

التشخيص الجزيئي لفيروس موزايك الخيار ومكافحته أحياناً بالطحلب *Spirolina platensis* والبكتيريا *Pseudomonas fluorescens* وبعض مستخلصات النباتات الطبية تحت ظروف الزراعة المكشوفة

معاذ عبد الوهاب الفهد، محمد غازي عبد المجيد وعقيل نجم عبود

قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة تكريت، تكريت، العراق، البريد الإلكتروني: maadhdf@gmail.com

الملخص

الفهد، معاذ عبد الوهاب، محمد غازي عبد المجيد وعقيل نجم عبود. 2020. التشخيص الجزيئي لفيروس موزايك الخيار ومكافحته أحياناً بالطحلب *Spirolina platensis* والبكتيريا *Pseudomonas fluorescens* وبعض مستخلصات النباتات الطبية تحت ظروف الزراعة المكشوفة. مجلة وقاية النبات العربية، 38(2): 137-148.

أجريت الدراسة في منطقة الحويش التابعة لقضاء سامراء، محافظة صلاح الدين للعروة الخريفية 2017/2018، بهدف تشخيص عزلة محلية لفيروس موزايك الخيار (*Cucumber mosaic virus*, CMV، جنس *Cucumovirus*، عائلة *Bromoviridae*) وتقويم التأثير المرضي، ومعرفة استجابة ثلاثة أصناف من الخيار له، ومكافحته أحياناً. أظهرت نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل مع النسخ العكسي (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) أن سلالة الفيروس المستخدمة في الدراسة تعود إلى فيروس موزايك الخيار، حيث ظهرت حزمة من خلال عملية الترحيل الكهربائي قدرها 207 زوج قاعدي والتي تشابهت مع العزلة الباكستانية العائدة للفيروس نفسه. قومت كفاءة ثلاثة عوامل طبيعية من مستخلصات نباتية الألبيزيا *Albizia lebbek* (L.) و عرق السوس *Glycyrrhiza glabra* (L.) والسيبان (*Parkinsonia aculeata* L.) والمكمل الغذائي من الطحلب سبيرولينا *Spirolina platensis* وبكتيريا *Pseudomonas fluorescens*. تفوقت معاملة التداخل بين الطحلب والبكتيريا وبلغت نسبة الإصابة 30.00% وشدة الإصابة 16.20% للمعاملة نفسها بالمقارنة مع معاملة الشاهد التي بلغت فيها نسبة الإصابة 100.00% وشدة الإصابة 14.93%. وتفوقت معاملة التداخل بين الطحلب والبكتيريا في إعطاء أعلى نسبة لكمية اليخضور/الكلوروفيل التي بلغت Spad 31.70 بالمقارنة مع معاملة الشاهد التي بلغت Spad 11.23. أدت معاملة التداخل بين الطحلب والبكتيريا إلى زيادة المساحة الورقية لسنف بيت الفا حيث بلغت 30.55 سم² مقارنة مع معاملة الشاهد والتي بلغت 22.51 سم². أما بالنسبة للحاصل، يبين النتائج تفوق المعاملة التكاملية بين طحلب *S. platensis* وبكتيريا *P. fluorescens* حيث بلغ الحاصل 1147.0 غ/نبات لسنف نجم، والقيمة الأقل كانت لمعاملة التداخل بين مستخلص الألبيزيا وطحلب السبيرولينا لسنف الخيار غزير وبلغت 420.5 غ/نبات، في حين كان حاصل معاملة الشاهد 390.8 غ/نبات.

كلمات مفتاحية: فيروس موزايك الخيار، CMV، *Pseudomonas fluorescens*، *Spirolina platensis*، تفاعل البلمرة المتسلسل مع النسخ العكسي.

المقدمة

الانتقال (Agrios، 2005). ويعد فيروس CMV عالمي الانتشار، وبخاصة في المناطق المعتدلة (Ferrira & Boley، 1992). قد تصل الخسائر التي تسببها الإصابة بهذا الفيروس حوالي 90% من المحصول (الجهاز المركزي للإحصاء وتكنولوجيا المعلومات، 2011). لهذا الفيروس مدى عوالم واسع، حيث يمكن أن يصيب أكثر من 800 نوع نباتي، تابعة لحوالي 40 عائلة (Ferrira & Boley، 1992). اعتمدت طرائق عديدة لتشخيص الفيروسات وكانت سابقاً تعتمد على الأعراض التي تظهر على النباتات الكاشفة (Mathews، 2002). مروراً بطرائق النقل واستخدام الاختبارات المناعية وانتهائها بالتقانات الجزيئية ومنها تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase Chain Reaction والتي تعد من الطرائق السريعة والدقيقة جداً للكشف عن الفيروسات

يعد نبات الخيار (*Cucumis sativus* L.) من النباتات التي تعود إلى العائلة القرعية (*Cucurbitaceae*)، وهو أحد المحاصيل الخضرية الصيفية التي تزرع في العراق ويتوافر طول السنة من خلال استخدام النمط الزراعي المكشوف والمحمي (Lower & Edwards، 1986). تبلغ مساحة الخيار المزروعة في العراق 11764 هكتاراً بإنتاج قدره بـ 149074 طناً وإنتاجية قدرها 12691 كغ/هكتار. ينتمي فيروس *Cucumber mosaic virus* (CMV) إلى الجنس *Cucumovirus*، جسيماته كروية متناظرة -غير مغلقة، قطرها 29 نانومتراً. وللفيروس عدة سلالات تختلف فيما بينها من حيث العوائل وأعراض الإصابة وطرائق

الإراضية ومعايير النمو والحاصل لنباتات الخيار وتقويم الفعالية الحيوية لمستخلصات ثلاثة نباتات طبية (عرق السوس والسيبان واللبيزيا).

مواد البحث وطرقه

جمع العينات النباتية المصابة وتأكد وحود الفيروس وانتشاره

تم الحصول على عينات من نباتات الخيار مصابة بفيروس CMV من مختبر الفيروسات - كلية الزراعة - جامعة تكريت مشخصة من قبل معاذ عبدالوهاب الفهد، كما تم الحصول على عينة أخرى من مختبر الأمراض - كلية الزراعة - جامعة بغداد مشخصة من قبل نورس عبدالله الكويثي. أُجريت زراعة نبات الخيار صنف بيت الفا ونبات الطرعوزي/الفقوس (*Cucumis melo flexuosus*) والبطيخ/الشمام (*Cucumis melo var. cantalupensis*) بمنطقة الحويش - سامراء لمعرفة وجود الفيروس وانتشاره، حيث سجلت أعراض ظاهرية واضحة بدون عملية التلقيح الميكانيكي، فظهرت أعراض الموزايك لفيروس CMV على نبات الطرعوزي والبطيخ/الشمام والخيار (*Cucumis sativus*).

التشخيص الجزيئي لفيروس موزايك الخيار

شخصت العزلة المحلية جزيئياً عن طريق تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل مع النسخ العكسي وحسب الخطوات الآتية والتي تم الحصول عليها من الشركة المنتجة لكت التشخيص (BIO NEER) والتي تضمنت الخطوات الرئيسية التالية: (1) عزل الحامض النووي الفيروسي الكلي، (2) قياس نقاوة وتركيز الـ RNA الكلي، (3) مضاعفة قطع الـ cDNA الفيروسي، (4) تحضير هلام الاكاروز وإجراء عملية الترحيل الكهربائي، (5) الكشف عن وجود الفيروس من خلال عملية الترحيل الكهربائي على هلام الأجاروز وبتركيز 1% وحسب بروتوكول الشركة المنتجة.

النباتية بالمقارنة مع الاختبارات الأخرى (Menzel et al., 2003). عوامل مختلفة (كائنات غير ممرضة، مسببات المرضية الضعيفة، المركبات الكيميائية والصناعية، المستخلصات النباتية، المكملات الغذائية العضوية) لها القابلية على تنشيط آليات دفاعية للنبات وتحفيز المقاومة ضد مسببات المرضية (Walters et al., 2005).

