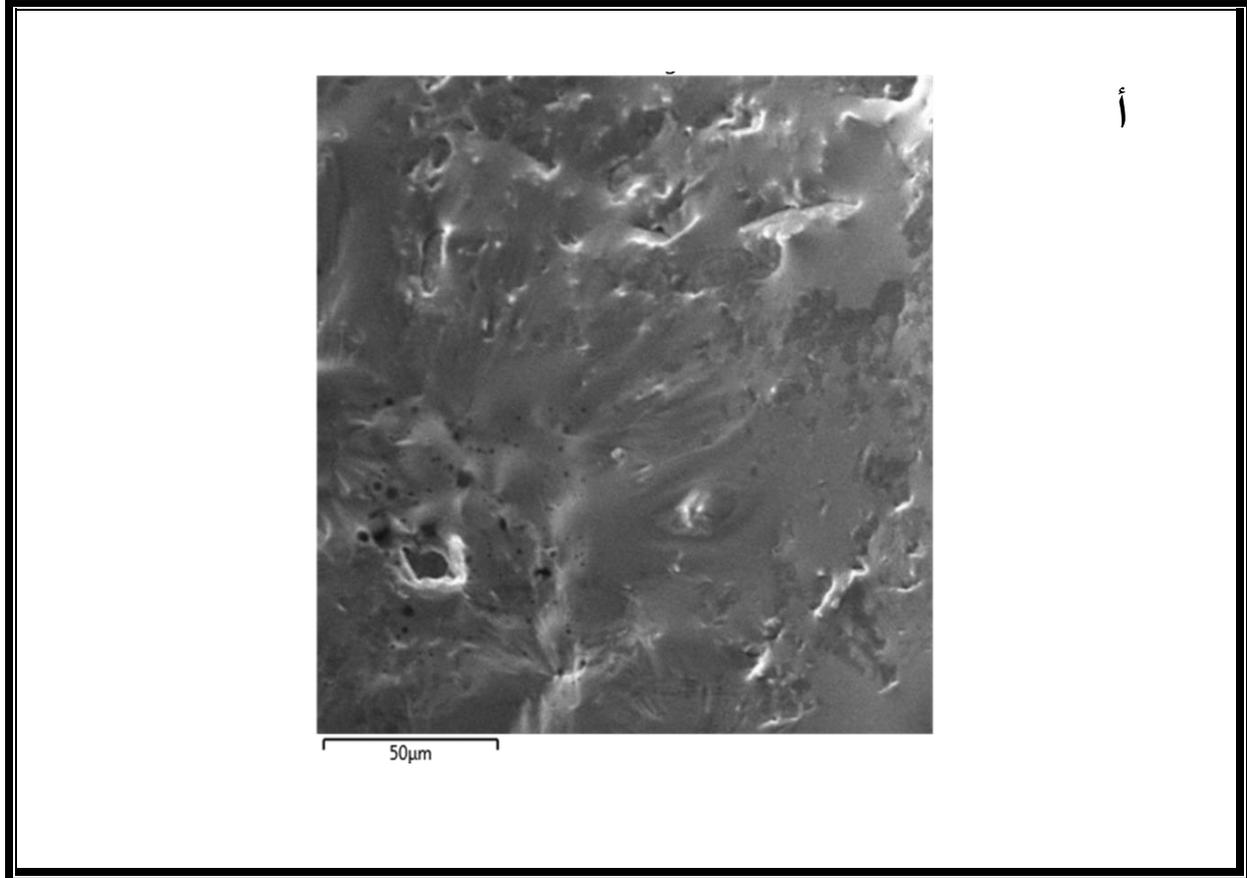
الامتصاصي، مما يغير المواقع الطيفية للذروة. كذلك يمكن أن تكون العينات تحتوي على شوائب أو تركيبات مختلفة تؤدي إلى تغييرات في الخصائص الامتصاصية (Klingshirn, 2007; Movlarooy, 2018). بالرغم من ذلك فقد وجد Kumar وآخرون (2024) عند استعمالهم احد انواع الفطر الاحيائي Trichoderma في تصنيع جسيمات الزنك النانوية ان الأشعة المرئية وفوق البنفسجية (UV-Vis) لقم الامتصاص كانت في نطاق 240-380 نانومتر، التي اعتبرها كدليل على تكوين جسيمات أكسيد الزنك النانوية. وهذا التفسير يتوافق مع نتائج دراستنا. ان هذه النتائج توفر فهماً أفضل لسلوك الجسيمات النانوية لأكسيد الزنك وكيفية تأثير العوامل المختلفة على خصائصها الامتصاصية. ولغرض تأكيد نتائج طبيعة قم الامتصاص هذه، استعملت تقنيات اخرى للتوصيف الإضافي.

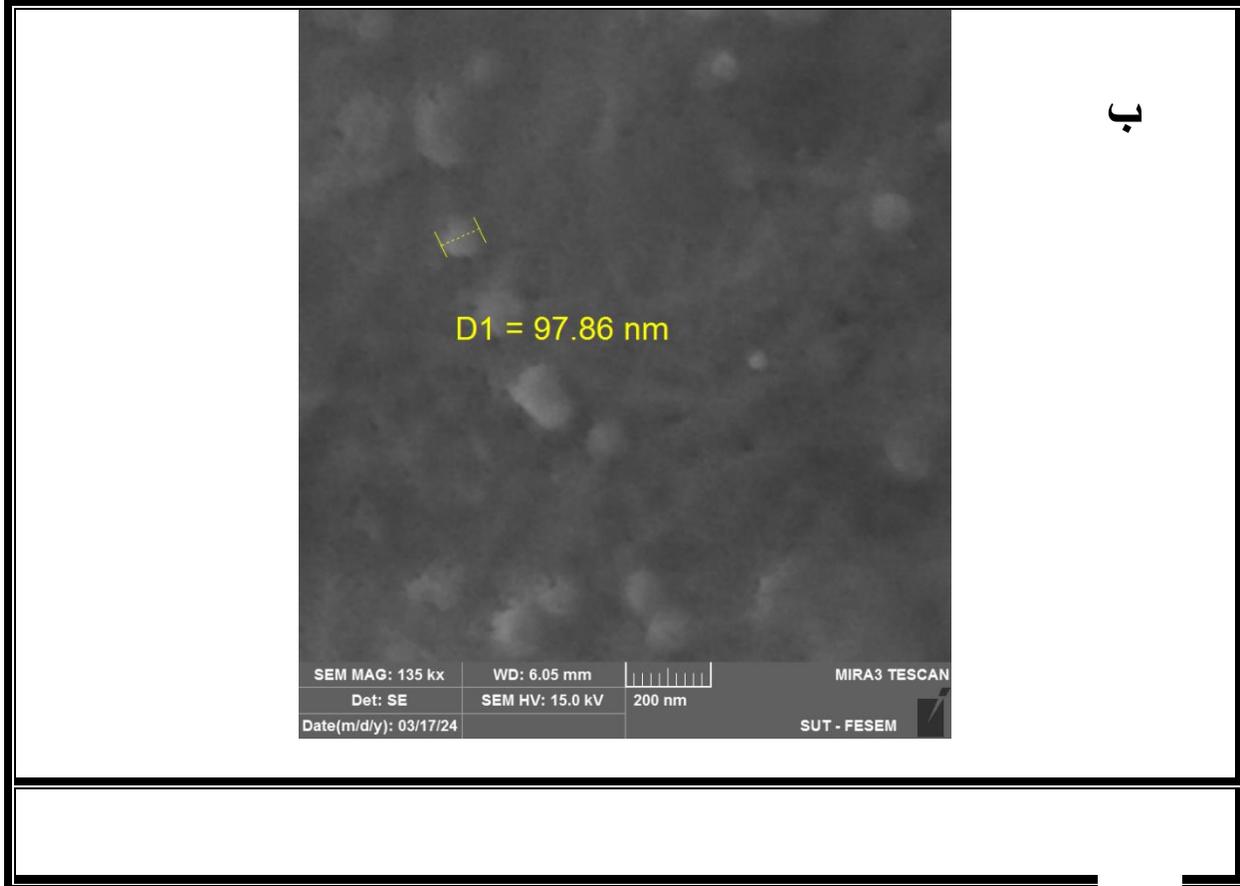
ثانياً: التشخيص باستعمال المجهر الإلكتروني النافذ Transmission Electron Microscopy (TEM)

لغرض تأكيد نتائج الاختبار السابق، تم إدراج عينة أخرى للمقارنة تمثلت بمحلول مادة أكسيد الزنك الذي استعمل في صناعة الجسيمات النانوية. خضعت هذه العينة، بجانب العينتين الأولى والثانية، للتشخيص باستخدام المجهر الإلكتروني النافذ. أظهرت النتائج عدم وجود أي جسيمات نانوية في عينة المقارنة (شكل 32 أ)، بينما أشارت خصائص السطوح الخارجية لجسيمات أكسيد الزنك (ZnO) النانوية المصنعة في العينتين الأولى والثانية (شكل 32 ب وج على التوالي) إلى وجودها في العينتين بأحجام وأشكال مختلفة. ومع ذلك، كانت معظم هذه الجسيمات بأحجام أقل من 100 نانومتر.



الشكل (31): اختبار التحليل الطيفي للأشعة المرئية وفوق البنفسجية (UV-Vis) لمادة أكسيد الزنك ZnO المصنعة، (أ) نتائج تحليل العينة الأولى (ب) نتائج تحليل العينة الثانية.





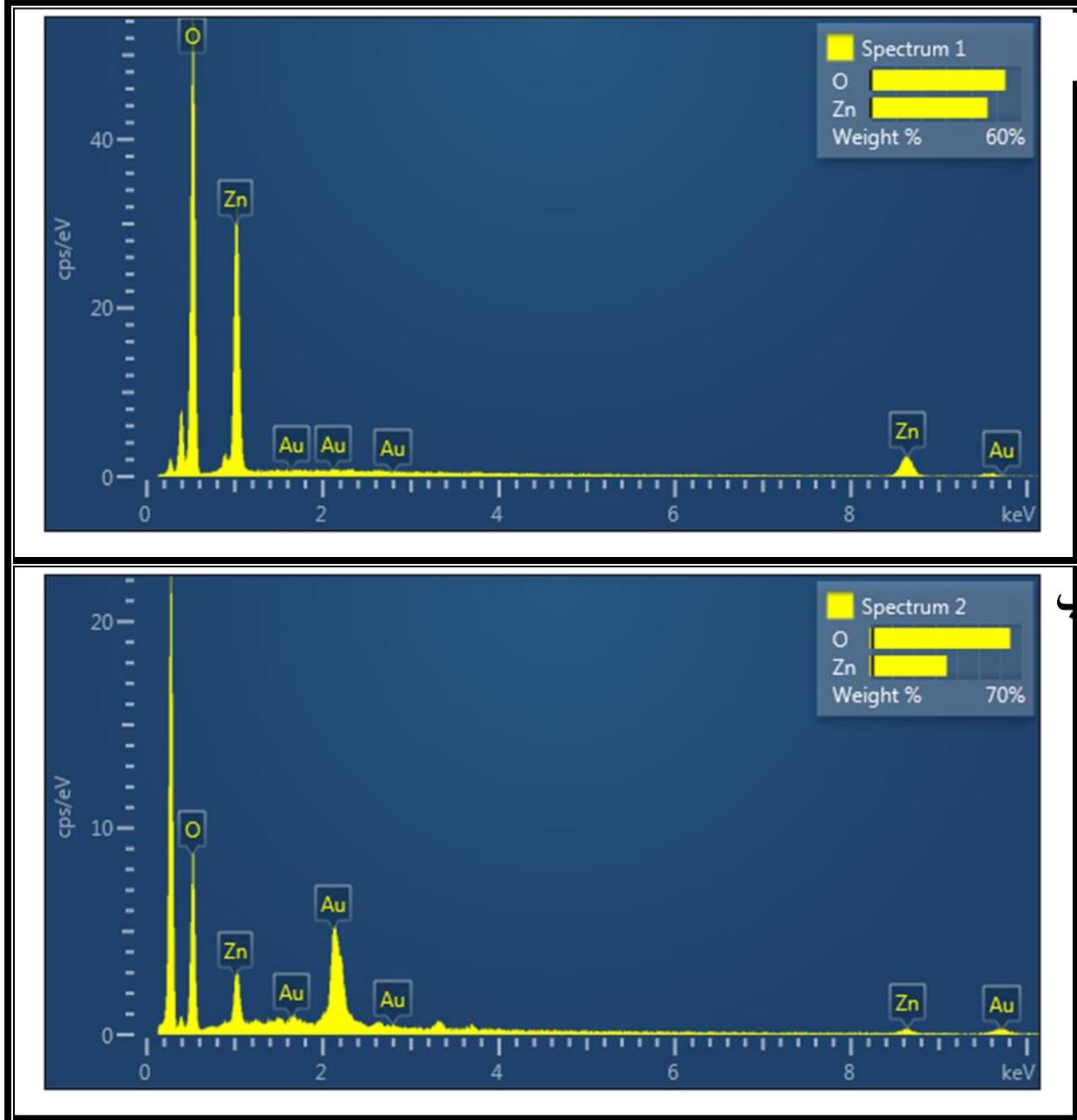
ش ج .): تحديد خصائص مادة أكسيد الزنك ZnO النانوية المصنعة بالمجهر الإلكتروني النافذ (أ) عينة المقارنة (ب) العينة الأولى (ج) العينة الثانية

ثالثاً: اختبار الطاقة المشتتة للأشعة السينية الطيفي Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX)

أكدت نتائج اختبار الطاقة المشتتة للأشعة السينية الطيفي الخاص بتحليل وتحديد خواص التركيب العنصري للمواد أن الجسيمات المتكونة في خليط العينتين هي جسيمات نانوية ذات شوائب قليلة. حيث تظهر القمم النموذجية المقابلة للزنك (Zn) عادةً في هذا الاختبار بين 1.01 كيلو إلكترون فولت ($L\alpha$) و8.64 كيلو إلكترون فولت ($K\alpha$)، في حين تظهر قمة الأوكسجين (O) عند حوالي 0.52 كيلو إلكترون فولت ($K\alpha$) (Goldstein وآخرون، 2018).

