

التشخيص الجزيئي لفيروس موزاييك وتقرم الذرة (MDMV) *Maize dwarf mosaic virus*
ومقاومته أحياناً باستخدام المكملات الغذائية وبكتريا *Bacillus subtilis*
على عدة تراكيب وراثية من محصول الذرة الصفراء

سحر محمود أحمد السامرائي¹، معاذ عبد الوهاب الفهد² وأحمد هواس عبد الله أنيس³

(1) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة تكريت، صلاح الدين، العراق، البريد الإلكتروني: saharalbadre123@gmail.com

(2) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة تكريت، صلاح الدين، العراق، البريد الإلكتروني: maadhdf@gmail.com

(3) قسم المحاصيل الحقلية، كلية الزراعة، جامعة تكريت، صلاح الدين، العراق، البريد الإلكتروني: ahmed75hawas@yahoo.com

الملخص

السامرائي، سحر محمود أحمد، معاذ عبد الوهاب الفهد، أحمد هواس عبد الله أنيس. 2019. التشخيص الجزيئي لفيروس موزاييك وتقرم الذرة *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV) ومقاومته أحياناً باستخدام المكملات الغذائية وبكتريا *Bacillus subtilis* على عدة تراكيب وراثية من محصول الذرة الصفراء. مجلة وقاية النبات العربية، 37(1): 49-58.

هدفت الدراسة إلى تشخيص فيروس *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV) لأول مرة في محافظة صلاح الدين، العراق من النباتات المصابة محلياً به بالاعتماد على تقانة تفاعل البوليمراز المتسلسل مع النسخ العكسي (RT-PCR) حيث أعطت حزمه واضحة بحجم 237 زوجاً قاعدياً (bp)، كما تضمنت الدراسة تقويم كفاءة عوامل أحيائية مختلفة شملت مكعبات طحلب (*Spirulina platensis* (SP) والفطر (*Cordyceps sinensis* (CS) ولقاح البكتريا *Bacillus subtilis* (BS) والتداخل بينهما على تراكيب وراثية مختلفة من الذرة الصفراء، ودُرست مؤشرات تأثيرها في تحفيز المقاومة ضد فيروس MDMV وبعض صفات النمو. توقفت المعاملة التكاملية الشاملة للعوامل الأحيائية أعلاه في صفة دليل المساحة الورقية حيث بلغت 2.36 سم²، فيما كانت معاملة الشاهد أقل، إذ بلغت 1.95 سم²، وانطبق التأثير نفسه في صفة كمية الكلوروفيل، حيث بلغ أعلى متوسط في المعاملة التكاملية الثلاثية spad56.97 وبفارق معنوي عن بقية المعاملات المفردة والثنائية، في حين بلغ أقل متوسط لمعاملة الشاهد spad49.13. أعطت المعاملة الثنائية SP+BS أدنى متوسط لنسبة الإصابة إذ بلغت 4.15 %، فيما بلغ أعلى متوسط لنسبة الإصابة في معاملة الشاهد 8.61 %. وتم قياس معامل شدة الإصابة وتأثيره في حاصل النبات الفردي واستجابته للمعاملات والتراكيب الوراثية، حيث وجد أن أعلى متوسط كان لمعاملة البكتريا *B. subtilis* إذ بلغت 1.36 مقارنة مع معاملة الشاهد التي بلغت 0.54.

كلمات مفتاحية: تشخيص جزيئي، مقاومة حيوية، فيروس موزاييك وتقرم الذرة، المكملات الغذائية العضوية، *Bacillus subtilis*، *Spirulina platensis*

المقدمة

الفيروسات لخطورتها وانتشاره العالمي وتأثيره في إنتاجية النبات حيث وصلت الخسائر التجريبية الناجمة عن هذا الفيروس في محصول أصناف الذرة الهجين القابلة للإصابة به عند إصابة النباتات مبكراً من 40-54% (مكوك وآخرون، 2008). ينتمي هذا الفيروس إلى جنس *Potyvirus* وعائلة *Potyviridae*، وجسيماته خيطية مرنة طولها حوالي 750-770 نانومتراً وقطرها حوالي 13 نانومتراً ولا ينتقل فيروس MDMV من نبات إلى آخر بالتلامس في الطبيعة ولكن ينتقل بالطرائق الميكانيكية وعن طريق حشرات المن. استثمرت في السنوات القليلة الماضية طرائق حديثة لمقاومة الفيروسات، كان من أبرزها تحفيز المقاومة النباتية باستخدام العوامل الأحيائية والمركبات الطبيعية ذات المنشأ العضوي المستخرجة من البكتريا والفطور والطحالب/الأشنيات

يُعد محصول الذرة الصفراء (*Zea mays* L.) من المحاصيل الاستراتيجية والغذائية والعلفية، ويحتل المرتبة الثالثة بعد القمح والرز من حيث الأهمية الاقتصادية والمركز الثاني عالمياً بعد القمح من حيث المساحة المزروعة والمركز الأول من حيث الإنتاج، ويزرع بمساحات واسعة عالمياً وعربياً. يصاب محصول الذرة بالعديد من الفيروسات التي تحد من إنتاجيته عالمياً حيث سجل عليه ما يقارب من 25 نوعاً فيروسياً، ويأتي فيروس موزاييك وتقرم الذرة *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV) الذي اكتشفه Williams و Alexander (1965) في ولاية أوهايو الأمريكية، في مقدمة هذه

دراسة الصفات الكمية بالإضافة إلى معامل شدة الإصابة بفيروس MDMV لصفة حاصل النبات الفردي؛ (3) تعزيز تحمل التراكيب الوراثية للإصابة بفيروس موزاييك وتقرم الذرة باستخدام بعض العوامل الحيوية والمكملات الغذائية العضوية المحفزة للمقاومة والنمو.

مواد البحث وطرائقه

جمع العينات والحصول على عذلة نقية لفيروس MDMV

جُمعت عينات من نباتات الذرة تبدي أعراضاً توجي بأنها مصابة بفيروس MDMV من حقول الذرة الصفراء في محافظة صلاح الدين وتم تأكيد أعراض الفيروس من خلال التشخيص الظاهري لأعراض الإصابة من قبل معاذ عبد الوهاب الفهد، مختبر أبحاث الفيروسات، كلية الزراعة، جامعة تكريت.