استخدمت طرائق جديدة لمقاومة الفيروسات وذلك باستخدام المكملات الغذائية الطبيعية ذات الفعالية التأثيرية بتحفيز الوسائل الدفاعية بالإضافة إلى الجانب الوقائي واختزال معايير الإصابة وزيادة مؤشرات النمو والحاصل (عايد والفهد، 2018). وجد أن مستخلصات نباتات الفلفل والجيرانيوم والداتور لها القدرة على استحثاث المقاومة ضد الإصابة الفيروسية، كذلك تعمل كمثبطات للإصابة عند خلطها مع الفيروس CMV. ولوحظ بأنها تحتوي مركبات ذات أوزان جزيئية منخفضة أو مرتفعة تمتلك فعالية ضد فيروسية (Apablaza & Bernier, 1972)؛ (Cheesin et al., 1994). وكذلك استخدمت بدائل المبيدات الكيماوية مثل المستخلصات النباتية لحماية الإنتاج النباتي من الأمراض التي تسببها الكائنات الفطرية والبكتيرية والفيروسية والنيماطودا، حيث تسبب خسائر كبيرة للاقتصاد أثناء موسم النمو أو في مراحل بعد الحصاد، بالإضافة لظهور أشكال مختلفة من المقاومة المكتسبة في الفطور الممرضة (فرانيسكو، 2006). وتوصل الجنابي (1984) من خلال اختبار له لتأثير 10 مستخلصات نباتية من ضمنها عرق السوس أظهرت فعالية عالية جدا لتنشيط الفيروس TYLCV حيث بلغت 100% ولجميع التراكيز المستعملة.

أجريت هذه الدراسة بهدف عزل والتشخيص الجزيئي للعزلة المحلية لفيروس CMV بوساطة اختبار RT-PCR واختبار استجابة ثلاثة تراكيب وراثية من محصول الخيار ضد فيروس CMV وتقويم كفاءة المكمل الغذائي الطبيعي المنتج من طحلب *Spirulina sp.* والتلقيح بالبكتيريا *P. fluorescens* في نسبة وشدة الإصابة بفيروس CMV وبعض المؤشرات

جدول 1. البادئات التي تم استخدامها لتشخيص فيروس موزايك الخيار بوساطة اختبار تفاعل البوليمراز المتسلسل (Shomaila et al., 2017).
Table 1. Primers used to diagnose the Cucumber mosaic virus by the PCR test (Shomaila et al., 2017).

حجم الحزمة المضخمة Size of amplified band	التركيز Concentration	تتابع القواعد Bases sequence	موقع التواجد Genomic site
191 bp	100 Pmol/μl	ACAAAAGTCCCAGCGAGAGA GGCGAACCAATCTGTATCGT	2b protein
218 bp	100 Pmol/μl	AACCAGTCTGGTCGTAACC TTGGTGGCTTCAGGGTAATC	3b CP
233 bp	100 Pmol/μl	TGATTCTACCGTGTGGGTGA CGAGTGCATCGTCTTTTGA	3b CP
207 bp	100 Pmol/μl	TGATTCTACCGTGTGGGTGA AGCACGGCGTACTTTCTCAT	3bCP

تجهيز المواد الطبيعية المستخدمة في المعاملات

(1) **السيبرولينا:** تم الحصول على المكمل الغذائي المتمثل بالطحلب *Spirulina platensis* من شركة DXN الماليزية، حيث أخذ 24 حبة سيبرولينا اي ما يعادل 6 غ سيبرولينا طحنت ووضعت في 54 مل ماء مقطر، كل 1 غ اضيف له 9 مل ماء مقطر.

(2) **مستخلص البكتيريا:** تم الحصول على عزلة بكتيريا *Pseudomonas florescence (Pf)* من المبيد الحيوي Bactvipe مجهز من شركة International Panacea Ltd الهندية. حضرت أطباق بتري معقمة وجاهزة وتم تعقيم جهاز العزل (Hood) وحضر الأجار المغذي وتمت عملية اختبار حيوية المنتج من خلال تنميته على وسط الأجار المغذي بإضافة 1 سم من البكتيريا *Pf* المشخصة مسبقاً في الأطباق وحضن الوسط بالحاضنة لمدة 72 ساعة عند 38 °س ولوحظ أن نسبة نمو المستعمرات البكتيرية وصلت إلى 100% من الأطباق المستعملة في الزراعة وأن التخفيف الأسرع نمواً والافضل هو التخفيف 10×10^{-6} من المستحضر الحيوي حيث أخذ الطبق وأضيف إلى دورق زجاجي فيه ماء مقطر سعة 250 مل وتم إكماله إلى 500 مل لتتقبع البذور فيه.

(3) **المستخلصات النباتية (السيبان والالبيزيا وعرق السوس):** استخدمت طريقة الاستخلاص المائي للحصول على المركبات الفعالة في نبات عرق السوس وتمت هذه الطريقة حسب ما وصفت سابقاً (العجيلي، 2005) حيث أخذ 10 غ مستخلص أوراق بعد التجفيف وطحنت جيداً وأضيفت إلى 50 مل ماء مقطر عند حرارة 90-100 °س لمدة 3 دقائق ثم برد المستخلص وتم ترشيحه باستخدام قماش الململ/الشاش للحصول على المواد الفعالة ثم نفعت بذور المعاملات في هذا المستخلص وكررت الطريقة نفسها على باقي المستخلصات.

المعاملات الحقلية

تضمنت التجربة 17 معاملة بثلاثة أصناف وتم تكرارها ثلاث مرات وشملت المعاملات الرئيسية التالية مع تداخلاتها:

1. المعاملة بمستخلص أوراق الالبيزيا ورمز لها في البحث بـ A + تلقح CMV،
2. المعاملة بمستخلص عرق السوس ورمز لها في البحث بـ B + تلقح CMV،
3. المعاملة بمستخلص أوراق السيبان ورمز لها في البحث بـ C + تلقح CMV،
4. المعاملة بالبكتيريا *Pseudomonas fluorescens* ورمز لها في البحث بـ Pf + تلقح CMV،

5. المعاملة بالطحلب *Spirulina platensis* ورمز لها في البحث بـ S + تلقح CMV، مع معاملتين للشاهد، الأولى لنباتات سليمة غير معاملة والثاني لنباتات مصابة بالفيروس فقط.

طرائق المعاملة بالمواد المستخدمة بالتجربة

- (1) **الالبيزيا:** تمت معاملة البذور التي تم إعدادها في التجربة حسب المخطط وذلك بنقع 20 بذرة لكل خط مع 20 مل من المستخلص، لمدة 24 ساعة ثم زرعت في الحقل مباشرة حسب المخطط المعد للتجربة، أما المعاملة الثانية فكانت بالرش فقط عند الورقة الحقيقية الثالثة والرابعة وذلك بعد طحن أوراق الالبيزيا 5 غ ووضعها في لتر ماء مقطر وخلطت جيداً بالتحريك المستمر، أما المعاملة الثالثة فكانت عند بداية التزهير بالطريقة نفسها للمعاملة الثانية. واستعملت الطريقة نفسها أعلاه لتحضير معاملات عرق السوس والسيبان.
- (2) **السيبرولينا:** حُضِرَ المعلق للطحلب وذلك بإضافة 1 غ من مسحوق الطحلب *S. platensis* إلى 9 مل من الماء المعقم المقطر ونقع 20 بذره فيه لمدة 24 ساعة، المعاملة الثانية كانت بالرش عند مرحلة التزهير.
- (3) **بكتيريا Pf:** تمت معاملة البذور التي تم إعدادها للزراعة كما في مخطط التجربة وذلك عن طريق نقع 20 بذرة في التركيز 10×10^{-6} المعد مسبقاً في التجربة المختبرية، لمدة 24 ساعة، المعاملة الثانية كانت بالرش عند مرحلة التزهير.

الإلحاق بالعزلة المحلية لفيروس CMV

استخدمت الطريقة نفسها التي ذكرت سابقاً (قاسم ومحمود، 2012) في إلقاح النباتات بالفيروس، إذ قطعت الأوراق الغضة الحديثة من النبات مصدر الفيروس والتي ظهرت عليها أعراض الموزاييك بشكل واضح. قطعت أنصال الأوراق بشكل قطع صغيرة بهاون خزفي، وتم إزالة العروق الكبيرة، وإضيف 34 مل ماء مقطر لـ 17 غ عينة نباتية مصابة (حجم: وزن). سحقنا الأوراق جيداً بوساطة خلاط كهربائي للحصول على مستخلص نباتي متجانس، ثم رشح المستخلص من خلال قماش الململ فوق الدورق ولقحت النباتات السليمة بمرحلة 2-4 أوراق حقيقية، بعد التأكد من خلوها تماماً من أي أعراض مرضية. بعدها عفر السطح العلوي لأوراق النباتات بشكل كامل وبكمية مناسبة من مادة الكاربوراندوم، وغمرت إصبع السبابة باللقاح وأسندت الورقة بكف اليد الأخرى بحيث يستلقي النصل على راحة الكف، وتم مسحه باللقاح لمرة واحدة، وبقوة ضغط متوسطة، ثم غسلت الأوراق لتي تم تلقحها فوراً بتيار ماء بوساطة مرشاة يدوية صغيرة خاصة للغسل لمدة 10 ثوان لإزالة أثر المادة الخادشة

واللقاح، ونقلت بعدها النباتات إلى البيت البلاستيكي وتمت متابعتها يومياً حتى وظهور الاعراض المرضية.

