الكشف عن عشرة فيروسات تصيب المحاصيل البقولية بالاختبار المصلي لبصمة النسيج النباتي

خالد محي الدين مكوك وصفاء غسان قمري
برنامج الأصول الوراثية، مختبر الفيروسات، إيكاردا، ص. ب. 5466، حلب، سورية

الملخص

مكوك، خالد محي الدين وصفاء غسان قمري. 1996. الكشف عن عشرة فيروسات تصيب المحاصيل البقولية بالاختبار المصلي لبصمة النسيج النباتي. مجلة وقاية النبات العربية. 14 (1) : 3-9.

أمكن باستعمال الاختبار المصلي لبصمة النسيج النباتي (Tissue-blot immunoassay) (TBIA) الكشف بدقة عن وجود عشرة فيروسات تصيب المحاصيل البقولية الغذائية، توجد أساساً إما في الأوعية الغربالية للنبات مثل فيروس التفاف أوراق الفول (BLRV) وفيروس اصفرار وموت الفول (FBNYV)؛ أو تلك التي تنتشر جهازياً في جميع أنسجة النبات مثل فيروس موزاييك الفصة (AMV)، فيروس موزاييك الخيار (CMV)، فيروس تبرقش الفول (BBMV)، فيروس ذبول الفول (BBWV)، فيروس موزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور (PSbMV)، فيروس موزاييك الفاصولياء الأصفر (BYMV)، فيروس تلون بذور الفول (BBSV) وفيروس موزاييك الفول الحقيقي (BBTMV). وقد تم في هذه الإختبارات استعمال الأجسام المضادة وحيدة الكلون أو متعددة الكلون وأعطى كلاهما نتائج جيدة. كما أمكن باستعمال هذا الإختبار الكشف عن الفيروسات في جميع أجزاء النبات وخلال جميع مراحل النمو. كما استعمل الإختبار بكفاءة عالية في الكشف عن الفيروس في مجموعات (5-25) من البادرات جمعت مع بعضها بوساطة غشاء البارافيلم، وطبعت على غشاء النيتروسيلليلوز كعينة واحدة. أظهرت النتائج بأن لهذا الإختبار استعمالات عملية في الكشف عن الفيروسات التي تنتقل بوساطة البذور، وذلك بعد تثبيت البذور المراد فحصها. كما أكدت النتائج بأن لهذا الإختبار ميزات عملية أكثر من إختبار إليزا العادي (DAS-ELISA)، فهو أسرع، إذ يمكن إنهاء الاختبار خلال أربع ساعات، وبدون فقد في حساسية الاختبار، كما أنه أقل تكلفة ولايحتاج إلى أجهزة غالية الثمن.

كلمات مفتاحية: محاصيل بقولية، فيروسات، اختبارات سيرولوجية، بصمة النسيج النباتي، إختبار إليزا العادي.

المقدمة

تعتبر الاختبارت السيرولوجية أكثر الاختبارات المستعملة في الكشف عن الفيروسات شيوعاً، كما يعد اختبار إليزا العادي Double antibody sandwich ELISA (DAS-ELISA) (1) والذي يُجرى على أطباق إليزا مصنوعة من البلاستيك (Polystyrene microtiter plates) من أهم هذه الاختبارت. في أوائل التسعينات، وصف اختبار بسيط وسريع يتم على غشاء النيتروسيلليلوز سمي بالاختبار المصلي لبصمة النسيج النباتي (Tissue-blot immunoassay) (TBIA) (2، 4، 5). وقد تمت دراسة كفاءة اختبار TBIA بالكشف عن المايكوبلازما وعدد من الفيروسات النباتية تنتمي إلى أربع مجموعات فيروسية: Cucumovirus، Luteovirus، Potexvirus و Potyvirus وعلى أنواع نباتية مختلفة (4)؛ كما طبق هذا الاختبار للكشف عن فيروس ذبول وتبقع البندورة على نبات *Impatiens* (2)؛ و فيروس اصفرار وتقزم الشعير (BYDV) على محاصيل الحبوب النجيلية (5). إلا أنه لم تدرس كفاءة هذا الاختبار بالكشف عن الفيروسات التي تصيب المحاصيل البقولية، ولهذا جاء هذا البحث لدراسة إمكانية استعمال هذا الاختبار في الكشف عن عشرة فيروسات تصيب المحاصيل البقولية الغذائية. ومن ثم كفاءة اختبار TBIA بالمقارنة مع اختبار DAS-ELISA في الكشف عن الفيروسات التي تنتقل بواسطة البذور.

