الفصل الثالث

الطرائق المتبعة لتشخيص الفيروسات النباتية

صفاء غسان قمري[1]، خالد محي الدين مكوك[1] ويوسف أبو جودة[2]
(1) المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (ايكاردا)، ص.ب. 5466، حلب، سورية؛
(2) كلية العلوم الزراعية والغذائية، الجامعة الأمريكية في بيروت، لبنان

المحتويات

1. المقدمة
2. الإختبارات التشخيصية بناءً على الخصائص الحيوية والمورفولوجية
   1.2. الأعراض الظاهرية
   2.2. المدى العوائلي وطرائق الإنتقال
   3.2. الخصائص الفيزيائية في العصير
   4.2. المجهر الإلكتروني والمجهر الضوئي
3. الإختبارات المصلية/السيرولوجية
   1.3. إختبارات الترسيب والتخثر/ التراص
   2.3. التفاعل المناعي تحت المجهر الإلكتروني
   3.3. إختبار الإدمصاص المناعي المرتبط بالأنزيم – اليزا (ELISA)
      1.3.3. العوامل التي تؤثر على نتائج اليزا
   4.3. إختبار الإرتباط المناعي النقطي (DIBA)
   5.3. إختبار بصمة النسيج النباتي المناعي (TBIA)
4. إختبارات تشخيصية ترتكز على الحمض النووي للفيروس
   1.4. إختبار تهجين الحمض النووي
   2.4. التفاعل المتسلسل للبوليمراز (PCR)
5. استنتاجات عامة
6. المراجع

1. المقدمة

تصيب الأمراض الفيروسية مختلف الأنواع النباتية، إلا أنه حالياً، ليس هناك أي طريقة كيميائية فعالة لمكافحة الفيروسات النباتية تكون مجدية اقتصادياً مشابهة لمبيدات البكتيريا أو الفطريات. لذلك تهدف استراتيجيات إدارة الأمراض الفيروسية أساساً إلى منع الإصابة بالفيروس عن طريق: (1) القضاء على مصدر العدوى لمنع الفيروس من الوصول إلى المحصول، (2) التقليل من انتشار الفيروس عن طريق التحكم في الناقل، (3) استخدام مواد اكثار (بذور، عقل،.....) خالية من الفيروس، و (4) استخدام نباتات مقاومة للفيروس أو التطعيم على أصول مقاومة للفيروس،

(5) العمليات الزراعية مثل تعديل موعد الزراعة، (6) العدوى بسلالات مستضعفة للوقاية من السلالات الخطرة.

ولتنفيذ تدابير المكافحة ضد الأمراض الفيروسية، يجب أولاً التشخيص الدقيق للفيروس الممرض، لأن ذلك يعتبر الخطوة الأساس لايجاد أفضل السبل للحد من انتشاره وتقليل الضرر الناتج من الإصابة به. وبحكم إزدياد التبادل التجاري للمواد الوراثية كالبذور ومواد الإكثار الإخرى عن طريق التجارة العالمية، فإن تشخيص الفيروسات في هذه المواد تكتسب أيضاً أهمية كبيرة لخدمات الحجر الصحي لضمان سلامة نقل المادة الوراثية عبر الحدود.

تم تطوير العديد من الطرائق التشخيصية للكشف عن الفيروسات النباتية. إن استخدام إختبار تشخيصي واحد في بعض الأحيان قد يوفر معلومات كافية عن هوية الفيروس، ولكن في أحيان أخرى نحتاج إلى مجموعة من الطرائق لتشخيص قاطع للفيروس. إن أفضل الإختبارات للكشف عن الفيروسات النباتية هي الإختبارات الحساسة والمتخصصة، والتي تكتمل في غضون فترة زمنية قصيرة نسبياً وغير مكلفة. إن التطورات الحديثة في التقنيات للكشف سواء عن البروتينات أو الأحماض النووية وفرت فرصة لتطوير طرائق تشخيص الأمراض النباتية الفيروسية.

ويتوقف نوع الإختبار التشخيصي الذي يتم إختياره على الموارد والتسهيلات المتاحة، وتوافر المواد الكاشفة، ومستوى الدقة والحساسية اللازمة لإجراء هذه الإختبارات، ونوع وعدد العينات التي سيتم إختبارها، وكمية المعلومات المتاحة عن الفيروس المراد الكشف عنه. في هذا الفصل سوف نعطي لمحة عامة عن بعض الإختبارات التشخيصية المتاحة للكشف عن الأمراض الفيروسية النباتية، مع التركيز على الكيفية التي يمكن أن يستخدمها الباحثون في البلدان النامية بما فيها المنطقة العربية.

2. الإختبارات التشخيصية بناءً على الخصائص الحيوية والمورفولوجية

1.2. الأعراض الظاهرية

تستخدم الأعراض التي تسببها الأمراض الفيروسية للتعرف على المسببات المرضية واجتثاث النباتات المريضة في محاولة للسيطرة على المرض. تكون المعاينة سهلة نسبياً عندما تكون الأعراض لمرض محدد واضحة. غير أن عوامل كثيرة مثل السلالة الفيروسية، النوع النباتي، وقت الإصابة والظروف البيئية يمكن أن تؤثر على الأعراض الظاهرية (Matthews, 1980). كما أن بعض الفيروسات لا تؤدي إلى أعراض إصابة ظاهرية. إضافة إلى ذلك، فإن فيروسات مختلفة أو سلالات مختلفة لنفس الفيروس يمكن أن تعطي أعراضاً مشابهة على نفس العائل النباتي. أحياناً كثيرة تظهر على النباتات أعراض مشابهة للأمراض الفيروسية إلا أنها ناتجة عن عوامل أخرى مثل الظروف الجوية غير

المناسبة، التربة المعدنية و نقص بعض العناصر المعدنية المغذية، الإصابة الناتجة عن آفات أخرى كالفايتوبلاسما والبكتيريا والحشرات أو النيماتودا، تلوث الهواء والضرر الناتج عن سوء استعمال المبيدات (وخاصة المبيدات العشبية).

مع أن الأعراض تعطي معلومات عن الفيروسات، فإن الخبرة الميدانية مطلوبة عند اتخاذ قرار حول تشخيص الفيروسات بناء على الأعراض فقط. في العادة، من الضروري أن يسير التشخيص بناءً على الأعراض جنباً إلى جنب مع الإختبارات الأخرى لضمان دقة تشخيص الإصابة الفيروسية (Bock, 1982).

2.2. المدى العوائلي وطرائق الانتقال

إن الكشف عن ماهية الفيروسات يمكن أن تعتمد جزئياً على معرفة طريقة انتقال الفيروس، أهي بالعدوى الميكانيكية، أم بالتطعيم أو بواسطة ناقل حشري أو أية نواقل حيوية أخرى (Jones, 1993). إن إلقاح النباتات العشبية ميكانيكياً باستخدام العصارة النباتية يمكن القيام بها بحد أدنى من التسهيلات، فالأعراض المميزة التي تنتجها الفيروسات على هذه النباتات تسمح بالكشف وتعريف العديد من الفيروسات (Horvath, 1993). وعلى الرغم من أن المدى العوائلي قد لا يكون طريقة دقيقة لتحديد ماهية الفيروس (Hamilton *et al*., 1981)، إلا أنها مازالت تستخدم في كثير من المختبرات لاعتبارها عنصراً هاماً في تشخيص الفيروس. يمكن زيادة دقة إختبارات المدى العوائلي عن طريق استخدام مجموعة مناسبة من النباتات (جدول 1) واجرائها بواسطة أصحاب خبرة في هذا الموضوع.

جدول 1. بعض النباتات الدالة الشائعة الإستعمال للكشف على الفيروسات (Noordam, 1973).

