الكشف عن الفطر *Polymyxa betae* Keskin باستخدام الماسح الإلكتروني وعن الفيروسات المنقولة بالتربة التي تصيب الشوندر السكري/البنجر في سورية ولبنان باستخدام إختبار التفاعل المتسلسل للبوليمراز مع النسخ العكسي المتعدد

أحمد محمد مهنا[1]، لبنى سهيل دبيه[2] وإيليا الشويري[3]

(1) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة دمشق، دمشق، سورية، البريد الإلكتروني: a.m.mouhanna@gmail.com؛ (2) مديرية وقاية النبات، وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، دمشق سورية؛ (3) فرع وقاية النبات، مصلحة الأبحاث العلمية الزراعية، تل العمارة، ص.ب. 287، زحلة، لبنان.

الملخص

مهنا، أحمد محمد، لبنى سهيل ديبة وإيليا شويري. 2016. الكشف عن الفطر *Polymyxa betae* Keskin باستخدام الماسح الإلكتروني وعن الفيروسات المنقولة بالتربة التي تصيب الشوندر السكري/البنجر في سورية ولبنان باستخدام إختبار التفاعل المتسلسل للبوليمراز مع النسخ العكسي المتعدد. مجلة وقاية النبات العربية، مجلة وقاية النبات العربية، 34(2): 106–113.

يعد الفطر *Polymyxa betae* Keskin الناقل الوحيد لفيروس اصفرار وموت عروق الشوندر/البنجر *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) وفيروس الشوندر السكري/البنجر المنقول بالتربة *Beet soil-borne virus* (BSBV). كما ينقل الفطر فيروسات أخرى كفيروس موزاييك الشوندر السكري/البنجر المنقول بالتربة *Beet soil-borne mosaic virus* (BSBMV) وفيروس الشوندر السكري/البنجرQ *Beet virus* Q (BVQ). جمعت 6 عينات تربة من حقول سبق معرفة إصابتها بمرض الريزومانيا من عدة مواقع في سورية ولبنان. أمكن الكشف عن الأبواغ الساكنة للفطر في جذور الشوندر السكري/البنجر باستخدام صبغات متعددة والمجهر باستخدام تكبيرات وصلت إلى 6000 مرة. استخلص الحمض النووي RNA من كامل عينات الشوندر التي اثبت إصابتها بالفطر *P. betae* و أجري اختبارMultiplex-PCR باستخدام بادئات متخصصة للفيروسات BNYVV، BSBV،BSBMV وBVQ. أمكن الكشف عن كل من فيروس BNYVV في العينات المجموعة من حمص (تلبيسة)، حماة (عين الكروم)، ولبنان (المعلقة)، فيروسBSBV في عينتي حمص (تلبيسة) ولبنان (المعلقة) وفيروس BSBMV في عينة الروضة (لبنان).

كلمات مفتاحية: الشوندر السكري/البنجر، BNYVV، BSBMV، BSBV، BVQ، *P. betae*، الماسح الالكتروني، Multiplex RT-PCR، سورية، لبنان.

المقدمة

يعد الشوندر السكري/البنجر (*Beta vulgaris* L.) من المحاصيل المهمة لإنتاج السكر في العالم وهو ثاني أهم مصدر لإنتاجه بعد قصب السكر (23). في سورية، يعد الشوندر السكري/البنجر المصدر الوحيد للحصول على السكر. يزرع الشوندر السكري في سورية في ثلاث عروات في كل من حمص، حماة، حلب، ادلب، الرقة، حوض الفرات ودير الزور (1). يصاب الشوندر السكري بالعديد من الأمراض الفيروسية أهمها مرض الريزومانيا الذي يسبب خسائر اقتصادية في الكثير من البلدان ويتوسع انتشاره في مختلف مناطق العالم (10، 14، 20، 25)، وتعزى الخسائر من جراء الإصابة بالمرض بسبب انخفاض وزن جذور الشوندر السكري ونقص محتواها من السكر (15). تظهر أعراض الإصابة بمرض الريزومانيا حقلياً بشكل بؤر محددة أو متسعة قد تشمل الحقل بكامله على هيئة اصفرار شاحب مع بقع نكروزية وذبول عام للنباتات وبخاصة عند الظهيرة. كما يلاحظ على المجموع الجذري نمو كثيف للشعيرات الجذرية على الجذر الرئيسي لتشكل ما يسمى باللحية، مع بقاء الجذر الرئيسي قزماً مشوهاً. وعند إجراء مقطع عرضي في الجذر الوتدي يلاحظ تلون الأوعية الناقلة باللون البني الناجم عن الأكسدة مما يؤدي لانسداد الأوعية الناقلة (2).

إن المسبب الرئيس لمرض الريزومانيا هو فيروس اصفرار وموت عروق الشوندر السكري *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV، جنس *Benyvirus*) (12)، تتميز جسيمات الفيروس بأنها عصوية الشكل لا يتجاوز قطرها 20 نانومتراً مكونة من أربعة أو خمسة أجزاء من الـحمض النووي الريبي وحيد السلسلة موجبة القطب ssRNA+، وتختلف أطوالها من 85 إلى 390 نانومتراً (7).

http://dx.doi.org/10.22268/AJPP-034.2.106113
© 2016 الجمعية العربية لوقاية النبات Arab Society for Plant Protection

ينتقل فيروس BNYVV إلى جذور الشوندر السكري بواسطة الفطر *Polymyxa betae* Keskin حيث تكون جسيمات الفيروس محمية ضمن الأكياس البوغية للفطر التي تستطيع البقاء ساكنة في التربة لسنوات طويلة تصل على الأقل إلى 15 سنة حتى بغياب جذور الشوندر السكري في التربة (9). ينتشر الفطر *P. betae* في أغلب المناطق التي تزرع الشوندر في العالم وسجل في العديد من الدول العربية، حيث كشف عنه في المغرب، لبنان، مصر وسورية (2).