التشخيص الجزيئي لفيروس MDMV

شُخصت العذلة التي تم الحصول عليها مسبقاً جزيئياً باستخدام تفاعل البوليمراز المتسلسل مع النسخ العكسي (RT-PCR) في المختبر المركزي، جامعة تكريت ومختبر كلية علوم الحياة، جامعة سامراء وذلك حسب الخطوات التالية التي وردت من الشركة مع إجراء بعض التعديلات عليها:

عزل الحامض النووي الريبي (RNA)

عُزل الحمض النووي الريبي وفقاً لطريقة العمل المعدة من قبل شركة BIO NEER الكورية المصنعة وتتضمن مرحلة الاستخلاص الخطوات التالية: (1) وزن 0.1 غ من أوراق النبات المصابة بالفيروس MDMV ثم سحقت في هاون خزفي معقم بإضافة النيتروجين السائل مع السحق السريع إلى أن يتم الحصول على مسحوق ناعم ثم يوضع في أنبوب إيندورف سعة 1.5 مل الخالي من أنزيم RNase؛ (2) أضيف 1 ميكروليتر من محلول الاستخلاص للعينات؛ (3) وضعت العينة في الثلج لمدة 10 دقائق؛ (4) وضعت العينة في جهاز الطرد المركزي المبرد عند حرارة 4°س لمدة 15 دقيقة وبسرعة 12000 دورة/الدقيقة؛ (5) سُحبت الطبقة العليا بوساطة ماصة دقيقة ووضعت في أنبوب إيندورف جديد؛ (6) أُضيف أيزوبروبيل كحول بما يعادل حجم العينة ثم حركت باليد 3-4 مرات ثم وضعت في مجمدة عند حرارة 20°س لمدة 10 دقائق؛ (7) وضعت العينة في جهاز الطرد المركزي المبرد عند حرارة 4°س لمدة 10 دقائق بسرعة 14000 دورة/دقيقة؛ (8) تم التخلص من الأيزوبروبيل الكحول بسكبها من أنبوب الإيندورف؛ (9) أُضيف 1 مل من الإيثانول تركيز 80% لغرض ترسيبها والمحضر من إضافة 20 ميكروليتر من Depc water مع 60 مل إيثانول، ثم خلطت العينة بوضعها في جهاز

والأعشاب البحرية. يعتبر الجنس سبيرولينا من الطحالب/الأشنيات الخضراء المزرقة وتنقسم إلى عدة أنواع ومن بينها طحلب/أشنة *S. platensis* ولها العديد من الخصائص الطبية، لذلك تستخدم كمضاد لنشاط الميكروبات ضد العديد من البكتريا والفطور والفيروسات المسببة للأمراض (Kim & Karadeniz, 2011). كما أن هذه الطحالب غنية بفيتامين B1 وB2 وA (B- carotene)، كما تحتوي على العديد من المركبات الضرورية كالكسريات والأحماض الأمينية وعناصر كبرى وصغرى لها دور أساس في تحسين نمو النبات (الجميلي والعيساوي، 2016). وأشار Spenille وآخرون (2009) أن للطحالب تأثيرات فسيولوجية كبيرة إذ أنها تعمل على زيادة مقاومة النبات ضد الإصابة بالأمراض وذلك عند إضافتها للنبات وتعد من المصادر العضوية التي تستخدم في الإنتاج النباتي. وأوصت الأمم المتحدة للأغذية والزراعة (FAO, 2011) باستخدام الطحالب الدقيقة وبالأخص طحلب *S. platensis* وأكدت على أهميتها كعامل مساعد ملموس في التخفيف من حدة سوء التغذية، وقد أسست منظمة غير حكومية مستقلة تدعى منظمة إمسام (IIMSAM) لتعميم استخدام السبيرولينا في مكافحة سوء التغذية الحاد في جميع أنحاء العالم في حالات الطوارئ الإنسانية. ينتمي فطر *Cordyceps sinensis* إلى الفطور الزقية/الكيسية، وجميع أنواع فطور جنس *Cordyceps* طفيليات داخلية تتطفل بشكل أساس على الحشرات ومفصليات الأرجل والقليل منها يتطفل على الفطور الأخرى. يحتوي هذا الفطر على الأحماض الأمينية الأساسية والأحماض الدهنية والفيتامينات B1، B2، B12، E وK بالإضافة إلى العديد من الكسريات والدهون المفسفرة والبروتينات والبوليتاسيوم والكالسيوم والحديد والنحاس والكروم ومركبات ومضادات حيوية. وأشارت الدراسات أن ميكانيكة عمل الفطر ضد الفيروسات تعمل على منع الفيروسات من الالتصاق بالحمض النووي وبالتالي عدم استنساخه وتكراره في الخلية الحية (Holliday et al., 2004). وتُعد بكتريا *B. subtilis* من العوامل الأحيائية التي لها وسائل دفاعية كثيرة ومختلفة للتفاعل مع العائل وكفاءة عالية تمكنها من تحفيز المقاومة الجهازية المستحثة وإنتاج المضادات الأحيائية (Bargabus et al., 2002).

ونظراً لعدم وجود دراسات تشخيص جزيئي سابقة عن هذا المرض في العراق والخسائر التي يسببها فضلاً عن مقاومته طبيعياً ومعرفة تأثير المكملات الغذائية العضوية فيه هدفت هذه الدراسة إلى: (1) التشخيص الجزيئي للعذلة المحلية واستحثاث المقاومة ضد الإصابة بالفيروس باستخدام عوامل أحيائية مختلفة وتتضمن مكعبات المكمل الغذائي المنتج من طحلب *S. platensis* ومكعبات المكمل الغذائي المنتج من الفطر *C. sinensis* ولقاح بكتريا *B. subtilis*؛ (2) تقويم أربع سلالات نقية وستة من هجنها الفردية من محصول الذرة الصفراء في

المعاملات المستخدمة في استحثاث مقاومة النبات لفيروس MDMV تضمنت التجربة ثمان معاملات على عشرة تراكيب وراثية من الذرة وكُررت كل معاملة مرتين كما هو مُبين في جدول 2.

مصدر المكملات الغذائية وطريقة استخدامها

تم الحصول على المكملات الغذائية العضوية من شركة DXN-Pharmaceutical SDN BHD الماليزية المتخصصة في إنتاج المكملات الغذائية العضوية والتي شملت مكعبات طُحلب *S. platensis* ومكعبات فطر *C. sinensis*. عُوملت البذور المعدة للزراعة بالطُحلب حسب مخطط التجربة وذلك بنقع البذور في أنبوبة اختبار زجاجية لكل تركيب وراثي في 10 مل ماء مقطر معقم مع إضافة 3 غ من الطُحلب (بعد طحن مكعباتها بمطحنة كهربائية) ولمدة 24 ساعة ثم زراعتها في أرض التجربة. أما المعاملة الثانية فكانت سقاياه خلال مرحلة النمو الخضري بعمر الورقة الحقيقه الرابعة بعد الإلقاح بالفيروس بـ 24 ساعة بإضافة 10 غ من مسحوق الطُحلب والفطر إلى لتر ماء لكل 8 نباتات. اما المعاملة الثالثة فكانت بعد أسبوع من الإلقاح بالفيروس، والمعاملة الرابعة كانت قبل التزهير بسبعة أيام وبالكمية نفسها. واتبعت الطريقة أعلاه نفسها للمعاملة بفطر *C. sinensis*.