النوع النباتي	عمر النبات المفضل عند الإعداء
الشوندر السكري/البنجر (*Beta vulgaris* L.)	5 أسابيع
Chenopodium amaranticolor, Coste & Reyn.	شهرين
Chenopodium quinoa L.	شهرين
الخيار (*Cucumis sativus* L.)	10 أيام
الداتورة (*Datura stramonium* L.)	5-8 أسابيع
Nicotiana glutinosa L.	6 أسابيع
التبغ (*Nicotiana tabacum* L.) – الصنف Samsun NN	5 أسابيع
التبغ (*Nicotiana tabacum* L.) – الصنف White Burley	5 أسابيع
الفاصولياء (*Phaseolus vulgaris* L.) – الصنف Beka	10 أيام
الفاصولياء (*Phaseolus vulgaris* L.) – الصنف Pinto	10 أيام
الفول (*Vicia faba* L.)	اسبوعين
اللوبياء (*Vigna sinensis* (L.) Endl.)	10 أيام

يمكن تشخيص الفيروسات التي لاتنتقل ميكانيكياً وفيروسات أشجار الفاكهة عن طريق النقل الحشري أو بالتطعيم على نباتات دالة حساسة (Fridlund, 1980؛ Martelli, 1993). ومع أن هذه الإختبارات تستخدم في العديد من المختبرات سواء لتشخيص الفيروسات أو لحفظها أو تكاثرها، إلا أنها تستهلك الوقت والموارد، ويصعب تمييز بعض الفيروسات عن طريق الأعراض الظاهرية فقط.

3.2. الخصائص الفيزيائية في العصير

إن الخصائص الفيزيائية (مثل درجة الحرارة المثبطة، نقطة التخفيف النهائية، مدة التعمير في المختبر) لقياس فعالية الفيروس في العصير النباتي، كانت تستخدم لتعريف الفيروسات النباتية. إلا أن مثل هذه الصفات غير موثوق بها ولم يعد يوصى بها لتشخيص الفيروسات (Francki, 1980).

4.2. المجهر الإلكتروني والمجهر الضوئي

إن استخدام المجهر الإلكتروني يمكن أن يعطي معلومات مفيدة عن الصفات المورفولوجية للجسيمات الفيروسية، وهو شائع الاستعمال في الكشف عن الفيروسات النباتية عندما تكون التسهيلات متوفره (Baker *et al*., 1985؛ Milne, 1993). كما يسمح المجهر الإلكتروني بكشف وجود إصابات بأكثر من فيروس واحد في نفس النبات إذا كانت صفاتها المورفولوجية مختلفة. إن الكشف عن الفيروسات الخيطية والعصوية الشكل مثل Potyviruses، Potexviruses و Tobamoviruses يكون أسهل من الفيروسات المتقايسة/متساوية الأبعاد وغيرها من الفيروسات عند فحصها بالمجهر الإلكتروني. يصعب رؤية الفيروسات التي توجد عادة بتراكيز منخفضة في عصارة النسيج النباتي تحت المجهر الإلكتروني ما لم يتم تركيز هذه الفيروسات قبل فحصها. ويمكن تحسين كفاءة المجهر الإلكتروني عند اقرانه بالإختبارات المصلية/السيرولوجية (immunoelectron microscopy). إلا أن استخدام المجهر الإلكتروني مكلف ويحتاج إلى خبرة، وهو غير متوفر في كثير من الأحيان. إن العديد من مؤسسات البحوث الزراعية لا تستطيع أن تتحمل تكلفة المجهر الإلكتروني الباهظة والتي تتطلب صيانة مستمرة.

يرافق الإصابة بالعديد من الفيروسات النباتية وجود أجسام محتواة وبلورات تراكمية كبيرة داخل الخلايا. إن الكشف عن هذه الأجسام بواسطة المجهر الضوئي يكون عملية بسيطة وسريعة ورخيصة نسبياً (Edwardson *et al*., 1993). وبما أن أشكال وخصائص الأجسام المحتواة (inclusion bodies) تنتج عن الإصابة ببعض الفيروسات، فإنه يمكن في بعض الأحيان تحديد نوع الفيروس إلى مستوى الجنس بناءً على الأجسام المحتواة الملاحظة وذلك باستخدام صبغات خاصة.

إن استخدام مثل هذه التقنية للكشف عن الفيروسات تحتاج إلى تجارب عملية مستفيضة ونادراً ما يستخدمها المبتدئ لتعريف الفيروسات النباتية بشكل روتيني.

3. الإختبارات المصلية/ السيرولوجية

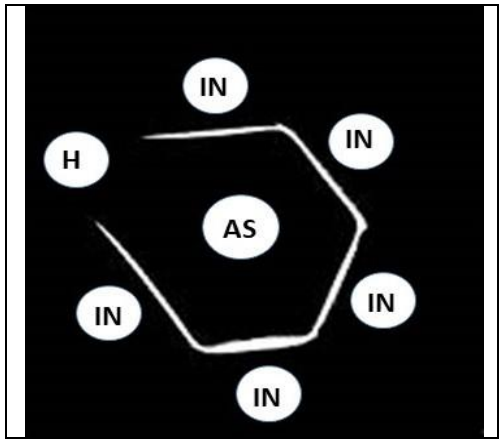
تم تطوير واستخدام الإختبارات المصلية/ السيرولوجية والأمصال المناعية بنجاح للكشف عن الفيروسات النباتية منذ عدة عقود من الزمن. وتعتبر الإختبارت السيرولوجية أكثر الإختبارات المستعملة في الكشف عن الفيروسات شيوعاً. في البداية، استخدم تفاعل الجسم المضاد مع مولد الضد (الفيروس) لتكوين مترسب مرئي مثل، إختبارات الترسيب فائق الصغر (microprecipitin test)، إختبار الإنتشار المزدوج في الآجار (Agar double diffusion test) وإختبار تخثر/ تراص الخلايا (Agglutination test) للكشف عن الفيروسات. وفي مرحلة لاحقة، اجريت الإختبارات على سطح صلب مثل الأطباق أو أغشية النيتروسلليلوز، حيث تستخدم كواشف لمشاهدة تفاعل الجسم المضاد مع الفيروس وذلك عن طريق تعليم الأجسام المضادة بانزيمات. سوف يتم التطرق إلى بعض هذه الإختبارات في الفقرات التالية، ولكن يمكن الإطلاع على تفاصيل الإختبارات في مراجع مختلفة (مكوك وقمري، 1996؛ Fegla *et al.*, 2001؛ Makkouk & van Regenmortel, 1982؛ Hampton *et al.*, 1990؛ Comeau, 1994؛ van Regenmortel & Dubs, 1993).

1.3. إختبارات الترسيب والتخثر/التراص

تعتمد إختبارات الترسيب (سواء في مادة سائلة أو في مادة هلامية) على تشكيل منطقة ترسيبية مرئية عندما تتحد كميات كافية من الفيروس مع الأجسام المضادة (Ball, 1974؛ van Regenmortel, 1982). استخدمت إختبارات الترسيب فائق الصغر من قبل بعض المختصين، ولكن استخدام إختباري الإنتشار المزدوج في الآجار وتخثر/تراص الخلايا كانا أكثر شيوعاً. في إختبار الإنتشار المزدوج في الآجار، تنتشر كلاً من الأجسام المضادة ومولد الضد (سواء الفيروس النقي أو العصارة النباتية الحاوية على الفيروس) عبر هلام الآجار وتكوّن خط ترسيبي مرئي في المنطقة التي يلتقيان فيها في الأجار/الهلام بالتركيزات المناسبة (Ouchterlony, 1962) (شكل 1). ويمكن استخدام هذا الإختبار لتمييز صلة القرابة مابين السلالات الفيروسية. لكن عيوب هذه الطريقة تتمثل بعدم توفر الحساسية الكافية في الكشف عن الفيروسات التي تتواجد بتراكيز منخفضة (مثل فيروسات الإصفرار Luteoviruses ومعظم الفيروسات التي تصيب الأشجار

الخشبية)، وضرورة تجزئة جسيمات الفيروسات الخيطية والعصوية لتمكينها من الإنتشار في الهلام، كما تحتاج إلى كميات كبيرة من الأجسام المضادة، والتي أصبحت الآن غالية الثمن.