مواد البحث وطرائقه

الفيروسات والعائل النباتي

استخدمت في الدراسة عشرة فيروسات تصيب المحاصيل البقولية الغذائية تنتمي إلى ثمانية مجموعات فيروسية مختلفة. كما تختلف هذه الفيروسات فيما بينها في أماكن وجودها في أنسجة النبات، فمنها مايوجد في الأوعية الغربالية للنبات فقط، مثل فيروس التفاف أوراق الفول (BLRV) الذي يتبع مجموعة فيروسات الإصفرار Luteoviruses، وفيروس اصفرار وموت الفول (FBNYV) الذي اكتشف مؤخراً وهو غير مصنف حتى الآن (3)؛ ومنها ماينتشر جهازياً في جميع أنسجة النبات مثل فيروس موزاييك الفصة (AMV) الذي يتبع مجموعة Alfamoviruses، فيروس موزاييك الخيار (CMV) الذي يتبع مجموعة Cucumoviruses، فيروس تبرقش الفول (BBMV) الذي يتبع مجموعة Bromoviruses، فيروس ذبول الفول (BBWV) الذي يتبع مجموعة Fabaviruses، فيروس موزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور (PSbMV) وفيروس موزاييك الفاصولياء الأصفر (BYMV) اللذان يتبعان مجموعة Potyviruses، فيروس تلون بذور الفول (BBSV) وفيروس موزاييك الفول الحقيقي (BBTMV) اللذان يتبعان مجموعة Comoviruses.

وقد تم الحصول على جميع العزلات للفيروسات المدروسة من سورية عدا العزلة الفيروسية لفيروس BBTMV المعزولة من نبات فول من ألمانيا (الدكتور هـ. رولوف، مختبرات معهد أمراض النبات

الفيروسية، براونشغايج، ألمانيا). وللمحافظة على هذه العزلات، تم إعداء نباتات فول وعدس في الدفيئة الزجاجية بالعزلات المختلفة، تم إجراء الاختبارات السيرولوجية للنباتات وهي في حالة طازجة.

الأمصال المضادة المستخدمة

استخدمت في هذا البحث أمصال مضادة متعددة الكلون (Polyclonal) للكشف عن فيروسات AMV، CMV، BBWV، BBMV، BYMV، PSbMV، BBSV و BBTMV وجميعها منتج في مختبر الفيروسات في إيكاردا، حلب، سورية، عدا المصل المضاد لفيروس BBTMV فهو مقدم من الدكتور هـ. رولوف، ألمانيا.

كما استخدمت أمصال مضادة وحيدة الكلون (Monoclonal) ومتعددة الكلون (Polyclonal) للكشف عن فيروسي BLRV (مقدمة من الدكتورة لينا كاتول) و FBNYV (مقدمة من الدكتور ألكسندر فرانس) وكلاهما من مختبرات معهد أمراض النبات الفيروسية، براونشغايج، ألمانيا.

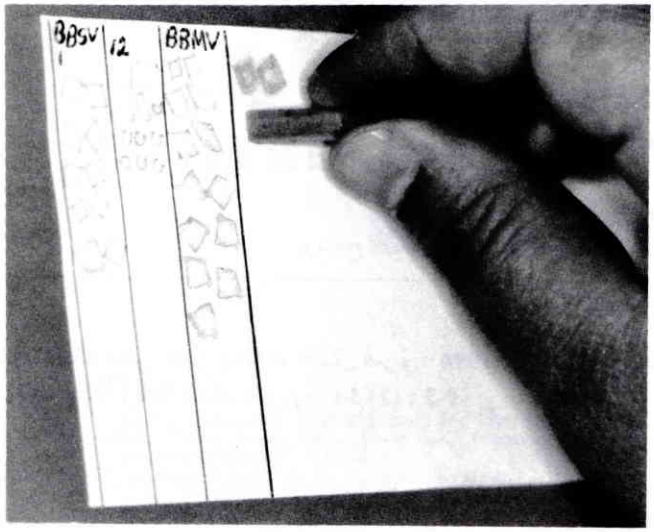
الاختبار المصلي لبصمة النسيج النباتي

1. **طريقة تحضير العينات وطبعها على غشاء النيتروسيلليلوز.** استعملت الطريقة الموصوفة سابقاً (2، 4، 5) للكشف عن الفيروسات المدروسة.

استعمل في هذا الاختبار غشاء مصنوع من النيتروسيلليلوز ذي ثقوب 0.45 ميكرومتر من إنتاج شركة Scheicher & Schuell (عنوان الشركة P.O. Box 4، Hahnestrasse 3، Dassel 1، D-3354، Germany).

أخذت أجزاء من نباتات العدس والفول المصابة بالفيروسات المدروسة (الساق، نصل الورقة، عنق الورقة، الجذر) وهي في حالة طازجة، وكل على إنفراد. تم قطع الجزء النباتي بآلة حادة (شفرة أو مشرط) بشكل عرضي، ثم طبع الجزء المقطوع مباشرة على غشاء النيتروسيلليلوز دون اللجوء إلى طحن العينات بأي محلول (شكل 1).

كما تم أيضاً دراسة حساسية الاختبار في الكشف عن النبات المصاب ضمن مجموعات من نباتات العدس والفول. فقد تم وضع نبات مصاب واحد مع أربع نباتات سليمة لتشكل مجموعة واحدة، ولفّت النباتات مع بعضها بواسطة غشاء من البارافيلم، ثم قطعت سوقها بآلة حادة وطبعت على غشاء النيتروسيلليلوز كعينة واحدة، وكررت هذه العملية بوضع نبات الفول المصاب مع 9 نباتات فول سليمة. أما نبات العدس المصاب فقد وضع مع 9، 14، 19 و 24 نبات عدس سليم.