اعتمد سلم لمعامل الإصابة (شكل 1) والمكون من ست درجات لمعرفة تطور الأعراض الظاهرية على النباتات وقد حسبت عن طريق عدد النباتات المصابة لكل درجة وتم تطبيق معادلة Mckinney (1923) كالتالي:

حساب نسبة الإصابة وقياس معامل الإصابة بفيروس CMV

استخدمت المعادلة التالية لحساب نسبة الإصابة لكل مكرر:

$$100 \times \frac{\text{عدد النباتات من الدرجة } 0 \times 0 + \dots + \text{عدد النباتات من الدرجة } 5 \times 5}{\text{العدد الكلي للنباتات المفحوصة} \times 5} = \text{معامل الإصابة \%}$$

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



شكل 1. السلم المرضي المستخدم لتقويم شدة إصابة نبات الخيار بفيروس موزايك الخيار. 0= سليم، 1= موزايك خفيف، 2= موزايك شديد على الأوراق، 3= بداية موزايك شديد والتفاف الأوراق، 4= اصفرار وموزايك شديد والتفاف للأوراق، 5= موزايك شديد والتفاف الأوراق مع تشوهات واختزال المساحة الورقية.

Figure 1. Disease scale used for assessing severity of cucumber infection with CMV. 1= Healthy, 2= Mild mosaic on the leaf, 3= Severe mosaic and leaf rolling, 4= Yellowing and severe mosaic and severe leaf rolling, 5= Severe mosaic and leaf rolling with malformation and reduction in leaf blade area.

النتائج والمناقشة

القياسات الحقلية

قيست كمية الكلوروفيل الكلي بوساطة جهاز Chlorophyll Meter نوع Spad وذلك بأخذ ثلاثة أوراق من كل نبات، اخذت من الاعلى ومن الاسفل في وقت واحد ومن كل مكرر، وقدر محتواها من الكلوروفيل وبعدها اخذ معدل القراءات الثلاث.

قيست المساحة الورقية بأخذ ثلاثة أوراق من كل نبات من الاعلى والوسط والاسفل لكل مكرر ثم وزنت، تم قطع قرص من كل ورقة، بعدها وزنت الاقراص المقطوعة، وطبقت المعادلة الآتية لحساب المساحة الورقية الموصوفة من قبل (Dovrnic, 1965):

$$\frac{\text{وزن الورقة} \times \text{قطر القرص}}{\text{وزن القرص}} = \text{المساحة الورقية}$$

قدرت كمية الحاصل الكلي (غ) عن طريق جني كل معاملة على حدة ووزنت بوساطة ميزان عادي وحسب الحاصل لكل نبات ولكل مكرر وبطريقة تراكمية.

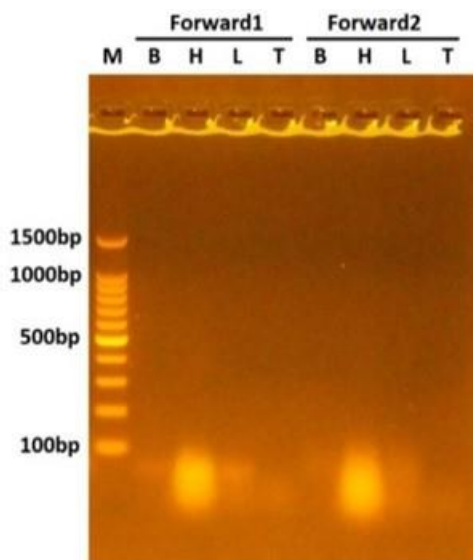
التشخيص الجزيئي لفيروس CMV

عزل الحامض النووي من أوراق نباتات الخيار المصابة بفيروس CMV بنجاح، وتم الحصول على كمية كافية من الحمض النووي الريبي (RNA) باستخدام العدة الجاهزة (Kit) تراوحت بين 12.696 و 7.420 نانوغرام/مايكروليتر وكانت درجة النقاوة مقبولة (حيث كانت نسبة إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية عند موجة 260 نانوميتر إلى الامتصاص نفسها عند موجة 280 نانوميتر 1.71) وجاءت تلك النتيجة بعد محاولات متكررة بسبب أن عملية عزل الحامض النووي RNA أكثر صعوبة من عزل الـ DNA لأنه حساس للتكسير عن طريق انزيمات الـ RNase ويحتاج ذلك أخذ عدد من الإحتياطات (حسن، 2004).

تفاعل البوليمراز المتسلسل

اثبتت المحاولات المتعددة لإجراء التفاعل الخاص الذي استخدم في الكشف عن الحامض النووي الريبي المنزوع الأوكسجين المكمل (cDNA) والذي ينتج من نسخ عكسي للـ RNA الفيروسي إلى cDNA

تأثير المعاملات في نسبة الإصابة المئوية إذ بلغت أدنى نسبة إصابة في معاملة بكتيريا Pf وكانت 49.22%، مقارنة بمعاملة الشاهد التي بلغت 100%. أظهرت النتائج عدم وجود فروق عالية المعنوية فيما بين الأصناف، إلا أن صنف بيت الفا أعطى أدنى نسبة إصابة (52.17%) مقارنة بباقي الأصناف. أما بشأن التداخل بين المعاملات والأصناف فقد أوضحت النتائج وجود فروق معنوية فيما بينها وكانت أقل نسبة إصابة في معاملة التداخل بين طحلب *S. platensis* والبكتيريا Pf لصنف غزير حيث بلغت 30.00%، بينما أعطت معاملة الشاهد لجميع الأصناف أعلى نسبة إصابة، حيث بلغت 100%.

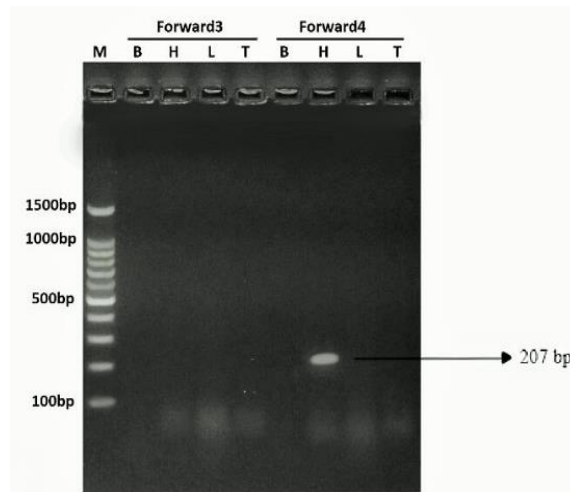


شكل 3. نتيجة الكشف الجزيئي عن العزلة المحلية لفيروس CMV باستخدام تفاعل البوليمراز المتسلسل والبادئات Forward 1 و Forward 2. M = الدليل الحجمي، H = يرمز لنبات الخيار، B = يمثل نبات الفلفل، L = يمثل نبات البندورة/الطماطم، T = يرمز لنبات الطرغوزي. **Figure 3.** Results of molecular detection of CMV by PCR using the primers Forward 1 and Forward 2. M= Molecular weight ladder, H= cucumber plant, B= pepper plant, L= tomato plant, T= tarose plant.

قد يعزى سبب تفوق معاملة التداخل بين الطحلب والبكتيريا Pf إلى أن طحالب السبيرولينا تحتوي مركبات حيوية لها تأثير مضاد حيوي للعديد من الأحياء المجهرية وبضمنها الفيروسات، وجاءت نتائج هذه الدراسة متوافقة مع ما توصل إليه *Bhagavathy et al.* (2011). وقد يعزى ذلك لتأثير البكتيريا بتحسين وزيادة سرعة النمو في النباتات والمساهمة في تقليل الزمن الذي يمكن أن تؤدي الإصابة خلاله إلى تطور الأعراض للفيروس وبالتالي هروب النبات من الإصابة الشديدة ويتوافق هذا مع ما ذكره *Murphy et al.* (2003).