كما سجلت إصابة جذور الشوندر السكري بفيروس الشوندر السكري المنقول بالتربة *Beet soil-borne virus* (BSBV، جنس *Pomovirus*) الذي تتشابه جسيماته مع جسيمات الفيروس BNYVV، فهي أربع جسيمات تتراوح أطوالها من 150 إلى 320 نانومتراً (2)، وفيروس موزاييك الشوندر السكري/البنجر المنقول بالتربة *Beet soil-borne mosaic virus* (BSBMV، جنس *Benyvirus*) الذي يتشابه مورفولوجياً مع الفيروس BNYVV فهو مكون من أربع جسيمات (8)، وفيروس الشوندر Q *Beet virus Q* (BVQ، جنس *Pomovirus*) الذي يتميز بجسيمات أيضاً عصوية الشكل مكونة من ثلاثة أجزاء (13). وبينما تختلف هذه الفيروسات في الأجناس التي تتبع لها فإنها تشترك في لناقل الحيوي وهو الفطر *P. betae* (15). على الرغم من الجدل حول علاقة هذه الفيروسات الثلاثة بمرض الريزومانيا فإنه من الشائع وجود هذه الفيروسات في الحقول المصابة بمرض الريزومانيا (15). أُثبت أن وجود مرض الريزومانيا دليل قاطع على وجود*P. betae* في التربة، في حين أن وجود *P. betae* لا يعني بالضرورة وجود الفيروسات التي تصيب الشوندر أو غيره من المحاصيل (3).

هدف هذا البحث إلى الكشف المباشر عن الفطر *P. betae* من خلال إجراء دراسة مجهرية لجذور الشوندر السكري تحت تكبيرات مختلفة باستخدام المجهر الضوئي والماسح الالكتروني، إضافة إلى الكشف عن الفيروسات المنقولة بوساطة الفطر *P. betae* باستخدام تقنية Multiplex RT-PCR.

مواد البحث وطرائقه

جمع عينات التربة

نفذ هذا البحث على عدة مراحل بالتعاون بين كل من مركز بحوث ودراسات المكافحة الحيوية والهيئة العامة للتقانة الحيوية في دمشق، وهيئة الطاقة الذرية، دمشق، وذلك في الفترة الواقعة بين تشرين الثاني/نوفمبر لعام 2012 وأيار/مايو لعام 2013. كما تم التعاون مع فرع وقاية النبات، تل العمارة التابع لمصلحة الأبحاث العلمية الزراعية، لبنان.

جمعت عينات التربة من عدة مواقع في محافظتي حمص (تلبيسة – صوامع الحبوب) وحماة (عين الكروم) من حقول أبدى فيها الشوندر السكري المزروع في الأعوام السابقة لعام الدراسة أعراض الإصابة بمرض الريزومانيا مستفيدين من المعلومات التي قدمها لنا المهندسون الزراعيون العاملون في الوحدات الإرشادية المنتشرة في المحافظتين، وذلك من أعماق مختلفة في حدود 5–25 سم من كافة أجزاء الحقل وخلطت مع بعضها، بحيث تراوح وزن العينة الواحدة من 2–3 كغ ووضعت في أكياس من النايلون، سجل عليها كافة البيانات. كما أرسلت إلينا (عبر فرع وقاية النبات، مصلحة الأبحاث الزراعية، تل العمارة، لبنان) ثلاث عينات تربة من منطقة البقاع (المعلقة، الروضة وعنجر) وجميعها من حقول ثبت سابقاً إصابتها بمرض الريزومانيا (6).

البذار

استعمل في التجارب بذار شوندر سكري/البنجر متعددة الجنين من الصنف سونيا. قدمت بذور الشوندر السكري من دائرة الشوندر السكري، قسم المحاصيل في الهيئة العامة للبحوث الزراعية بدمشق.

تجهيز التربة للزراعة

قبل استخدام عينات التربة في الزراعة، عقمت تربة رملية بالاوتوكلاف لمدة ساعة واحدة ومزجت مع عينات التربة بنسبة 20%، اما بالنسبة للشاهد فعقمت تربة مأخوذة من مزرعة كلية الزراعة وخلطت بنسبة 20% بالرمل المعقم. وزع تراب كل عينة الممزوج بالرمل المعقم في صواني تشتيل أبعادها 40×60 سم، ثم زرعت بذور الشوندر السكري تحت شروط البيت الزجاجي من حرارة 24±2ºس ورطوبة 60–70%. بعد 12 أسبوعاً من الزراعة قلعت النباتات وغسلت الجذور جيداً، وقسمت نباتات كل عينة إلى مجموعتين: الأولى خزنت في البراد واستعملت للكشف عن الفطر *P. betae* مجهرياً، والثانية خزنت بالمجمدة عند حرارة –70ºس إلى حين الاستعمال.