تحضير عزلة بكتيريا *B. subtilis*

تم الحصول على عزلة البكتريا *B. subtilis* من مختبر أبحاث الفيروسات، كلية الزراعة، جامعة تكريت ونميت العزلة على وسط الأجار الغذائي (NA) 15 دقيقة. بعد نمو البكتريا في الوسط الصلب تم تحضير التخفيفات وذلك بأخذ 1 مل من البكتريا في الوسط الصلب وإضافته إلى 9 مل من الماء المقطر المعقم للحصول على تخفيف $10^{-1} \times 1$ وبعدها أخذ 1 مل من التخفيف وإضافته إلى 9 مل من الماء المقطر المعقم للحصول على تخفيف $10^{-2} \times 1$ إلى حين الوصول إلى التخفيف $10^{-5} \times 1$ وتمت زراعة البكتريا من هذا التخفيف على الوسط الصلب NA لاستخدامه لاحقاً.

الرجاج الكهربائي لمدة 15 ثانية؛ 10) وضعت العينة في جهاز الطرد المركزي لمدة 5 دقائق عند حرارة 4°C بسرعة 12000 دورة/دقيقة؛ 11) دُويت العينة بإضافة RNase-free DH2O وحفظت عند حرارة 20°C لاستعمالها في الخطوات اللاحقة.

قياس تركيز ونقاوة RNA المستخلص

تم قياس تركيز ونقاوة RNA المستخلص باستخدام جهاز تركيز ونقاوة الحامض النووي (NANO DROP 2000c) ألماني المنشأ (عايد، 2018).

تحويل الـ RNA الفيروسي إلى cDNA

تم اضافة المواد المذكورة أدناه إلى الكت نوع RT-Premix المجهز من قبل شركة BIO NEER وحسب التراكيز الموصى بها من قبل الشركة نفسها كالاتي: عينة 1 ميكروليتر RNA، 1 ميكروليتر Oligo-dTe، 18 ميكروليتر DEPC-DW ليصبح الحجم الكلي 20 ميكروليتر. أدخلت عينة التفاعل في جهاز المدور الحراري نوع Veriti ألماني المنشأ لإجراء التحضين واستخدام البرنامج التالي: 37°C لمدة 10 دقائق لإلتصاق الباديء، 55°C لمدة ساعة لتكوين الحمض النووي المنزوع الأوكسجين المكمل cDNA، 95°C لمدة 5 دقائق للتثبيت الحراري.

مضاعفة قطع الـ DNA باستعمال تفاعل البوليمراز المتسلسل

أدخلت عينة التفاعل في جهاز المدور الحراري نوع Veriti لإجراء التحضين بوجود البادئات المستخدمة في تشخيص الفيروس (Neishaburi et al., 2015) (جدول 1) باستخدام البرنامج التالي: 35 دورة تتألف كل منها من 94°C لمدة 5 دقائق للتفكيك الحراري، 55°C س لمدة دقيقة واحدة للإستطالة ثم بعد ذلك 72°C س لمدة 15 دقيقة للإستطالة النهائية.

جدول 1. البادئات المستخدمة في تضخيم أجزاء من مجين فيروس MDMV (Neishaburi et al., 2015).

Table1. Primers used to amplify genomic segments of MDMV (Neishaburi et al., 2015).

حجم الحزمة المضخمة (زوج قاعدي) Amplified band size (bp)	التركيز Concentration	التتابع The Sequence
237	100 Pmole/ μl	5'-AAAAACAACAARACTCAACACAACACAAC-3' 5'-GGAGCTGTTTCGCTGCAAAGG-3'
603	100 Pmole/ μl	5'-CCTTGACAACCCTCGTGACG-3' 5'-GTGGCAAGCTATGGCGTTAT-3'
1140	100 Pmole/ μl	5'-ACACAAAGGGCACAGTGGTC-3' 5'-CACAGACCTCCAACGATGT-3'

Table 2. Treatments used to induce resistance to MDMV in maize plants.

المعاملة Treatment	الرمز Code	صحة النبات	Plant health
طحلب <i>Spiroplina platensis</i>	SP	ملقح بفيروس	Inoculated with MDMV
فطر <i>Cordyceps sinensis</i>	CS	ملقح بفيروس	Inoculated with MDMV
بكتريا <i>Bacillus subtilis</i>	BS	ملقح بفيروس	Inoculated with MDMV
<i>S. platensis</i> + <i>C. sinensis</i>	SP+CS	ملقح بفيروس	Inoculated with MDMV
<i>S. platensis</i> + <i>B. subtilis</i>	SP+BS	ملقح بفيروس	Inoculated with MDMV
<i>B. subtilis</i> + <i>C. sinensis</i>	CS+BS	ملقح بفيروس	Inoculated with MDMV
<i>S. platensis</i> + <i>C. sinensis</i> + <i>B. subtilis</i>	SP+ CS+BS	ملقح بفيروس	Inoculated with MDMV
شاهد 1 Control 1	شاهد	ملقح بفيروس	Inoculated with MDMV
شاهد 2 Control 2	شاهد	غير ملقح بالفيروس	Not inoculated with the virus

وباستخدام D_{ii} يمكن حساب نسبة معامل شدة تأثير الإصابة لكل تركيب وراثي ولكل مكرر على حدة كما يلي:

$$DSI = \{1 - (Y_{Di}/Y_{Si})\} / D_{ii}$$

حيث أن: DSI = معامل شدة تأثير الإصابة للتركيب الوراثي (i)؛
 Y_{Di} = متوسط الصفة المدروسة للتركيب الوراثي (i) في مكرر ما
 للنباتات المصابة؛ Y_{Si} = متوسط الصفة المدروسة للتركيب الوراثي (i)
 في مكرر ما للنباتات السليمة.

قياس بعض مؤشرات النمو والحاصل

قياس دليل المساحة الورقية (سم) - تم قياس أقصى طول من ورقة
 العرناس الرئيس وأقصى عرض ثم حسب المساحة من المعادلة التالية
 (Stewart & Dwyer, 1999):

$$\text{مساحة الورقة} = \text{أقصى طول} \times \text{أقصى عرض} \times 0.75$$

وتم استخراج دليل المساحة الورقية من المعادلة التالية:

$$\text{دليل المساحة الورقية} = \frac{\text{مساحة الورقة}}{\text{مساحة الارض التي يشغلها النبات}}$$

قياس كمية الكلوروفيل الكلي بالطريقة المباشرة - تم قياس المحتوى
 النسبي للكلوروفيل في الأوراق بواسطة جهاز Chlorophyll meter متنوع
 CM-A لقياس وحدات سباد (SPAD units) وأخذت قراءات أربعة
 نباتات من كل تركيب وراثي ولكل مكرر وقدر محتواها من الكلوروفيل
 بواسطة الجهاز إذ تم قراءة الأوراق بصورة مفردة ثم أخذ معدل القراءات
 من خلال الجهاز نفسه.

حاصل النبات الفردي (غ) - تم حساب وزن النبات الفردي بعد فرط
 بذور أربع عينات من كل تركيب وراثي ولكل مكرر على حدة.