باستخدام تقنية RT-PCR بأن نباتات الخيار المصابة والتي ظهرت عليها أعراض مرضية تختلف حسب مرحلة النمو والصنف، كانت تحتوي على فيروس موزايك الخيار.

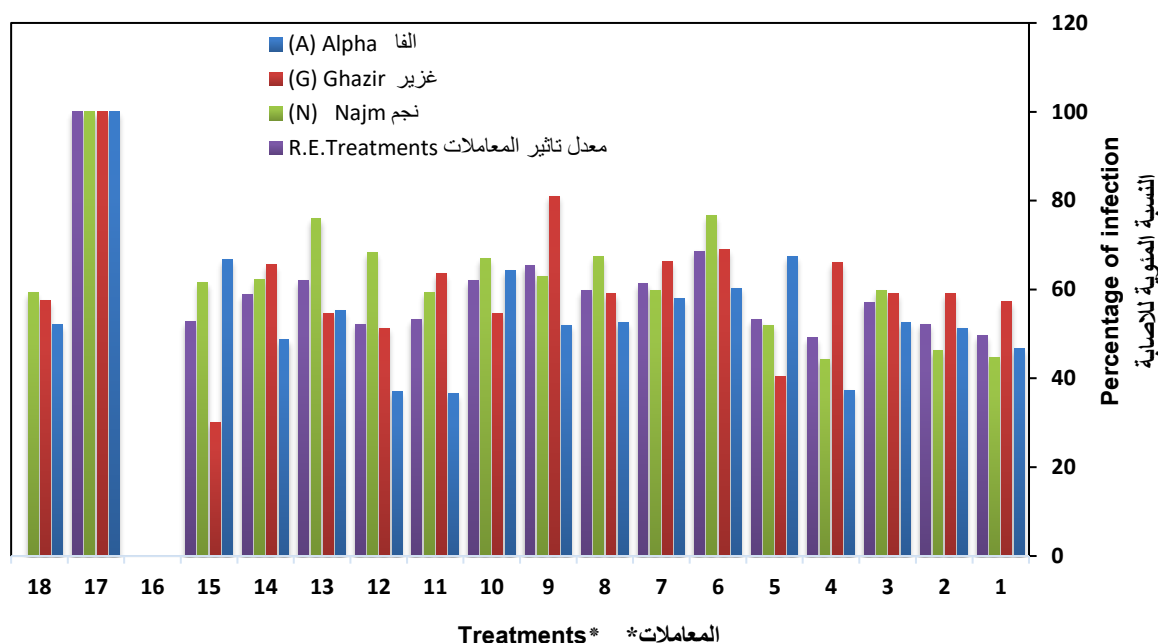
أمكن تضخيم القطع المستقيمة لجين الغلاف البروتيني الموجود في مجين الفيروس باستخدام زوج البادئات الرابع (4 Forward H)، حيث أظهر التفاعل حزمياً واضحة بحجم 207 زوج قاعدي، وكما هو موضح في شكل 2، أما البادئات Forward 1، Forward 2، و Forward 3 فلم تظهر أي تضخيم (شكل 2 و 3). تتماثل هذه النتيجة لاختبار التشخيص الجزيئي مع ما توصل إليه *Shomaila et al.* (2017) في منطقة روالبندي، باكستان وهذا يدل على وجود تقارب كبير بين العزلة المذكورة في منطقة الحويش، قضاء سامراء، صلاح الدين مع العزلة الباكستانية (*Shomaila et al.*, 2017) واختلفت عن العزلات في مناطق البنجاب والسند والاقليم الحدودي الشمالي الغربي واسلام اباد وبلوشستان.



شكل 2. نتيجة الكشف الجزيئي عن العزلة المحلية لفيروس CMV باستخدام تفاعل البوليمراز المتسلسل والبادئات Forward 3 و Forward 4. M = الدليل الحجمي، H = يرمز لنبات الخيار، B = يمثل نبات الفلفل، L = يمثل نبات البندورة/الطماطم، T = يرمز لنبات الطرغوزي. **Figure 2.** Results of molecular detection of CMV by PCR using the primers Forward 3 and Forward 4. M= Molecular weight ladder, H= cucumber plant, B= pepper plant, L= tomato plant, T= tarose plant.

تقويم فعالية بعض العوامل الأحيائية في تحفيز مقاومة النباتات ضد فيروس CMV على أصناف نباتات الخيار

تأثير المعاملات المستخدمة في النسبة المئوية للإصابة في النباتات - أظهرت نتائج التحليل الإحصائي (شكل 4) وجود فروق معنوية بين معدل



شكل 4. تأثير المعاملات المستخدمة في النسبة المئوية للإصابة بفيروس CMV على ثلاثة أصناف من الخيار. *المعاملات: 1= معاملة الألبيزيا *Albizia lebbek* (A); 2= معاملة عرق السوس *Glycyrrhiza glabra* (B); 3= معاملة السيسان *Parkinsonia aculeata* (C); 4= معاملة بكتيريا *Pseudomonas fluorescense* (Pf); 5= معاملة طحلب السبيرولينا *Spirulina platensis* (S); 6= التداخل بين A&B؛ 7= التداخل بين A&C؛ 8= التداخل بين A&Pf؛ 9= التداخل بين A&S؛ 10= التداخل بين B&C؛ 11= التداخل بين B&Pf؛ 12= التداخل بين B&S؛ 13= التداخل بين C&Pf؛ 14= التداخل بين C&S؛ 15= التداخل بين Pf&S؛ 16= الشاهد بدون إصابة؛ 17= الشاهد المصاب بالفيروس؛ 18= معدل تأثير الأصناف.

Figure 4. Effect of different treatments used on CMV incidence (%) on three cucumber varieties. *Treatments: 1= *Albizia lebbek* (A); 2= *Glycyrrhiza glabra* (B); 3= *Parkinsonia aculeata* (C); 4= *Pseudomonas fluorescense* (Pf); 5= *Spirulina platensis* (S); 6= Interaction A&B; 7= Interaction A&C; 8= Interaction A&Pf; 9= Interaction A&S; 10= Interaction B&C; 11= Interaction B&Pf; 12= Interaction B&S; 13= Interaction C&Pf; 14= Interaction C&S; 15= Interaction Pf&S; 16= Healthy Control; 17= Infected Control; 18= R.E. Varieties.

فعالية عالية لتثبيط فيروس اصفرار وتجعد أوراق البندورة/الطماطم حيث بلغت 100%.

يمكن تفسير تفوق معاملة التداخل بين طحالب السبيرولينا *S. platensis* وبكتيريا Pf إلى أن الطحالب تمتلك مواد غنية بالبروتينات والفييتامينات والمعادن بالإضافة إلى الأحماض الدهنية ومتعدد الفينولات والسكريات وتحتوي على الأصباغ مثل الكاروتينات والكلوروفيل التي من شأنها تحفيز نمو ومقاومة النباتات لمسببات الأمراض وهذا يتفق مع ما نشر سابقاً (Usharani et al., 2015؛ Abbassy et al., 2014).

جاءت نتائج هذه الدراسة متوافقة مع ما توصل إليه Kim & Kim (1999) بأن بكتيريا Pf تحفز المقاومة الجهازية للنباتات ضد الأمراض، وكذلك مع ما أشارت إليه دراسات أخرى (El-DougDoug et al., 2013؛ Murphy et al., 2003؛ Ryu et al., 2004)، وربما بآليات مختلفة أقربها للتفسير أن البكتيريا Pf التي تم عزلها من الجذور ذات أهمية كبيرة كمحفز نمو وتعد من عناصر المكافحة الأحيائية لمسببات أمراض النبات، واستعملت هذه البكتيريا في استحثاث المقاومة للنباتات ضد الفيروسات (محسن، 2018). أكدت عدة دراسات أن بكتيريا Pf تعمل

قياس معام الإصابة للنباتات بتأثير المعاملات

أشارت النتائج (شكل 5) إلى وجود تأثير معنوي في معام الإصابة بالفيروس بين المعاملات إذ بلغت أدناها 20.57% في المعاملة التكاملية بين مستخلص عرق السوس وبكتيريا Pf، بينما أعطت معاملة الشاهد أعلى نسبة لمعام الإصابة إذ بلغت 27.43%. أما بالنسبة لتأثير الأصناف فوجدت فروق معنوية بينها وكان معام الإصابة أدناها لصف بيت الفا (21.26%) مقارنة مع معاملة الشاهد (27.43%).