الكشف عن الفطر *P. betae* في جذور النباتات باستخدام المجهر الضوئي

غسلت جذور الشوندر السكري بالماء العادي ومن ثم بالماء المقطر ونقعت كل عينة بمحلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH (1 نظامي) لمدة 24 ساعة ثم غسلت مرة أخرى بالماء المقطر ومن ثم بالكحول الإيتيلي 90% (21). لسهولة ملاحظة الأبواغ الساكنة ضمن الشعيرات الجذرية قسمت الجذور إلى ثلاثة أقسام: الأول نقع بصبغة أحمر كارمن 0.5%، والثاني بصبغة فيوجن 0.5% لمدة نصف

ساعة ثم غسلت بالماء المقطر، أما الثالث فغسل فقط بالماء المقطر ولم يصبغ. وضعت الجذور على شرائح مجهرية وفحصت تحت المجهر الضوئي باستخدام تكبيرات مختلفة للكشف عن الأبواغ الساكنة.

الكشف عن الفطر *P. betae* في جذور النباتات باستخدام الماسح الالكتروني

أجري الكشف المجهري في مختبرات هيئة الطاقة الذرية في دمشق حيث عوملت جذور الشوندر السكري بهدف تثبيتها بمحلول جلوترألدهايد بتركيز 3% مع إضافة محلول منظم درجة حموضته 7.2 لمدة ست ساعات عند درجة حرارة الغرفة، ومن ثم غسلت العينات ثلاث مرات بمحلول منظم درجة حموضته 7.2، لمدة 10–15 دقيقة، وبعدها نزع الماء من العينة بالتجفيف حيث مررت العينة في تراكيز تصاعدية من كحول الإيتانول (30%، 50%، 70%، 90%، 100%) ولمدة 10 دقائق لكل منها، أما مرحلة التجفيف للنقطة الحرجة (نقطة التحول) فقد نفذت ضمن مجففة خاصة (Boekel) ولمدة 40 دقيقة، ثم وضعت العينات بعد ذلك على حامل خاص (Stubs) للتبخير، ولصقت بوساطة طلاء الفضة الموصل أو بشريط لاصق ثنائي الوجه بعد ذلك نقلت العينة إلى جهاز التبخير بالتفريغ، وبعدها تمت تغطية العينة بطبقة رقيقة من الذهب، بسمك 10–30 نانومتراً، لتكون قد أصبحت جاهزة للفحص بالمجهر الإلكتروني الماسح.

الكشف الجزيئي عن الفيروسات المنقولة بواسطة الفطر *P. betae*

استخلاص الـــحمض النووي الريبي (RNA)

تمت عملية استخلاص RNA من كل عينة من جذور الشوندر السكري المصابة بالفطر *P. betae* ومن جذور سليمة، حيث طحن 100–200 مغ من الجذور باستخدام الآزوت السائل، وأضيف 1 مل من محلول TriZol, TRI-reagent لكل 100 مغ من الجذور، مزجت جيداً ثم أضيف 0.3 مل كلوروفورم لكل 1 مل محلول TriZol، ثم وضعت بالمثفلة لمدة 15 دقيقة عند 4°س وسرعة 13000 د/د. أخذ الرائق العلوي (حوالي 600 ميكروليتر) ووضع في أنبوب 1.5 مل، ثم أضيف حجم مماثل من كحول الإيزوبروبانول وترك عند درجة حرارة المختبر لمدة 20–30 دقيقة، ثم ثفل لمدة 20 دقيقة. غسل الراسب بالكحول الإيتيلي 70% وثفل لمدة عشرة دقائق وبعدها جفف لمدة خمس دقائق عند 50 °س. أذيب الراسب بإضافة 30 ميكروليتر ماء خالي من إنزيمات النيوكلياز (RNAse/DNase-Free water) (5). قدرت كمية ونقاوة الـــ RNA بوساطة جهاز مقياس الطيف الضوئي، بالإعتماد على نسبة امتصاص الأشعة فوق البنفسجية عند طول موجة 260 نانومتراً إلى طول موجة 280 نانومتراً وضبط التركيز لجميع العينات عند 1 ميكروغرام/ميكروليتر، ثم حفظت عند حرارة –20 °س إلى حين الاستخدام.

البادئات المستخدمة

استخدم أربعة أزواج من البادئات المتخصصة للكشف عن الفيروسات المتوقع أن تكون مترافقة مع الفطر *P. betae*، صُنعت جميعها في هيئة الطاقة الذرية، دمشق، وتم ضبط تركيز جميع البادئات ليصبح 10 ميكروليتر/بيكومول (جدول 1).

اختبار Multiplex RT-PCR للكشف عن الفيروسات BNYVV، BSBV، BSBMV و BVQ

نُفّذ اختبار Multiplex RT-PCR باستخدام جميع البادئات المذكورة في الجدول 1 في آن واحد، حيث استخدم مجموعة (طقم أدوات) النسخ العكسي بخطوة واحدة (OneStep RT-PCR kit) المصنع من قبل شركة Qiagen، للحصول على السلسلة المكملة cDNA من الحمض النووي الريبي المستخلص ومن ثم مضاعفتها بنفس الوقت عبر برنامج خاص للمدور الحراري (Thermo cycler).