المعاملة بالبكتريا *B. subtilis*

عوملت البذور المعدة للزراعة بالمعلق البكتيري المعد كما ذكر في الفقرة
 السابقة لكل تركيب وراثي من الذرة وذلك بنقع البذور في أنبوبة اختبار
 زجاجية تحتوي على 9 مل ماء مقطر ومعقم وإضافه 1مل من المعلق
 المخفف $10^{-5} \times 1$ لمدة 24 ساعة ثم زرعت في أرض التجربة. عززت
 النباتات بمعاملتها مره أخرى بالبكتريا سقاية بمرحلة الورقة الحقيقية الرابعة
 بعد الإلقاح بـ 24 ساعة بإضافة طبق من البكتريا النامية يحتوي على
 0.5 سم من الوسط الغذائي منمى عليه البكتريا بالتركيز المخفف $10^{-5} \times 1$
 على لتر ماء لكل 8 نباتات. اما المعاملة الثالثة فكانت بعد أسبوع من
 الإلقاح، والمعاملة الأخيرة كانت قبل موعد التزهير بسبعة أيام.

الصفات المدروسة

معايير الإصابة

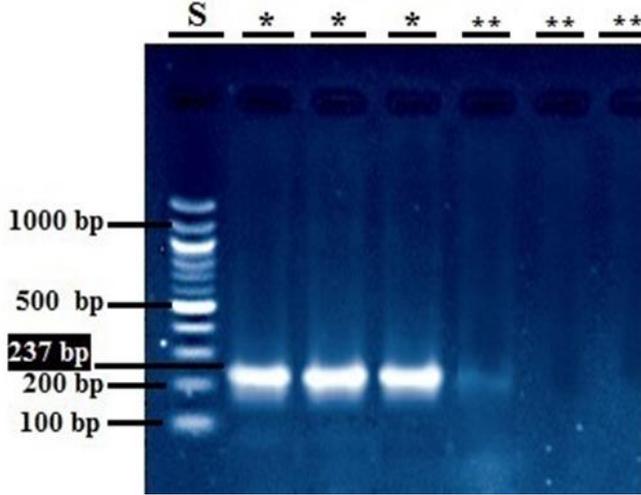
نسبة الإصابة بفيروس MDMV - حُسبت نسبة الإصابة بالفيروس
 حسب المعادلة التالية:

$$\text{نسبة الإصابة \%} = \frac{\text{عدد النباتات المصابة}}{\text{العدد الكلي للنباتات}} \times 100$$

معامل شدة الإصابة - تم تقدير معامل تأثير شدة الإصابة لصفة حاصل
 النبات الفردي باستخدام معامل Fischer و Maurer (1978) وحسب
 المعادلة التالية:

$$1 - YD/YSI = D_{ii}$$

حيث أن: D_{ii} = ناتج المتوسط العام للصفة تحت الإصابة/ المتوسط
 العام للصفة للنباتات السليمة؛ YD = المتوسط العام للصفة تحت الإصابة؛
 YSI = المتوسط العام للصفة للنباتات السليمة.



شكل 1. الكشف عن فيروس MDMV في نبات الذرة الصفراء بتقنية RT-PCR باستخدام بادئ يضخم جزء من المجين الفيروسي بحجم 237 زوج قاعدي. S= يمثل سلم أحجام أحماض نووية مختلفة، * = استخدام بادئ يضخم قطعة من الحمض النووي الفيروسي بحجم 237 زوج قاعدي، ** = بادئات أخرى لم تعط أية نتائج.

Figure 1. Detection of *Maize dwarf mosaic virus* in infected maize by RT-PCR using a primer that amplifies a segment of the viral genome of 237 bp in size. S= Represent a DNA size ladder, *=Use of a primer that amplifies a viral genomic segment of 237 bp, ** =Use of primers that failed to amplify viral genomic segments.

تأثير المعاملات المستخدمة في بعض مؤشرات المقاومة والنمو على النباتات المصابة بفيروس MDMV

تأثير المعاملات المختلفة والتراكيب الوراثية والتداخل على النسبة المئوية للإصابة بالفيروس

يلاحظ من النتائج التي تم الحصول عليها (جدول 3) وجود فروق عالية المعنوية بين المعاملات المستخدمة إذ كان أدنى متوسط لنسبة الإصابة في معاملة SP+BS بلغ 4.15%، فيما كان أعلى متوسط لنسبة الإصابة في معاملة الشاهد وبلغ 8.61%، وأن نسبة الإصابة في التراكيب الوراثية تدنت في الأب ZP-301 إذ وصلت إلى 3.68% وفي الهجين 2×1 حيث بلغت 4.11%، ويرجع سبب ذلك إلى طبيعة الظروف الجوية وتأثيرها في التراكيب الوراثية حيث تكون متحملة في منطقة وغير متحملة في منطقة أخرى وكذلك طبيعة التربة وموعد الزراعة وهذا يتوافق مع دراسة سابقة (Al-Fahad, 2018).

أما عن تأثير التداخل بين التراكيب الوراثية والمعاملات فقد ظهرت أدنى نسبة للإصابة للأب ZM19L والهجين 2×1 في معاملة SP +BS حيث بلغت 1.66% لكليهما. إن احتمالية تفوق الطحلب في هذه الصفة يمكن إرجاعه إلى إنتاجه مركبات حيوية ذات تأثير مضاد أحياناً لمجموعة من الأحياء المجهرية ومن ضمنها الفيروسات وهذا ما أشار إليه

تشخيص فيروس MDMV على الذرة الصفراء باستخدام تقانة PCR
عزل الحمض النووي الريبي - تم عزل الحمض النووي الريبي الفيروسي من أوراق نبات الذرة الصفراء المصابة بفيروس MDMV والحصول على كمية مناسبة من الحمض النووي في حدود 993-1011 نانوجرام/ميكروليتر بنقاوة عالية للمستخلص. إن عملية عزل الحمض النووي الريبي هي أصعب من عملية عزل الـ DNA وذلك لأنه حساس جداً للتكسير بواسطة أنزيمات الريبونوكلياز (RNase) (حسن، 2004). لذلك احتاجت عملية عزل حمض RNA إلى استخدام بعض المواد الكيمايائية التي تثبط من فعل RNase مثل مادة Diethyl (DEPC) pyrocarbonate. ونظراً لصعوبة عزل RNA من النباتات لوجود الجدار السميك المحيط بالجدار الخلوي يتطلب استخدام السحق اليدوي بوجود النتروجين السائل. تم ترسيب الـ RNA في الطور المائي بواسطة الإيثانول المبرد ثم إذابته في محلول Depc water وحفظ عند درجة حرارة 20-°س لحين الاستخدام (تلج، 2013).