أما فيما يخص تأثير التداخل بين المعاملات، أعطت معاملة التداخل بين السبيرولينا *S. platensis* وبكتيريا Pf لصف غزير أدنى نسبة في معام الإصابة (16.20%)، تلتها معاملة الشاهد ولجميع الأصناف الأخرى (27.43%)، ويمكن تفسير ذلك بأن الكليسيريزين مع حامضه الموجودين في عرق السوس والتي لها فعالية مشابهة لفعالية الهرمونات الستيرويدية، أي تؤدي إلى زيادة في تكوين البروتينات (Tyler, 1993). كما توصل الجنابي (1984) من خلال اختباره لتأثير مستخلصات عشرة أنواع نباتية ومن ضمنها عرق السوس الذي اظهر

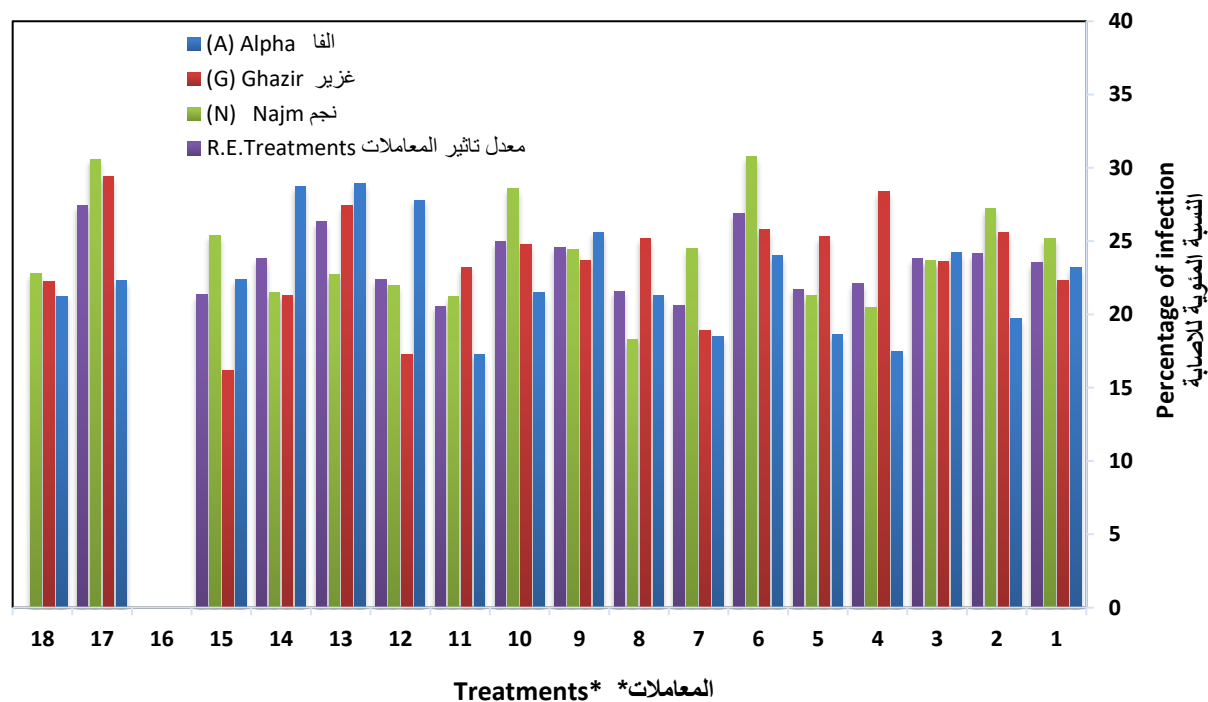
بين طحالب السبيرولينا *S. platensis* وبكتيريا Pf أعلى نسبة بكمية الكلوروفيل وبلغت Spad 31.70 بينما كانت معاملة التداخل بين الالبيزيا وعرق السوس هي الأدنى من بين المعاملات لصنف غزير إذ بلغت Spad 16.40، تلتها معاملة الشاهد إذ بلغت Spad 15.40.

قد يعزى سبب تفوق معاملة طحلب السبيرولينا وبكتيريا Pf إلى أن المعاملة بالبكتيريا لها دور كبير في تحفيز المقاومة الجهازية للنباتات وبالتالي يقلل من نسب التأثير للفيروس في كمية الكلوروفيل وهذا ما أكده الفهد (2012) حيث تعمل البكتيريا Pf من خلال الاختلاف في مقاومة الأصناف وأيضاً مدى التحمل للإصابة بالفيروس، وبينت عدة دراسات على احتواء الطحلب *S. platensis* منظمات نمو ومن أهمها السايكوبينينات التي تسهم بزيادة تصنيع الكلوروفيل وكذلك تعويض الخلل بالقواعد النيتروجينية نتيجة الإصابة بالفيروس كما وأشار إلى ذلك من قبل Mao *et al.* (2005). ويمكن ارجاع سبب تفوق الصنف بيت للفا إلى امتلاكه جينات تحمل صفات مقاومة لتأثير الفيروس على تحطيم البلاستيدات الخضراء (الفهد، 1999).

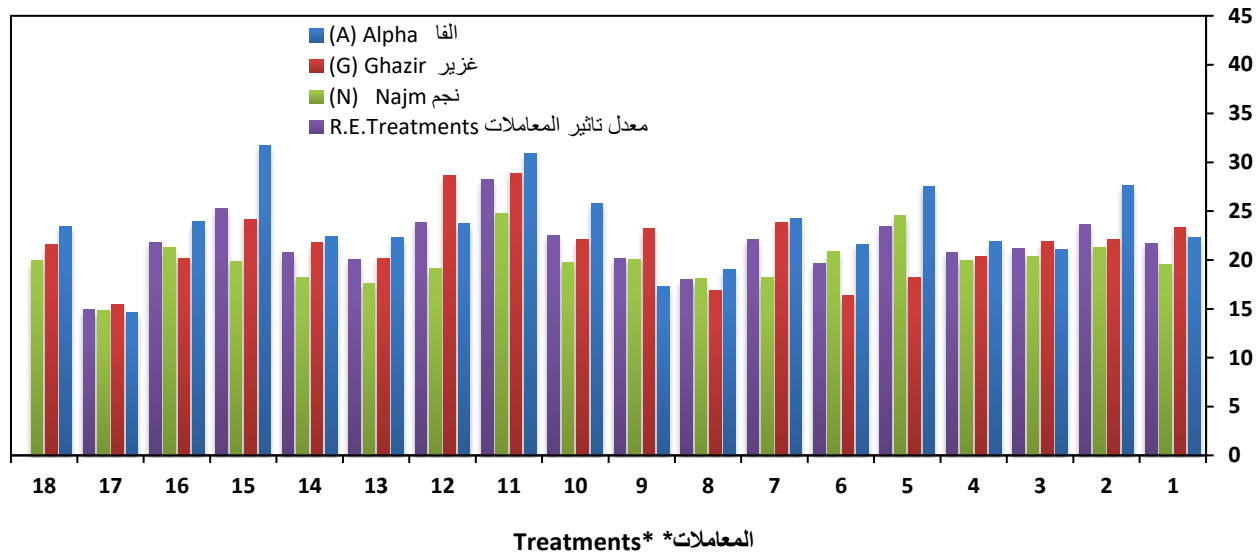
على تحفيز المقاومة الجهازية بالنبات وذلك بتحفيز النبات على إفراز أنزيمات متعددة تساعد في مقاومة الفيروس باليات متعددة ومن ضمنها تحليل الغلاف البروتيني للفيروس وايضا تساعد على إنتاج الفايثولكسينات التي بدورها تعتبر مركبات دفاعية داخل النبات (Figueiredo *et al.*, 2010؛ Glick *et al.*, 1999).