جدول 1. التتابع النيكليوتيدي للبادئات المستخدمة في الكشف عن الفيروسات المنقولة بالفطر *P. betae*.

Table 1. Base sequence of primers used to detect viruses transmitted by the fugal vector *P. betae*.

الفيروس Virus	تسلسل البادئ '3→'5 Sequence 5'→3'	حجم القطعة المضخمة (زوج قاعدي) Size of amplified fragments (bp)	المرجع Reference
BNYVV	F: CGAAGATAGCAGCACACAGGTTC R: TCAAGATAGGAGGCCTGTGGCAT	(RNA1) 458	27
BSBV	F: CTTACGCTGTTCACTTTTATGCC R: GTCCGCACTCTTTTCAACTGTTC	(RNA1) 399	15
BVQ	F: GTTTTCAAACTTGCCATCCT R: CCACAATGGGCCAATAGA	(RNA3) 689	24
BSBMV	F: CACAGCTCTCACATTGC R: CAGCATAAGCAGAATGC	(RNA2) 986	11

أُنجز اختبار mRT-PCR باستخدام 50 ميكرولتر من الحجم الكلي للمواد ضمن أنبوبة سعة 250 ميكرولتر (جدول 2)، ومن ثم وضعت في جهاز المدور الحراري وفق برنامج خاص بتقنية RT-PCR (جدول 3).

رحلت نواتج تفاعل البلمرة على هلامة الآغاروز 1.5% التي تحتوي على صبغة بروميد الإيثيديوم Ethedium Bromide (EtBr) المحضرة مسبقاً، في جهاز الرحلان الكهربائي عند شدة تيار كهربائي 100 فولت ولمدة 70 دقيقة مع إضافة مؤشر لسلم جزيئي بعتبة 100 زوج قاعدي (Ladder of 100 bp DNA)، ووثقت النتائج بتصوير هلامة الآغاروز.

جدول 2. المكونات الداخلة في تفاعل mRT-PCR للحصول على السلسلة المكملة cDNA.

Table 2. Components available in the reaction mixture of mRT-PCR to produce cDNA.

المكونات Components	الحجم (ميكرولتر) Volume (µl)
RNase-free water	12
5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	10
dNTP Mix	2
Primer A	4
Primer B	4
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	2
Q-Solution, 5x	10
Template RNA	6
Total volume الحجم الكلي	50

جدول 3. برنامج المدور الحراري الخاص بتقانة RT-PCR.

Table 3. Thermocycler program for the RT-PCR test.

المرحلة Step		الزمن (دقيقة) Time (minute)	الحرارة (°س) Temperature (°C)
Reverse transcription		30	50
Initial PCR activation step		15	95
Denaturation	40 cycles	1	94
Annealing		1	52
Extension		1	72
Final Extension		10	72

النتائج

الكشف المجهري عن الأبواغ الساكنة للفطر *P. betae* في خلايا جذور الشوندر السكري

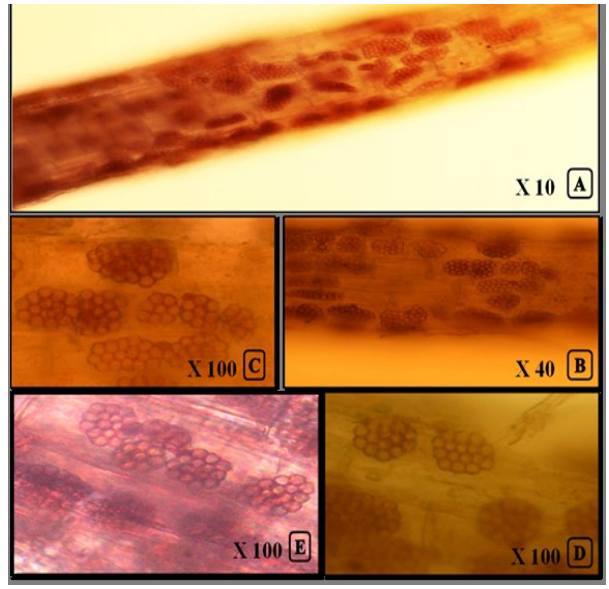
بينت الدراسة المجهرية لجميع جذور الشوندر السكري المزروعة في الترب التي تم جمعها إصابتها بالفطر *P. betae* (جدول 4).

وقد أظهرت صور المجهر الضوئي العادي عند تكبيرات مختلفة وجود الأكياس البوغية (Cystosorus) للفطر *P. betae* على شكل كرات عنقودية ضمن الشعيرات الجذرية للعينات داخل الخلايا وفي الفراغات الخلوية البينية (شكل 1)، إلا أن صبغات فيوجن وأحمر كارمن التي استُخدمت بهدف تمييز الأبواغ الساكنة لم تبد أية فروقات في سرعة التمييز قبل وبعد الاستخدام.

جدول 4. مواقع عينات التربة التي جمعت من حقول الشوندر السكري/البنجر المصابة بالريزومانيا.

Table 4. Locations of soil samples collected from Rhizomania infected sugar beet fields.