تتوافق هذه النتائج مع ما تم الحصول عليه، حيث أظهرت نتائج هذا الاختبار أن قمم الزنك والأوكسجين كانت في المواقع المثالية للعينة الأولى (شكل 33 أ) وللعينة الثانية (شكل 33 ب). وتشير النتائج أيضاً إلى غياب القمم المقابلة للعناصر الأخرى باستثناء عنصر الذهب (Au) الذي تمت إضافته كمقارنة وتأكيد لنتائج الاختبار

(Rao وآخرون، 2004). تبين هذه النتائج بوضوح أن مادة أكسيد الزنك (ZnO) النانوية موجودة في الخليط بنسبة عالية، إذ كانت نسبتها 60% في العينة الأولى و70% في العينة الثانية، مما يشير إلى قلة وجود الشوائب في خليط العينتين الأولى والثانية.



شكل (33): تحديد خصائص مادة أكسيد الزنك ZnO النانوية باستعمال اختبار الطاقة المشتتة للأشعة السينية الطيفي، (أ) نتائج تحليل العينة الأولى (ب) نتائج تحليل العينة الثانية.

تُعد الفطريات مرشحة ممتازة للإنتاج الكبير للجسيمات النانوية (NPs) بسبب بساطتها، وقابليتها العالية للتوسع، وسهولة المعالجة، وسهولة التعامل معها، وكفاءتها من حيث التكلفة في كل من النطاق المختبري والصناعي. كما ان الفطريات الخيطية معروفة بتحملها العالي للمعادن وخصائصها في التراكم الاحيائي. اذ تحتوي جدران الخلايا الفطرية على مجموعات وظيفية مختلفة مثل الأمين، الكربوكسيل، السلفهيدريل، الهيدروكسيل، والفوسفات، التي تعمل كليجانادات وتساعد في ربط أيونات المعادن. علاوة على ذلك، تُفرز الفطريات مجموعة واسعة من البروتينات والإنزيمات مثل ATPase ، 3-جلوكاناز ، هيميسليلوز ، جسرالدهيد-3-فوسفات ديهيدروجيناز ، وإنزيم تحلل جدار الخلية b-1 ، التي تلعب دورًا مهمًا في التخليق الكبير والمستدام للجسيمات المعدنية النانوية. الفطريات مثل *Penicillium chrysogenum* ، *Fusarium oxysporum* ، و *Verticillium sp.* المذكورة في التخليق الاحيائي للجسيمات المعدنية النانوية مثل البلايتين، الفضة، اوكسيد الزنك، السيليكون، والتيتانيوم (Vaishaly وآخرون، 2015؛ Dikshit وآخرون، 2021).

يوجد هناك عدد من التقارير أوضحت التخليق الحيوي للجسيمات النانوية باستخدام الفطريات أحادية الخلية ومتعددة الخلايا (Chauhan وآخرون، 2011). اذ تُستخدم المستخلصات الخارجية أو الداخلية للفطريات المختلفة مثل *Aspergillus niger* ، *Aspergillus clavatus* ، *Penicillium sp.* و *Trichoderma spp.* بشكل واسع في تخليق الجسيمات النانوية (Soni وآخرون، 2012؛ Du وآخرون، 2011؛ Verma وآخرون، 2011؛ Elegbede وآخرون، 2020).

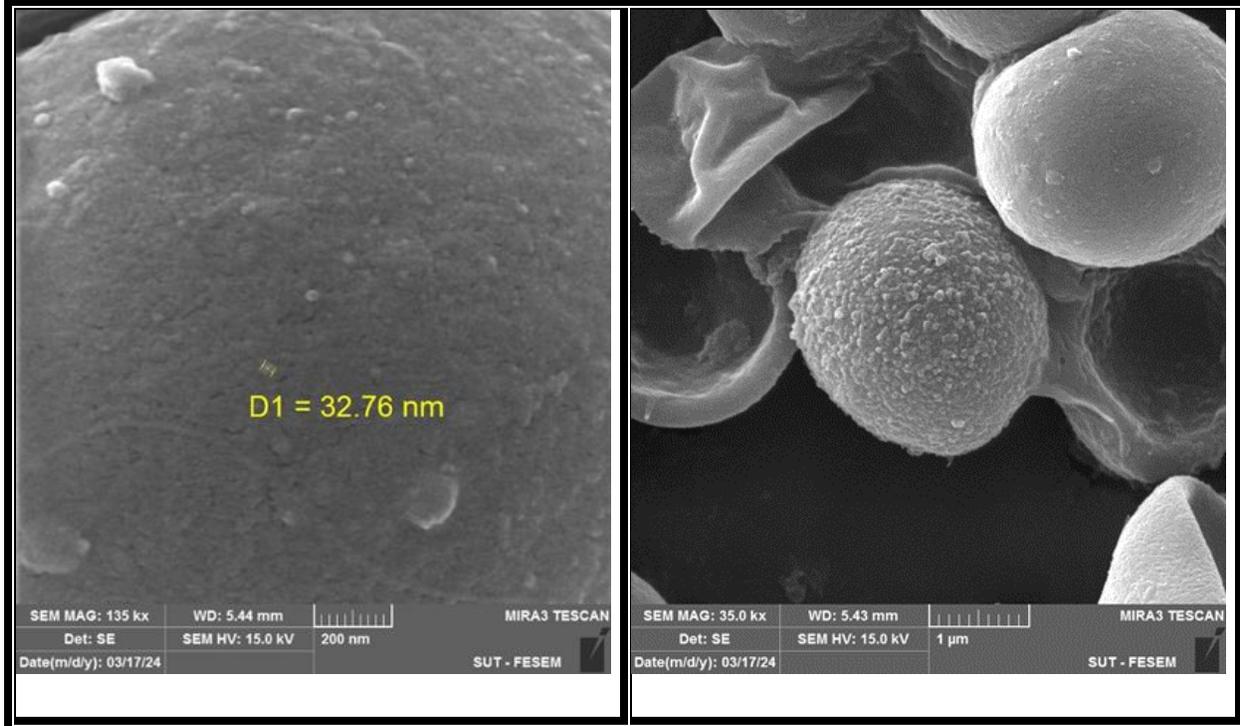
لقد اشار Ramírez-Valdespino و Oarrantia-Borunda (2021) الى ان اوكسيد الزنك النانوي هو من بين الجسيمات النانوية الرئيسية التي تم تصنيعها بواسطة انواع عديدة من الجنس *Trichoderma spp.* . فمثلا Shobha وآخرون (2020) استعمل نوعين من الفطر *Trichoderma* شملت *T. reesei* و *T. harzianum* في تصنيع مادة اوكسيد الزنك النانوية بشكل مفرد او سوية باحجام تراوحت بين 12-35 نانومتر واختبار فعاليتها ضد مسبب مرض اللفحة البكتيرية على الرز *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* اذ استنتجوا ان الجسيمات الزنك النانوية المُصنَّعة حيويًا الانواع المشتركة للفطر *Trichoderma spp.* صديقة للبيئة ويمكن استعمالها كبديل للمبيدات الكيميائية في الزراعة. كما قام Kumar وآخرون (2024) بتصنيع جسيمات الزنك النانوية التي كانت باحجام 20-30 نانومتر واختبار فعاليتها ضد المسبب المرضي للنبات *Phomopsis vexans* و *Colletotrichum capsici* وقد اشار الى ان نتائج هذه الدراسة تسلط الضوء على إمكانية استعمال جسيمات الزنك النانوية ZnONPs المصنعة بواسطة الفطر *Trichoderma* كنهج مستدام وفعال لإدارة الأمراض الفطرية النباتية. يضاف الى هذه الامثلة ما ذكره Ghareeb وجماعته (2024) من ان استخدام

الفطر *Trichoderma longibrachiatum* كوسيلة آمنة للمكافحة الحيوية لإنتاج جسيمات الزنك النانوية طريقة واعدة لإدارة الآفات والأمراض في المحاصيل الزراعية وذلك اعتماداً على الدراسة التي قام بها من إنتاج لهذه الجسيمات النانوية واختبار فعاليتها ضد الديدان الشعبانية والفطريات الكامنة في التربة.

رابعاً: تحميل الجسيمات النانوية لمادة اوكسيد الزنك على ابواغ العامل الاحيائي *T. koningiopsis*

أظهرت النتائج نجاح عملية تحميل الجسيمات النانوية لمادة اوكسيد الزنك (ZnO nanoparticles) على ابواغ العامل الاحيائي *T. koningiopsis* وذلك من خلال تغطية معظم الابواغ الفطرية بالجسيمات النانوية والتي كانت ايضا بحجم مختلفة اقل من 100 نانومتر (شكل 34 أ و ب).

يمكن أن يُعزى نجاح تحميل أبواغ الفطريات بالجسيمات النانوية إلى عدة أسباب رئيسية تتعلق بخصائص الأبواغ والجسيمات النانوية وكذلك الظروف المحيطة التي تشمل التفاعلات الكيميائية، إذ تحتوي أسطح الأبواغ على مجموعات وظيفية مثل الهيدروكسيل، والأمين، والكربوكسيل التي يمكن أن تتفاعل مع الجسيمات النانوية عبر الروابط الكيميائية (Sharma وآخرون، 2014). كما يوجد هناك تأثير للشحنة السطحية للأبواغ إذ يمكن لها أن تساعد في جذب الجسيمات النانوية المشحونة بشكل معاكس، مما يعزز التفاعل بينها. بالإضافة إلى أن الجسيمات النانوية الصغيرة يمكن أن تتفاعل بسهولة أكبر مع الأبواغ بسبب زيادة مساحة السطح النسبي (Mandal وآخرون، 2006). كما أن استعمال المواد الصديقة للبيئة والتي تشمل العوامل الاحيائية الفطرية في تحضير الجسيمات النانوية يعزز توافقها مع الأبواغ (Mukherjee وآخرون، 2008).



شكل (34): تحميل جسيمات اوكسيد الزنك النانوية على ابواغ العامل الاحيائي *T. koningiopsis*. (أ) ابواغ العامل الاحيائي *T. koningiopsis*، (ب) سطح احد الابواغ الذي يحمل جسيمات نانوية.