نتائج تفاعل اختبار البوليمراز المتسلسل (PCR) - يعد استخدام الحمض النووي الريبي الفيروسي المستخلص من النباتات المصابة بالفيروس MDMV ذو حساسية عالية لظروف التفاعل، لذلك لا بد من تحديد الظروف المثلى اللازمة لإجراء التفاعل. ولقد تم الحصول على أفضل النتائج التي يمكن تلخيصها كما يلي: (أ) استخدام الكت RT-Premix والكت RT-PCR من شركة BIO NEER، (ب) أظهر استخدام التراكيز 993، 1520 و 1011 نانوجرام/ميكروليتر من الحمض النووي الريبي حزمًا واضحة، (ج) أعطى استخدام تركيز 100 بيكومول من البادئات حزمًا واضحة قابلة للقياس.

نتائج الترحيل الكهربائي - أدى استخدام إحدى البادئات الثلاث (شكل 1) إلى تضخيم حزمة ذات حجم 237 زوج قاعدي وكانت هذه النتيجة مماثلة لما توصل إليه Neishaburi وآخرون (2015)، أما البادئات الأخرى فلم تعط أية نتيجة. ربما يعود سبب عدم ظهور حزم للبادئات الأخرى المستخدمة في الدراسة كونها ترجع إلى سلالات أخرى للفيروس أو أنها تعرضت لخلل تصنيعي أو تجريبي وهذا يتفق مع مذكره عايد والفهد (2018).

تأثير المعاملات المختلفة والتراكيب الوراثية والتداخل فيما بينها في معامل شدة الإصابة بالفيروس

أظهرت النتائج (جدول 4) وجود تأثير للمعاملات المختلفة والتراكيب الوراثية والتداخل فيما بينها في معامل شدة الإصابة حيث كان أعلى متوسط للمعاملات الثلاث المستخدمة في الدراسة للمعاملة بيكتريا BS إذ بلغ 1.36. وبالنسبة للتراكيب الوراثية، ظهر تفوق معنوي للأب ZM51L بقيمة 1.14 على الأبوين ZP-301 و ZM19L وللهجين 2×1 بقيمة 1.50 مقارنة مع معامل الشاهد الذي بلغ 0.54. من خلال ماتوصل اليه Fischer و Maurer (1978) أنه كلما اقتربت قيمة المعامل من واحد فما فوق أعطى مؤشراً على أن التركيب الوراثي أكثر تحملاً للإصابة، وأن الهجين يكون أكثر تحملاً للإصابة وأكثر زيادة في الإنتاج من الصنف العادي وهذا يماثل مع ماتوصل إليه Al-Fahad (2018). أما التداخل بين المعاملات والتراكيب الوراثية فكان الأعلى لمعاملة البيكتريا مع الهجين 2×1 إذ بلغ 2.97، وبلغ معامل أقل تداخل 0.31 للأب ZM19L. إن سبب تفوق معاملة البيكتريا ربما يرجع إلى الدور المعروف لهذه البيكتريا في تحفيز مقاومة النبات ضد الفيروس فضلاً عن دورها التغذوي بتجهيز النبات بالعناصر اللازمة للنمو أو زيادة مساحة المجموع الجذري وبالتالي تزداد فائدة العناصر الغذائية وهذا يتوافق مع ماتوصل إليه باحثون سابقون (تلج، 2013؛ عبد الجبار، 2012؛ مندو وآخرون، 2011). وأشارت دراسات سابقة إلى إمكانية استخدام هذا النوع من البيكتريا لتحقيق مفهوم الترب المقاومة ذاتياً (الفهد، 2006؛ محسن، 2018).

Bhagavathy وآخرون (2011) في دراستهم لتحليل وجود مواد كيميائية طبيعية نشطة بيولوجياً في الطحالب ودورها المضاد للمسببات المرضية. كما ان لطحلب *Spirulina* فعالية تشييطية واضحة لاحتوائها على سكريات متعددة وبيبتيدات حلقيه وقلويات (Rania & Taha, 2008). أو قد يكون تفسيراً فسيولوجياً في تأثير الطحالب يكمن في احتوائها على منشطات نمو وأحماض أمينية حرة تحسن من كفاءة عمليات التمثيل الغذائي داخل الورقة وذلك عن طريق زيادة كفاءة عملية البناء الضوئي وتنشيط نمو الجذور، كما قد تقوم بدور هرمونات النمو الطبيعية من تكون طبقة اللغنين وبالتالي يزيد من تحملها للإصابة وهذا يتمشى مع توصل إليه عبد الحافظ (2011). كما وأن تحفيز النمو والمقاومة للإصابة يعود إلى معاملة البذور (نقع البذور) مما زاد من استمرارية النمو ضمن المعدلات الإعتيادية أو أسرع رغم إصابتها وجعل النبات قوياً ومتحملاً للإصابة (حسن وفرج، 2013). في حين تعمل البيكتريا على تحفيز المقاومة الجهازية للنبات وهذه العوامل مجتمعة أدت إلى خفض نسبة الإصابة بالفيروس، أكدت دراسات سابقة هذا التأثير في فيروسات مختلفة منها ToMV، TMV و BYMV حيث كانت الأكثر تأثيراً في خفض نسبة الإصابة وشدتها وزيادة مؤشرات النمو والحاصل (تلج، 2013؛ عايد والفهد، 2018).

جدول 3. تأثير المعاملات المختلفة والتراكيب الوراثية المختلفة للذرة والتداخل فيما بينها في نسبة الإصابة بفيروس MDMV.

Table 3. Effect of different treatments and genotypes and their interference on MDMV infection rate.

متوسطات المعاملات Average of Treatments	تراكيب الذرة الوراثية المستخدمة Maize genotypes used										المعاملات Treatments
	4×3	4×2	3×2	4×1	3×1	2×1	ZM19L	ZP-301	ZM51L	ZM4L	
5.66	6.87	2.08	6.87	6.45	6.04	7.29	6.04	4.16	6.45	4.37	SP
7.24	5.83	5.83	8.33	5.83	6.66	5.83	4.33	5.83	6.66	5.33	CO
4.91	3.12	4.68	9.37	5.46	3.90	3.12	4.68	3.12	4.68	5.03	B.S
4.31	4.86	5.77	4.08	3.24	5.69	4.89	5.66	4.02	4.91	5.74	CO+BS
5.51	6.18	2.97	5.59	6.90	2.37	7.73	4.52	3.21	5.73	5.97	SP+CO
4.15	4.16	2.46	8.33	6.66	7.33	1.66	1.66	1.66	5.00	1.66	SP+BS
4.88	4.86	5.77	4.08	3.24	5.69	4.89	4.13	4.99	4.91	4.74	SP+ CO+BS
8.61	10.80	6.80	10.00	12.08	8.63	10.83	7.83	10.46	10.83	10.66	نبات مصاب بدون معاملة (شاهد) Infected plant without treatment (Control)
	5.74	6.00	6.98	6.87	5.78	4.11	5.00	3.68	5.20	5.20	متوسطات التراكيب الوراثية Average of genotypes

جدول 4. تأثير المعاملات المختلفة والتراكيب الوراثية والتداخل فيما بينها في معامل شدة الإصابة بفيروس MDMV.