المحافظة Province		الموقع	Location	المحصول الحالي Present crop		المحصول السابق Previous crop		الإصابة بالفطر Infection	كثافة الأبواغ الساكنة Resting spores density	
Syria	**سورية**									
Homs	حمص	صوامع الحبوب	Cereals stores	Cumin	كمون	Sugar beet	شوندر	+	Medium	متوسطة
		تلبيسة	Talbisah	Sugar beet	شوندر	Wheat	قمح	+	High	عالية
Hama	حماة	عين الكروم	Ein Elkorum	Sugar beet	شوندر	Wheat	قمح	+	High	عالية
Lebanon	**لبنان**									
Bekaa	البقاع	المعلقة	Maallaka	Wheat	قمح	-		+	Medium	متوسطة
Bekaa	البقاع	الروضة	Al rawda	Potato	بطاطا	-		+	Medium	متوسطة
Bekaa	البقاع	عنجر	Anjar	Potato	بطاطا	-		+	High	عالية



شكل 1. عينات الجذور المصابة بالفطر *P. betae* بتكبيرات مختلفة والمأخوذة من نباتات الشوندر السكري المزروعة في تربة مصابة حيث تبدو الأبواغ الساكنة بشكل عناقيد Cystosorus. (A) جذور بدون استخدام صبغة تحت تكبير 10 مرات. (B) و (C) جذور باستخدام صبغة فيوجن تحت تكبير 40 و 100مرة. (D) و (E) جذور باستخدام صبغة أحمر كارمن تحت تكبير 100 مرة.

Figure 1. Sugar beet roots infected with *P. betae* checked under light microscope using different stains and showed resting spores as Cystosorus. (A) Roots without stain using magnification of 10 X. (B) and (C) Roots with Fugen stain using magnification of 40 X and 100 X. (E) and (D) Roots with Carmen red stain using magnification of 100 X.

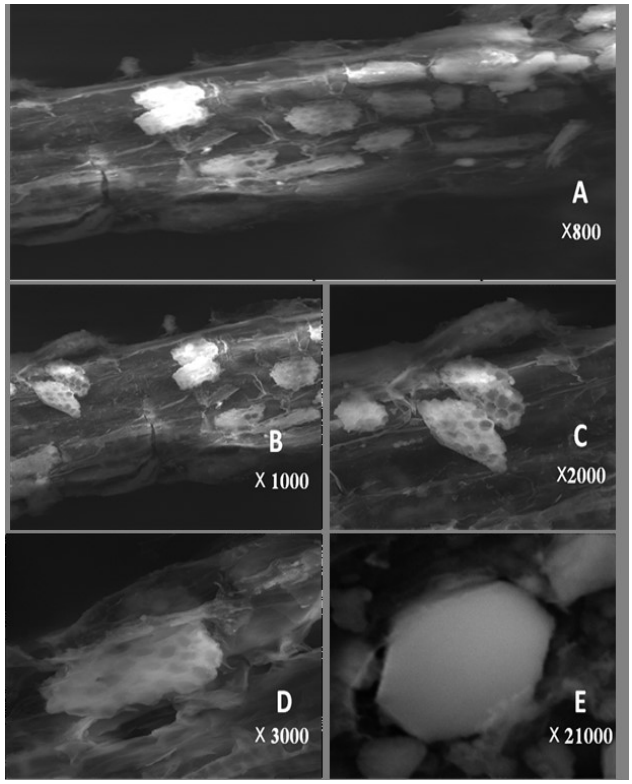
كما أوضحت صور الماسح الالكتروني الشكل العام للفطر *P. betae* حيث بدت الأكياس البوغية بشكل هلامي وذات تجاويف مختلفة وصولاً للبوغة المنفردة، مما سهل تمييز أبواغ الفطر ضمن الشعيرات الجذرية المصابة (شكل 2).

الكشف الجزيئي عن الفيروسات المنقولة بوساطة الفطر *P. betae*

بينت نتائج تقنية Multiplex RT-PCR التي أجريت على جميع العينات إصابة 50% من العينات بالفيروس BNYVV وذلك في كل من عينات حمص (تلبيسة)، حماة (عين الكروم)، ولبنان (المعلقة)، وكان وزن الحزمة المضخمة من RNA1 لفيروس BNYVV حوالي 458 bp، كما أظهرت النتائج وجود إصابة مشتركة بكل من الفيروسين BNYVV و BSBV في عينتي حمص (تلبيسة) ولبنان (المعلقة)، حيث كان وزن الحزمة المضخمة من RNA1 لفيروس BSBV حوالي 399 bp. أما بالنسبة لباقي العينات فلم يلاحظ وجود أي حزم للفيروسين BNYVV و BSBV، في حين لوحظ وجود حزمة وزنها حوالي 1000 bp في عينة لبنان (الروضة) مما يدل على إصابتها بفيروس BSBMV (شكل 3).