تأثير المعاملات المستخدمة في النسبة المئوية للكلوروفيل (Spad) لثلاثة أصناف من الخيار مصابة بفيروس CMV

يلاحظ من نتائج التحليل الإحصائي (شكل 6) وجود فروقات معنوية في معدل تأثير المعاملات المختلفة في النسبة المئوية للكلوروفيل، وان اعلى قيمة اعطتها معاملة التداخل الثنائي بين مستخلص أوراق عرق السوس وبكتيريا Pf بلغت Spad 28.2 واختلفت معنوياً عن المعاملات الاخرى وتلتها معاملة الشاهد إذ بلغت Spad 14.93 ويلاحظ تأثير الأصناف بانها تختلف معنوياً فيما بينها حيث كانت كمية الكلوروفيل لصنف بيت الفا هي الأعلى وبلغت Spad 23.91. أما فيما يخص التداخل بين المعاملات والأصناف اوضحت النتائج وجود فروق معنوية بين المعاملات حيث اعطت معاملة التداخل



شكل 5. تأثير المعاملات المختلفة في معامل إصابة الخيار بفيروس CMV. *المعاملات: يرجى الاطلاع على الشكل رقم 4. Figure 5. The effect of different treatments on severity index of cucumber infected with CMV. *Treatments: Please see figure 4.



شكل 6. تأثير المعاملات المستخدمة في النسبة المئوية للكوروفيل (Spad) لثلاثة أصناف من الخيار. *المعاملات: يرجى الاطلاع على الشكل 4. **Figure 6.** The effect of different treatments used on chlorophyll content in three cucumber varieties. ***Treatments:** Please see figure 4.

أشار Gray & Smith (2005) أن البكتيريا المحفزة لنمو النبات الموجودة في المسافات بين الخلايا وكذلك داخل الخلايا للنبات ربما تعيق حركة الفيروس داخل النبات وبالتالي تعمل على تقليل شدة الإصابة وتؤدي إلى حدوث نوع من المقاومة بالنباتات الملقحة بالبكتيريا.

تأثير المعاملات المستخدمة في كمية الحاصل

دلّت نتائج تجربة تأثير المعاملات المستخدمة في كمية الحاصل لثلاثة أصناف من الخيار مصابة بفيروس CMV (شكل 8) بأنه كانت هناك فروق معنوية فيما بين معدلات تأثير المعاملات، حيث أعطت معاملة التداخل بين طحلب *S. platensis* وبكتيريا *P. fluorescens* 1016 غ/نبات، تلتها معاملة الشاهد والتي بلغت 453.83 غ/نبات. أما فيما يتعلق بتأثير الأصناف فقد لوحظ وجود فروق ظاهرية لم تصل إلى مستوى المعنوية لصنف نجم وبلغت 798.53 غ/نبات. أما بشأن التداخل بين المعاملات، فقد بينت النتائج تفوق معاملة التداخل بين طحلب *S. platensis* وبكتيريا Pf وبلغت 1147.0 غ/نبات لصنف نجم، والاقبل كانت لمعاملة التداخل بين مستخلص الالبيزيا *A. lebeck* وطحلب *S. platensis* لصنف غزير وبلغت 425.0 غ/نبات، في حين أعطت معاملة الشاهد 8.390 غ/نبات.

قد يكون للإصابة بفيروس CMV تأثير في كمية الحاصل من خلال تقليل نسبة التزهير للنباتات واحداث تشوهات للأزهار والأوراق وتقليل نسبة الكلوروفيل وهذا ينتج عنه اختزال حجم الثمار وهذا ما أشارت إليه أبحاث سابقة (الخلف وآخرون، 2010؛ مندو وآخرون، 2011؛ Jones et al., 2008؛ El-Bramawy et al., 2012). لا يستبعد أن

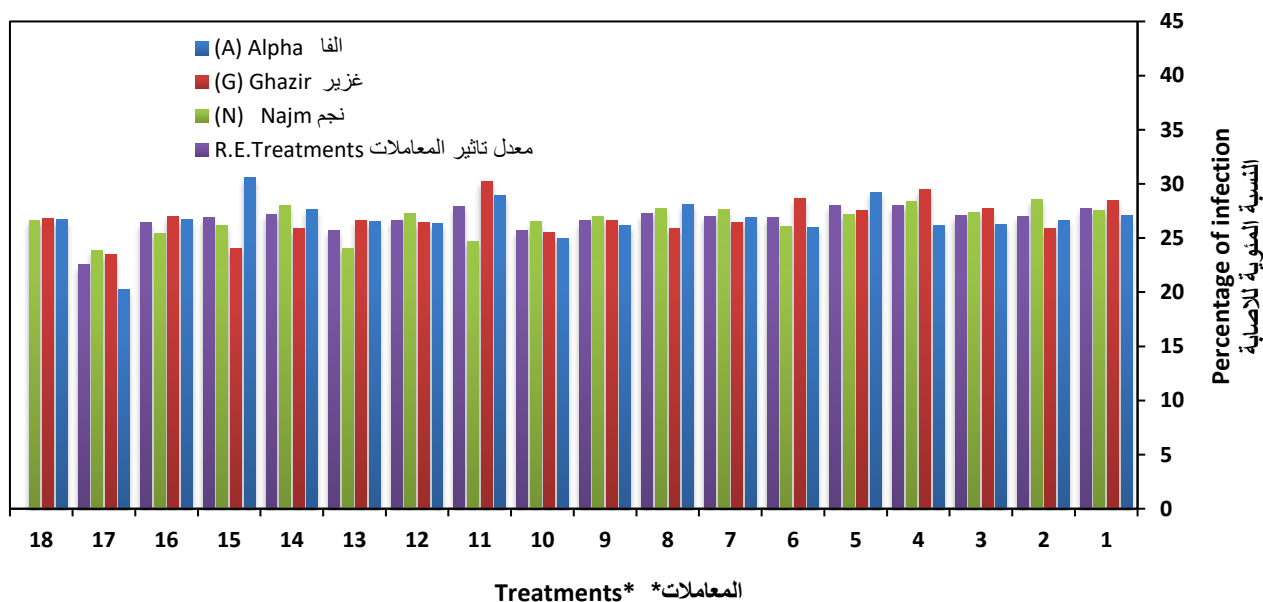
تأثير المعاملات المستخدمة في المساحة الورقية لنباتات الخيار بينت نتائج تأثير المعاملات المستخدمة في المساحة الورقية لثلاثة أصناف من الخيار مصابة بفيروس CMV (شكل 7) وجود فروقات معنوية بين معدل تأثير المعاملات لطحلب السبيرولينا *S. platensis* وبلغت 27.99 سم²، تلتها معاملة الشاهد إذ بلغت 22.51 سم². وكانت هناك فروق معنوية بين معدل تأثير الأصناف حيث احتل الصنف غزير الصدارة في المساحة الورقية بلغت 27.19 سم²، تلاه في التأثير الصنف بيت الفا الذي بلغت 27.1 سم². أما بشأن التداخل بين المعاملات والأصناف فقد اشارت النتائج إلى وجود فروقات معنوية بين المعاملات المستخدمة إذ أعطت معاملة طحلب السبيرولينا *S. platensis* وبكتيريا Pf لصنف بيت الفا النسبة الاعلى حيث بلغت 30.55 سم²، والأدنى كانت بمعاملة التداخل بين مستخلص السيسبان وبكتيريا Pf وبلغت 23.99 سم² تلتها معاملة الشاهد إذ بلغت 23.83 سم². من المحتمل أن يعود السبب في تباين المعاملات إلى اختلاف الأصناف وكذلك تحفيز البكتيريا لنمو النباتات ومقاومتها وتكوين مواد أخرى كمنظمات النمو وهذا ينسجم مع ما توصلت إليه أبحاث سابقة (عبد الجبار، 2012؛ الفهد، 2012؛ Murphy et al., 2003؛ Pieterse et al., 2000).

وربما يعزى السبب في تفوق معاملة الطحلب والبكتيريا إلى أن الطحلب *S. platensis* يحتوي على الفسفور الذي يسهم بزيادة المجموع الخضري وكذلك المساحة الورقية وينعكس على قابلية النبات لامتصاص العناصر الغذائية ويرجع ذلك بشكل ايجابي على زيادة نواتج عملية البناء الضوئي لتصنيع المواد الغذائية (Isaac, 1994).