في إختبار التخثر/التراص، فإن الجسم المضاد يرتبط أو يغطي السطوح لبعض جسيمات المادة الخامدة (مثل خلايا الدم الحمراء، لبن الشجر latex، أو خلايا بكتيريا المكورات العنقودية *Staphylococcus aureus*)، وإن التفاعل الموجب للجسم المضاد مع الفيروس يكون على شكل تخثر أو تراص جسيمات المادة الخامدة التي يمكن أن تشاهد بالعين المجردة أو باستخدام مكبرة. يعتبر إختبار التخثر/التراص أكثر حساسية من باقي الإختبارات الترسيبية ويمكن اجراؤه لفيروسات ذات تراكيز منخفضة (Chirkov *et al*., 1984؛ Hughes & Ollennu, 1993؛ Walkey *et al*., 1992).



شكل 1. إختبار الإنتشار المزدوج في الآجار، الخط الترسيبي يلاحظ فقط مابين العينة المصابة الموجودة في الحفر الخارجية التي تحوي عصارة من النبات المصاب (IN) والمصل المضاد الموجود في الحفرة المركزية (AS). ويلاحظ عدم وجود خط ترسيبي مقابل عصارة من نبات سليم (H).

مع أن إختبارات الترسيب والتخثر/التراص أقل حساسية من الإختبارات المصلية/السيرولوجية الأخرى، إلا أنها طرق ممتازة للكشف عن الفيروسات التي تكون بتراكيز معقولة في النباتات. إن هذه الإختبارات سهلة جداً، فبمجرد الحصول على نقطة من عصارة النبات المصاب يتم فحصها بالأمصال المضادة المناسبة. يمكن إجراء هذه الإختبارات بالحد الأدنى من الإمكانيات والخبرات، وبالتالي فهي مناسبة للكثير من المختبرات التي تملك إمكانيات محدودة ولديها كميات كافية من الأمصال المضادة.

2.3. التفاعل المناعي تحت المجهر الإلكتروني

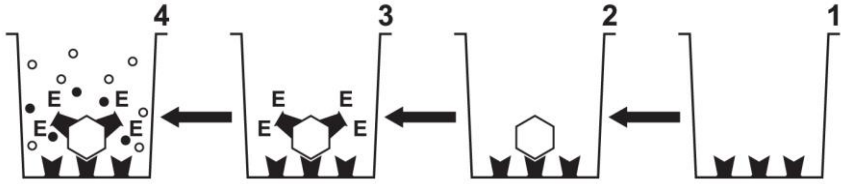
توجد ثلاثة طرق يمكن استخدامها للكشف عن الفيروسات النباتية وتشخيصها تحت المجهر الإلكتروني وهي التجميع (Clumping)، الاصطياد (Trapping) والزخرفة (Decoration)، إلا أن إختبار الزخرفة هو الأكثر شيوعاً في الاستخدام (Derrick, 1973؛ Milne, 1991)، كما يمكن الجمع بينها كاستخدام طريقة الاصطياد أولاً يليها الزخرفة على نفس العينة. تجمع هذه الطرق بين خصوصية الإختبارات المصلية/السيرولوجية مع التكبير الذي يسمح به المجهر الإلكتروني. ففي طريقة الزخرفة تغلف الجسيمات الفيروسية بشكل انتقائي بالأجسام المضادة مما يسمح بمشاهدة الفيروسات بسهولة أكبر والتأكد من ماهية الفيروس المراد تشخيصه بالإعتماد على خاصتين: شكل الفيروس وانتقائية الأجسام المضادة. وتسمح هذه الطريقة بالكشف بسهولة عن وجود إصابة مزدوجة بفيروسين لهما نفس الشكل المورفولوجي. بالإضافة إلى التشخيص، فإنه يمكن استخدام هذه الطرق لتقدير مدى العلاقة السيرولوجية ما بين الفيروسات.

3.3. إختبار الإدمصاص المناعي المرتبط بالإنزيم – اليزا (ELISA)

إن إختبار الإدمصاص المناعي المرتبط بالإنزيم (اليزا) هو أكثر الإختبارات شيوعاً للكشف عن الفيروسات في المواد النباتية، والحشرات الناقلة، والبذور ومواد الاكثار الخضرية منذ أن تم وصفه في عام 1977 (Clark & Adams, 1977). وخلافاً لإختبارات الترسيب والتخثر/التراص، فإن إختبار اليزا تجرى على أسطح صلبة، ويتم عادة على أطباق إليزا مصنوعة من البلاستيك – البولي ستيرين (Polystyrene microtiter plates) (أطباق صلبة/جامدة) أو كلوريد البوليفينيل (PVC، أطباق مرنة). وبسبب القابلية للتكيف والحساسية والاقتصاد في استخدام الكواشف، يستخدم إختبار اليزا في مجموعة واسعة من الحالات، وخاصة لإختبار عدد كبير من العينات في فترة قصيرة نسبياً من الزمن. تم تطوير تحويرات كثيرة من اليزا، وتختلف هذه الطرائق عن بعضها البعض في مبدأ وضع الأجسام المضادة والفيروس، ولكن مبدأ التفاعل والنتائج النهائية متقاربة (Clark & Bar-Joseph, 1984؛ Cooper & Edwards, 1986؛ van Regenmortel & Dubs, 1993). وسوف نتناول بشيء من التفصيل ثلاثة من هذه الطرائق.

الطريقة الأولى – إختبار اليزا بالإحتواء المزدوج للفيروس بالأجسام المضادة (Double antibody sandwich-ELISA (DAS-ELISA)، في هذه الطريقة تستعمل الأجسام المضادة (تكون عادة من نوع غلوبيولينات غاما المناعية Immuno-globulin – طراز IgG المعزولة من المصل المضاد) لتغليف سطوح حفر طبق اليزا حيث تسمح بالتقاط الجسيمات

الفيروسية في عينة الإختبار. ثم يكشف فيما بعد عن الفيروس المرتبط بالأجسام المضادة عن طريق التحضين بالأجسام المضادة المربوطة بالأنزيم يليه إضافة المادة الكاشفة (شكل 2). يعتبر إختبار DAS-ELISA عالي التخصص ويحتاج إلى تحضير الأجسام المضادة النقية لربطها بالأنزيم.



شكل 2. شكل توضيحي يبين المبدأ العام لإختبار اليزا بالإحتواء المزدوج للفيروس بالأجسام المضادة "Double antibody sandwich-ELSA" (DAS-ELISA). (1) اضافة الأجسام المضادة المتخصصة، (2) اضافة العينة التي تحتوي على الفيروس، (3) اضافة الأجسام المضادة المتخصصة المرتبطة بالأنزيم (E)، (4) اضافة المادة الكاشفة التي ستتلون باللون الأصفر نتيجة وجود الأنزيم.