شكل 1. طريقة طبع النباتات المراد فحصها بالاختبار المصلي لبصمة النسيج النباتي على غشاء النيتروسيلليلوز.

Figure 1. A nitrocellulose membrane after blotting cut surfaces of plant stem sections on it.

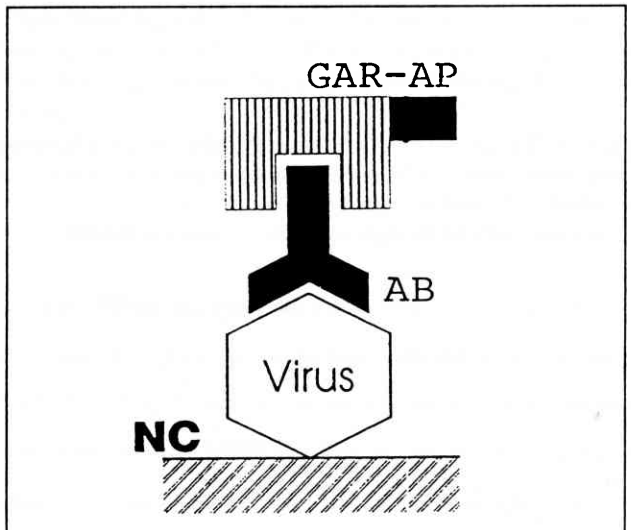
2. **الكشف عن الفيروسات الموجودة بوساطة غشاء النيتروسيلليلوز.** بعد الإنتهاء من طبع العينات على غشاء النيتروسيلليلوز فحصت مباشرة، ويوضح الشكل رقم 2 المبدأ العام للاختبار المصلي لبصمة النسيج النباتي. أما خطوات الطريقة السيرولوجية التي اتبعت لمعالجة غشاء النيتروسيلليلوز بعد طبع العينات عليه فهي كالتالي:

1. يغسل الغشاء ثلاث مرات بمحلول الغسيل PBST (PBS يحتوي على 0.05% من مادة Tween 20) بفاصل 3-5 دقائق بين الغسلة والأخرى.
2. يوضع الغشاء في محلول Polyvinyl alcohol (Sigma P-8136) المذاب بـ PBST بتركيز 1 ملغ/ مل ولمدة دقيقة، أو استعمال حليب خال من الدسم (non-fat-milk) مذاب بـ PBST بتركيز 3% ولمدة ساعة.
3. يغسل الغشاء كما ورد في الخطوة رقم 1.
4. يوضع الغشاء في محلول الأمصال المضادة المتعددة الكلون (المنتجة في الأرانب) أو الأمصال المضادة الوحيدة الكلون (المنتجة في الفئران) تبعاً للفيروس المختبر. وذلك بعد تخفيفها حتى 1000/1 في محلول PBS. ويترك لمدة ساعة على درجة حرارة الغرفة.
5. يغسل الغشاء كما ورد في الخطوة رقم 1.
6. يوضع الغشاء في محلول الأجسام المضادة المنتجة في أجسام الماعز ضد الأجسام المضادة للأرانب (Goat anti-rabbit immunoglobulins) (Sigma A-8025) أو للفئران (Goat-anti mouse immunoglobulins) (Sigma A-5153) المرتبطة بإنزيم الفوسفاتاز القلوي

(حسب الأجسام المضادة المستعملة في الخطوة رقم 4) وذلك بعد تخفيفها حتى 2000/1 في محلول الربط (Conjugate buffer)، ويترك لمدة ساعة على درجة حرارة الغرفة.

7. يغسل الغشاء كما ورد في الخطوة رقم 1.
8. يوضع الغشاء في مادة التفاعل التي يفككها الإنزيم والمكونة من 3 مغ من مادة Nitroblue tetrazolium (Sigma N-6876) و 1 مغ من 3-bromo-4-chloro-5-indolyl phosphate (Sigma B-8503) المذابة في 10 مل من محلول Tris-HCl عياريته 0.1 جزيء ودرجة حموضته 9.5 والمحتوي على 0.1 جزيء من ملح الطعام (NaCl) و 0.05 جزيء من كلوريد المغنيزيوم ($MgCl_2$). يترك الغشاء في هذه المادة لمدة 15–20 دقيقة، يغسل بعدها بالماء المقطر، وتتم قراءة التفاعل بالعين المجردة للفيروسات التي تنتشر في جميع أنسجة النبات، وتستعمل المكبرة (Binocular) للفيروسات التي توجد في الأوعية الغربالية فقط. ويدل ظهور اللون الأزرق الأرجواني في العينات على وجود الفيروس، واللون الأخضر أو عدم ظهور اللون على خلو العينة من الفيروس.

تجري جميع مراحل الاختبار السابقة عند درجة حرارة الغرفة، كما يفضل أن تجرى جميع خطواته على هزاز دائري وبسرعة بطيئة.



GAR-AP = انزيم فوسفاتاز القلوي المرتبط بأجسام مضادة منتجة في الماعز ضد الجلوبيولينات المناعية للأرانب، AB = أجسام مضادة للفيروس المراد الكشف عن وجوده، NC = غشاء النيتروسيللوز
GAR-AP= Goat antirabbit-alkaline phosphatase, AB= Antibody, NC= Nitrocellulose membrane.