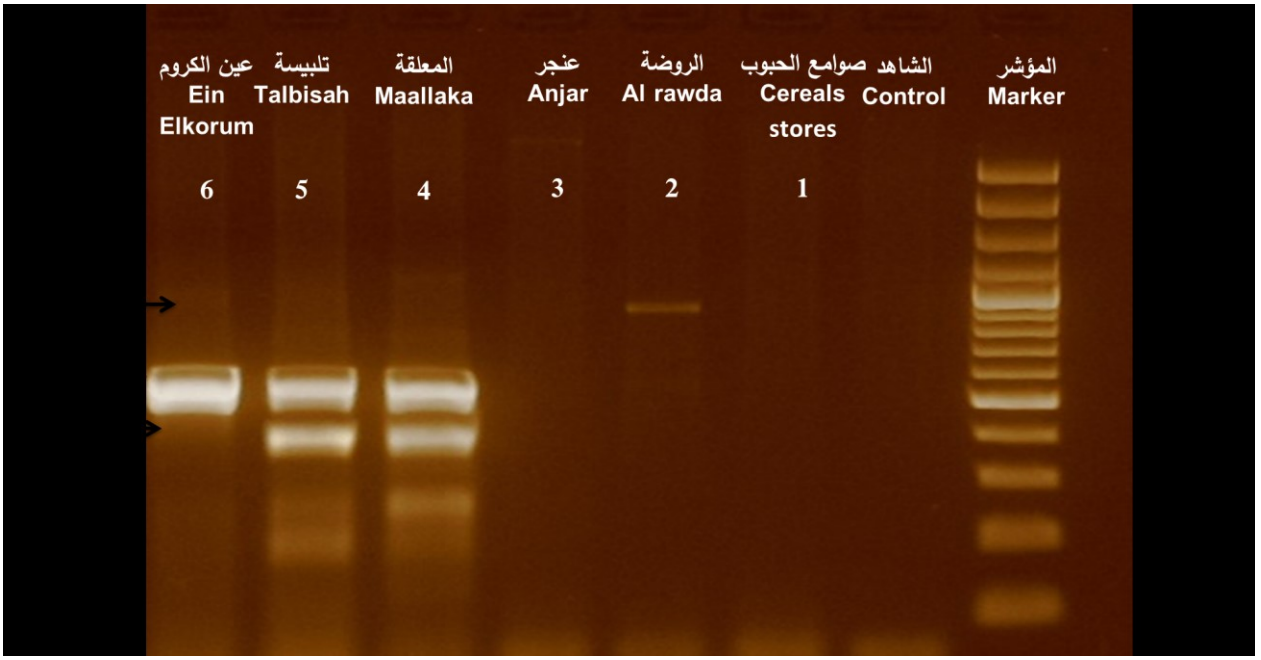
المناقشة

هناك تقارير سابقة أشارت إلى انتشار الفطر *P. betae* في مناطق مختلفة في كل من سورية ولبنان (3، 18). جاءت هذه الدراسة لتؤكد بدورها انتشار الفطر *P. betae* في بعض من المواقع السورية واللبنانية. أظهرت صور المجهر الضوئي الأكياس البوغية للفطر *P. betae* وبداخلها الأبواغ الساكنة في الشعيرات الجذرية لنباتات الشوندر السكري. كما استخدم المجهر الالكتروني الماسح الذي يستطيع تكبير العينات حتى 100 ألف مرة ولا يحتاج لتقطيع العينة إلى شرائح إنما يكفي رش العينة بطلاء معدني. أعطى الماسح الالكتروني صوراً ثلاثية الأبعاد وأكثر دقة وحساسية للأكياس البوغية للفطر *P. beta*e.



شكل 2. الفطر *P. betae* ضمن جذور الشوندر السكري كما تبدو تحت المجهر الالكتروني الماسح باستخدام تكبيرات مختلفة. (A) الشعيرات الجذرية لنبات الشوندر السكري مصاب بالفطر *P. betae* على تكبير 800 مرة، (B) الأكياس البوغية للفطر *P. betae* على تكبير 1000 مرة، (C) الأكياس البوغية بشكل أوضح على تكبير 2000 مرة، (D) الكيس البوغي للفطر *P. betae* على تكبير 3000 مرة، (E) الأبواغ المنفردة للفطر *P. betae* على تكبير 21000 مرة.

Figure 2. *P. betae* in root hairs of sugar beet under SEM using different magnifications. (A) Root hairs of sugar beet infected with *P. betae* at 800 X magnification. (B) Cystosorus of *P. betae* with magnification of 1000 X, (C) Clarifyed Cystosorus with magnification of 2000 X, (D) Cystosori with magnification of 3000 X, (E) Single Spore of *P. betae* with magnification of 21000 X.



شكل 3. الكشف عن الفيروسات المنقولة بوساطة *P. betae* باستخدام mRT-PCR في ستة عينات. 1: صوامع الحبوب، 2: الروضة 3: عنجر، 4: المعلقة، 5: تلبيسة، 6: عين الكروم، M: سلم مؤشر جزيئي، C: شاهد.

Figure 3. Detection of viruses transmitted by *P. betae* using mRT-PCR in six samples from different origins: 1. Cereals stores, 2: Al rawda, 3: Anjar, 4: Maallaka, 5: Talbisah, 6: Ein Elkorum, M: Molecular ladder, C: Control.