جدير بالاشارة الى ان كثافة تحميل الابواغ بالجسيمات النانوية كانت متباينة وقد يرجع سبب ذلك الى تباين حجم وشكل الجسيمات النانوية يلعب دور في ذلك اذ تختلف الأبواغ في قدرتها على تحميل الجسيمات بناءً على حجم وشكل هذه الجسيمات. الجسيمات الأصغر قد تكون أسهل في التحميل والارتباط بالأبواغ اذ اظهرت النتائج ان احجام الجسيمات النانوية كانت باحجام مختلفة (Sinha وآخرون، 2009). بالاضافة الى ان تركيز الجسيمات النانوية في المحلول يؤثر على كثافة التحميل. اذ ان تركيزات أعلى قد تزيد من احتمال تفاعل الجسيمات مع الأبواغ، ولكن قد تؤدي أيضًا إلى تكثف الجسيمات وتقليل كفاءة التحميل. ايضا قد تؤثر مدة تعرض الأبواغ للجسيمات النانوية على كثافة التحميل. اذ ان فترات التعرض الأطول قد تسمح بتفاعل أكبر بين الأبواغ والجسيمات، خصوصاً اننا اقتصرنا على فترة التحميل لمدة 24 ساعة فقط و لكن فترات طويلة جدًا قد تؤدي إلى تشبع السطح وتقليل الكفاءة. وتلعب البيئة المحيطة التي تشمل درجة الحموضة (pH)، القوة الأيونية، ودرجة الحرارة دوراً مهماً في التفاعلات بين الأبواغ والجسيمات النانوية. اذ ان الظروف المثلى تختلف بناءً على نوع الأبواغ والجسيمات (El-Sayed، 2001).

4-4: تقييم كفاءة برنامج مكافحة متكاملة في حماية نباتات الباميا من الإصابة بحشرة الذبابة البيضاء ومايرافقها من فايروسات

اظهرت النتائج ان البيت البلاستيكي الذي تم اختياره كان موبؤه بحشرات الذبابة البيضاء والفايروسات المرافقة وذلك من خلال حصول الاصابة الطبيعية الحشرية والفايروسية على صنف نبات الباميا اذ ظهرت اعداد كبيرة من حشرة الذبابة البيضاء النشطة ومنذ المراحل الأولى من النمو لمحصول الباميا مع عدم وجود حشرة المن. كما ظهرت الاعراض المرضية الفايروسية المميزة وبشكل متباين بين المعاملات بهئية اعراض تبرقش وفسيفساء واصفرار ما بين العروق وتشوه وتنخر في الأوراق وصغر حجمها وتثخن في عروقها وتجدها وتقرزم في النباتات المصابة. ان تنوع وتعدد الاعراض المرضية الفايروسية يؤكد وجود اكثر من فايروس في الحقل سبب اصابة فايروسية معقدة.

أظهرت نتائج التحليل الاحصائي عدم وجود فروقات معنوية بين المعاملات، وبالرغم من عدم وجود تأثير على نسبة الاصابة الفايروسية اذ كانت جميع النباتات في جيع المعاملات مصابة بالفايروسات وحشرة الذبابة البيضاء وبنسبة 100%، الا انه كان هنالك خفض لشدة الاصابة الفايروسية واعداد حشرة الذبابة البيضاء. فظهر الصنف Hort-5 افضلية عن الصنف عبير وكانت كفاءة المبيد كونان افضل من المبيد اكاتارا في حين كانت فعالية العامل الاحيائي لوحده مشابه للمستحضر الاحيائي النانوية. بالاضافة الى ذلك فقد تباينت كفاءة المعاملات التكاملية التي طبقت في الحقل في شدة الإصابة الفايروسية و التأثير على اعداد حشرة الذبابة البيضاء (جدول 8)، اذ كان افضل هذه المعاملات التكاملية هي تلك المعاملات التي شملت زراعة التركيب الوراثي Hort-5 و تطبيق المبيد كونان مع تطبيق العامل الاحيائي لوحده اوالمستحضر الاحيائي النانوي لوحده من خلال خفض شدة الاصابة الى 31.0% و33.3% على التوالي واعداد حشرة الذبابة البيضاء الى معدل 9.8 و 8.5 حشرة على التوالي تلتها معاملة زراعة التركيب الوراثي Hort-5 و تطبيق المبيد اكاتارا و تطبيق المستحضر الاحيائي النانوي بنسبة شدة اصابة 33.3% ومعدل اعداد الحشرة بلغ 9.4 مقارنة مع المعاملات التي زرعت فيها التركيب الوراثية فقط اذ كانت نسبة شدة الاصابة واعداد حشرة الذبابة البيضاء للتركيب الوراثي Hort-5 قد بلغت 50.7% و 12.1 حشرة على التوالي بينما بلغت في معاملة التركيب الوراثي عبير 73.3% و16.4 حشرة على التوالي.

جدير بالإشارة الى ان فعالية المعاملات التي تتضمن تطبيق المبيدات الكيميائية الحشرية و العامل الاحيائي او المستحضر الاحيائي النانوي المختبرة في هذه الدراسة لها تأثيراً واضحاً على شدة الاصابة الفايروسية واعداد حشرة الذبابة البيضاء وكان التداخل بينهما وبين التركيب الوراثي Hort-5 واضحاً من خلال تحقيق افضل النتائج في هذه الدراسة.

جدول (8): معدلات نسب الإصابة وشدة الإصابة الفايروسية ومعدل عدد حشرة الذبابة البيضاء على نباتات الباميا في التجربة الحقلية

ت	المعاملات	معدل نسبة الإصابة	معدل نسبة شدة الإصابة	معدل اعداد الحشرة
1	التركيب الوراثي Hort-5 + عدم تطبيق المبيدات + عدم تطبيق العامل والمستحضر الاحيائي	100	50.7	12.1
2	التركيب الوراثي Hort-5 + تطبيق المبيد كونان + عدم تطبيق العامل والمستحضر الاحيائي	100	44.0	9.9
3	التركيب الوراثي Hort-5 + تطبيق المبيد اكتارا + عدم تطبيق العامل والمستحضر الاحيائي	100	36.0	8.9
4	التركيب الوراثي Hort-5 + عدم تطبيق المبيدات + تطبيق العامل الاحيائي	100	46.0	8.5
5	التركيب الوراثي Hort-5 + تطبيق المبيد كونان + تطبيق العامل الاحيائي	100	31.0	9.8
6	التركيب الوراثي Hort-5 + تطبيق المبيد اكتارا + تطبيق العامل الاحيائي	100	38.0	5.8
7	التركيب الوراثي Hort-5 + عدم تطبيق المبيدات + تطبيق المستحضر الاحيائي	100	52.0	12.0
8	التركيب الوراثي Hort-5 + تطبيق المبيد كونان + تطبيق المستحضر الاحيائي	100	33.3	8.5
9	التركيب الوراثي Hort-5 + تطبيق المبيد اكتارا + تطبيق المستحضر الاحيائي	100	33.3	9.4
10	التركيب الوراثي عبير + عدم تطبيق المبيدات + عدم تطبيق العامل والمستحضر الاحيائي	100	73.3	16.4
11	التركيب الوراثي عبير + تطبيق المبيد كونان + عدم تطبيق العامل والمستحضر الاحيائي	100	46.7	11.9
12	التركيب الوراثي عبير + تطبيق المبيد اكتارا + عدم تطبيق العامل والمستحضر الاحيائي	100	40.7	13.2
13	التركيب الوراثي عبير + عدم تطبيق المبيدات + تطبيق العامل الاحيائي	100	73.0	7.7
14	التركيب الوراثي عبير + تطبيق المبيد كونان + تطبيق العامل الاحيائي	100	44.0	8.4
15	التركيب الوراثي عبير + تطبيق المبيد اكتارا + تطبيق العامل الاحيائي	100	50.0	8.4
16	التركيب الوراثي عبير + عدم تطبيق المبيدات + تطبيق المستحضر الاحيائي	100	60.0	9.8
17	التركيب الوراثي عبير + تطبيق المبيد كونان + تطبيق المستحضر الاحيائي	100	52.0	11.2
18	التركيب الوراثي عبير + تطبيق المبيد اكتارا + تطبيق المستحضر الاحيائي	100	60.0	10.4

تتسجم هذه النتيجة مع الطرح العام الخاص بإدارة ومقاومة الامراض الفايروسية النباتية في حالة عدم توفر الاصناف المنيعه او عالية المقاومة من خلال زراعة التراكيب الوراثية المحتملة للإصابة مع ضرورة تطبيق استراتيجيات مقاومة أخرى تتوافق معها من اجل الوصول إلى التكامل الفعال (مكوك وآخرون، 2008، Barba وآخرون، 2014). اذ يمكن أن يؤثر هذا الاسلوب التكاملي بشكل كبير على نقل وتكاثر فايروساتالنبات من خلال إنشاء نهج متعدد الجوانب لإدارة الأمراض. الا ان الأصناف المحتملة، التي تسمح بتراكم الفيروسات دون التسبب في ضرر كبير للعائل، يمكن أن تعزز من تضاعف الفيروس وتقلل من تأثير العدوى وتعزيز تحمل النبات للعدوى الفايروسية (Montes وآخرون، 2021). فمثلا وجد Maliogka وآخرون (2015) ان افضل وسائل مقاومة الامراض الفايروسية على محصول العنب هي عملية زراعة الأصناف المحتملة مع مكافحة او إدارة النواقل الحشرية. بالإضافة إلى ذلك، فإن الاكتشاف الدقيق وفي الوقت المناسب للفايروسات النباتية ضروري للتحكم الفعال، لأنه يسمح بإزالة النباتات المصابة وإدارة الناقلات الحشرية، وهي استراتيجيات أساسية في السيطرة على الأمراض الفايروسية (Grešíková، 2022).

كما يمكن أن تلعب العوامل الاحيائية من الكائنات الحية الدقيقة المفيدة، مثل بعض انواع بكتيريا الجذور المعززة لنمو النبات والبكتيريا الداخلية والفطريات، دورًا كبيرًا في قمع الاصابة الفايروسية من خلال تحفيز آليات المقاومة النظامية المستحثة وتراكم الإنزيمات الدفاعية (Manjunatha وآخرون، 2022). خير مثال على العوامل الاحيائية الفطرية هي الانواع المتعددة التابعة للجنس *Trichoderma* التي تلعب دورًا متعدد الأوجه في مكافحة مسببات الأمراض النباتية، بما في ذلك الفايروسات، من خلال استعمالها آليات مختلفة. ولكن على الرغم من أن انواع الجنس *Trichoderma* معروفه في المقام الأول بفعاليتها ضد مسببات الأمراض الفطرية والبكتيرية، الا ان لها دور مهم غير مباشر في إدارة الأمراض الفايروسية. اذ تنتج أنواع *Trichoderma* مجموعة من المستقلبات الثانوية، مثل البيبتايبولات والجيليوكسين والتريكوكونينات، التي لها خصائص مضادة كما تشمل هذه المستقلبات الثانوية أيضًا مركبات يمكنها تنشيط آليات الدفاع النباتية، مما يعزز قدرة النبات على مقاومة العدوى الفايروسية كما تحفز *Trichoderma spp.* المقاومة الجهازية في النباتات عن طريق إنتاج محفزات مثل كيتين قليل السكريد و-βجلوكان، التي تنشط استجابات الدفاع النباتية، بما في ذلك تلك ضد الفيروسات (Oyesola وآخرون، 2024). يتضمن هذا التحفيز للمقاومة الجهازية تفعيل عدة مسارات دفاعية نباتية، مثل حمض الجاسمونيك (JA)، وحمض الساليسيليك (SA)، وحمض الأبسيسيك (ABA)، والإيثيلين (ET)، وهي ضرورية لمكافحة الضغوط البيولوجية والغير البيولوجية، بما في ذلك الهجمات الفايروسية (Mahapatra وآخرون، 2024). بالإضافة إلى ذلك، تعزز *Trichoderma spp.* نمو النبات وامتصاص المغذيات، مما يمكن أن يحسن الصحة العامة والقدرة على التحمل لدى النباتات، مما يجعلها أقل عرضة للعدوى

الفايروسية (Yao وآخرون، 2023). كما تساهم آليات مكافحة الاحيائية لـ *Trichoderma*، مثل المنافسة والمضادات الحيوية والتطفل الفطري، أيضًا في إنشاء بيئة جذرية صحية، مما يقلل من فرص انتقال الفايروسات من خلال النواقل المنقولة عن طريق التربة (Kumar وآخرون، 2023). علاوة على ذلك، فإن قدرة انواع *Trichoderma* على تشكيل علاقات تكافلية مع جذور النباتات وتحسين جودة التربة من خلال المعالجة الاحيائية يمكن أن تخلق بيئة أقل ملاءمة لتكاثر الفيروسات (Yao وآخرون، 2023). يمكن أن يعزز استخدام الترايب الاحيائية القائمة على انواع الفطر *Trichoderma*، والتي تدمج الميكروبات المفيدة مثل البكتيريا المحفزة لنمو النبات (PGPB)، الجهاز المناعي للنبات وتوفر بديلاً مستدامًا للمبيدات الحشرية والأسمدة الكيميائية (Salwan و Sharma، 2023). وقد سلطت الدراسات الحديثة الضوء أيضًا على أهمية تحديد واستخدام سلالات *Trichoderma* المحددة التي تكون فعالة بشكل خاص في تحفيز الاستجابات المناعية للنباتات ومكافحة الأمراض الفايروسية (Manzar وآخرون، 2022). بشكل عام، وعلى الرغم من أن *Trichoderma* قد لا يستهدف الفايروسات النباتية بشكل مباشر، فإن دوره في تعزيز مناعة النبات، وتعزيز النمو، وخلق بيئة تربة صحية يساهم بشكل غير مباشر في السيطرة على الأمراض الفايروسية في النباتات (Japanis وآخرون، 2022).