شكل 2. شكل توضيحي يبين المبدأ العام للاختبار المصلي لبصمة النسيج النباتي

Figure 2. Schematic diagram showing the pattern of reactants in the tissue-blot immunoassay (TBIA).

الطريقة المختصرة للاختبار المصلي لبصمة النسيج النباتي

تم إجراء طريقة أخرى لاختبار TBIA باستخدام الأجسام المناعية (IgG) المعزولة من المصل المضاد والمرتبطة مع إنزيم الفوسفاتاز القلوي (Alkalin Phosphataes) (Sigma P-5521). وتبعاً للطريقة التالية:

يوضع الغشاء بعد المرحلة رقم 3 (طريقة اختبار TBIA المذكورة في الفقرة السابقة) في محلول الأجسام المناعية المرتبطة بإنزيم الفوسفاتاز القلوي وذلك بعد تخفيفها حتى 1000/1 في محلول الربط (Conjugate buffer)، ويترك لمدة ساعة – ساعتين على درجة حرارة الغرفة، ومن ثم يتابع الاختبار إبتداءً من المرحلة رقم 7 وحتى النهاية.

مقارنة اختباري TBIA و DAS-ELISA في الكشف عن الفيروسات التي تنتقل بالبذور

استخدمت في هذه التجربة بذور ناتجة من نباتات عدس مصابة بفيروس تلون بذور الفول، زرعت ضمن علب خاصة لتنبيتها، ثم وضعت ضمن حاضنات خاصة ترواحت درجة حرارتها مابين 15–20 ° سلزيوس. وبعد الإنبات، أخذت البادرات، ووضعت ضمن مجموعات حوت كل منها على 5، 10، 20 و 25 بادرة، ورقمت المجموعات وفحصت باختبار TBIA؛ وقد تم فحص 1000 بادرة في كل معاملة. ثم فحصت المجموعات السابقة نفسها باختبار DAS-ELISA، حيث تم استخلاص العصارة النباتية من البادرات باستعمال جهاز لطحن العينات بعد إضافة محلول منظم فوسفاتي (عياريته 0.2 جزيء ودرجة حموضته 6) بنسبة 1 مل محلول لكل بادرة، واتبعت الخطوات نفسها المتبعة سابقاً من قبل كلارك وآدم (1). ولتمييز المجموعة المصابة عن السليمة في اختبار DAS-ELISA، وضعت عصارة بادرات سليمة (الشاهد السليم) في ثمانية حفر من طبق ELISA، واعتبرت العينة مصابة بالفيروس إذا تجاوز امتصاصها للضوء امتصاص الشاهد السليم (غير المصاب) عند الموجة 405 نانومتر + ثلاثة أضعاف قيمة الإنحراف المعياري.

تم تقدير النسبة المئوية لإصابة البذور باختبار TBIA عن طريق عدّ البادرات المصابة، وحساب النسبة المئوية للإصابة. أما بالنسبة لتقدير نسبة الإصابة باختبار DAS-ELISA، فقد قدرت حسب المعادلة التالية المقترحة من قبل Maury ومشاركوه (6):

$P = [1-(H/N)^{1/n}] \times 100$، حيث:

P= النسبة المئوية للإصابة؛ H= عدد المجموعات الخالية من الفيروس؛ N= العدد الكلي للمجموعات المفحوصة؛ n= عدد البادرات في كل مجموعة.