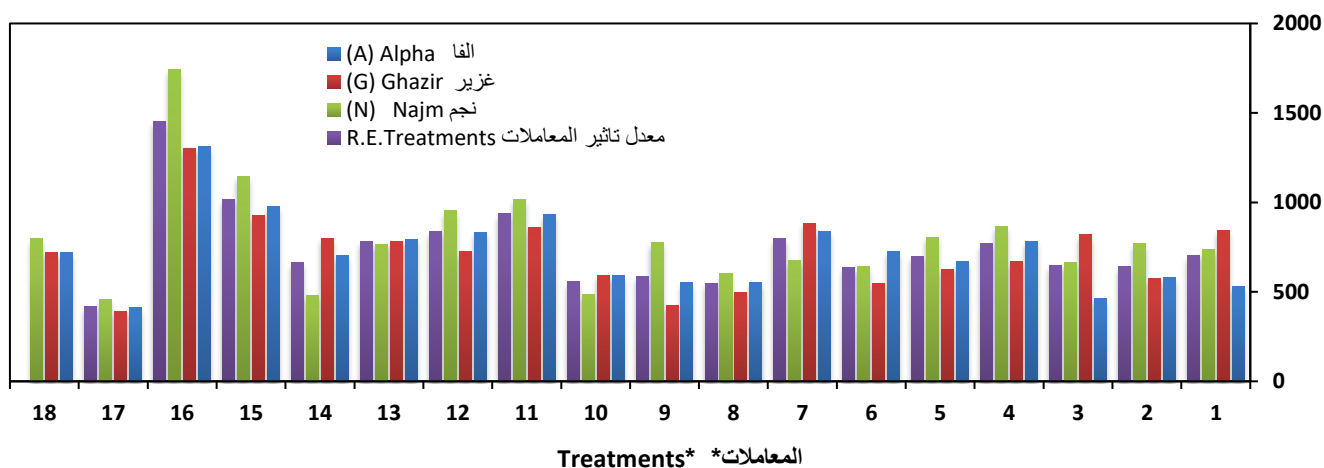
البحرية لتحسين نمو وانتاجية النباتات، كذلك فان دور البكتيريا في افرازها لمنظمات النمو والمركبات المحلية للعناصر الغذائية غير الجاهزة له من التأثير العالي في تحسين نمو النبات والتغلب على التأثير المرضي للفيروس فضلا عن تحفيز المقاومة الجهازية للنباتات (Ton et al., 2002). بالإضافة إلى أن عملية الرش الورقي عن طريق هذه المستخلصات ادى إلى زيادة النمو الخضري والانتاجي وذلك بسبب توفير مغذيات أساسية يعجز الجذر عن توفيرها (السامرائي وآخرون، 2012).

يكون التركيب الوراثي للأصناف تأثير في الإستجابة للإصابة وانعكاس ذلك في تقليل الحاصل كنتيجة لضعف النمو واختزال كمية الكلوروفيل والمساحة الورقية (الفهد، 2006).

ربما يعود سبب تفوق معاملة التداخل بين طحلب *S. platensis* وبكتيريا *P. fluorescens* إلى وجود مركبات تغذية فعالة في طحالب السبيرولينا *S. platensis* مثل الفينولات والستيرويدات والسكريات المتعددة والبيبتيدات أدت إلى الزيادة في كمية الحاصل وهذا ما ذكره Bulter & Hunter (2007) من أن اضافة المستخلصات المتكونة من الطحالب



شكل 7. تأثير المعاملات المستخدمة على المساحة الورقية (سم²) لثلاثة أصناف من الخيار. *المعاملات: يرجى الاطلاع على الشكل 4.
Figure 7. The effect of different treatments used on the leaf area (cm²) for three cucumber varieties. *Treatments: Please see figure 4.



شكل 8. تأثير المعاملات المستخدمة في كمية الحاصل لثلاثة أصناف من الخيار مصابة بفيروس CMV. *المعاملات: يرجى الاطلاع على الشكل 4.
Figure 8. Effect of the treatments used on the yield of three cucumber varieties infected with CMV. *Treatments: Please see figure 4.

Abstract

Al-Fahd, M.A., M.G. Abdelmagid and O.N. Abboud. 2020. Molecular diagnosis of a *Cucumber mosaic virus* and its biological control using the algae *Spirulina platensis*, bacterium *Pseudomonas fluorescens* and some herbal extracts under field conditions. *Arab Journal of Plant Protection*, 38(2): 137-148.

This work was conducted in Al-Ehwaish Area, Samarra District, Salahaddin Governorate during autumn of 2017-2018 growing season. The study aimed at diagnosing the local CMV isolate (*Cucumber mosaic virus*, genus *Cucumovirus*, family *Bromoviridae*) and evaluating the effect of the disease on three cucumber varieties following different biological control approaches. The use of RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction) confirmed that the virus strain used in this study was *Cucumber mosaic virus* (CMV), and was very close to a Pakistani isolate of the same virus. The efficacy of three plant extracts of *Albizia lebbek* (L.), licorice (*Glycyrrhiza glabra*) and *Parkinsonia aculeata* (L.), the dietary supplements of the algae *Spirulina platensis* and the bacterium *Pseudomonas fluorescens* in controlling CMV were evaluated. The combined treatment of the algae + bacterium was superior and led only to 30% infection and 16.2% disease index compared to 100.00% infection and 14.93% disease index for the control treatment. In addition, the combined algae and bacterium treatment produced the highest chlorophyll content amounted to 31.70 Spad, compared to 11.23 Spad for the control. The combined algae and bacteria treatment increased the leaf surface area of Beit Alfa cucumber variety which reached 30.55 cm² compared to 22.51 cm² for the control. The yield experiment showed that the combined *S. platensis* and *P. fluorescens* treatment was the best with a yield of 1147.0 g/plant for the cucumber variety Nejm, and the lowest was for the combined treatment of the *A. lebbek* and *S. platensis* extracts with the cucumber variety Ghazir which yielded 420.5 g/plant, whereas the control treatment yield was 390.8 g/plant.

Keywords: Cucumber mosaic virus, CMV, Algae, *Spirulina platensis*, bacteria, molecular diagnosis, RT-PCR.

Corresponding author: Maaz Abdelwahab Al-Fahd, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Tikrit University, Tikrit, Iraq, Email: maadhft@gmail.com

References

- الفهد، معاذ عبد الوهاب عبد العالي. 2006. دراسة تشخيصية وأهمية اقتصادية ومقاومة لفايروس تقزم وأصفرار الشعير (Barley yellow dwarf virus). اطروحة دكتوراه. كلية الزراعة، جامعة بغداد. 182 صفحة.
- الفهد، معاذ عبد الوهاب. 2012. التشخيص المناعي لفايروس الموزاييك الأصفر للقرع الزكيني *Zucchini yellow mosaic virus potyvirus* وتقويم تفاعله مع ثلاث أصناف لمحصول القرع تحت نظام الزراعة المكشوفة والمحمية في محافظة صلاح الدين. مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية، 13: 173-185.
- الفهد، معاذ عبد الوهاب عبد العالي. 1999. استخدام بعض العوامل الاحيائية والطبيعية في حماية محصول الطماطة من الإصابة بذبابة التبغ البيضاء (*Bemisia tabaci* (Genn) وفايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطة TYLCV). رسالة ماجستير، جامعة البصرة، العراق. 155 صفحة.
- قاسم، نبيل عزيز وعلي حميد محمود. 2012. فايروسات النبات العملي. مطبعة جامعة الموصل. 466 صفحة.
- محسن، عامر سعد. 2018. انتاج مستحضر احياي من لقاح بكتيريا. *Rhizobium sp* لمقاومة فايروس فسيفساء اللوبيا الشديد على ثلاثة أصناف من اللوبيا في محافظة صلاح الدين. رسالة ماجستير. كلية الزراعة، جامعة تكريت، العراق. 178 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/الشمام للإصابة بفيروس الموزاييك الأصفر للكوسا (ZYMV) وتقدير الفاقد في الإنتاج الثمري. مجلة وقاية النبات العربية، 29: 245-252.
- Abbassy, M.A., G.I. Marei and M.H. Selwan. 2014. Antimicrobial Activity of Some Plant and Algal Extracts. *International Journal of Plant and Soil Science*, 3: 1366-1373. <https://doi.org/10.9734/IJPSS/2014/8440>
- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology*. 5th Edition, Elsevier. 922 pp.