بينت هذه الدراسة إصابة كامل عينات جذور الشوندر السكري التي زرعت في ترب تم جمعها من حقول سجلت الإصابة فيها سابقاً بمرض الريزومانيا مما يؤكد قدرة الفطر *P. betae* في الحفاظ على حيويته في التربة لفترات طويلة (9). إن الفطر *P. betae* لا يعتبر ممرضاً لنباتات الشوندر السكري ولكنه يلعب دوراً رئيسياً في وبائية الأمراض الفيروسية التي تصيب الشوندر السكري (19). لذا كان لابد من إيجاد تقنية حساسة ومتخصصة للكشف عن الفيروسات المنقولة بوساطة الفطر *P. betae*. تتميز تقنية mRT-PCR بإمكانية الكشف عن عدة فيروسات باستخدام أكثر من زوج من البادئات ضمن التفاعل الواحد وذلك بهدف مضاعفة عدة قطع من المجين/الجينوم تتبع كل منها لفيروس محدد، مما يساعد على اختصار الزمن والتكلفة، شريطة توافق البادئات في درجة التحامها. استخدمت سابقاً تقنية الـ mRT-PCR للكشف في آن واحد عن فيروسات تتبع لأجناس مختلفة وتصيب عوائل نباتية مختلفة (26)، كما استخدمت أيضاً للتمييز بين الأنواع ضمن الجنس للفيروس BNYVV نفسه (22)، وقد أعطت هذه التقنية في دراسة أجريت في جمهورية بولندا نتائج إيجابية في الكشف عن الفيروسات BNYVV، BVQ، و BSBV التي تصيب الشوندر السكري (4).

بينت نتائج تقنية mRT-PCR التي أُجريت على كامل العينات المصابة بالفطر *P. betae* إصابة بعض العينات بالفيروس BNYVV، وهي عينات حمص (تلبيسة)، حماة (عين الكروم) ولبنان (المعلقة) في حين أن باقي العينات المصابة بالفطر *P. betae* لم تكن مصابة بالفيروس BNYVV وهذا يتوافق مع ما سُجل سابقاً (3) بأن وجود الفطر *P. betae* داخل جذور الشوندر السكري لا يعني بالضرورة وجود الفيروسات المنقولة بوساطته، مما يؤكد ضرورة إجراء الاختبارات الجزيئية للكشف عن هذه الفيروسات. كما أظهرت النتائج ترافق الفيروس BSBV مع الفيروس BNYVV في كل من موقعي حمص (تلبيسة) ولبنان (المعلقة)، بينما كان الفيروس BNYVV موجود بشكل منفرد في عينة حماة. وبينما سجلت إصابة عينة واحدة من العينات المدروسة بالفيروس BSBMV، وهي عينة لبنان (الروضة)، لم يسجل تواجد الفيروس BVQ في أي من العينات المدروسة.

إن تطوير أساليب وطرائق تشخيص المسببات المرضية تسهم في التنبؤ عن المرض واتباع افضل الطرق لمكافحتها، لذلك لا بد من التقصي عن الفيروسات المنقولة بوساطة الفطر *P. betae* قبل انتشارها للحد من أثرها السلبي وتجنب الخسائر الفادحة التي سببتها هذه الفيروسات سابقاً في محصول الشوندر السكري (16، 17).

Abstract

Mouhanna, A.M., L.S. Dibeh and E. Choueiri. 2016. Detection of *Polymyxa betae* using scanning electron microscopy and soil borne viruses in sugar beet by multiplex RT-PCR in Syria and Lebanon. Arab Journal of Plant Protection, 34(2): 106-113.

Polymyxa betae Keskin is considered the only vector of *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) and *Beet soil borne virus* (BSBV). In addition, *P. betae* is a vector of other viruses such as *Beet soil borne mosaic virus* (BSBMV) and Beet virus Q (BVQ). Six soil samples were collected from different locations of sugar beet fields previously infected with Rhizomania in Syria and Lebanon. Detection of resting spores of *P. betae* was carried out in the roots of sugar beet using scanning electron microscopy with multiple dyes and magnifications up to 6000 x. Total RNA was extracted from sugar beet samples infected with *P. betae* and subjected to multiplex-PCR test using specific primers of BNYVV, BSBV, BSBMV and BVQ. BNYVV was detected in Homs (Talbisah), Al Ghab (Ein Elkorum) and Lebanon (Maallaka) samples; BSBV was found in Homs (Talbisah) and Lebanon (Maallaka) samples; whereas BSBMV was only detected in Lebanon (Al rawda).

Keywords: Sugar beet, BVQ, BSBV, BNYVV, BSBMV, *P. betae*, SEM, multiplex RT-PCR, Syria, Lebanon.

Corresponding author: ***Ahmed Mohamed Mouhanna, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria, email: a.m.mouhanna@gmail.com***

References

10. **Gidner, S., B.L. Lennefors, N.O. Nilsson, J. Bensefelt, E. Johansson, U. Gyllenspetz and T. Kraft.** 2005. QTL mapping of BNYVV resistance from the WB41 source in sugar beet. Genome, 48: 279–285.
11. **Heidel, G.B., C.M. Rush, T.L. Kendall, S.A. Lommel and R.C. French.** 1997. Characteristics of beet soil-borne mosaic virus, a furo-like virus infecting sugar beet. Plant Disease, 81: 1070-1076.
12. **Iskander, A.L., K.A. El-Dougdoug, B.A. Othman, S. S. Eisa and A.A. Megahed.** 2014. Impact of soil salinity on fungal vector of Rhizomania virus infecting *Beta vulgaris*. African Journal of Agricultural Research, 9: 3330-3337.
13. **Koenig, R. and D.E. Lesemann.** 2000. Genus Benyvirus. Pages 917-922 In: Virus Taxonomy. M.H.V. van Regenmortel, C.M. Fauquet and D.H.L. Bishop (eds.). 7th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Academic Press, San Diego, CA.
14. **McGrann, G.R.D., G.M. Mutasa, E.F. Gottgens and M. Steven.** 2009. Progress towards the understanding and control of sugar beet Rhizomania Disease. Plant Pathology, 10: 129-141.
15. **Meunier, A., J.F. Schmit and C. Bragard.** 2003. Sequences analysis of Belgian isolates of BNYVV and development of a simultaneous detection of sugar beet virus by RT-PCR. Applied Environmental Microbiology, 69: 2356–2360.
16. **Mouhanna, A.M., A. Nasrallah, G. Langan and E. Schlosser.** 2002. Surveys for Beet necrotic yellow vein virus (the cause of Rhizomania) and other viruses, and soil–borne fungi infecting sugar beet in Syria. Journal of Phytopathology, 150: 657-662.
17. **Mouhanna, A.M.** 2001. Rizomania: Untersuchungen zur Epidemiologie und zur Systemisch Aktivierten Resistenz (SAR) bei der Zucherruebe. Diss. Fachverlag Koehler, Giessen. 236 pp. ISBN 3-934229-91-3.
18. **Mouhanna, A.M., E. Choueiri and G. Langen.** 2008. First report of *Polymyxa betae* and *Polymyxa*