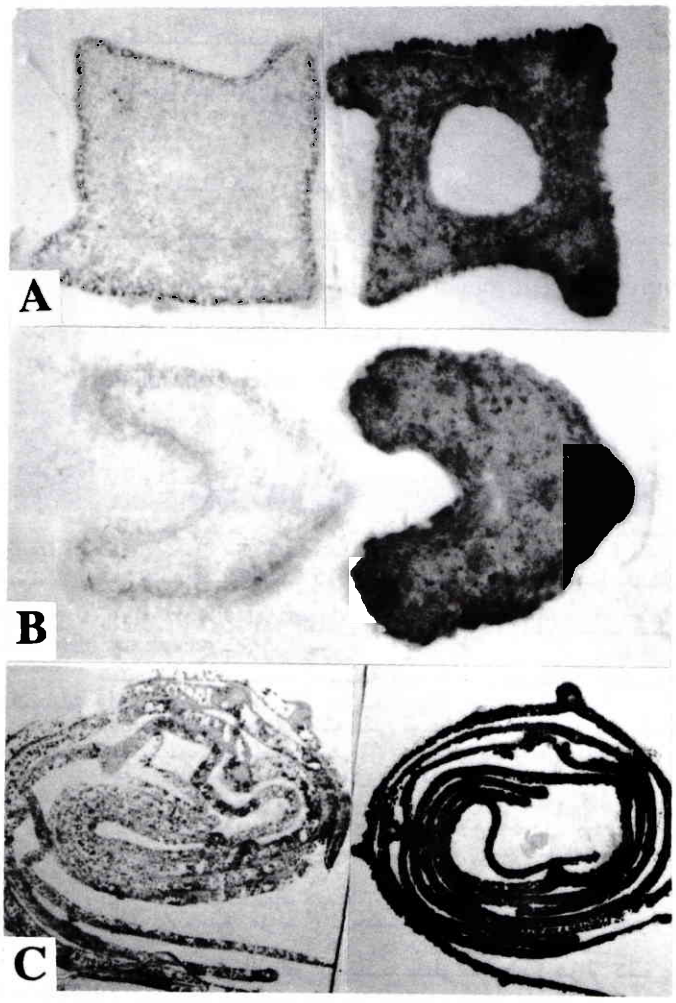
النتائج والمناقشة

الكشف عن الفيروسات بالاختبار المصلي لبصمة النسيج النباتي

تم في اختبار TBIA الكشف عن عشرة فيروسات تصيب المحاصيل البقولية، تتبع ثمان مجموعات فيروسية، ثمانٌ منها توجد في جميع أنسجة النبات وهي: AMV، CMV، BBMV، BBWV، PSbMV، BYMV، BBSV و BBTMV حيث تلونت جميع أجزاء النبات المصاب باللون الأزرق الأرجواني (شكل 3). واثنان منها يوجدان فقط في الأوعية الغربالية للنبات وهما: BLRV، FBNYV؛ وفي هذه الفيروسات تلونت الأوعية الغربالية للنبات المصاب باللون الأزرق الأرجواني فقط (الشكلين 4 و 5). كما أمكن بواسطة هذا الاختبار الكشف عن الفيروسات العشرة السابقة في جميع أجزاء النبات (الساق، نصل الورقة، عنق الورقة، الجذر) وذلك عند استخدام الأمصال المضادة المتعددة الكلون. كما تم أيضاً الكشف عن فيروسي BLRV و FBNYV باستخدام الأمصال المضادة الوحيدة الكلون والمتعددة الكلون وبالحساسية نفسها.

كما أمكن أيضاً بواسطة اختبار TBIA الكشف عن الفيروسات السابقة بالطريقتين العادية والمختصرة، مع اختصار الوقت من أربع ساعات إلى ساعتين عند استخدام الطريقة المختصرة، دون أن تتأثر حساسية الاختبار. وعند استعمال الطريقة المختصرة لا بدّ من عزل IgG من الأمصال المضادة ومن ثم ربطها بإنزيم الفوسفاتاز القلوي لكل فيروس على حدة. أما في الطريقة العادية فيمكن استخدام الأمصال المضادة (Antiserum) للفيروسات المنتجة من الأرانب لكل فيروس على حدة دون عزل الأجسام المناعية منها؛ ومن ثم استخدام الأجسام المضادة المنتجة في أجسام الماعز ضد الأجسام المضادة للأرانب (غير المتخصصة). ولاتختلف هذه الطرائق عن بعضها البعض من ناحية التكلفة، إلا أنه يمكن أن تكون الطريقة المختصرة أقل كلفة عند توافر الأجسام المناعية المرتبطة بإنزيم الفوسفاتاز القلوي. وبناء عليه يتم اختيار الطريقة العادية أوالمختصرة حسب الإمكانات المتوافرة لدى كل مختبر وحسب السرعة المطلوبة لفحص العينات. كما أنه لايمكن استخدام الأجسام المضادة الوحيدة الكلون في الطريقة المختصرة وذلك لصعوبة ربطها مع إنزيم الفوسفاتاز القلوي.

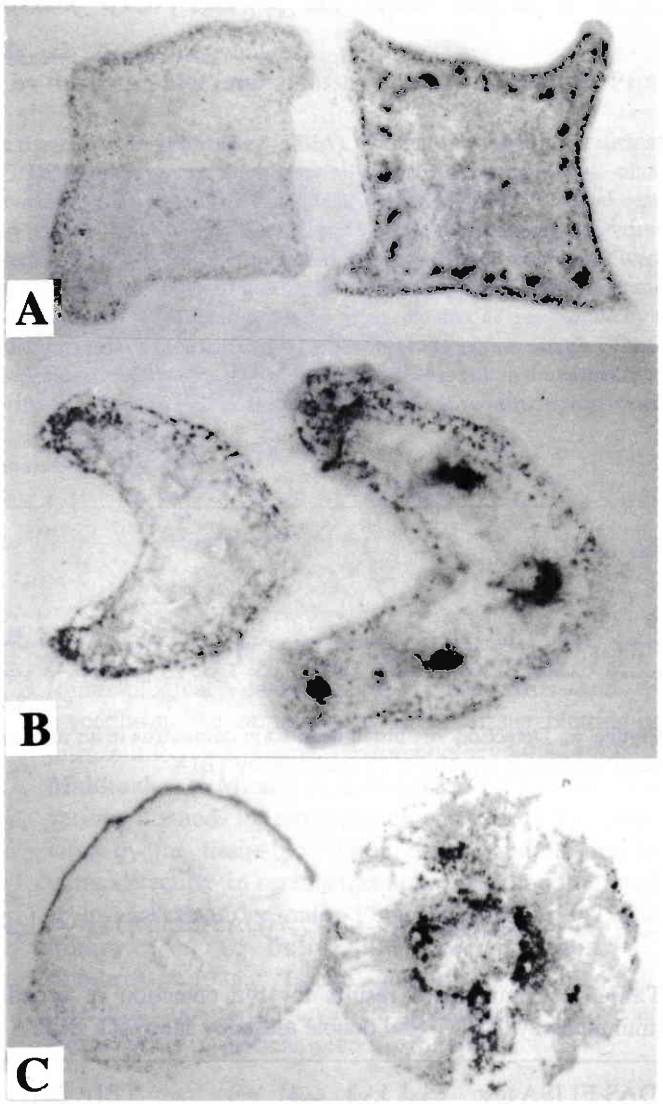
أما بالنسبة للمواد المستخدمة في اختبار TBIA سواء بالطريقة العادية أوالمختصرة (الأجسام المناعية المرتبطة بإنزيم الفوسفاتاز القلوي؛ الأمصال المضادة؛ والأجسام المضادة المنتجة في أجسام الماعز ضد الأجسام المضادة للأرانب وللفئران) فيمكن جمعها بعد إنتهاء الاختبار واستخدامها أكثر من مرة دون أي تأثير في حساسية الاختبار. أما المواد التي تستخدم في اختبار DAS-ELISA فإنها عادة لاتجمع، وهذا ما يميز اختبار TBIA عن اختبار DAS-ELISA من ناحية التكلفة.