علاوة على ذلك، تقدم خصوصية تفاعلات الفيروس-الناقل أهدافًا إضافية لاستراتيجيات المقاومة، والتي يمكن أن تعطل دورة المرض وتقلل من انتشار الفايروس (Whitfield وآخرون، 2015). إلا أن مكافحة الحشرات الناقلة ومنعها من نقل الإصابة الفايروسية تُعد مشكلة صعبة، كما ان بقاء عدداً قليلاً منها كفيلاً باحداث ونشر الإصابة الفايروسية في الحقل والمعروف ان الحشرات هي الناقل الرئيسي للعديد من الفايروسات تحت ظروف الحقل والبيوت البلاستيكية. وبالتالي فإن غالبية المزارعين يعتمدون على مكافحة الحشرات الناقلة باستخدام المبيدات الكيميائية. الا أن هناك عدة مخاطر للاستمرار باستعمال هذه الوسيلة إذ قد يؤدي الاستعمال المتكرر لنفس المبيد الى تحفيز وتطوير ظهور سلالات من الناقل مقاومة لفعل هذه المبيدات، و تؤدي إلى قتل الأعداء الطبيعية للحشرات الناقلة من طفيليات ومفترسات لذلك وجب استعمال المبيدات المتخصصة وتطبيق اكثر من مبيد حشري فعال وبشكل متناوب مع بعضها البعض او مع وسائل مقاومة اخرى مثل استعمال المواد النانوية التي اثبتت كفاءتها في العديد من الدراسات كبديل للمبيدات الكيميائية وذلك من اجل التقليل من احتمالية تطوير المقاومة لتاثير المبيدات الكيميائية من قبل الحشرة الناقلة (Matthews، 2002، Van den Berg وآخرون، 2021).

تُظهر الجسيمات النانوية (NPs) مجموعة متنوعة من الآليات لتثبيط تكاثر وانتقال فايروسات النباتات، مستغلة خصائصها الفيزيائية والكيميائية الفريدة. تتضمن إحدى الآليات الأساسية التفاعل المباشر للجسيمات

النانوية مع الجسيمات الفيروسيّة، مما قد يؤدي إلى تعطيل الفيروس. على سبيل المثال، ثبت أن الجسيمات النانوية الفضية (AgNPs) ترتبط بالجسيمات الفيروسيّة، مما يثبط تكاثرها وتراكمها داخل الأنسجة النباتية، وبالتالي تظهر نشاطًا علاجيًا مضادًا للفيروسات مثل فيروس موزايك الفاصولياء الأصفر (BYMV) (El Gamal وآخرون، 2022) وبالمثل، أظهرت الجسيمات النانوية الكيتوسانية (ChiNPs) القدرة على إنتاج جزيئات فيروسية معيبة وغير مكتملة، مما يقلل بشكل كبير من الإصابة الفيروسيّة وتراكمها في النباتات (El Gamal وآخرون، 2022).

هنالك إليه أخرى تتمثل في تحفيز استجابات دفاع النبات. على سبيل المثال، وُجد أن المواد النانوية القائمة على الكربون مثل الفوليرين C60 تزيد من تنظيم الهرمونات النباتية الدفاعية مثل حمض الأبسيسيك وحمض الساليسيليك، مما يعزز استجابة الجهاز المناعي للنبات ويثبط تكاثر الفيروس (Al-Zaban وآخرون، 2022). بالإضافة إلى ذلك، يمكن للجسيمات النانوية أن تتداخل مع تفاعلات الفيروس والناقل، مما يقلل من كفاءة اكتساب الفيروس وانتقاله بواسطة النواقل الحشرية فمثلا أظهرت الجسيمات النانوية الفضية (AgNPs) كفاءة في تقليل اكتساب وانتقال فيروس BYMV بواسطة المن، مما يحد من انتشار الفيروس (El Gamal وآخرون، 2022).

علاوة على ذلك، يمكن للجسيمات النانوية أن تنشط آليات الدفاع النباتية بشكل غير مباشر عن طريق تعزيز التعبير عن الجينات المرتبطة بالمرض (PR) والإنزيمات الدفاعية. على سبيل المثال، وجد أن الجسيمات النانوية الكيتوسانية (ChiNPs) تزيد بشكل كبير من تنظيم جين PR-1 وتزيد من إنتاج المركبات الفينولية ذات الصلة بالدفاع، مما يعزز مقاومة النبات للإصابة الفيروسيّة (El Gamal وآخرون، 2022). يمتد استخدام التكنولوجيا النانوية أيضًا إلى تطوير مبيدات النانو، التي يمكن أن تستهدف وتعطل السلامة الهيكلية للجسيمات الفيروسيّة، مما يؤدي إلى تعطيلها ويتم تحقيق ذلك من خلال آليات مثل تفاعل الجسيمات النانوية مع الحمض النووي الفيروسي، مما يؤدي إلى تثبيط تكاثر الحمض النووي وفي النهاية إلى موت الخلايا (Ghosh وBera، 2021).

يضاف إلى ذلك، يشمل تطبيق التكنولوجيا النانوية في الزراعة، والمعروف باسم "النانوفايروسات النباتية"، استخدام الجسيمات النانوية لتوصيل الحمض النووي الريبي مزدوج الشريط (dsRNA) لتفعيل مسارات تداخل الحمض النووي الريبي (RNAi) في النباتات، مما يوفر طريقة جديدة لإدارة الأمراض الفيروسيّة (Carvalho وآخرون، 2022). يوجد هنالك عدد من الدراسات التي تم فيها استكشاف الإمكانيات المضادة التي تمتلكها مختلف الجسيمات النانوية المعدنية وأكاسيد المعادن ضد الفيروسات النباتية، فمثلا أكسيد الزنك (ZnO) وأكسيد الحديد النانوية، أظهرت القدرة على تثبيط تكاثر الفيروس من خلال آليات مثل توليد أنواع

الأكسجين التفاعلية (ROS) وتعطيل بروتينات غلاف الفايروس (Singh وآخرون، 2022؛ Bhatti و Delong، 2023)

بشكل عام، تبرز التفاعلات المتعددة الأوجه للجسيمات النانوية مع فايروسات النباتات وناقلاتها والنباتات المضيفة الإمكانيات الواعدة للتكنولوجيا النانوية في تطوير استراتيجيات فعالة مضادة للفيروسات لحماية المحاصيل بشكل مستدام (Pattanayak وآخرون، 2023؛ El-Ganainy وآخرون، 2023). لذلك، فإن دمج الأصناف المتحملة مع طرق الاكتشاف الدقيقة والعوامل الاحيائية المفيدة وتطبيق التقنيات النانوية يمكن أن يخلق نهجًا قويًا ومستدامًا لإدارة الأمراض الفايروسية النباتية، مما يقلل من معدلات النقل والتكاثر مع الحفاظ على إنتاجية وصحة المحاصيل (Montes وآخرون، 2021؛ Grešíková، 2022).

5: الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendations

1-5: الاستنتاجات

Conclusions

1. نجاح تقنية الـ NGS بطريقة Metatranscriptomics في تشخيص وبعملية تشخيص واحدة لجميع الإصابات الفايروسية المعقدة على محصول الباميا مما يعطيها الأفضلية على طرق التشخيص الجزيئي الأخرى.
2. التشخيص وتحديد الجينوم الكامل للفايروس (CLCUGV) وتوابعه الثلاث Cotton leaf curl و Okra leaf curl و Gezira alphasatellite و Gezira betasatellite الذي يسجل لأول مرة في العراق على محصول الباميا.
3. التشخيص وتحديد الجينوم الكامل ولأول مرة في العراق للفايروس (CBTV) على محصول الباميا.
4. التشخيص الأول في العراق للفايروس الفطري (ENaV) على محصول الباميا.
5. نجاح عملية تصنيع مستحضر احيائي نانوي باستعمال العامل احيائي *T. koningiopsis* وجسيمات أكسيد الزنك ZnO النانوية ولأول مرة في العراق.
6. تحقيق اسلوب المكافحة المتكاملة الافضلية في خفض اعداد حشرة الذبابة البيضاء ونسبة شدة الاصابة بالفايروسات المرافقة وكانت الثلاث معاملات التكاملية الافضل هي تلك التي تشمل زراعة التركيب الوراثي Hort-5 وتطبيق المبيد كونان مع العامل احيائي لوحده اوالمستحضر احيائي النانوي لوحده تلتهما معاملة زراعة التركيب الوراثي Hort-5 و تطبيق المبيد اكرارا و تطبيق المستحضر احيائي النانوي.

2-5: التوصيات

Recommendations

1. تطبيق تقنية الـ NGS بطريقة Metatranscriptomics في تشخيص الفايروسات النباتية على محاصيل اخرى نظراً لقدرتها على تشخيص جميع الإصابات الفايروسية المعقدة على محصول الباميا بعملية تشخيص واحدة.
2. المتابعة والرصد الدقيق للفايروسات المشخصة في هذه الدراسة لتقييم تأثيرها على محصول الباميا والمحاصيل الأخرى التي تنتمي الى العائلة الخبازية لغرض تطوير استراتيجيات مكافحة فعالة ضدها.

3. بعد نجاح تصنيع المستحضر الأحيائي النانوي في هذه الدراسة والذي يشير إلى الإمكانية الواعدة لاستعماله في مكافحة الفايروسات، ويوصى بتوسيع الأبحاث لاختبار فعاليته ضد الفايروسات الأخرى وعلى محاصيل أخرى مع تقييم استعمال عوامل أحيائية أخرى سواء كانت فطرية أو بكتيرية في تصنيع المستحضرات الأحيائية النانوية.

4. نظرًا لنجاح أساليب مكافحة المتكاملة في خفض أعداد حشرة الذبابة البيضاء ونسبة شدة الإصابة بالفايروسات، يُنصح بتبني هذه الأساليب كخيار رئيسي في إدارة المحاصيل. يُفضل استعمال التركيب الوراثي Hort-5 وتطبيق المبيد كونان مع العامل الحيوي أو المستحضر الأحيائي النانوي.

5. تقييم مقاومة أو تحمل أصناف أو تراكيب وراثية أخرى باستعمال تقنية NGS وإمكانية تكاملها مع المبيدات الحشرية و/أو المستحضرات الأحيائية النانوية في مقاومة الإصابة الفايروسية المعقدة على محصول الباميا والمحاصيل الأخرى.

6. التشخيص الأول للفايروسات باستعمال التقنيات الجزيئية الحديثة وتصنيع واستعمال المستحضرات الأحيائية النانوية يشير إلى أهمية تعزيز القدرات البحثية المحلية ودعم مشاريع البحث والتطوير في مجالات التكنولوجيا الأحيائية والزراعة المستدامة.