Table 4. Effect of treatments of different maize genotypes and their interaction on severity index of infection with MDMV.

متوسطات المعاملات Average of Treatments	تراكيب الذرة الوراثية المستخدمة Maize genotypes used										المعاملات Treatments
	4×3	4×2	3×2	4×1	3×1	2×1	ZM19L	ZP-301	ZM51L	ZM4L	
0.95	1.10	1.38	1.62	0.90	1.49	1.85	1.03	1.38	1.23	1.46	SP
1.05	1.11	0.91	0.94	1.09	1.08	1.27	0.85	1.23	1.06	1.00	CO
1.36	1.40	2.14	1.51	0.88	1.53	2.97	1.63	1.14	0.90	1.77	B.S
0.54	0.44	0.43	0.39	0.31	0.38	0.92	0.31	0.43	0.36	0.49	نبات مصاب بدون معاملة (شاهد)
											Infected plant without treatment (Control)
	1.16	1.09	1.36	1.05	1.37	1.50	1.63	0.54	1.14	0.93	متوسطات التراكيب الوراثية
	Average of genotypes										

قيمة الفرق المعنوي الأدنى للمعاملات عند احتمال 5% = 0.31 وللتركيب الوراثية = 0.50 وللتداخل = 1.00

LSD values at P=0.05 for treatments=0.31, for genotypes=0.50, for interaction=1.00

للعناصر الغذائية والماء وبخاصة الداخلة في تكوين الكلوروفيل وهذا ينعكس في زياده محتواه وربما يعود ذلك لاحتوائه على العناصر الغذائية بصورة كاملة وأن الفيروس يؤثر في نمو النبات ويسبب تقزمه واختزال في حجم الأوراق والثمار ونقص في كمية الكلوروفيل من خلال تحويل الفعاليات الأيضية للنباتات المصابة لصالحه وأن إضافة المركبات الغنية بالعناصر الغذائية والموجودة في طحلب SP وفطر CO يساعد في حدوث استجابته لدى النبات في زيادة فعاليته الحيوية وزيادة مقاومته وتعويض النقص الفسيولوجي الحاصل في العناصر الغذائية وبالتالي تقليل أضرار الإصابة المبكرة ومنها اختزال نسبة الكلوروفيل (المولى، 1984؛ محمد، 2009).

تأثير المعاملات المختلفة والتراكيب الوراثية والتداخل فيما بينها في

دليل المساحة الورقية/سم² بعد الإصابة بفيروس MDMV

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي (جدول 6) تأثيراً معنوياً للمعاملات في دليل المساحة الورقية بعد الإصابة حيث تفوقت معنوياً المعاملة التكاملية (بطحلب SP مع بكتريا BS مع فطر CO) إذ بلغت 2.36 سم² مقارنة بالشاهد غير المعامل والتي بلغت 1.95 سم². بالنسبة للتركيب الوراثية (الأبء + الهجن) فقد تفوق الأب ZM4L والهجين 3×2 معنوياً لهذه الصفة حيث بلغت المساحة الورقية 2.42 سم². إن تفوق صفة ارتفاع النبات بعد الإصابة ربما انعكست بدورها في زيادة المساحة الورقية بين التركيب الوراثية للذرة الصفراء، وهذا يتفق مع ماتوصل اليه الدليمي (2014). وفيما يخص تأثير التداخل بين التركيب الوراثية والمعاملات فقد تفوقت معاملة طحلب SP مع الأب ZM4L حيث بلغت 3.19 سم²، ربما يعود سبب هذا التأثير إلى أن الطحلب أسهم في زيادة المساحة الورقية لأن تأثيره يشبه تأثير منظمات النمو لاحتوائها على الأوكسينات والجبرلينات مما تزيد من امتصاص العناصر الغذائية وانقسام الخلايا، فضلاً عن تنشيط الإنزيمات التي تحفز نمو النبات ومقاومته للأمراض (الفهد والجميلي، 2011؛ Jensen, 2004).

تأثير المعاملات المختلفة والتراكيب الوراثية والتداخل فيما بينها في

كمية الكلوروفيل الكلي بعد الإصابة بفيروس MDMV.

أظهرت النتائج (جدول 5) وجود فروق معنوية في كمية الكلوروفيل بالنسبة للمعاملات والتراكيب الوراثية والتداخل بينهما، حيث بلغ أعلى متوسط في المعاملة التكاملية الثلاثية spad56.97 وبفارق معنوي على أغلب المعاملات، في حين كان أقل متوسط في معاملة الشاهد الذي بلغ spad.49.13 ربما يعزى سبب تفوق المعاملات التكاملية الثلاثية إلى أن الطحلب يحتوي على مادة Betain التي تعد مصدراً لعنصر النيتروجين الذي يزيد من كمية الكلوروفيل ويمنع تحلله كما أشار Kuwada (2006)، وكذلك وجود البكتريا وقدرتها على توفير كميات إضافية من العناصر المغذية فضلاً عن دورها المهم في تحفيز المقاومة الجهازية للنبات عن طريق تحفيز الخلايا على تكوين بروتينات تثبط تصاعف الفيروس من خلال تحفيز مورثات المقاومة في النبات وجاء هذا الاستنتاج مطابقاً لما نشره ثلج (2013) عن تأثير التركيب الوراثية في هذه الصفة بين الأبء والهجن كان أعلى متوسط للأب ZM19L حيث بلغ spad56.83 وكذلك تفوق الهجين 2×1 على جميع التركيب الوراثية بمعدل spad56.95، ويرجع ذلك إلى العامل الجيني المتمثل بمورثات المقاومة والتي زادت صفة التحمل والتي تؤدي إلى خفض الإصابة بالفيروس أو التقليل من نسبة جسيمات الفيروس اللازمة لإحداث الإصابة وبالتالي تقليل الضرر من الإصابة بالفيروس وزيادة نسبة الكلوروفيل في بلاستيدات النباتات (مندو وآخرون، 2011).

وفيما يخص التداخل بين التركيب الوراثية للذرة والمعاملات المختلفة فقد تفوقت معاملة SP+CO مع التركيب الوراثي ZM19L حيث بلغت كمية الكلوروفيل spad 63.66، تليها المعاملة التكاملية الثلاثية مع الأب ZM19L إذ بلغت spad 62.85، بينما بلغ أقل تداخل في معاملة الشاهد مع الهجين 3×2 التي بلغت spad36.52. ويُمكن أن يعود سبب تفوق معاملة الطحلب إلى زيادة كفاءة تكوين الجذور وتحفيز امتصاصها

جدول 5. تأثير المعاملات المختلفة وتراكيب الذرة الوراثية والتداخل فيما بينها في كمية الكلوروفيل الكلي بعد الإصابة بفيروس MDMV.