شكل 3. استعمال الاختبار المصلي لبصمة النسيج النباتي للكشف عن فيروس موزاييك الفصة في ساق نبات الفول (A)، فيروس موزاييك الفاصولياء الأصفر في عنق ورقة نبات الفول (B)، وفيروس موزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور في ورقة نبات الفول (C). النبات المصاب على اليمين والنبات السليم على اليسار.

Figure 3. The use of TBIA for detecting alfalfa mosaic alfamovirus in faba bean stem (A), bean yellow mosaic potyvirus in faba bean leaf petiole (B), and pea seed-borne mosaic potyvirus in leaf blade (C). Infected plants to the right and healthy plants to the left.

وعند الكشف عن وجود الفيروسات المدروسة ضمن مجموعات من نباتات الفول (5 و 10 نباتات في المجموعة)، ونباتات العدس (5،10، 15، 20 و 25 نبات في المجموعة) حوت كل منها نباتاً مصاباً واحداً، استطاع اختبار TBIA أن يكشف عن النبات المصاب في كل المجموعات وبحساسية عالية (شكل 6). الاّ أن احتمال وقوع الخطأ في استعمال اختبار TBIA هو أقل من احتماله في اختبار DAS-ELISA اذ أن وجود الفيروس في نبات واحد فقط من نباتات المجموعة يكون جلياً (شكل 6)؛ الاّ أن وجوده في العينة المستخرجة من طحن نباتات المجموعة الواحدة وفحصها بواسطة DAS-ELISA يكون مشكوكاً فيه عندما يكون تركيز الفيروس في النبات المصاب قليلاً جداً.