References

6- المصادر

1-6 المصادر العربية

- ابو عرقوب، محمود موسى (2002). المضادات الحيوية والمقاومات الثلاثة (مكتسبة - مستحثة - حيوية) ودورها في أمراض النبات. المكتبة الاكاديمية للطباعة والنشر. جمهورية مصر العربية.
- التيمي ، زينب لطيف حميد (2019). دراسة تشخيصية جزيئية للفطريات المسببة لمرض موت البادرات Damping –off disease على نبات الطماطة ومكافحتها باستخدام التكامل بعض العوامل الاحيائية والمركبات النانوية. رسالة ماجستير .كلية التربية للعلوم الصرفة- جامعة كربلاء.
- جابر، محمد حسن (2020). عزل وتشخيص الفطريات المسببة لمرض تعفن البذور وموت بادرات الحنطة *Triticum aestivum* في محافظة كربلاء ومكافحتها باستخدام التكامل بين بعض الأصناف والمركبات النانوية والعامل الاحيائي *Trichoderma harzianum*. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة كربلاء.
- حمدي، رجا فاضل وساجد صالح الدين سليم (2015). استخدام منتجات اليبس الثانوي للفطرين *Trichoderma* و *Aspergillus* في تحفيز مقاومة نباتات الطماطة *Lycopersicon esculantum* ضد الاصابة بفايروس موزائيك الطماطة *Tomato mosaic virus*.
- 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.
- دخيل، فيد عباس (2021). العزل والتشخيص الجزيئي للمسببات الممرضة لبعض نباتات الزينة في مشاتل محافظة كربلاء ومكافحتها باستعمال بعض الطرق الاحيائية والكيميائية. 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 .
- عباس، محمود عثمان (2022). التشخيص الجزيئي لأنواع الجنس *Begomovirus* المنتشرة على عدد من العوائل النباتية في محافظة كربلاء. أطروحة ماجستير، جامعة كربلاء، العراق.

- عبد الله، رافد أحمد (2014). مدخل الى عالم النانو. إصدارات إي-كتب. لندن. المملكة المتحدة.
- القاسم، صبحي (1998). الذبابة البيضاء وبائيتها وأخطارها وطرق مكافحتها في البلدان العربية. نشرة زراعية . إعداد الوحدة العلمية لشركة المواد الزراعية ، الطبعة الثالثة. العراق.
- الكرطاني، محمد سعدون محمد (2023). أستعمال تقنية الجيل التالي لتحديد التسلسل في التشخيص والتوصيف الجزيئي للفايروسات والفايروسات الممرضة لمحصول الكوسا ومقاومتها بأسلوب المكافحة المتكاملة. 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 .
- الياسري، حوراء إسماعيل عباس (2023). التشخيص والتوصيف الكامل لبعض الفايروسات الممرضة والداخلية لنبات الخيار ومقاومتها باستعمال بعض العوامل الاحيائية وغير الاحيائية. أطروحة دكتوراه/ جامعة الكوفة/ العراق .

6-2 المصادر الأجنبية

- Abdel-Azeem, A., Nada, A. A., O'Donovan, A., Thakur, V. K., and Elkelish, A. (2020). Mycogenic silver nanoparticles from endophytic *Trichoderma atroviride* with antimicrobial activity. *Journal of Renewable Materials*, 8(2), 171-185.
- Abuzeid, H., Christian, M., Julien., Likun, Zhu., Ahmed, M., Hashem. (2023). Green Synthesis of Nanoparticles and Their Energy Storage, Environmental, and Biomedical Applications. *Crystals*, Berlin, Germany.
- Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology* (5th ed.). Academic Press Books, Elsevier, The Netherland.
- Akhtar, S., Khan, A. J., Singh, A. S., & Briddon, R. W. (2014). Identification of a disease complex involving a novel monopartite begomovirus with beta and alphasatellites with okra leaf curl disease in Oman. *Archives of Virology*, 159, 1199–1205.

- Andolfo, G.; Dohm, J.C.; Himmelbauer, H. (2021). Prediction of NB-LRR resistance genes based on full-length sequence homology. *Plant Journal of Cell Molecular Biology*, 110, 1592–1602.
- Al-ani, R. A., Adhab, M. A., Hamad, S. A. H., & Diwan, S. N. H. (2011). Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), identification, virus vector relationship, strains characterization, and a suggestion for its control with plant extracts in Iraq. *African Journal of Agricultural Research* 6(22), 5149–5155.
- Alegbejo, M. , Ogunlana, M. and Banwo, O. .(2008). Short communication. Survey for incidence of Okra mosaic virus in northern Nigeria and evidence for its transmission by beetles. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6(3), 408-411
- Alghuthaymi, M. A., Abd-Elsalam, K. A., AboDalam, H. M., Ahmed, F. K., Ravichandran, M., Kalia, A., & Rai, M. (2022). Trichoderma: An eco-friendly source of nanomaterials for sustainable agroecosystems. *Journal of Fungi*, 8, 367–379.
- Al-Zaban, M. I., Alhag, S. K., Dabloul, A. S., Ahmed, A. E., Alghamdi, S., Ali, B., Al-Saeed, F. A., Saleem, M. H., & Poczai, P. (2022). Manufactured nano-objects confer viral protection against Cucurbit chlorotic yellows virus (CCYV) infecting *Nicotiana benthamiana*. *Microorganisms*, 10(9), 1837.
- Amin, B., Mahleghah, G., Mahmood, H. M. R., & Hossein, M. (2009). Evaluation of interaction effect of drought stress with ascorbate and salicylic acid on some physiological and biochemical parameters in okra (*Hibiscus esculentus* L.). *Research Journal of Biological Sciences*, 4, 380-387.
- 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/>.

- Anikina, I., Kamarova, A., Issayeva, K., Issakhanova, S., Mustafayeva, N., Insebayeva, M., Mukhamedzhanova, A., Khan, S. M., Ahmad, Z., Lho, L. H., Han, H., & Raposo, A. (2023). Plant protection from virus: A review of different approaches. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1163270.
- Anitha, K. R., & Nandihalli, B. S. (2008). Seasonal incidence of sucking pests in okra ecosystem. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, 21, 137-138.
- Appiah, A. S., Amiteye, S., Boateng, F., & Amoatey, H. M. (2020). Evaluation of okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) cultivars for resistance to okra mosaic virus and okra yellow vein mosaic virus. *Australasian Plant Pathology*, 49(5), 541–550.
- Athanasopoulou, K., Boti, M.A., Adamopoulos, P.G., Skourou, P.C., and Scorilas, A. (2022). Third-Generation Sequencing: The Spearhead towards the Radical Transformation of Modern Genomics. *Life* 2022, 12, 30.
- Awasthi, L.P. (2020). *Applied plant virology advances, detection, and antiviral strategies*. Academic Press is an imprint of Elsevier, UK.
- Bahrulolum, H., Nooraei, S., Javanshir, N., et al. (2021). Green synthesis of metal nanoparticles using microorganisms and their application in the agrifood sector. *Journal of Nanobiotechnology*, 19, 86.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell 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.
- Bawa, S. H., & Badrie, N. (2016). Nutrient profile, bioactive components, and functional properties of okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench). In R. R. Watson & V. R. Preedy (eds.), *Fruits, Vegetables, and Herbs* (pp. 365-409). Academic Press, UK.
- Bhatti, A., & DeLong, R. K. (2023). Nanoscale interaction mechanisms of antiviral activity. *ACS Pharmacology & Translational Science*, 6(2), 220–228.
- Biswal, S. K., Nayak, A. K., Parida, U. K. and Nayak, P. L. (2012) Applications of nanotechnology in agriculture and food sciences. *International Journal of Science Innovations and Discoveries* 2:21–36.
- Boiteux, L.S., Fonseca, M.E.N., Vieira, J.V., Pereira-Carvalho, R.C. (2012). Breeding for resistance to viral diseases. In: Fritsche–Neto, R., Borém, A. (Org.). *Plant Breeding for Biotic Stress Resistance*. 1ed. Berlin: Springer -Verlag, v.1. p. 57-79.
- Bolger, A. M., Lohse, M. and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30 (15), 2114-2120.
- Brown, J. K. (1992). Virus diseases. In R. J. Hillocks (Ed.), *Cotton diseases* (pp. 275–329). Wallingford, UK: CAB International.
- Brown, J. K. (1994). Current status of *Bemisia tabaci* as a plant pest and virus vector in agroecosystems worldwide. *FAO Plant Protection Bulletin*, 42(1/2), 3–32.
- Brown, J. K., Zerbini, F. M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Ramos Sobrinho, R., Silva, J. C. F., Fiallo-Olivé, E., Briddon, R. W., Hernández-Zepeda, C., Ali Idris, Malathi, V. G., Martin, D. P., Rivera-Bustamante, R., Ueda, S., & Varsani,

- A. (2015). Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Archives of Virology*, 160(6), 1593–1619.
- Brzozowski, L. J.; Gardner, J.; Hoffmann, M. P., Kessler, A.; Agrawal, A. A., & Mazourek, M. (2020). Attack and aggregation of a major squash pest: Parsing the role of plant chemistry and beetle pheromones across spatial scales. *Journal of Applied Ecology*, 57: 1442–1451.
 - 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.
 - Carvalho, R., Jones, J. B., & Paret, M. L. (2022). Utility of nanoparticles in management of plant viruses. In G. M. Balestra & E. Fortunati (Eds.), *Nanotechnology-based sustainable alternatives for the management of plant diseases*. Elsevier, The Netherlands.
 - Chandi, R.S. (2021). Integrated Management of Insect Vectors of Plant Pathogens. *Agricultural Reviews*. 10.18805/ag.R-1982.
 - Chauhan, A., Zubair, S., Tufail, S., Sherwani, A., Sajid, M., Raman, S. C., Azam, A., & Owais, M. (2011). Fungus-mediated biological synthesis of gold nanoparticles: Potential in detection of liver cancer. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 2305–2319.
 - Chaurasia, R., Agrawal, O., Rupesh, Bansal, S., & Mukherjee, M. (2023). Green nanostructures. In M. Sen & M. Mukherjee (Eds.), *Bioinspired and green synthesis of nanostructures: A sustainable approach*. Wiley, USA.
 - Cohen, S., Duffus, J. E., Larsen, R. C., Liu, H. Y., & Flock, R. A. (1983). Purification, serology, and vector relationships of squash leaf curl virus, a whitefly-transmitted geminivirus. *Phytopathology*, 73(12), 1669–1673.

- Coles, D. and Frewer, L.J. (2013). Nanotechnology applied to European food production: a review of ethical and regulatory issues. *Trends in Food Science and Technology* 34:32–43.
- Czotter, N., Molnar, J., Szabó, E., Demian, E., Kontra, L., Baksa, I., Szittyá, G., Kocsis, L., Deak, T., Bisztray, G., Tusnady, G. E., Burgyan, J., & Varallyay, E. (2018). NGS of virus-derived small RNAs as a diagnostic method used to determine viromes of Hungarian vineyards. *Frontiers in Microbiology*, 9, 122.
- Das, R., and Thakur, D. (2022). Recent Developments in Nanotechnological Interventions for Pesticide Remediation. In: Krishnan, A., Ravindran, B., Balasubramanian, B., Swart, H.C., Panchu, S.J., Prasad, R. (eds) *Emerging Nanomaterials for Advanced Technologies. Nanotechnology in the Life Sciences*. Springer, Cham, Switzerland.
- Deeplata, S., & Rao, D. V. (2013). Study of metabolites of okra (*Abelmoschus esculentus*) after infection of pest. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 21(2), 347-350.
- Deguine, J.P., Aubertot, J.N., Flor, R.J. et al. (2021). Integrated pest management: good intentions, hard realities. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 41 (38):1-35.
- Dhankhar, S.K., Dhankhar, B.S., and Yadava, R. K. (2005). Inheritance of resistance to yellow vein mosaic virus in an interspecific cross of okra (*Abelmoschus esculentus*). *Indian Journal of Agricultural Sciences* 75,87–99.
- Dikshit, P. K., Kumar, J., Das, A. K., Sadhu, S., Sharma, S., Singh, S., Gupta, P. K., & Kim, B. S. (2021). Green synthesis of metallic nanoparticles: Applications and limitations. *Catalysts*, 11(902).

- Du, L., Xian, L., & Feng, J. X. (2011). Rapid extra-/intracellular biosynthesis of gold nanoparticles by the fungus *Penicillium* sp. *Journal of Nanoparticle Research*, 13, 921–930.
- El Gamal, A. Y., Atia, M. M., El Sayed, T., Abou-Zaid, M. I., & Tohamy, M. R. (2022). Antiviral activity of chitosan nanoparticles for controlling plant-infecting viruses. *South African Journal of Science*, 118(1/2).
- El Gamal, A. Y., Tohamy, M. R., Abou-Zaid, M. I., Atia, M. M., El Sayed, T., & Farroh, K. Y. (2022). Silver nanoparticles as a viricidal agent to inhibit plant-infecting viruses and disrupt their acquisition and transmission by their aphid vector. *Archives of Virology*, 167(1), 85–97.
- Elegbede, J. A., Lateef, A., Azeez, M. A., Asafa, T. B., Yekeen, T. A., Oladipo, I. C., et al. (2020). Biofabrication of gold nanoparticles using xylanases through valorization of corncob by *Aspergillus niger* and *Trichoderma longibrachiatum*: Antimicrobial, antioxidant, anticoagulant and thrombolytic activities. *Waste and Biomass Valorization*, 11, 781–791.
- El-Ganainy, S. M., Soliman, A. M., Ismail, A. M., Sattar, M. N., Farroh, K. Y., & Shafie, R. M. (2023). Antiviral activity of chitosan nanoparticles and chitosan silver nanocomposites against Alfalfa mosaic virus. *Polymers*, 15, 2961.
- Ellis, M. H., Silva, T. F., Stiller, W. N., Wilson, L. J., Vaslin, M. F. S., Sharman, M., & Llewellyn, D. J. (2013). Identification of a new Polerovirus (family Luteoviridae) associated with cotton bunchy top disease in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 42(3), 261–269.
- El-Sayed, M. A. (2001). Some Interesting Properties of Metals Confined in Time and Nanometer Space of Different Shapes. *Accounts of Chemical Research*, 34(4), 257-264.