Table 5. Effect of different treatments and maize genotypes and their interaction on the amount of total chlorophyll after MDMV infection.

متوسطات المعاملات Average of treatments	تراكيب الذرة الوراثية المستخدمة Maize genotypes used										المعاملات Treatments
	4x3	4x2	3x2	4x1	3x1	2x1	ZM19L	ZP-301	ZM51L	ZM4L	
54.50	52.11	51.57	51.06	61.90	54.31	53.56	55.48	55.08	56.98	53.97	SP
50.95	53.47	46.28	44.74	52.98	55.11	56.89	59.11	62.43	52.27	60.18	CO
53.71	55.12	46.50	49.51	53.82	54.58	58.50	59.17	53.32	54.23	52.38	BS
56.72	56.04	52.74	58.12	55.29	60.81	58.77	55.49	56.28	56.65	57.99	CO+BS
55.31	57.62	46.34	48.03	58.90	56.48	60.30	63.66	59.35	56.97	55.46	SP+CO
56.55	59.83	43.23	53.57	56.80	55.62	56.88	59.68	46.60	58.47	54.33	SP+BS
56.97	57.22	47.00	58.24	56.29	58.55	58.59	62.85	57.54	53.11	59.28	SP+ CO+BS
49.13	51.95	40.20	36.52	45.04	45.72	52.16	46.18	40.76	46.21	41.58	نبات مصاب بدون معاملة Infected plant without treatment
	56.17	45.61	45.61	55.13	55.02	56.95	56.83	52.67	54.36	55.65	متوسطات التراكيب الوراثية Average of genotypes

قيمة الفرق المعنوي الأدنى عند احتمال 5% للمعاملات = 2.00، للتراكيب الوراثية = 2.24، للتداخل = 6.34

LSD values at P=0.05 for treatments=2.00, for genotypes=2.24, for interaction=6.34

جدول 6. تأثير المعاملات المختلفة وتراكيب الذرة الوراثية والتداخل فيما بينها في المساحة الورقية بعد الإصابة بفيروس MDMV.

Table 6. Effect of different treatments and maize genotypes and their interaction on leaf area after virus infection with MDMV.

متوسطات المعاملات Average of treatments	تراكيب الذرة الوراثية المستخدمة Maize genotypes used										المعاملات Treatments
	4x3	4x2	3x2	4x1	3x1	2x1	ZM19L	ZP-301	ZM51L	ZM4L	
2.05	2.41	2.00	2.33	1.94	2.14	2.87	2.30	1.67	2.09	3.19	SP
2.20	1.93	2.82	1.97	2.39	1.64	2.14	2.25	2.81	1.86	2.81	CO
2.09	2.25	1.83	2.32	1.70	2.03	2.21	2.02	2.64	2.19	2.70	BS
2.33	2.71	2.03	2.60	2.48	2.39	2.83	2.53	2.00	2.23	2.48	CO+BS
2.31	2.88	1.73	2.79	2.54	2.69	2.32	2.41	2.15	1.97	2.63	SP+CO
2.00	2.20	2.31	2.52	2.06	2.82	2.93	2.71	2.47	1.45	2.08	SP+BS
2.36	2.60	2.36	2.47	1.99	2.28	2.26	2.38	2.72	2.36	2.19	SP+ CO+BS
1.95	1.35	1.26	1.73	1.49	1.70	1.77	1.90	1.11	1.14	1.27	نبات مصاب بدون معاملة Infected plant without treatment
	2.29	2.04	2.42	2.07	2.11	2.16	2.19	1.94	2.03	2.42	متوسطات التراكيب الوراثية Average of genotypes

الفرق المعنوي الأدنى عند احتمال 5% للمعاملات = 0.25، لتراكيب الذرة الوراثية = 0.28، للتداخل = 0.80

LSD at P=0.05 for treatments=0.25, for maize genotypes=0.28, for interaction=0.80

Abstract

Alsamarray, S.M.A., M.A. Al-Fahed and A.H.A. Anis. 2019. Molecular diagnosis of *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV) and bio-control with food supplements and *Bacillus subtilis* on several maize genotypes. Arab Journal of Plant Protection, 37(1): 49-58.

This study aimed at diagnosing *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV) for the first time in the governorate of Salah al-Din, Iraq in locally infected maize plants using RT-PCR, which amplified a specific viral genomic segment of 237 bp. The study also evaluated the efficiency of various biological agents, including *Spirulina platensis*, mushroom powder *Cordyceps sinensis*, and *Bacillus subtilis* and their combined effect in stimulating resistance against MDMV, and on certain growth traits in different maize genotypes. The overall integrated treatment of the biological factors above was expressed in an increase of leaf area index of 2.36 cm², compared to 1.95 cm² for the untreated control. The same effect was obtained in relation to chlorophyll content, where the highest mean was obtained following the triple treatment (56.97 spad), when the mean for the control treatment was 49.13 spad. The triple treatment gave the lowest mean of infection rate, which reached 4.15% following the BS + SP treatment and was the highest (8.61%) in the untreated control. Disease severity and its effect on plant yield and its response to the different treatments and maize genotypes was investigated. The highest disease severity index of 1.36 was obtained for the treatment with *B. subtilis*, and the lowest for the untreated control (0.54).

Keywords: Molecular diagnosis, biological control, *Maize dwarf mosaic virus*, organic food supplement, *Spirulina platensis*, *Cordyceps sinensis*, *Bacillus subtilis*.

Corresponding author: Sahar M.A. Alsamarray, Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Tikrit, Salah Al-Din, Iraq, email: saharalbadre123@gmail.com