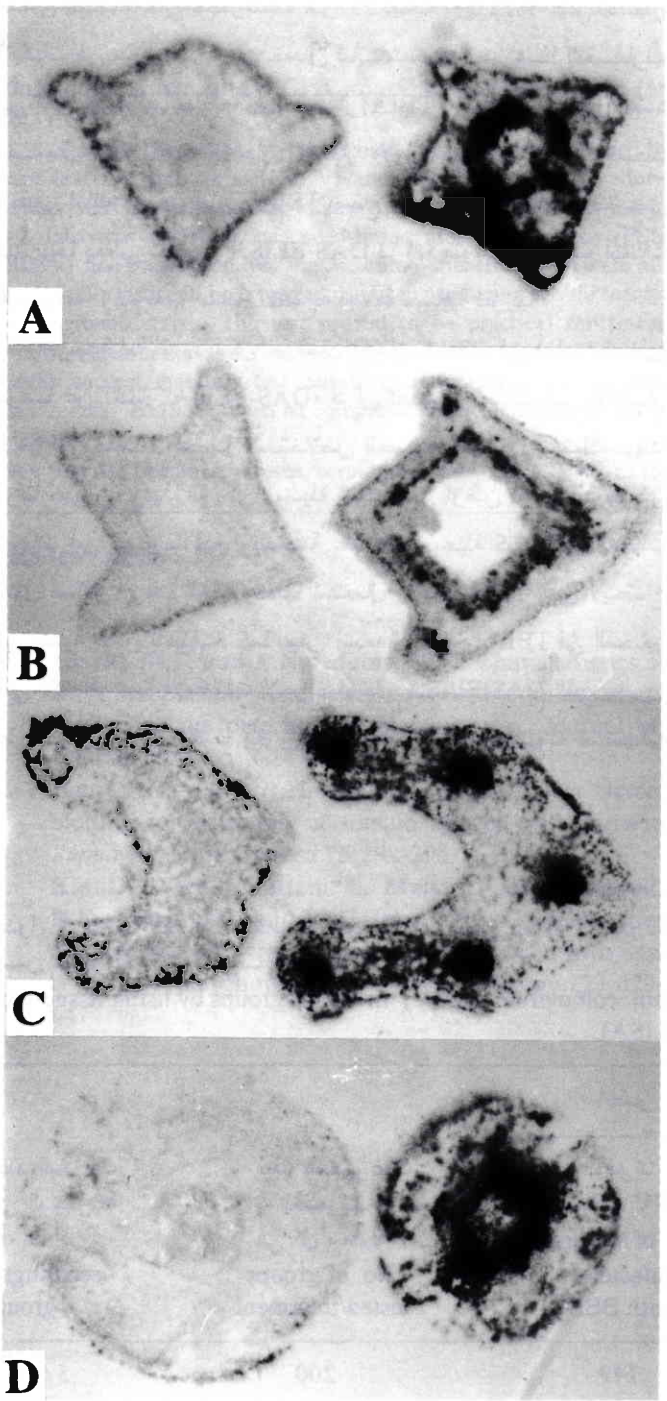


شكل 4. الكشف عن فيروس التفاف أوراق الفول بواسطة الاختبار المصلي لبصمة النسيج النباتي في ساق نبات الفول (A)، عنق الورقة لنبات الفول (B)، وجذر نبات الفول (C).النبات المصاب على اليمين والنبات السليم على اليسار.

Figure 4. Detection of bean leaf roll luteovirus by TBIA in faba bean stem (A), petiole (B) and root (C). Infected plants to the right and healthy plants to the left.

مقارنة اختباري TBIA و DAS-ELISA في الكشف عن الفيروسات التي تنتقل بالبذور

تمت مقارنة كفاءة اختبار TBIA مع اختبار DAS-ELISA للكشف عن فيروس BBSV ضمن مجموعات حوت كل منها على 5، 10، 20 و 25 بادرة عدس وبمعدل 1000 بادرة لكل معاملة. وعند فحص المجموعات السابقة بكلا الاختبارين، وجد بأن عدد البادرات المصابة بفيروس BBSV كانت 149، 153، 142 و 150 بادرة مصابة نتيجة اختبار TBIA؛ و255، 214، 149 و 137 بادرة مصابة عند فحصها باختبار DAS-ELISA للمجموعات السابقة، على التوالي (جدول 1).



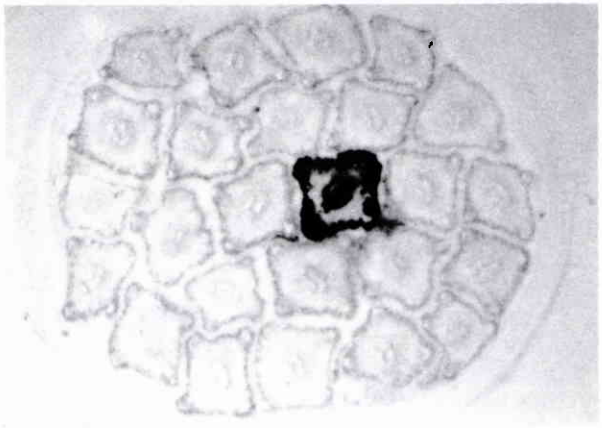
شكل 5. الكشف عن فيروس اصفرار وموت الفول بواسطة الاختبار المصلي لبصمة النسيج النباتي في ساق نبات العدس (A)، ساق نبات الفول (B)، عنق الورقة لنبات الفول (C)، وجذر نبات الفول (D).النبات المصاب على اليمين والنبات السليم على اليسار.

Figure 5. Detection of faba bean necrotic yellows virus by TBIA in lentil stem (A), faba bean stem (B), faba bean leaf petiole (C) and faba bean root (D). Infected plants to the right and healthy plants to the left.

ان النتائج المعروضة في الجدول 1 تشير إلى أن نسبة الإصابة في النباتات المفحوصة هي نفسها تقريباً (14.2–15.0%) في اختبار TBIA بغض النظر عن عدد النباتات في المجموعة الواحدة. الاّ أنه عند استعمال اختبار DAS-ELISA كانت نسبة الإصابة 13.7% عند

فحص النباتات في مجموعات من 25 نبات و 22.5% عند فحص النباتات في مجموعات من خمس نباتات. ويؤكد هذا التقارب في النتائج عند استعمال اختبار TBIA والتباين الكبير عند استعمال DAS-ELISA بأن الاختبار الأول هو أكثر دقة. والسبب الحقيقي لذلك هو أن اختبار TBIA يسمح بقراءة نتيجة كل نبات على حدة بينما يعطي اختبار DAS-ELISA قراءة متوسطة لجميع نباتات المجموعة ويتم تقدير نسبة الإصابة بعملية حسابية تقريبية.