الخطوات الرئيسية لاتمام إختبار DAS-ELISA:

1. تغطى حفر أطباق اليزا بـ 100- 200 ميكروليتر/حفرة من محلول التغطية (Coating buffer) يحتوي على غلوبيولينات غاما المناعية (طراز IgG) المتخصصة بتركيز 1-10 ميكروغرامات لكل ميلليلتر (تبعاً لفاعلية المصل المضاد). يحضر محلول التغطية كما يلي: يذاب 1.59 غ من كربونات الصوديوم (Na_2CO_3) و 2.93 غ من بيكربونات الصوديوم ($NaHCO_3$) و 0.2 غ من أزيد الصوديوم (NaN_3) في ليتر واحد من الماء المقطر، ثم تعدل درجة حموضته (pH) إلى 9.6.
2. تحضن أطباق اليزا لمدة أربع ساعات عند درجة حرارة 37 °س.
3. تغسل الأطباق خمس مرات بمحلول الغسيل PBST (PBS يحتوي على 0.05% من مادة Tween 20) وذلك بفاصل 5 دقائق بين الغسلة والأخرى. يحضر محلول PBS (محلول منظم ملحي فوسفاتي) كما يلي: يذاب 8 غ من كلوريد الصوديوم (NaCl) و 0.757 غ من فوسفات الصوديوم اللامائية أحادية الهيدروجين (Na_2HPO_4) و 0.2 غ من كلوريد البوتاسيوم (KCl) و 0.2 غ من أزيد الصوديم (NaN_3) في ليتر واحد من الماء المقطر، ثم تعدل درجة حموضته (pH) إلى 7.4.
4. يضاف لكل حفرة 100-200 ميكروليتر من العينة المراد فحصها والمحضرة بمحلول فوسفاتي عيارية 0.2 مولار ودرجة حموضته 6، وبحيث يوضع كل عينة في حفرتين متجاورتين.
5. تحضن أطباق اليزا 16 ساعة عند درجة حرارة 4 °س أو 3 ساعات عند درجة حرارة 37 °س.
6. تغسل الأطباق كما ورد في الخطوة رقم 3.

7. يضاف لكل حفرة من حفر طبق اليزا 100-200 ميكروليتر من الأجسام المضادة (غلوبيولينات غاما المناعية) المتخصصة المرتبطة بإنزيم الفوسفاتاز القلوي (Alkaline phpsphatase) والمخففة من 1000:1-500:1 في محلول المنظم للربط (Conjugate buffer) (تبعاً لفاعلية المصل المضاد). يحضر هذا المحلول كما يلي: يذاب 20 غ من مادة Polyvenylpyrrolydone (PVP) و 2 غ من مادة بياض البيض (Ovalbumin) في ليتر واحد من محلول الغسيل (PBST).
8. تحضن أطباق اليزا لمدة 4 ساعات عند درجة حرارة 37 °س.
9. تغسل الأطباق كما ورد في الخطوة رقم 3.
10. يضاف لكل حفرة من حفر طبق اليزا 100-250 ميكروليتر من مادة p-Nitrophenyl phosphate (مادة شفافة تتفكك وتتحول إلى اللون الأصفر بفعل إنزيم الفوسفاتاز القلوي) وبتركيز 0.5 مغ/مل من محلول منظم لإذابة المادة التي يعمل عليها الأنزيم (Substrate buffer) درجة حموضته 9.8. يحضر هذا المحلول كما يلي: يمزج 97 مل من Diethanolamine مع 800 مل من الماء المقطر، ويذاب فيها 0.2 غ من أزيد الصوديم (NaN3). ثم تضبط درجة الحموضة (pH) على 9.8 باستعمال حمض كلور الماء (HCl) ويكمل الحجم إلى ليتر واحد بالماء المقطر، يفضل تحضير هذا المحلول المنظم عند الإستعمال وأن لا يخزن لمدة تزيد عن أسبوع.
11. تترك الأطباق عند درجة حرارة المختبر لمدة تتراوح مابين 30 دقيقة إلى ساعتين (حسب قوة التفاعل)، ثم تقدر شدة التفاعل بقياس درجة امتصاص الضوء عند الموجة 405 نانومترات، وباستعمال قارئ اليزا.

الطريقة الثانية – إختبار اليزا بتغطية الطبق بمولد الضد مباشرة -Direct antigen coating ELISA (DAC-ELISA)، حيث يتم وضع الفيروس (العينات المراد فحصها) مباشرة في طبق الاليزا (Younes, 1995 ؛Hourani & Abou-Jawdah, 2003 ؛Fegla *et al*., 1997, 2004)، في غياب أي أجسام مضادة لربط الفيروس فيها كما في DAS-ELISA. في الخطوة الثانية، تعامل حفر أطباق اليزا بمادة Bovine serum albumin ثم تضاف الأجسام المضادة المتخصصة بالفيروس (يطلق عليه عادة الأجسام المضادة الأولية) سواء على شكل IgG أو مصل مضاد خام. ثم يتم الكشف عن الأجسام المضادة الأولية بواسطة أجسام مضادة متخصصة (يطلق عليها اسم الأجسام المضادة الثانية أو الأجسام المضادة الكاشفة) مربوطة بالأنزيم، يتبعها اضافة المادة الكاشفة التي تعطي لوناً. إن الأجسام المضادة الكاشفة (الأجسام المضادة الثانية) ترتبط تحديداً بالأجسام المضادة الأولية، حيث أنها انتجت ضد IgGs المتحصل عليها من الحيوان الذي انتج فيه الأجسام المضادة للفيروس (مثال على ذلك، اذا انتجت الأجسام المضادة الخاصة بالفيروس في الأرانب، عندها يجب انتاج أجسام مضادة لجلوبيولينات الأرانب المناعية في حيوان آخر مثل الماعز). من عيوب هذه الطريقة، التنافس ما بين الجسيمات الفيروسية والمواد النباتية الأخرى الموجودة في العصارة النباتية للمواقع الموجودة في حفر طبق اليزا وارتفاع قراءة الشواهد السلبية. يمكن التقليل من أثر هذه العيوب باستخدام طامسات (blocking agents) مناسبة وتخفيفات أعلى نسبياً للمستخلص الحاوي للفيروس

عن التخفيف الذي يستخدم عادة مع اليزا بالاحتواء المزدوج للفيروس بالأجسام المضادة (DAS-ELISA)، وكذلك معاملة الأمصال المضادة بعصير النباتات السليمة قبل الاستعمال (Younes, 1995 ؛Fegla *et al*., 1997, 2001).

الطريقة الثالثة – إختبار **اليزا بالاحتواء الثلاثي للفيروس بالأجسام المضادة Triple antibody sandwich-ELISA (TAS-ELISA)**، وهي طريقة واسعة الانتشار ومماثلة لإختبار DAS-ELISA، إلا أن لها خطوة اضافية قبل اضافة الأجسام المضادة الكاشفة المرتبطة بالأنزيم. في هذه الخطوة الإضافية، يتم اضافة الأجسام المضادة وحيدة الكلون المنتجة في حيوان آخر (عادة الفئران) التي تختلف حصراً عن الأجسام المضادة الأولية المستخدمة. عندها يتم الكشف عن الأجسام المضادة وحيدة الكلون عن طريق اضافة أجسام مضادة خاصة بها مرتبطة بالأنزيم (يقصد بذلك الأجسام المضادة للفئران منتجة في حيوان آخر مثل الماعز أو الأرانب) وبحيث لايرتبط بالأجسام المضادة الأولية، يليها إضافة المادة الكاشفة التي ستعطي اللون (Al-Moudallal *et al*., 1984).