المراجع

1. **المحاميد، وحيد، فاروق بكدش وياسين الحسن**. 2006. دراسة اقتصادية لمحصول الشوندر السكري في الجمهورية العربية السورية خلال الأعوام 1985-2003. مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية، 2: 315-333.
2. **مكوك، خالد محي الدين، فجلة جابر إبراهيم فجلة وصفاء قمري غسان**. 2008. الأمراض الفيروسية للمحاصيل الزراعية المهمة في المنطقة العربية. الجمعية العربية لوقاية النبات، بيروت، لبنان. 361 صفحة.
3. **مهنا، أحمد محمد**. 2012. الكشف عن انتشار *Polymyxa* Keskin *betae* و*Polymyxa graminis* Led في سورية. مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية، 2 :177-193.
4. **Borodynko, N., N. Rymelska, B. Hasiów-Jaroszewska and H. Pospieszny.** 2009. Molecular characterization of three soil-borne sugar beet-infecting viruses based on the coat protein gene. Journal of Plant Pathology, 91: 191-193.
5. **Chomczynski P. and N. Sacchi.** 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry, 162:156-159.
6. **Choueiri, E., H. Younis, A. Saad, S. Issa, L. Hanna, S. Hajj Hassan and T. El Tackach.** 2001. Occurrence and distribution of sugar beet viruses in Lebanon. Phytopathologia Mediterranea, 40: 260-264.
7. **Culal-Kılıç, H., N. Yardımc and G. Urgen** 2014. Detection of Beet Necrotic Yellow Vein Virus by Double Stranded RNA Analysis. International Journal of Biology, 6: 95-101.
8. **D'Alonzo, M., A. Delbianco, C. Lanzoni, C. Autonell, D. Gilmer and C. Ratti.** 2012. Beet soil-borne mosaic virus RNA-4 encodes a 32 kDa protein involved in symptom expression and in virus transmission through *Polymyxa betae*. Virology, 423: 187-194.
9. **Davarani, F.H., S. Rezaee, S.B. Mahoudi, P. Norouzi and M.R. Safarnejad.** 2013. Identification and quantification of viruliferous and non *viruliferous Polymyxa betae*. International Journal of Bioscience, 3: 165-171.

graminis in Lebanon. Journal of Plant Pathology, 90: 585.

19. **Ourania, I.P., S. Piergiorgio, B. Enrico and N.S. George.** 2001. Achievements and prospects in breeding for rhizomania resistance in sugar beet. Field crops Research, 122: 165-172.
20. **Peltier, C., K. Hleibieh, H. Thiel, E. Klein, C. Bragard and B. Gilmer.** 2008. Molecular biology of the beet necrotic yellow vein virus. Plant viruses, 2: 14-24**.**
21. **Phillips, J. and D.S. Hayman.** 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British Mycological Society, 55: 158–161.
22. **Rattia, C., G. Clover, C. Autonell, V. Harjub and C. Henryb.** 2005. A multiplex RT-PCR assay capable of distinguishing beet necrotic yellow vein virus types A and B. Journal of Virological Methods, 124: 41–47.
23. **Refay, Y.A.** 2010. Root yield and quality traits of three sugar beet (*Beta vulgaris* L.) varieties in relation to sowing date and stand densities. World Journal of Agricultural Sciences, 6: 589-594.
24. **Rubies, C.A., C. Ratti and R. Resca.** 2006. First Report of *Beet virus Q* in Spain. Plant Disease, 90: 110.
25. **Rush, C.M., H.Y. Liu, R.T. Lewellen and R. Acosta-Leal.** 2006. The continuing saga of rhizomania of sugar beets in the United States. Plant Disease, 90: 4–15.
26. **Staniulis, J., I. Zitikaitė, M. Žižytė, E. Jackevicienė, L. Urbanavicienė and D. Šneideris** 2012. Detection and molecular identification of alien viruses of plums, sugar beets and tomatoes. Žemdirbystė, 99: 85–92.
27. **Suarez, M.B., I. Grondona, P. Garcia-Benavides, E. Monte and I. Garcia-Acha.** 1999. Characterization of beet necrotic yellow vein furovirus from Spanish sugar beets. International Microbiology, 2: 87-92.

Received: September 3, 2015; Accepted: February 9, 2016

تاريخ الاستلام: 2015/9/3؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2016/2/9