- Emmanuel, C. J., Manohara, S., & Shaw, M. W. (2020). Molecular characterization of begomovirus-betasatellite-alphasatellite complex associated with okra enation leaf curl disease in Northern Sri Lanka. *3 Biotech*, 10(12), 506.
- Falkenberg, T., Ekesi, S., & Borgemeister, C. (2022). Integrated Pest Management (IPM) and One Health - a call for action to integrate. *Current opinion in insect science*, 53,
- FAOSTAT (2022). FAOSTAT (Food and Agriculture Organisation of the United Nations statistics). Retrieved July 8, 2024, from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- Fereres, A. and Moreno, A. (2009). Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteron insects. *Virus Research*, 141(2): 158-168.
- 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.
- Gambley, C., Cremer, J., Campbell, P., Roach, R., & Abdel-Salam, A. M. (2020). New host records for Cotton leaf curl Gezira virus: Capsicum and melon in Egypt. *Australasian Plant Disease Notes*, 15(3), 33.
- Ganesh, K. V., Mathew, D., Augustine, R. K. B. S., Alex, S., M R, S., & Cherian K, A. (2022). Development of transgenic okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) lines having RNA mediated resistance to Yellow vein mosaic virus (Geminiviridae). *Journal of Virological Methods*, 301, 114457.
- Gemedé, H. F., Haki, G. D., Beyene, F., Woldegiorgis, A. Z., & Rakshit, S. K. (2015). Proximate, mineral, and antinutrient compositions of indigenous Okra (*Abelmoschus esculentus*) pod accessions: Implications for mineral bioavailability. *Food Science & Nutrition*, 4(2), 223–233.

- Ghareeb, Y. R., Belal, E. B., El-Khateeb, N. M. M., et al. (2024). Utilizing bio-synthesis of nanomaterials as biological agents for controlling soil-borne diseases in pepper plants: Root-knot nematodes and root rot fungus. *BMC Plant Biology*, 24, 110.
- Ghosh, S. K., & Bera, T. (2021). Unraveling the mechanism of nanoparticles for controlling plant pathogens and pests. In S. Jogaiah, H. B. Singh, L. F. Fraceto, & R. de Lima (Eds.), *Advances in nano-fertilizers and nano-pesticides in agriculture* (Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition). Woodhead Publishing, UK.
- Goldstein, J. I., Newbury, D. E., Michael, J. R., Ritchie, N. W. M., Scott, J. H. J., & Joy, D. C. (2018). *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*. Springer, Cham, Switzerland.
- Grešíková, S. (2022). The transmission of plant viruses. *Agriculture*, 68(3), 119–126.
- Grue`re, G., Narrod, C. and Abbott, L. (2011). Agriculture, food, and water nanotechnologies for the poor: opportunities and constraints. Policy Brief 19, vol 19. International Food Policy Research Institute, Washington, USA.
- Hadidi, A. (2019). Next-generation sequencing and CRISPR/Cas13 editing in viroid research and molecular diagnostics. *Viruses*, 11(2), 120.
- Hančinský, R., Mihálik, D., Mrkvová, M., Candresse, T., & Glasa, M. (2020). Plant Viruses Infecting Solanaceae Family Members in the Cultivated and Wild Environments: A Review. *Plants* (Basel, Switzerland), 9(5), 667.
- 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.

- Harman, G. E. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96, 190–194.
- Harman, G. E., Herrera-Estrella, A. H., Horwitz, B. A., & Lorito, M. (2012). *Trichoderma* – from basic biology to biotechnology. *Microbiology*, 158, 1–2.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 43–56.
- Heather, J. M., and Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1-8.
- Hull, R. (2014). *Plant Virology* (5th ed.). Academic Press, USA.
- Hulo, C., de Castro, E., Masson, P., Bougueleret, L., Bairoch, A., Xenarios, I., & Le Mercier, P. (2011). ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. *Nucleic Acids Research*, 39(Database issue), D576-D582.
- ICTV. (2022). *Virus taxonomy: The classification and nomenclature of viruses*. The online report of the ICTV. Retrieved from https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report
- Idris, A. M. (1990). Cotton leaf curl virus disease in the Sudan. In *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent* (pp. 263–267).
- Idris, A. M., & Brown, J. K. (2002). Molecular analysis of Cotton leaf curl virus-Sudan reveals an evolutionary history of recombination. *Virus Genes*, 24(3), 249–256.
- Idris, A., Al-Saleh, M., Amer, M., Abdalla, O., & Brown, J. (2014). Introduction of Cotton leaf curl Gezira virus into the United Arab Emirates. *Plant Disease*, 98(11), 1593.
- Iwu, M. M. (2016). *Food as medicine: Functional food plants of Africa* (1st ed.). CRC Press.

- Jamir, I., Mandal, A. K., Devi, A. P., Bhattacharjee, T., Maurya, P. K., Dutta, S., Chattopadhyay, A., Pramanik, K., & Banik, S. (2020). Screening of genotypes against viral diseases and assessment of yield loss due to yellow vein mosaic virus in okra grown in the eastern part of India. *Indian Phytopathology*, 73, 125-133.
- Japanis, F. G., Vetaryan, S., Raja, N. K. K., Mokhtar, M. A. A., & Mohd Fishal, E. M. (2022). The impact of *Trichoderma* spp. on agriculture and their identification. *Malaysian Applied Biology*, 51(6), 1–15.
- Jo, Y., Bae, J.-Y., Kim, S.-M., Choi, H., Lee, B. C., & Cho, W. K. (2018). Barley RNA viromes in six different geographical regions in Korea. *Scientific Reports*, 8, 13237.
- Ju, H. J., Jeong, J. J., & Noh, J. (2014). A review of detection methods for the plant viruses. *Research in Plant Disease*, 20 (3),173-181.
- Kapoor, A., & Lipkin, W. I. (2001). Virus discovery in the 21st century. In eLS. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0023621>
- Khan, M. R., & Rizvi, T. F. (2017). Application of nanofertilizer and nanopesticides for improvements in crop production and protection. In M. Ghorbanpour (Ed.), *Nanoscience and Plant–Soil Systems*, Soil Biology 48. Springer International Publishing, UK.
- King, A. M. Q., Lefkowitz, E. J., Mushegian, A. R., Adams, M. J., Dutilh, B. E., Gorbalenya, A. E., Harrach, B., Harrison, R. L., Junglen, S., Knowles, N. J., Kropinski, A. M., Krupovic, M., Kuhn, J. H., Nibert, M. L., Rubino, L., Sabanadzovic, S., Sanfaçon, H., Siddell, S. G., Simmonds, P., Varsani, A., Zerbini, F. M. and Davison, A. J. (2018). Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the

International Committee on Taxonomy of Viruses. Archives of Virology 163:2601-2631.

- Klingshirn, C. (2007). ZnO: From basics towards applications." *Physica Status Solidi (b)*, 244(9), 3027-3073.
- Kumar, A., Verma, R. B., Solankey, S. S., & Adarsh, A. (2015). Evaluation of okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) genotypes for yield and yellow vein mosaic disease. *Indian Phytopathology*, 68(2), 201-206.
- Kumar, J., Kumar, A., Singh, S. P., Roy, J. K., & Lalit, A. (2012). First report of radish leaf curl virus infecting okra in India. *New Disease Reports*, 7, 13–24.
- Kumar, R., Singh, S. P., Ivanov, F., et al. (2024). Trichoderma-mediated synthesis of ZnONPs: Trend efficient for repressing two seed- and soil-borne phytopathogens *Phomopsis vexans* and *Colletotrichum capsici*. *BioNanoScience*.
- Kumar, S., Bhuvaneshwari, R., Jain, S., Nirwan, S., Fatima, Z., Kumar, D., Chhikara, B. S., Rathi, B., & Poonam. (2024). A systematic review on pesticide-loaded nanocapsules: A sustainable route for pesticide management to enhance crop productivity. *Current Nanoscience*, 20(3), 280-297.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547–1549.
- Kumar, V., Koul, B., Taak, P., Yadav, D., & Song, M. (2023). Journey of Trichoderma from pilot scale to mass production: A review. *Agriculture*, 13(10), 2022.
- Lahuf, A. A., Kareem, A. A., Al-Sweedi, T. M., & Alfarttoosi, H. A. (2019). Evaluation the potential of indigenous biocontrol agent *Trichoderma harzianum* and its interactive effect with nanosized ZnO particles against the sunflower

damping-off pathogen, *Rhizoctonia solani*. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 365, 012011.

- Lamichhane, J. R., Dürr, C., Schwanck, A. A., Robin, M. H., Sarthou, J. P., Cellier, V., and Aubertot, J. N. (2017). Integrated management of damping-off diseases. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 37, 1-25.
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*, 9(4), 357–359.
- Lee, H. J., & Jeong, R. D. (2022). Metatranscriptomic analysis of plant viruses in imported pear and kiwifruit pollen. *The Plant Pathology Journal*, 38(3), 220–228.
- Leke, W., Mignouna, D. B., Brown, J. K., & Kvarnheden, A. (2015). Begomovirus disease complex: Emerging virus diseases threat in vegetable production systems of West and Central Africa - A review. *Agriculture & Food Security*, 4(1), 55–67.
- Li, F., Qiao, R., Wang, Z., Yang, X., & Zhou, X. (2022). Occurrence and distribution of geminiviruses in China. *Science China Life Sciences*, 65(8), 1498-1503.
- Mahapatra, B., Ghosh, D., & Mukhopadhyay, R. (2024). Biocontrol potential of *Trichoderma* and *Pseudomonas*: A review. *International Journal of Advanced Biochemistry Research*, 8(Special Issue 4, Part B), 129–132.
- Mahon, C. R. and Lehman, D. C. (2019). *Textbook of diagnostic microbiology*, Sixth edition. Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, USA
- Majithia, M. and Barretto, D. A. (2023). Biocompatible green-synthesized nanomaterials for therapeutic applications. In P. Morajkar, and M. Naik (Eds), *In Progress in Biochemistry and Biotechnology, Advances in Nano and Biochemistry*. Academic Press, USA.

- Maliogka, V. I., Martelli, G. P., Fuchs, M., and Katis, N. I. (2015). Control of viruses infecting grapevine. *Advances in virus research*, 91: 175–227.
- Maluta, N. K. P., Lopes, J. R. S., Fiallo-Olive, E., Navas-Castillo, J. and Lourenção, A. L. (2021). Foliar application of systemic insecticides disrupts feeding behavior of the whitefly *Bemisia tabaci* MEAM1 and the transmission of tomato chlorosis virus in potato plants. *Journal of Pest Science*, 1-12.
- Mandal, D., Bolander, M. E., Mukhopadhyay, D., Sarkar, G., & Mukherjee, P. (2006). The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application. *Applied microbiology and biotechnology*, 69(5), 485–492.
- Manjunatha, L., Rajashekara, H., Uppala, L. S., Ambika, D. S., Patil, B., Shankarappa, K. S., Nath, V. S., Kavitha, T. R., & Mishra, A. K. (2022). Mechanisms of microbial plant protection and control of plant viruses. *Plants (Basel, Switzerland)*, 11(24), 3449.
- Manzar, N., Kashyap, A. S., Goutam, R. S., Rajawat, M. V. S., Sharma, P. K., Sharma, S. K., & Singh, H. V. (2022). Trichoderma: Advent of versatile biocontrol agent, its secrets and insights into the mechanism of biocontrol potential. *Sustainability*, 14(12786).
- Marquis-Hrabe, J., Jung, D., Park, S., Boray, A., Ronholm, J. (2023). Foodborne Bacterial Pathogen Big Data – Genomic Analysis. In: Farber, J., Dara, R., Ronholm, J. (eds) *Harnessing Big Data in Food Safety*. Food Microbiology and Food Safety. Springer, Cham.
- Massart, S., Olmos, A., Jijakli, H., and Candresse, T. (2014). Current impact and future directions of high throughput sequencing in plant virus diagnostics. *Virus research*, 188, 90-96.
- Matsumura, E. E., Coletta-Filho, H. D., Nouri, S., Falk, B. W., Nerva, L., Oliveira, T. S., Dorta, S. O., & Machado, M. A. (2017). Deep sequencing analysis

of RNAs from citrus plants grown in a citrus sudden death-affected area reveals diverse known and putative novel viruses. *Viruses*, 9, 92.