ونتيجة لما تقدم، يمكن استعمال اختبار TBIA في أغلب المخابر عوضاً عن اختبار DAS-ELISA، إذ أن تحضير العينات في الاختبار الأخير، وبخاصة طحنها لاستخلاص العصير النباتي يستهلك جهداً ووقتاً كبيرين، ولهذا فإن أي وسيلة لاختصار الزمن أو الجهد بطحن العينات أمر مرغوب فيه، وبخاصة عند فحص عدد كبير من العينات بشكل مستمر، وهذه الغاية يحققها استعمال اختبار TBIA الذي لايحتاج إلى عملية طحن للعينات. كما يمكن استعمال اختبار TBIA في المخابر التي لاتتوافر فيها الإمكانات لإجراء اختبار DAS-ELISA الذي يجرى على أطباق ELISA كونه يتفوق على هذه الأخيرة بسهولة استخدامه وبإختصار الوقت، ولايحتاج إلى أجهزة مرتفعة الثمن لقراءة التفاعل الذي يمكن تقديره بالعين المجردة.



شكل 6. الكشف عن بادرة عدس مصابة بفيروس تلون بذور الفول ضمن مجموعة مؤلفة من 25 بادرة عدس بوساطة الاختبار المصلي لبصمة النسيج النباتي

Figure 6. Detection of broad bean stain comovirus in an infected lentil seedling in a group of 25 seedlings by TBIA.

جدول 1. نتائج الاختبار المصلي لبصمة النسيج النباتي (TBIA) مقارنة باختبار إليزا العادي (DAS-ELISA) في الكشف عن فيروس تلون بذور الفول ضمن مجموعات من بادرات العدس.

Table 1. Comparative results for the detection of broad bean stain comovirus (BBSV) in lentil groups by using tissue-blot immunoassay (TBIA) and double antibody sandwich ELISA (DAS-ELISA).

DAS-ELISA test اختبار إليزا العادي		TBIA test اختبار TBIA			
نسبة* الإصابة (%) بـ BBSV infection* rate %	عدد المجموعات المصابة بـ BBSV No. of groups infected with BBSV	نسبة* الإصابة (%) بـ BBSV infection* rate %	عدد البادرات المصابة بـ BBSV No. of seedlings infected with BBSV	عدد المجموعات المفحوصة في كل معاملة No. of groups tested/treatment	عدد البادرات في المجموعة No. of seedlings/ group
22.5	144	14.9	149	200	5
21.4	91	15.3	153	100	10
14.9	48	14.2	142	50	20
13.7	39	15.0	150	40	25

* تم حساب نسبة الإصابة حسب المعادلة المقترحة من قبل Maury ومشاركوه (6) والمشروحة في النص.

* Rate of infection was calculated by using the formula of Maury *et al.* (6).

Abstract

Makkouk, K.M. and S.G. Kumari. 1996. Detection of ten viruses by the tissue-blot immunoassay (TBIA). Arab J. Pl. Prot. 14(1): 3-9.

Sensitive detection of ten legume viruses was obtained by using the tissue-blot immunoassay (TBIA). Phloem limited viruses such as bean leaf roll luteovirus (BLRV) and faba bean necrotic yellows virus (FBNYV); and viruses which generally invade systemically all plant tissues such as alfalfa mosaic alfamovirus (AMV), cucumber mosaic cucumovirus (CMV), broad bean mottle bromovirus (BBMV), broad bean wilt fabavirus (BBWV), pea seed-borne mosaic potyvirus (PSbMV), bean yellow mosaic potyvirus (BYMV), broad bean stain comovirus (BBSV) and broad bean true mosaic comovirus (BBTMV) were all easily detected by this method. Polyclonal and monoclonal antibodies were used in the tests and both proved useful in producing visible reaction. TBIA was sensitive enough to detect the virus in all parts of the plant and at all growth stages. The test proved to be practical for testing groups of seedlings (5-25) after wrapping them together as one bundle by a parafilm membrane and then cutting them with a razor blade and blotting the cut surface on a nitrocellulose membrane as one sample. These results suggest that this test can be easily employed for the detection of seed-borne viruses after germinating the seeds, and is more practical than regular ELISA. It can be completed in less than four hours without sacrificing sensitivity. It is cheaper and does not require sophisticated facilities.

Key words: Legumes, viruses, serological tests, TBIA, DAS-ELISA, immunoassays.

References

المراجع

1. **Clark, M.F. and A.N. Adams.** 1977. Characteristics of the microplate method enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology 34:475-483.
2. **Hsu, H.T. and R.H. Lawson.** 1991. Direct tissue blotting for detection of tomato spotted wilt virus in *Impatiens*. Plant Disease 75:292-295.
3. **Katul, L., H.J. Vetten, E. Maiss, K.M. Makkouk, D.E. Lesemann and R. Casper.** 1993. Characteristics and serology of virus-like particles associated with faba bean necrotic yellows. Annal Applied Biology 123:629-647
4. **Lin, N.S., Y.H. Hsu and H.T. Hsu.** 1990. Immunological detection of plant virus and a mycoplasmalike organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membrane. Phytopathology 80:824-828.
5. **Makkouk, K.M. and A. Comeau.** 1994. Evaluation of various methods for the detection of barley yellow dwarf virus by the tissue-blot immunoassay and its use for virus detection in cereals inoculated at different growth stages. European Journal of Plant Pathology 100:71-80
6. **Maury, Y., C. Duby, J.M. Bossenec and G. Boudazin.** 1985. Group analysis using ELISA: determination of the level of transmission of soybean mosaic virus in soybean seed. Agronomie 5:405-415.