الخطوات الرئيسية لاتمام إختبار TAS-ELISA:

1. تغطى حفر أطباق اليزا بـ 100- 200 ميكروليتر/حفرة من محلول التغطية (Coating buffer) يحتوي على غلوبيولينات غاما المناعية (طراز IgG) المتخصصة بتركيز 1-10 ميكروغرامات لكل ميليليتر (بناء لفاعلية المصل المضاد). يحضر محلول التغطية كما يلي: يذاب 1.59 غ من كربونات الصوديوم (Na_2CO_3) و 2.93 غ من بيكربونات الصوديوم ($NaHCO_3$) و 0.2 غ من أزيد الصوديوم (NaN_3) في ليتر واحد من الماء المقطر، ثم تعدل درجة حموضته (pH) إلى 9.6.
2. تحضن أطباق اليزا لمدة أربع ساعات عند درجة حرارة 37 ºس.
3. تغسل الأطباق خمس مرات بمحلول الغسيل PBST (PBS يحتوي على 0.05% من مادة Tween 20) وذلك بفاصل 5 دقائق بين الغسلة والأخرى. يحضر محلول PBS (محلول منظم ملحي فوسفاتي) كما يلي: يذاب 8 غ من كلوريد الصوديوم (NaCl) و 0.757 غ من أحادية الهيدروجين فوسفات الصوديوم اللامائية (Na_2HPO_4) و 0.2 غ من كلوريد البوتاسيوم (KCl) و 0.2 غ من أزيد الصوديم (NaN_3) في ليتر واحد من الماء المقطر، ثم تعدل درجة حموضته (pH) إلى 7.4.
4. يضاف لكل حفرة 100-200 ميكروليتر من العينة المراد فحصها والمحضرة بمحلول فوسفاتي عياريته 0.2 مولار ودرجة حموضته 6، وبحيث يوضع كل عينة في حفرتين متجاورتين.
5. تحضن أطباق اليزا لمدة 16 ساعة عند درجة حرارة 4 ºس.
6. تغسل الأطباق كما ورد في الخطوة رقم 3.

7. يضاف لكل حفرة من حفر طبق اليزا 200 ميكروليتر حليب خالي الدسم (Non-fat milk) بنسبة 1% مذاب بمحلول PBST، وذلك لتغطية السطوح الداخلية للحفر والتي بقيت عارية بعد المراحل السابقة.
8. تحضن أطباق اليزا لمدة ساعة واحدة عند درجة حرارة 4 ºس.
9. تغسل الأطباق كما ورد في الخطوة رقم 3.
10. يضاف لكل حفرة من حفر طبق اليزا 100-200 ميكروليتر من الأجسام المضادة وحيدة الكلون المتخصصة (المنتجة في أجسام الفئران) والمخففة 1:100-1:1000 في المحلول المنظم للربط (Conjugate buffer) (بناء لفاعلية المصل المضاد). يحضر هذا المحلول كما يلي: يذاب 20 غ من مادة Polyvenylpyrrolydone (PVP) و 2 غ من مادة بياض البيض (Ovalbumin) في ليتر واحد من محلول الغسيل (PBST).
11. تحضن أطباق اليزا لمدة ساعتين عند درجة حرارة 4 ºس.
12. تغسل الأطباق كما ورد في الخطوة رقم 3.
13. يضاف لكل حفرة من حفر طبق اليزا 100-200 ميكروليتر من الأجسام المضادة متعددة الكلون المنتجة في أجسام الماعز ضد الأجسام المضادة للفئران والمرتبطة بإنزيم الفوسفاتاز القلوي (Goat antimouse Conjugate-ALP) وذلك بعد تخفيفها حتى 1:2000 أو 1:5000 (حسب الشركة الصانعة) في المحلول المنظم لربط (Conjugate buffer).
14. تحضن أطباق اليزا لمدة ساعتين عند درجة حرارة 37 ºس.
15. تغسل الأطباق كما ورد في الخطوة رقم 3.
16. يضاف لكل حفرة من حفر طبق اليزا 125-250 ميكروليتر من مادة p-Nitrophenyl phosphate (مادة شفافة تتفكك وتتحول إلى اللون الأصفر بفعل إنزيم الفوسفاتاز القلوي) وبتركيز 0.5 مغ/مل من محلول منظم لاذابة المادة التي يعمل عليها الأنزيم (Substrate buffer) درجة حموضته 9.8. يحضر هذا المحلول كما يلي: يمزج 97 مل من Diethanolamine مع 800 مل من الماء المقطر، ويذاب فيها 0.2 غ من أزيد الصوديم (NaN3). ثم تضبط درجة الحموضة (pH) على 9.8 باستعمال حمض كلور الماء (HCl) ويكمل الحجم إلى ليتر واحد بالماء المقطر.
17. تترك الأطباق عند درجة حرارة المختبر لمدة تتراوح مابين 30 دقيقة إلى ساعتين (حسب قوة التفاعل)، ثم تقدر شدة التفاعل بقياس درجة امتصاص الضوء عند الموجة 405 نانومترات، وباستعمال قارئ اليزا.

ومن مميزات إختبار TAS-ELISA، والذي يتم فيه الكشف عن الفيروس عن طريق الأجسام المضادة غير المتخصصة بفيروس محدد، بل متخصصة بالأجسام المضادة للفيروس أو الأجسام المضادة الأولية. وكنتيجه لذلك، فإن جسم مضاد واحد مربوط بالأنزيم (الأجسام المضادة المنتجة في أجسام الماعز ضد الأجسام المضادة للأرانب goat antirabbit، أو الأجسام المضادة المنتجة في أجسام الماعز ضد الأجسام المضادة للفئران goat antimouse) يمكن استخدامه للكشف عن عدد كبير من الفيروسات، مما يجعل هذا الإختبار اقتصادياً وبالتالي مناسباً للكشف عن مجموعة من الفيروسات في عدد كبير من العينات خلال المسوحات الحقلية.

هناك أنزيمات متعددة لربطها مع الأجسام المضادة، إلا أنه في معظم إختبارات اليزا يستخدم انزيم الفوسفاتاز القلوي (Alkaline phosphatase) أو انزيم البيروأوكسيداز (Peroxidase). إن

الأجسام المضادة المربوطة بالانزيم متوفرة تجارياً لدى العديد من الشركات، إلا أنه يمكن ربط الأجسام
المضادة بالانزيم بسهولة مخبرياً (Avrameas, 1972؛ Farr & Nakane, 1974). كما تم استخدام انزيم البنسيليناز (Penicillinase) عوضاً عن أنزيم الفوسفاتاز القلوي (قمري ومكوك، 1993؛ Sudarshana & Reddy, 1989)، وهو رخيص ومتوفر وحساسية الكشف عند استخدامه متشابهة لأنزيم الفوسفاتاز القلوي (Singh & Barker, 1991)، إلا أن هذه الطريقة لا تستخدم على نطاق واسع بسبب الصعوبات المتصلة في قياس النتائج. بالاضافة إلى ذلك، فإن الأجسام المضادة المرتبطة بالبنسيليناز غير متوفرة تجارياً ومعظم المختبرات في العديد من البلدان النامية تفتقر إلى مرافق تسمح القيام بمثل هذه التحضيرات. وللتغلب على هذه المشاكل، يمكن استخدام البنسيليناز في الإختبارات التي يمكن رصد تغير لون التفاعل بالعين المجردة.

1.3.3. العوامل التي تؤثر على نتائج اليزا

رغم أن خطوات إختبارات اليزا بسيطة، إلا أنه يوجد عوامل كثيرة يمكن أن تؤثر على حساسية ودقة الإختبار والتي تشمل نوعية الأجسام المضادة، تحضير وتخزين الكواشف، وقت التحضين ودرجة الحرارة، اختيار الجزء المناسب من العينات النباتية، واستعمال المحلول المناسب للاستخلاص (McLaughlin *et al.*, 1981 ؛Hewings & D'Arcy, 1984). ومن الأهمية بمكان ادراج الشواهد السالبة والموجبة في كل إختبار لتحديد الحد الأدنى للتفريق بين النبات المصاب والسليم في العينات المفحوصة. عموماً تعتبر العينة مصابة اذا كان متوسط قرائتها يزيد عن متوسط قراءة الشاهد السليم + 3 مرات قيمة الانحراف القياسي أو ضعفي قيمة متوسطات الشاهد السلبي.