- Matthews, R.E.F. (2002). *Plant Virology*. 4rd ed. Academic Press, London, UK.
- Medina-Hernández, D., Caamal-Chan, M. G., Vargas-Salinas, M., Loera-Muro, A., Barraza, A., & Holguín-Peña, R. J. (2019). Molecular characterization and phylogenetic analysis of a Squash leaf curl virus isolate from Baja California Sur, Mexico. *PeerJ*, 7, e6774.
- Mishra, G.P., Singh, B., Seth, T., Singh, A.K., Halder, J., Krishnan, N., Tiwari, S.K. and Singh, P.M. (2017). Biotechnological Advancements and Begomovirus Management in Okra (*Abelmoschus esculentus* L.): Status and Perspectives. *Frontiers Plant Sciences*. 8:360.
- Mohammed, M.S. and Lahuf, A.A. (2023). First report of Cucumber vein yellowing virus in Iraq. *New Disease Report*, 47: e12183.
- Mokili, J. L., Rohwer, F., & Dutilh, B. E. (2012). Metagenomics and future perspectives in virus discovery. *Current Opinion in Virology*, 2, 63–77.
- Montes, N., Vijayan, V., & Pagán, I. (2021). Host population structure for tolerance determines the evolution of plant–virus interactions. *New Phytologist*, 231, 1570–1585.
- Movlaroooy, T. (2018). Study of quantum confinement effects in ZnO nanostructures. *Materials Research Express*, 5(3), 035032.
- Mugerwa, H., Seal, S., Wang, H. L., Patel, M. V., Kabaalu, R., Omongo, C. A. and Colvin, J. (2018). African ancestry of New World, *Bemisia tabaci*-whitefly species. *Scientific reports*, 8(1): 2734.
- Mukherjee, P., Roy, M., Mandal, B.P., Dey, G.K., Mukherjee, P.K., Ghatak, J., Tyagi, A.K. and Kale, S.P. (2008) Green Synthesis of Highly Stabilized

Nanocrystalline Silver Particles by a Non-Pathogenic and Agriculturally Important Fungus *T. asperellum*. *Nanotechnology*, 19, 075103.

- Nagendran, K., Pandey, K. K., Rai, A. B., & Singh, B. (2017). Viruses of vegetable crops: Symptomatology, diagnostics and management. Technical Bulletin No. 75, ICAR - Indian Institute of Vegetable Research.
- Navas-Castillo, J., Fiallo-Olivé, E. and Sánchez-Campos, S. (2011). Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annual Review Phytopathology* 49:219-248.
- Naveed, A., Khan, A. A., & Khan, I. A. (2009). Generation mean analysis of water stress tolerance in okra (*Abelmoschus esculentus* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 41, 195-205.
- Nerva, L., Varese, G. C., Falk, B. W. and Turina, M. (2017). Mycoviruses of an endophytic fungus can replicate in plant cells: evolutionary implications. *Scientific reports*, 7(1), 1908.
- Oliveira, M. R. V., Henneberry, T. J., & Anderson, P. (2001). History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. *Crop Protection*, 20, 709-723.
- Oppong-Sekyere, D., Akromah, R., Nyamah, E. Y., Brenya, E., & Yeboah, S. (2012). Evaluation of some okra (*Abelmoschus* spp.) germplasm in Ghana. *African Journal of Plant Science*, 6(5), 166-178.
- Oyesola, O. L., Tonjock, R. K., Bello, A. O., Taiwo, O. S., & Obembe, O. O. (2024). Trichoderma: A review of its mechanisms of action in plant disease control. *Preprints*, 2024051378.
- Pantaleo, V., & Chiumenti, M. (2018). *Viral metagenomics: Methods and protocols*. Springer, Germany.

- Paredes-Montero, J. R., Hameed, U., Zia-Ur-Rehman, M., Rasool, G., Haider, M. S., Herrmann, H. W., & Brown, J. K. (2019). Demographic expansion of the predominant *Bemisia tabaci* (Gennadius)(Hemiptera: Aleyrodidae) mitotypes associated with the Cotton leaf curl virus epidemic in Pakistan. *Annals of the Entomological Society of America*, 112(3), 265-280.
- Pattanayak, S. P., Bose, P., & Sunita, P. (2023). Interaction between nanoparticles and phytopathogens. In F. Fernandez-Luqueno & J. K. Patra (Eds.), *Agricultural and environmental nanotechnology: Interdisciplinary biotechnological advances*. Springer, Singapore.
- Paudel, D.B. and Sanfaçon, H. (2018). Exploring the diversity of mechanisms associated with plant tolerance to virus infection. *Frontier Plant Science* 9:1575.
- Pérez-de-Luque, A. and Hermosín, M. C. (2013). Nanotechnology and its use in agriculture. In: *Bio-nanotechnology: a revolution in food, biomedical and health sciences*. Bagchi, D., Bagchi, M., Moriyama, H. and Shahidi, F. (editors). Wiley, West Sussex, UK.
- 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. *Frontiers in Microbiology*, 8,1998.
- Perring, T.M., Gruenhagen, N.M. and Farrar, C.A. (1999). Management of plant viral diseases through chemical control of insect vectors. *Annual Review of Entomology*, 44: 457-81.
- Pimentel, D. (2009). Pesticides and Pest Control. In: Peshin, R., Dhawan, A.K. (eds) *Integrated Pest Management: Innovation-Development Process*. Springer, Dordrecht, The Netherland.

- Prasad, R., Kumar, V. and Prasad, K.S. (2014). Nanotechnology in sustainable agriculture: present concerns and future aspects. *African Journal of Biotechnology* 13:705–713.
- Radcliffe, E. B., Hutchison, W. D., and Cancelado, R. E. (Eds.). (2009). *Integrated Pest Management: Concepts, Tactics, Strategies and Case Studies*. Cambridge University Press, UK.
- Radouane, N., Ezrari, S., Belabess, Z. , Tahiri, A., Tahzima, R. , Massart, S., Jijakli, H., Benjelloun, M. and Lahlali, R. (2021). Viruses of cucurbit crops: current status in the Mediterranean Region. *Phytopathologia Mediterranea*, 60(3): 493–519.
- Rahman, M. S., Ahmed, A. U., Jahan, K., & Khatun, F. (2020). Management of cucumber mosaic virus (CMV) infecting cucumber in Bangladesh. *Bangladesh Journal of Agricultural Research*, 45(1), 65-76.
- Rahman, M. T., Sobur, M. A., Islam, M. S., Ievy, S., Hossain, M. J., El Zowalaty, M. E., Rahman, A. T. and Ashour, H. M. (2020). Zoonotic Diseases: Etiology, Impact, and Control. *Microorganisms*, 8(9): 1405.
- Ramírez-Valdespino, C. A., & Orrantia-Borunda, E. (2021). Trichoderma and nanotechnology in sustainable agriculture: A review. *Frontiers in Fungal Biology*, 2, 764675.
- Rani, M., Shanker, U., Yadav, J., Keshu (2021). Degradation of Pesticides Residue by Engineered Nanomaterials. In: Inamuddin, Ahamed, M.I., Lichtfouse, E. (eds) *Sustainable Agriculture Reviews 48*. Sustainable Agriculture Reviews, vol 48. Springer, Cham, Switzerland.
- Rao, C. N. R., Müller, A., and Cheetham, A. K. (2004). *The Chemistry of Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications*. Wiley-VCH, Germany.

- Rashid, S., Wani, F., Ali, G., Sofi, T. A., Dar, Z. A., & Hamid, A. (2022). Viral metatranscriptomic approach to study the diversity of virus(es) associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the North-Western Himalayan region of India. *Frontiers in Microbiology*, 13, 943382.
- Ray, M.K., Mishra, A.K., Mohanta, Y.K., Mahanta, S., Chakrabartty, I., Kungwani, N.A., Avula, S.K., Panda, J., and Pudake, R.N. (2023). Nanotechnology as a Promising Tool against Phytopathogens: A Futuristic Approach to Agriculture. *Agriculture*, 13, 1856.
- Raza, A., and Shahid, M. S. (2020). Next-generation sequencing technologies and plant molecular virology: a practical perspective. In *Applied Plant Virology* (pp. 131-140). Academic Press, USA.
- Riley, D. G., and Srinivasan, R. (2019). Integrated Management of Tomato Yellow Leaf Curl Virus and its Whitefly Vector in Tomato. *Journal of Economic Entomology*, 112(4), 1526–1540.
- Riyaz, S.U.M., and Kathiravan, K. (2019). Integrated Pest Management Approaches. In: Kumar, R. (eds) *Geminiviruses*. Springer, Cham, Switzerland.
- Rosa, C., and Falk, B.W. (2014). Virus-resistant crops and trees. *Plant biotechnology: Experience and future prospects* (Springer international publishing), pp. 155-168.
- Rosell, R. C., Torres-Jerez, I., & Brown, J. K. (1999). Tracing the geminivirus-whitefly transmission pathway by polymerase chain reaction in whitefly extracts, saliva, haemolymph, and honeydew. *Phytopathology*, 89(3), 239–246.
- Rubio, L., Galipienso, L., and Ferriol, I. (2020). Detection of plant viruses and disease management: Relevance of genetic diversity and evolution. *Frontiers in plant Science*, 11, 1092.

- Saddique, M.A.B., Zafar, S., Ashraf, Z., Muneer, M.A., Farid, B., Shabeer, S. (2022). Resistance Gene Identification, Cloning, and Characterization in Plants. In: Abd-Elsalam, K.A., Mohamed, H.I. (eds) Cereal Diseases: Nanobiotechnological Approaches for Diagnosis and Management. Springer, Singapore.
- Sahithya, K., Kounin, S., Sahana, P., and Arjun, K. (2022). Applications of Nanomaterials for Adsorptive and Catalytic Removal of Chemical Pesticides: An Overview. *Asian Journal of Chemistry*, 34(4), 807–818.
- Sahu, P. K., Sao, R., Mondal, S., Vishwakarma, G., Gupta, S. K., Kumar, V., and Das, B. K. (2020). Next generation sequencing based forward genetic approaches for identification and mapping of causal mutations in crop plants: A comprehensive review. *Plants*, 9 (10), 1355.
- Salari, K., Heydarnejad, J., Massumi, H., & Others. (2023). Incidence of cotton leaf curl Gezira virus and the associated alphasatellites and betasatellites in crops and ornamental plants in southern Iran. *Tropical Plant Pathology*, 48(1), 62–72.
- Samanta, S., Singh, B. R., & Adholeya, A. (2017). Intracellular Synthesis of Gold Nanoparticles Using an Ectomycorrhizal Strain EM-1083 of *Laccaria fraterna* and Its Nanoanti-quorum Sensing Potential Against *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian journal of microbiology*, 57(4), 448–460.
- 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.
- Sani, I., Ismail, S. I., Abdullah, S., Jalinias, J., Jamian, S. and Saad, N. (2020). A Review of the Biology and Control of Whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), with Special Reference to Biological Control Using Entomopathogenic Fungi. *Insects*, 11(9): 619.