- مكوك، خالد محي الدين، جابر إبراهيم فجلة وصفاء غسان قمري. 2008. الأمراض الفيروسية للمحاصيل المهمة في المنطقة العربية. الجمعية العربية لوقاية النبات. دار النهضة العربية، بيروت. 631 صفحة.
- مندو، محمد جمال، أمين عامر حاج قاسم، صلاح الشعبي وصفاء غسان قمري. 2011. تقويم قابلية بعض المدخلات المحلية والأصناف الهجينة من الكوسا والبطيخ الأصفر/الشمم للإصابة بفيروس الموزاييك الأصفر للكوسا (ZYMV) وتقدير الفاقد في الإنتاج الثمري. مجلة وقاية النبات العربية، 29: 245-252.
- المولى، عبد الكريم قاسم جبر. 1984. تشخيص ودراسة الأهمية الاقتصادية للفيروس المسبب لمرض موزاييك الفلفل في العراق. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة بغداد، العراق. 64 صفحة.
- Al-Fahad, Maadh A. 2018. Molecular diagnosis and determine effect of cultivars, dates of planting and geographic locations in percentage and severity infection of *Begeminviridae*, *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) on tomato in five desert areas of Iraq. *Iraq Journal of Desert Studies*, 8: 8-18. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.12454.78401>
- Bargabus, R.L., N.K. Zidack, J.E. Sherwood and B.J. Jacobsen. 2002. Characterization of systemic Resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic phyllosphere-colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 66: 289-298. <https://doi.org/10.1006/pmpp.2003.0443>
- Bhagavathy, S., P. Sumathi and J.S. Bell. 2011. Algae *Chlorococcum humicola*-a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1: S1-S7 [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60111-1](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60111-1)
- FAO. 2011. Production yearbook, Food and Agriculture Organization of the United Nation, Rome Italy. <http://www.fao.org/home/en/>
- Fischer, R.A. and R. Maurer. 1978. Drought resistance in spring wheat cultivars: I- Grain yield responses. *Australian Journal of Agricultural Research*, 29: 897-912. <https://doi.org/10.1071/AR9780897>
- Holliday, J., P. Cleaver, M.L. Power and D. Patel. 2004. Analysis of quality and techniques for hybridization of medicinal fungus *Cordyceps sinensis*. *International Journal of Medical Mushrooms*, 6: 147-160.
- Jensen, E. 2004. Seaweed, fact or fancy. From the organic broadcaster, Published by Moses the Midwest Organic and Sustainable Education, From the Broadcaster, 12: 164-170.
- Kim, S.K. and F. Karadeniz. 2011. Anti-HIV Activity of extracts and compounds from marine algae. *Advances in Food and Nutrition Research*, 64: 255-265. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387669-0.00020-X>
- Kuwada, K. 2006. Effect of red and green algal extracts on hypha growth of arbuscular fungi and on mycorrhizal development and growth of Papaya and Passionfruits. *Agronomy Journal*, 98: 1340-1344. <https://doi.org/10.2134/agronj2005.0354>
- ثلج، خلف عطية محمد. 2013. التشخيص الجزيئي والمقاومة الحيوية لفيروس موزاييك الفاصوليا الأصفر على الباقلاء في محافظة صلاح الدين. رسالة ماجستير. كلية الزراعة، جامعة تكريت، العراق. 87 صفحة.
- الجميلي، عمر جاسم محمد وسمير عبد علي العيساوي. 2016. تأثير الرش بـ *Brassinolide* ومستخلص الطحالب *Tecamin* في صفات النمو والإنتاج لأشجار التفاح صنف Anna. مجلة العلوم الزراعية العراقية، 47: 1225-1234.
- حسن، أحمد محمد وجمعة فاروق فرج. 2013. تأثير التقليم والرش ببعض محفزات النمو في صفات النمو الخضري لشتلات اللانكي صنف Clementine. مجلة الفرات للعلوم الزراعية، 5: 244-225.
- حسن، عبد المنعم صادق. 2004. تكنولوجيا الجينات، مكتبة أوزيريس، قصر النيل، القاهرة، مصر. 364 صفحة.
- الدليمي، بشير حمد عبد الله وعبده الله ماجد عبد الحميد المحمدي. 2014. تأثير الرش بالحديد والبورون في صفات النمو لصنفين من فول الصويا *Glycine max* (L.) Merrill. مجلة الأنبار للعلوم الزراعية 12: 218-223.
- عايد، بسمة ضباب ومعاذ عبد الوهاب الفهد. 2018. التشخيص الجزيئي والمقاومة الطبيعية للعزلة المحلية من فيروس فسيفساء الطماطة (ToMV) على محصول نباتات الفلفل. مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية، 18: 21-31.
- عايد، بسمة ضباب. 2018. تأثير مستحضري *Spirulina ganodermalucidum* والبكتريا *Bacillus Subtilis* في مقاومة نبات الفلفل ضد فيروس موزاييك الطماطة *Tomato mosaic virus* (ToMV). رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة تكريت، العراق. 103 صفحة.
- عبد الجبار، فرح عبد الستار. 2012. استحثاث المقاومة في نباتات الطماطة ضد فيروس موزاييك الطماطة *Tomato mosaic virus* بواسطة البكتريا *Pseudomonas fluorescens*. مجلة الأنبار للعلوم الزراعية، 10: 331-339.
- عبد الحافظ، احمد ابو اليزيد. 2011. استخدام مستخلصات الطحالب والأعشاب البحرية في تحسين نمو الحاصلات البستانية: خطوة نحو منظومة زراعية مستدامة. مجلة شمس الزراعية، العدد 122.
- الفهد، معاذ عبد الوهاب عبد العالي. 2006. دراسة تشخيصية والأهمية الاقتصادية والمقاومة لفيروس تقزم واصفرار الشعير *Barly yellow dwarf virus*. اطروحة دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة بغداد، العراق. 204 صفحة.
- الفهد، معاذ عبد الوهاب وسامي عبد الرضا الجميلي. 2011. تأثير بعض منظمات النمو النباتية في حماية محصول الطماطة *Nicotiana tabacum* والتبغ *Lycopersicon esculentum* الإصابة بفيروس فسيفساء التبغ *Tobacco mosaic virus* (Tobamovirus, TMV). المؤتمر العلمي الخامس، كلية الزراعة، جامعة تكريت، 26-27 نيسان/أبريل 2011.
- محسن، عامر سعد. 2018. إنتاج مستحضر أحيائي من لقاح بكتريا *Rhizobium* sp. لمقاومة فيروس فسيفساء اللوبيا الشديد على ثلاثة أصناف من اللوبيا في محافظة صلاح الدين. رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة تكريت.
- محمد، عبد الرحيم سلطان. 2009. تأثير التسميد النيتروجيني والرش بمستخلصات الأعشاب البحرية في النمو والحاصل لنبات الخيار. مجلة ديالى للعلوم الزراعية 1: 134-145.

extract to moderate the negative effects of alternate bearing in Apple trees. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 84: 131-137.

<https://doi.org/10.1080/14620316.2009.11512610>

Stewart, D.W. and L. Dwyer. 1999. Mathematical characterization of leaf shape and area of maize hybrids. *Crop Science*, 39: 422-427.

<https://doi.org/10.2135/cropsci1999.0011183X003900200021x>

Williams, L.E. and L.J. Alexander. 1965. *Maize dwarf mosaic*, a new corn disease. *Phytopathology*, 55: 802-804.

Neishaburi, F.S.M., M. Masumi, S. Nasrollanejad, N. Rahpeymasarvestani and K.N. Izadpanah. 2015. Analyses of complete nucleotide sequence of Iranian isolate of maize dwarf mosaic virus (MDMV) and notes on the origin and evolution of MDMV. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 51: 70-81.

Rania, M.A. and H.M. Taha. 2008. Evaluation of Medium components by plackett-Burman design for Antimicrobial activity of Cyanobacteria (*Spirulina platensis*). *Global Journal of Biotechnology*, 3: 22-31.

Spennle, F., G. Fiori, M. Noferini, M. Sproccati and G. Costa. 2009. Perspective on the use of a seaweed

Received: July 30, 2018; Accepted: January 8, 2019

تاريخ الاستلام: 2018/7/30؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2019/1/8