تحضير الكواشف – تتوقف نوعية نتائج إختبار اليزا على نوعية وحسن استخدام الكواشف. ولهذا فإن جميع الكواشف يجب أن تحضر بماء ذات نوعية جيدة ويفضل الماء المقطر. كما أن تركيز ودرجة حموضة المحاليل المنظمة التي تحتوي على الكواشف، نقاوة المواد الكيميائية، ونظافة الزجاجيات تساهم أيضاً في النتائج النهائية للإختبار. يجب تخزين الكواشف والمحاليل والأجسام المضادة بشكل مناسب لمنع التلوث من الكائنات المجهرية غير المرغوب بها من خلال استخدام أدوات أو معدات ملوثة.

تحضير/استخلاص العينات – إن استخلاص/طحن العينات النباتية هي أكثر استهلاكاً للوقت في مراحل إختبار اليزا، وبالتالي يجب استخدام طريقة مناسبة لاستخلاص عدد كبير من العينات في أقصر فترة ممكنة. إذا كان عدد العينات النباتية كبيراً، يفضل حفظ العصارات النباتية في درجات

حرارة منخفضة تفادياً لتفكك الفيروسات. كما أن تصفية العصارات النباتية عن طريق السرعات المنخفضة بجهاز الطرد المركزي قبل اضافتها إلى حفر طبق اليزا تعتبر عملية مفيدة. وفي بعض الحالات، يمكن إضافة بعض المواد مثل polyvinylpyrrolidone (1–2% وزن/حجم) التي ترتبط بالبولي فينول أو diethyldithiocarbamate (DIECA، حولي 0.1 مولر) كمادة مانعة للاكسدة في محلول الاستخلاص لمنع أكسدة العصارة النباتية خلال عملية الاستخلاص، ومن ثم تقلل الآثار الضارة التي يسببها تكوّن البولي فينولات البنية اللون على كشف الفيروسات في العينات النباتية (Clark & Adams 1977؛ McLaughlin e*t al.*, 1981؛ Scott *et al.* 1989).

توزع الفيروس – من المعروف أن الفيروسات تتوزع بشكل غير متساوي في أجزاء النبات العائل والبذور (Adams, 1978؛ Kolber *et al.*, 1982؛ Latvala *et al.*, 1997؛ Torrance & Dolby, 1984) مما يجعل أخذ العينات من الخطوات المهمة للكشف عن الفيروسات. وفي حال أن توزع الفيروس غير معروف، فإن استخدام عينة مركبة من أجزاء مختلفة من النباتات أو البذور يساعد على تجنب هذه المشكلة.

نوعية الأجسام المضادة – تعد نوعية الأجسام المضادة من أهم عوامل إختبارات اليزا (Clark, 1981). عند حقن الغطاء البروتيني للفيروس بطريقة مناسبة في حيوان من ذوات الدم الحار (الأرانب عادة ما تستخدم لهذا الغرض، على الرغم من أنه يمكن استخدام الفئران والدجاج والأغنام والماعز) يقوم بتحفيز الخلايا المناعية المتخصصة مما يؤدي إلى انتاج الأجسام المضادة المتخصصة للفيروسات في دم الحيوان. إن الأساس لجميع الإختبارات المصلية/السيرولوجية الموصوفه أعلاه يعتمد على توفير الأجسام المضادة متعددة الكلون (Polyclonal antibodies) أو الأجسام المضادة وحيدة الكلون (Monoclonal antibodies). إن الأجسام المضادة متعددة الكلون هو خليط غير متجانس من الأجسام المضادة الموجهة نحو مختلف مولدات الضد أو المحددات لإنتاج الأجسام المضادة (epitopes) الموجودة على الغلاف البروتيني للفيروس. أما الأجسام المضادة وحيدة الكلون فيتم انتاجها باستخدام تكنولوجيا الخلايا المدمجة Hybridoma (Köhler & Milstein, 1975)، وعلى عكس الأجسام المضادة متعددة الكلون، فإن كل جسم مضاد وحيد الكلون ينتج من نسل الخلايا المستمدة من خلية واحدة مدمجة (single hybridoma cell). لذا، فإن الأجسام المضادة وحيدة الكلون تتألف من جزيئات متجانسة مع نفسها وترتبط بمولد ضد واحد.

4.3. إختبار الإرتباط المناعي النقطي (DIBA)

يمكن استخدام إختبار الارتباط المناعي النقطي (Dot-blot Immunobinding assay) (DIBA) للكشف عن الفيروسات سواء في النباتات أو في نواقل الفيروسات الحشرية (قمري ومكوك، 1993؛ Banttari & Goodwin, 1985؛ Graddon & Randles, 1986؛ Lange & Heide, 1986؛ Makkouk *et al.*, 1993؛ Rybicki & Von Wechmar, 1982؛ Younes, 1995). إن مبدأ هذا الإختبار مشابه تماماً لإختبار اليزا، إلا أن العصارة النباتية للعينات توضع على أغشية النيتروسيليلوز بدلاً من استخدام أطباق اليزا. وبالتالي فإن المادة الكاشفة التي تستخدم في إختبار DIBA (وبشكل عام كل الإختبارات التي تجرى على أغشية النيتروسيليلوز) يجب أن تعطي ناتجاً نهائياً لا يذوب في الماء، وبالتالي يرسب على غشاء النيتروسيليلوز (الكشف عن طريق اللون) أو يمكنه اطلاق ضوء عن طريق تفاعل كيميائي يكشف عنه عن طريق التصوير الاشعاعي (قمري ومكوك، 1993؛ Leong *et al.*, 1986؛ Makkouk *et al.*, 1993). يعتبر إختبار DIBA ذات حساسية جيدة، سهل وغير مكلف، والنتائج يمكن أن يتم قرائتها بالعين المجردة. وقد أمكن زيادة حساسية هذه الطريقة بالاختيار الأمثل لمنظم الاستخلاص ومحلول الطمس وتخفيف المصل المضاد المستخدم (Fegla *et al*., 2000a).

5.3. إختبار بصمة النسيج النباتي المناعي (TBIA)

إن إختبار بصمة النسيج النباتي المناعي (Tissue blot immunoassay)، هو نوع من إختبار DIBA، ولكن في هذا الإختبار يتم قطع الجزء النباتي الطازج مباشرة (ورقة، ساق، عنق ورقة، جذر، درنة، أو الحشرة) بواسطة آلة حادة، ثم تطبع على أغشية النيتروسيليلوز مباشرة (شكل 3 ـ أ)، ثم يكشف عن الفيروس كما في الخطوات المفصلة لاحقاً (مكوك وقمري، 1996؛ Hsu & Lawson 1991؛ Navot *et al.*, 1989؛ Makkouk *et al.*, 1993؛ Polston *et al.*, 1991). هذا الإختبار بسيط جداً، ولا يتطلب تحضير أو طحن للعينات، كما يقدم معلومات عن توزع الفيروسات في الأنسجه النباتية (مكوك وقمري، 1996؛ Abou-Jawdah *et al*., 1996؛ Fegla *et al*., 2001؛ Hu *et al.*, 1997؛ Lin *et al.*, 1990؛ Makkouk & Comeau, 1994).

خطوات إختبار بصمة النسيج النباتي المناعي (TBIA)

1. طبع العينات (شكل 3 ـ أ): تؤخذ الأجزاء النباتية الطازجة المصابة بالفيروسات بقطع الجزء النباتي بآلة حادة (شفرة أو مشرط) بشكل عرضي، ثم يطبع الجزء المقطوع مباشرة على غشاء النيتروسيليلوز (ذي ثقوب 0.45 ميكرومتراً) دون اللجوء إلى طحن العينات بأي محلول.