المراجع

- الجنابي، عبد الباسط عباس علي. 1984. تأثيرات مستخلصات نباتية مختلفة على فايروس موزاييك التبغ. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة بغداد. 243 صفحة.
- الجهاز المركزي للإحصاء وتكنولوجيا المعلومات. 2011. تقرير محاصيل الخضر الصيفية لسنة 2011. وزارة التخطيط والتعاون الإنمائي، العراق. 244 صفحة.
- حسن، عبد المنعم صادق. 2004. تكنولوجيا الجينات. مكتبة أوزوريس، قصر النيل، القاهرة. 364 صفحة.
- الخلف، محمد، صفاء غسان قمري، أمين حاج قاسم، خالد محي الدين موكوك وصلاح الشعبي. 2010. انتشار الموزاييك الأصفر للفاصوليا على البقوليات الغذائية الشتوية والأعشاب المرافقة لها وتأثيره في انتاجية محصول الفول والحد من انتشاره في سورية. مجلة وقاية النبات العربية، 28: 38-47.
- السامرائي، سميرة محمد صالح وعبد الرزاق عثمان حسن. 2012. تأثير الرش بمستخلص الطحالب البحرية (الجاتون) في النمو الخضري والزهري لنبات الجعفرى. مجلة ذي قار للبحوث الزراعية، 1: 201-211.
- عايد، بسمه ضباب ومعاذ عبد الوهاب الفهد. 2018. التشخيص الجزيئي والمقاومة الطبيعية للعزلة المحلية في فايروس فسيفساء الطماطة ToMV على محصول نباتات الفلفل البارد. مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية، 18: 108-116.
- عبد الجبار، فرح عبد الستار. 2012. استحثاث المقاومة في نباتات الطماطة ضد فايروس موزاييك الطماطة *Tomato mosaic virus* بواسطة البكتيريا *Pseudomonas fluorescens*. مجلة الأنبار للعلوم الزراعية، 10: 331-339.
- العجيلي، ثامر عبدالله زهوان. 2005. تأثير الجبريلين GA₃ وبعض المغذيات على انتاج الكليسيرايدين Glycyrrhizin وبعض المكونات الأخرى في نبات عرق السوس *Glycyrrhiza glabra*. اطروحة دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة بغداد. العراق. 119 صفحة.
- فرانسيسكو، فاريثا. 2006. المقاومة لمبيدات الفطريات في وقاية النبات. قسم وقاية النبات وعلم الأحياء التطبيقي. جامعة باري، إيطاليا.

- Isaac, O.** 1994. *Calendula officinalis* L. Die Ringelblum, portrait einer Arzneipflanze. Zeitschrift Phytotherapy, 16: 357-370.
- Murphy, J.F., M.S. Reddy, C.M. Ryu, J.W. Kloepper and R. Li.** 2003. Rhizobacteria-mediated growth promotion of tomato leads to protection against *Cucumber mosaic virus*. Phytopathology, 93: 1301-1307.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.10.1301>
- Jones, R., B. Coutts, G. Burchell and S. Wylie.** 2008. *Bean yellow mosaic virus* in lupins: strains, losses, epidemiology and control. Pages 420-424. In: Proceedings of the 12th International Lupin Conference, Fremantle, Western Australia, 14-18 September, 2008.
- Kim, H.W. and B.K. Kim.** 1999. Biomedical triterpenoids of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllphoromycetidae). International Journal of Medicinal Mushrooms, 1: 121-138.
- Lower, R.L. and M.D. Edwards.** 1986. Cucumber breeding. Pages 173-207. In: Breeding Vegetable Crops. AVI Publishing Co. Westport, Connecticut, U.S.A. 584 pp.
- Mao, T.K, V. de Water and M.E. Gershwin.** 2005. Effect of Spirulina-based dietary supplement on cytokinen production from allergic rhinitis patients. Journal of Medicinal Food, 8: 27-30.
<https://doi.org/10.1089/jmf.2005.8.27>
- Mathews, R.E.F.** 2002. Plant Virology. Fourth edition. Academic Press, London, UK. 1056 pp.
- Mckinney, H.H.** 1923. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedling by *Helminthosporium sativum*. Journal of Agricultural Research, 26: 195-217.
- Menzel, W., V. Zahn and E. Maiss.** 2003. Multiplex RT-PCR-ELISA compared with bioassay for the detection of four apple viruses. Journal of Virological Methods, 110: 153-157.
[https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(03\)00112-5](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(03)00112-5)
- Ryu, C.M., M.A. Farag, C.H. Hu, M.S. Reddy, J.W. Kloepper and P.W. Paré.** 2004. Bacterial volatiles induce systemic resistance in Arabidopsis. Plant Physiology, 134: 1017-1026.
<https://doi.org/10.1104/pp.103.026583>
- Shomaila, I., H. Shah, M. Ashfaq and A. Khan Kassi.** 2017. Standardization of PCR protocol to check diversity among Pakistani isolates of *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV) infecting chilli pepper. Journal of Entomology and Zoology Studies, 5: 729-735.
- Ton, J., J.A.V. Pelt, L.C. Vallon and C.M.J. Pieterse.** 2002. Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in Arabidopsis. Molecular Plant Microbe interactions, 15: 27-34.
<https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.1.27>
- Tyler, V.** 1993. The Honest Herbal. Pharmaceutical Products Press, NY. 375 pp.
- Apablaza, G.E. and C.C. Bernier.** 1972. Inhibition of tobacco mosaic virus infection by plant extracts. Canadian Journal of Botany, 50: 1473-1478.
<https://doi.org/10.1139/b72-180>
- 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 Medicine, 1: S1-S7.
[https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60111-1](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60111-1)
- Bulter, T. and A. Hunter.** 2007. Impact of seaweed extract on Turf grass growth and nutrition on a golf green to USGA specification. Acta Horticulturae, 762: 81-90.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.762.7>
- Cheesin, M., A.E. Zipf and A. Metra.** 1994. Antiviral Proteins in Higher plants. LRC Press. 190 pp.
- Pieterse, C.M.J., J.A. Van Pelt, J. Ton, S. Parchmann, M.J. Mueller, A.J. Buchala, J-P. Métraux and L.G. Van Loon.** 2000. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. Physiological and Molecular Plant Pathology, 57: 123-134. <https://doi.org/10.1006/pmpp.2000.0291>
- Dovrnic, V.** 1965. Lucrari practiced Ampelografic Ed. Didaea-tiea Sipedagogiea Bucuresti, Romania.
- El-Bramawy, M.A.S.A. and E.K.F. El-Beshehy.** 2012. Inheritance of resistance to *Bean yellow mosaic virus* in faba bean plants. International Journal of Virology, 8: 98-105. <https://doi.org/10.3923/ijv.2012.98.105>
- El-DougDoug, Kh.A., A.A. Megahed, B. Othman, A.S.M. Lashin, M.A. Ibrahim and H.A. Idress.** 2013. Induction of salicylic acid in cucumber plants against *cucumber mosaic cucumovirus* using biotic inducers. American Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 3: 248-255.
<https://doi.org/10.3923/ajbmb.2013.248.255>
- Ferrira, S.A. and R.A. Boley.** 1992. *Cucumber Mosaic Virus*. Crop knowledge master. Department of Plant Pathology, CTAHR, University of Hawaii, Manoa. 5 pp.
http://www.extento.hawaii.edu/Kbase/Crop/Type/cuc_vir.htm
- Figueiredo, M.V.B., L. Seldin, F.F. Araujo and R.L.R. Mariano.** 2010. Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications. Pages 21-34. In: Plant growth and health promoting bacteria. D.K. Maheshwari (ed.). Microbiology monographs 18. Springer, Berlin. 448 pp.
<https://doi.org/10.1007/978-3-642-13612-2>
- Gilck, B. R., C.L. Patten, G. Holuin and D.M. Penrose.** 1999. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College Press, London, UK. 276 pp.
<https://doi.org/10.1142/p130>
- Gray E.J. and D.L. Smith.** 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. Soil Biology and Biochemistry, 37: 395-412.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.08.030>

Walters, D.R., D. Walsh, A.C. Newton and G.D. Lyon. 2005. Induced resistance for plant disease control: Maximizing the efficacy of resistance elicitors. *Phytopathology*, 95: 1368-1373.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-1368>

Usharani, G., G. Srinivasan, S. Sivasakthi and P. Saranraj. 2015. Antimicrobial activity of *Spirulina platensis* solvent extracts against pathogenic bacteria and fungi. *Advances in Biological Research*, 9: 292-298. <https://doi.org/10.5829/idosi.abr.2015.9.5.9610>

Received: July 22, 2019; Accepted: May 4, 2020

تاريخ الاستلام: 2019/7/22؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2020/5/4