- Scortichini, M. (2022). Sustainable Management of Diseases in Horticulture: Conventional and New Options. *Horticulturae*, 8(6): 517-548.
- Serfraz, S., Amin, I., Akhtar, K. P., & Mansoor, S. (2014). Recombination among begomoviruses on malvaceous plants leads to the evolution of okra enation leaf curl virus in Pakistan. *Journal of Phytopathology*, 163, 764–776.
- Shahmohammadi, N., Dizadji, A., Al-Waeli, M. , and Kvarnheden, A. (2023). First report of cotton leaf curl Gezira virus infecting *Malva parviflora* and in Iraq. *Australasian Plant Disease Notes*, 18, 13
- Sharma, P., Pandey, A. K., & Roy, N. (2014). "Enhanced Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles Immobilized on Fungal Spore Templates." *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14(4), 2752-2758.
- Sharma, V., & Salwan, R. (2023). *Trichoderma*-derived elicitor-like molecules and their role in plant immunity. Elsevier, 1–11.
- Sharman, M., Smith, T., Webb, M., & Others. (2022). Host range and genetic diversity of two polerovirus species associated with cotton bunchy top disease. *Australasian Plant Pathology*, 51, 221–230.
- Sheikh, M. A., Safiuddin, Z. K., & Mahmood, I. (2013). Effect of Bhendi yellow vein mosaic virus on yield components of okra plants. *Journal of Plant Pathology*, 95, 391-393.
- Shobha, B., Lakshmeesha, T. R., Ansari, M. A., Almatroudi, A., Alzohairy, M. A., Basavaraju, S., et al. (2020). Mycosynthesis of ZnO nanoparticles using *Trichoderma* spp. isolated from rhizosphere soils and its synergistic antibacterial effect against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Journal of Fungi*, 6(181).
- Sims, D., Sudbery, I., Ilott, N. E., Heger, A., & Ponting, C. P. (2014). Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nature reviews. Genetics*, 15(2),121–132.

- Singh, R., Kuddus, M., Singh, P. K., & Choden, D. (2022). Nanotechnology for nanophytopathogens: From detection to the management of plant viruses. *BioMed Research International*, 2022, 8688584.
- Sinha, S., Pan, I., Chanda, P., & Sen, S. K. (2009). Nanoparticles fabrication using ambient biological resources. *Journal of Applied Bioscience*, 22, 112-119.
- Smith, L. M., Sanders, J. Z., Kaiser, R. J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C. R., and Hood, L. E. (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, 321(6071), 674-679.
- Soberwell Rynjah, V. A., Sathiyamurthy, T., Saraswathi, T., & Harish, S. (2018). Field screening of okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) genotypes against okra yellow vein mosaic virus disease. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(5), 1852-1854.
- Soni, N., & Prakash, S. (2012). Synthesis of gold nanoparticles by the fungus *Aspergillus niger* and its efficacy against mosquito larvae. *Research in Pharmacy*, 2, 1–7.
- Sukul, P. K., and Kar, C. (2023). Green conversion methods to prepare nanoparticles. In M. Sen & M. Mukherjee (Eds.), *Bioinspired and green synthesis of nanostructures: A sustainable approach*. Wiley, USA.
- Sumanth, B., Lakshmeesha, T. R., Ansari, M. A., Alzohairy, M. A., Udayashankar, A. C., Shobha, B., Niranjana, S. R., Srinivas, C., and Almatroudi, A. (2020). Mycogenic Synthesis of Extracellular Zinc Oxide Nanoparticles from *Xylaria acuta* and Its Nanoantibiotic Potential. *International journal of nanomedicine*, 15, 8519–8536.
- Thakur, A., Thakur, P. and Paul Khurana, S.M. (2022). *Synthesis and Applications of Nanoparticles*. Springer, Cham, Switzerland.

- Thomas, R. B., & Hatfield, R. W. (Eds.). (2022). Okra: Cultivation, nutritional properties, and health benefits. Nova Science Publishers, USA.
- Thorburn, F. (2016). *The use of next generation sequencing in the diagnosis and typing of viral infections*. Doctoral dissertation, University of Glasgow, Scotland, UK.
- Umar, M. A., Zeshan, M. A., Iftikhar, Y., Umair, M., Ghani, M. U., Binyamin, R., Ali, M., and Ghuffar, S. (2023). Resistant genotypes and botanicals are the potential hindrances against vector-transmitted Okra yellow vein mosaic virus. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 35(1), 155-163.
- Vaishaly, A., Mathew, B., Krishnamurthy, N., & Krishnamurthy, T. (2015). Bioaccumulation of heavy metals by fungi. *International Journal of Environmental Chemistry and Chromatography*, 1, 15–21.
- Van den Berg, H., Velayudhan, R., Yadav, R. S. (2021). Management of insecticides for use in disease vector control: Lessons from six countries in Asia and the Middle East. *PLoS neglected tropical diseases*, 15(4): e0009358.
- Varma, A., & Singh, M. K. (2024). The role of satellites in the evolution of begomoviruses. *Viruses*, 16, 970.
- Venkataravanappa, V., Reddy, C. N. L., Swarnalatha, P., Devaraju, A., & Jalali, S. (2012). Molecular evidence for association of cotton leaf curl alabad virus with yellow vein mosaic disease of okra in north India. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 45, 2095–2113.
- Verma, V. C., Kharwar, R. N., Singh, S. K., Solanki, R., & Prakash, S. (2011). Erratum to: Biofabrication of anisotropic gold nanotriangles using extract of endophytic *Aspergillus clavatus* as a dual functional reductant and stabilizer. *Nanoscale Research Letters*, 6, 261.

- Vijayreddy, D. Dutta, P. and Puzari, K. R.(2023). Nanotechnology in Plant Disease Management. *Research Biotica*. 5, 2, 56–62.
- Villegas, C., Ramos-Sobrinho, R., Jifon, J. L., Keith, C., Al Rwahnih, M., Sétamou, M., Brown, J. K., & Alabi, O. J. (2019). First report of Cotton leaf curl Gezira virus and its associated alphasatellite and betasatellite from disease affected okra plants in the United States. *Plant Disease*, 103(12), 3291.
- Vitti, A., Pellegrini, E., Nali, C., Lovelli, S., Sofo, A., Valerio, M., Scopa, A., & Nuzzaci, M. (2016). *Trichoderma harzianum* T-22 induces systemic resistance in tomato infected by Cucumber mosaic virus. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1520.
- Wang, Z., Dai, P., Yang, X., Ruan, C. C., Biondi, A., Desneux, N., & others. (2019). Selectivity of novel and traditional insecticides used for management of whiteflies on the parasitoid *Encarsia formosa*. *Pest Management Science*, 75, 2716-2724.
- Wasala, S., S. , Senevirathne, I., Senanayake, J. B. and Navoditha, A. (2019). Genetic analysis of Okra Yellow Vein Mosaic Virus disease resistance in wild relative of okra *Abelmoschus angulosus* Wall. Ex Wight & Arn. *Plant Genetic Resources*, 17, 346-351.
- Watson, J. D. and Crick, F. H. C. (1953). A structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, 171 (4356): 737–738.
- Webster, C. G., Wylie, J. S. and Jones, M. G. K. (2004). Diagnosis of plant viral pathogens. *Current Science*, 86: 1604-1607.
- West, A.J. and Mordue, A.J. (1992). The influence of azadirachtin on the feeding behavior of aphids and slugs. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 62: 75-79.
- Whattam, M., Dinsdale, A., and Elliott, C. E. (2021). Evolution of plant virus diagnostics used in Australian post-entry quarantine. *Plants*, 10(7), 1430.

- Whitfield, A. E., & Rotenberg, D. (2015). Disruption of insect transmission of plant viruses. *Current Opinion in Insect Science*, 8, 79–87.
- Wright, A. A., Cross, A. R., & Harper, S. J. (2020). A bushel of viruses: Identification of seventeen novel putative viruses by RNA-seq in six apple trees. *PLOS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227669>
- Yao, X., Guo, H., Zhang, K., Zhao, M., Ruan, J., & Chen, J. (2023). Trichoderma and its role in biological control of plant fungal and nematode disease. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1160551.
- Yohe, S., and Thyagarajan, B. (2017). Review of clinical next-generation sequencing. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 141(11), 1544-1557.
- Zerbino, D. R., & Birney, E. (2008). Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome research*, 18(5), 821–829.
- Zhang, T., Breitbart, M., Lee, W. H., Run, J. Q., Wei, C. L., Soh, S. W. (2006). RNA viral community in human feces: Prevalence of plant pathogenic viruses. *PLOS Biology*, 4(1), e3. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040003>
- Zhou, X. (2013). Advances in understanding begomovirus satellites. *Annual Review of Phytopathology*, 51, 357–381.

Abstract

This study aimed to identify the virus community (virome) affecting okra crops and evaluate an integrated pest management strategy against them, which includes genetic varieties, Nano biopreparation, and insecticides.

After collecting infected plant samples from different fields of okra crops, Next-Generation Sequencing (NGS) technology using the Metatranscriptomics method was employed to fully identify and characterize the viruses infecting okra plants. The bioagent *Trichoderma koningiopsis* was used to produce nanoparticles of zinc oxide (ZnO) as Nano biopreparation, which was used alongside genetic varieties and insecticides in an integrated pest management program for controlling the viruses and whitefly insects affecting okra crops.

The results of the NGS data analysis revealed the presence of several viruses and viral satellites alongside one fungal virus. These included the Cotton leaf curl Gezira virus (CLCuGeV), identified through multiple contiguous overlapping sequences similar to the reference genome of the virus in plant samples, with raw read sequences coverage of the full genome 100% and a similarity rate of 97.7%, with a copy number of 413.7 X. Consequently, the full genome of this virus was reported in the GenBank database under the name Cotton leaf curl Gezira virus isolate Okra/Iraq-1 with the accession number PP837748.1. The results also indicated the presence of the viral satellites Cotton leaf curl Gezira alphasatellite (CLCuGA), Cotton leaf curl Gezira betasatellite (CLCuGB), and Okra leaf curl alphasatellite (OLCuA), with multiple contiguous overlapping sequences similar to their genomes, with coverage rates of 100% for all of them, and similarity rates ranging from 93% to 100%. These three genomes were documented in GenBank with the following names and accession numbers: Cotton leaf curl Gezira alphasatellite isolate Okra/Iraq-1 (PP837749.1), Cotton leaf curl Gezira betasatellite isolate Okra/Iraq-1 (PP837750.1), and two isolates for Okra leaf curl alphasatellite isolate Iraq-1+2 (PP779765.1) and (PP839930.1), respectively, noting that the latter satellite is recorded for the first time in Iraq. The results also showed the presence of the Cotton bunchy top virus (CBTV), with coverage and similarity to the reference genome of 85.4% and 97.3%, respectively, and an average copy number of 12.1 X. The full genome of this virus was deposited in the NCBI-GenBank under the name Cotton

bunchy top virus isolate Iraq-1 with the accession number PP680224.1, marking its first record in Iraq.

In addition to these viruses identified in this study, the fungal virus (Mycovirus) Erysiphe necator-associated virus (EnVS) was identified by finding multiple contiguous overlapping sequences similar to a part of the reference genome. The Iraqi isolate had a high similarity rate of 93.48% with the type EnVS-1, leading to the documentation of the RdRp gene of the Iraqi isolate in the GenBank under the name Erysiphe necator -associated virus 1 isolate Iraq-1 with the accession number PP352232.1.

Moreover, the process of manufacturing a Nano biopreparation was accomplished for the first time in Iraq using the bioagent *Trichoderma koningiopsis* and zinc oxide (ZnO). The nanoparticles were of diverse sizes and were loaded onto the surface of the bioagent's spores. They were successfully used in field experiments.

Finally, field experiment results confirmed that the integrated pest management method was preferable for reducing the number of whitefly insects and the disease severity percentage of the virus infection. The best-integrated treatments included planting the genetic variety Hort-5 and applying the Conan insecticide with either the bioagent alone or the Nano biopreparation alone, reducing the disease severity percentage to 31.0% and 33.3%, respectively, and the number of whitefly insects to an average of 9.8 and 8.5 insects, respectively. These were followed by the treatment of planting the genetic variety Hort-5 and applying the Actara insecticide and the Nano biopreparation, with a disease severity percentage of 33.3% and an average number of insects reaching 9.4. Compared with the control treatments that involved planting the genetic varieties only, which showed disease severity percentage and number of whitefly insects for the Hort-5 variety of 50.7% and 12.1 insects, respectively, while the Abeer variety had 73.3% and 16.4 insects, respectively.



University of Kerbala

College of Agriculture

Department of Plant Protection

**Evaluation of Some Genotypes, Nano-Biological
Formulation, and Chemical Insecticides in Controlling
Viruses Identified by Next Generation Sequencing in Okra
Plants**

**A thesis submitted to the council of the College of Agriculture / University of
Kerbala as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master
in Science in Agriculture / Plant Protection**

Provided by

Mariam Hashem Al-Helu

Supervised by

Professor Dr. Adnan Abdaljeleel Lahuf

July 2024

Muharram 1446