2. يغسل الغشاء ثلاث مرات بمحلول الغسيل PBST (PBS يحتوي على 0.05% من مادة Tween 20) بفاصل 5-3 دقائق بين الغسلة والأخرى. يحضر محلول PBS (محلول منظم ملحي فوسفاتي) كما يلي: يذاب 8 غ من كلوريد الصوديوم (NaCl) و 0.757 غ من أحادية الهيدروجين فوسفات الصوديوم اللامائية (Na_2HPO_4) و 0.2 غ من كلوريد البوتاسيوم (KCl) و 0.2 غ من أزيد الصوديم (NaN_3) في ليتر واحد من الماء المقطر، ثم تعدل درجة حموضته (pH) إلى 7.4.
3. يوضع الغشاء في محلول Polyvinyl alcohol المذاب بـ PBST بتركيز 1 ملغ/ مل ولمدة دقيقة، أو استعمال حليب خال من الدسم (non-fat-milk) مذاب ب PBST بتركيز 3% ولمدة ساعة.
4. يغسل الغشاء كما ورد في الخطوة رقم 2.
5. يوضع الغشاء في محلول الأمصال المضادة المتعددة الكلون (المنتجة في الأرانب) أو الأمصال المضادة وحيدة الكلون (المنتجة في الفئران) تبعاً للفيروس المختبر. وذلك بعد تخفيفها حتى 1/500- 1/1000 في محلول PBS. ويترك لمدة ساعة على درجة حرارة الغرفة.
6. يغسل الغشاء كما ورد في الخطوة رقم 2.
7. يوضع الغشاء في محلول الأجسام المضادة المنتجة في أجسام الماعز ضد الأجسام المضادة للأرانب (Goat antirabbit immunoglobulins) أو للفئران (Goat antimouse immunoglobulins) المرتبطة بإنزيم الفوسفاتاز القلوي (حسب الأجسام المضادة المستعملة في الخطوة رقم 5) وذلك بعد تخفيفها حتى 1/2000 أو 1/5000 (حسب الشركة الصانعة) في محلول الربط (Conjugate buffer)، ويترك لمدة ساعة على درجة حرارة الغرفة. يحضر محلول الربط كما يلي: يذاب 20 غ من مادة Polyvenylpyrrolydone (PVP) و 2 غ من مادة بياض البيض (Ovalbumin) في ليتر واحد من محلول الغسيل (PBST).
8. يغسل الغشاء كما ورد في الخطوة رقم 2.
9. يوضع الغشاء في مادة التفاعل التي يفككها الإنزيم والمكونة من 3 مغ من مادة Nitroblue tetrazolium و 1 مغ من مادة5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate 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.

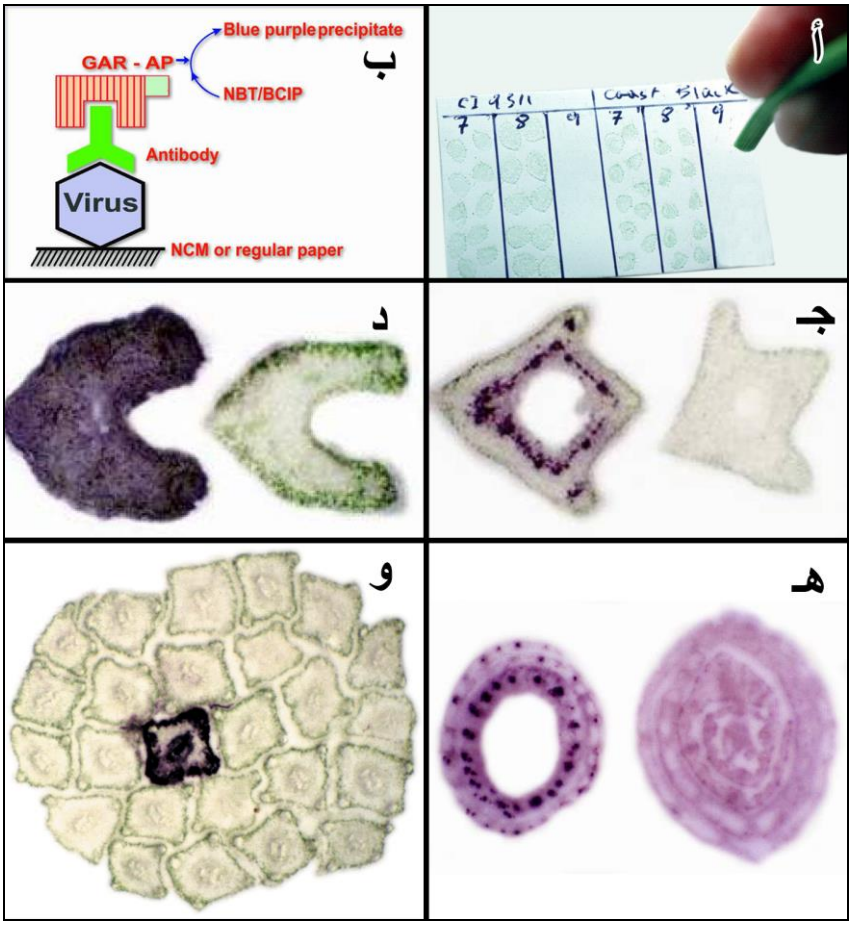
تجري جميع مراحل الإختبار السابقة عند درجة حرارة الغرفة، كما يفضل أن تجرى جميع خطواته (باستثناء مرحلة الكشف -8) على هزاز دائري وبسرعة منخفضة.

أما عيوب إختباري DIBA و TBIA، فتنحصر بأنه في بعض الأحيان يكون لون التفاعل ضعيفاً ولا يمكن تحديد قوة التفاعل بسهولة. ومع ذلك فإن حسناتهما كثيرة منها: الحساسية العالية، الفترة الزمنية القصيرة اللازمة لإختبار عدد كبير من العينات، عدم الحاجة إلى امكانيات كبيرة لإتمام الإختبار، والقدرة على تخزين الأغشية المطبوعة بالعينات لفترات طويلة، وانخفاض تكاليف إجراء

الإختبار. بالإضافة إلى ميزة أخرى، وهي أن العينات المطبوعة على أغشية النيتروسيليلوز يمكن ارسالها بواسطة البريد لمختبر آخر سواء في داخل البلد أو خارجه لإجراء الإختبار، في حال عدم توفر الامكانيات المحلية لاتمام الإختبار.

وقد درست كفاءة إختبار TBIA بالكشف عن المايكوبلازما وعدد من الفيروسات النباتية تنتمي إلى أربع مجموعات فيروسية: *Cucumovirus*، *Luteovirus*، *Potexvirus* و *Potyvirus* وعلى أنواع نباتية مختلفة (Lin *et al.*, 1990)؛ كما طبق هذا الإختبار للكشف عن فيروس ذبول وتبقع البندورة على نبات *Impatiens* (Hsu & Lawson, 1991)؛ وفيروس اصفرار وتقزم الشعير (BYDV) (شكل 3 - د) على محاصيل الحبوب النجيلية (Makkouk & Comeau, 1994) و 10 فيروسات تصيب المحاصيل البقولية، تتبع ثمان مجموعات فيروسية، ثمانٌ منها توجد في جميع أنسجة النبات وهي: AlMV، CMV، BBMV، BBWV، PSbMV، BYMV، BBSV و BBTMV حيث تتلون جميع أجزاء النبات المصاب باللون الأزرق الأرجواني (شكل 3 - هـ). وإثنان منها يوجدان فقط في الأوعية الغربالية للنبات وهما: BLRV، FBNYV؛ وفي هذه الفيروسات تتلون الأوعية الغربالية للنبات المصاب باللون الأزرق الأرجواني فقط (شكل 3 - جـ) (مكوك وقمري، 1996). كما أمكن بواسطة هذا الإختبار 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 إما الأمصال المضادة الوحيدة الكلون أوالمتعددة الكلون وبالحساسية نفسها.

ويمكن لإختبار TBIA أن يكشف عن نبات مصاب واحد ضمن مجموعة حوت 25 نباتاً وبحساسية عالية (شكل 3 - و). كما أن احتمال الحصول على تشخيص خاطئ في استعمال إختبار TBIA عند فحص عينة مركبة من عدة نباتات هو أقل من احتماله في إختبار DAS-ELISA إذ أن الكشف عن وجود الفيروس في نبات واحد فقط من نباتات المجموعة يكون جلياً؛ إلاّ أن وجوده في العينة المستخرجة من طحن نباتات المجموعة الواحدة وفحصها بواسطة DAS-ELISA يكون مشكوكاً فيه عندما يكون تركيز الفيروس في النبات المصاب قليل جداً، علاوة على أن طحن النباتات فى مجاميع وفحصها بالاليزا قد تنتج عنه مخاطر لأن حساب نسبة الإصابة يتم في تلك الحالة تبعاً لمعادلة رياضية (Maury *et al.*, 1985) يتطلب تطبيقها السليم التوزع العشوائي للعينات المصابة في مجاميع، وعليه لو تجمعت عدة عينات مصابة في مجموعة واحدة وظل عدد آخر من المجاميع خالياً من العينات المصابة فإن نسبة الإصابة المقدرة بالمعادلة الرياضية ستكون أقل من المقدرة ببصمة النسيج النباتي (فجلة وآخرون، 2007؛ Fegla *et al.*, 2000b) وذلك لأن البصمة النسيجية، كما ذكرنا، تشير إلى العينات المصابة بغض النظر عن توزعها فى المجاميع.



شكل 3. (أ) طريقة طبع النباتات المراد فحصها بالإختبار المصلي لبصمة النسيج النباتي المناعي (TBIA) على غشاء النيتروسيليلوز، (ب) شكل توضيحي يبين المبدأ العام لإختبار TBIA، (جـ) الكشف عن فيروس الإصفرار الميت للفول (FBNYV) بواسطة إختبار TBIA في ساق نبات الفول (النبات المصاب على اليسار والنبات السليم على اليمين)، (د) الكشف عن فيروس الموزاييك الأصفر للفاصولياء (BYMV) في عنق ورقة نبات الفول (النبات المصاب على اليسار والنبات السليم على اليمن)، (هـ) الكشف عن فيروس اصفرار وتقزم الشعير (BYD) بواسطة إختبار TBIA في ساق شعير (النبات المصاب على اليسار والنبات السليم على اليمين)، (و) الكشف عن بادرة عدس مصابة بفيروس تلون بذور الفول (BBSV) ضمن مجموعة مؤلفة من 25 بادرة عدس بوساطة إختبار TBIA.

أما بالنسبة للمواد المستخدمة في إختبار TBIA (الأجسام المناعية المرتبطة بإنزيم الفوسفاتاز القلوي؛ الأمصال المضادة؛ والأجسام المضادة المنتجة في أجسام الماعز ضد الأجسام المضادة للأرانب وللفئران) فيمكن جمعها بعد إنتهاء الإختبار واستخدامها أكثر من مرة دون أي تأثير في

حساسية الإختبار. أما المواد التي تستخدم في إختبار DAS-ELISA فإنها عادة لاتجمع، وهذا ما يقلل كلفة إختبار TBIA عن إختبار DAS-ELISA.

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

4. إختبارات تشخيصية ترتكز على الحمض النووي للفيروس

رغم أن الإختبارات السيرولوجية تستخدم على نطاق واسع للكشف عن الفيروسات، إلا أن استخدام الأمصال المضادة لها بعض المحاذير، حيث أنها تستند على مولدات الضد الموجودة على الغلاف البروتيني للفيروس، الذي لا يمثل سوى حوالي 10% من اجمالي مجين الفيروس (Gould & Symons, 1983)، وبالتالي لا تأخذ في الاعتبار بقية مجين الفيروس. بينما في الإختبارات التي تعتمد على الحمض النووي، يمكن استهداف أي منطقة من المجين الفيروسي لتكوين إختبار تشخيصي. بالإضافة إلى ذلك، هناك حالات مرضية لايمكن تطبيق إختبارات مناعية للكشف عنها مثل الفيرويدات والأحماض النووية المرافقة والفيروسات التي لها تنوع في الطرز السيرولوجية (مثل، *Indian & African Peanut clump virus*، *Tobacco rattle virus*) والفيروسات التي تكون ضعيفة مناعياً أو التي يصعب تنقيتها وكذلك عندما يراد تحديد سلالات الفيروس. وبالتالي فإن الإختبارات التشخيصية بالاعتماد على الحمض النووي في مثل هذه الحالات تكون الطريقة الأمثل للإختبار.

1.4. إختبار تهجين الحمض النووي

يتكون الحمض النووي DNA من سلسلتين متكاملتين مرتبطتين ببعضهما بقوة بواسطة رابطات الهيدروجين (G≡C، A=T). يعتبر انجذاب أحد سلاسل الحمض النووي للسلسلة المكملة له من أقوى وأكثر التفاعلات دقة في الطبيعة. تم استغلال هذه الصفة في تطوير إختبار تهجين الحمض النووي، الذي يقوم على أساس التكامل بين سلسلتين من الحمض النووي (DNA:DNA، DNA:RNA أو RNA:RNA). في هذه الإختبارات، تستخدم كواسم في تشكيل الهجين مع الحمض

النووي المستهدف سلسلة مفردة من الحمض النووي (إما DNA أوcDNA أو RNA) تكون مكملة لمنطقة من مجين الفيروس (المراد الكشف عنه) وتكون معلمة بجزئ مراسل (reporter molecule). بعد ذلك، يتم الكشف عن السلسلة المزدوجة المتشكلة (الهجينة) المستهدفة بعدة طرق، حسب "الجزئ المراسل" المستخدم.

إن إختبار النقطة أو البقعة التهجينية (dot- or spot-blot hybridization) هو اسلوب شائع الاستخدام في تشخيص الأمراض النباتية الفيروسية (Garger *et al.*, 1983؛ Maule *et al.*, 1983؛ Owens & Diener, 1984؛ Palukaitis, 1984؛ Rosner *et al.*, 1986). تنطوي العملية برمتها على: (1) تغيير طبيعة الحمض النووي بجعله سلسلة مفردة خالية من التراكيب الثانوية، ويتم ذلك عادة بتعريضه لحرارة مرتفعة في إناء يغلي فيه الماء ثم تبريده بسرعة في الثلج (2) طبع وتثبيت الحمض النووي المستهدف (أي الحمض النووي الفيروسي في العينة المراد فحصها) على أغشية النيتروسيليلوز أو أغشية النايلون الموجبة الشحنة، (3) تغطية الأماكن الحرة على الأغشية بواسطة مواد غير متخصصة بالحمض النووي [في العادة تستخدم نطاف السلمون (Salmon sperm) أو الحمض النووي للغدة الصعتريه للعجل (calf-thymus DNA)] أو بواسطة البروتين [عادة يستخدم زلال مصل بقري (Bovine serum albumin) أو حليب غير دهني مجفف]، (4) السماح للتهجين بين الحمض النووي الفيروسي والواسم (الموجود بشكل سلسلة مفردة حرة في محلول التهجين)، (5) ازالة الواسم غير المهجن بالأغشية بواسطة عدة مرات من الغسيل، (6) الكشف عن المراسل الجزيء في الواسم المهجن بالسلسلة المستهدفة.

هذا ويعتبر تكوين محلول التهجين وتكوين محلول الغسيل ودرجة الحرارة التي يتم استعمالها في هاتين المرحلتين من أهم العناصر التي تعتمد عليها تخصصية التهجين، فكلما علت الحرارة وقل تركيز الأملاح زادت تخصصية الكشف. فالتهجين في محلول مائي عند درجة حرارة 65 °س يكون عال التخصصية، أما في محلول فورمامايد عند درجة حرارة 30–40 °س فهو أقل تخصصية. كذلك الغسيل في محلول 0.1X SSC وحرارة 65 °س يسمح بتخصصية عالية، أما في محلول 5X SSC ودرجة حرارة 50 °س فتكون تخصصية منخفضة.

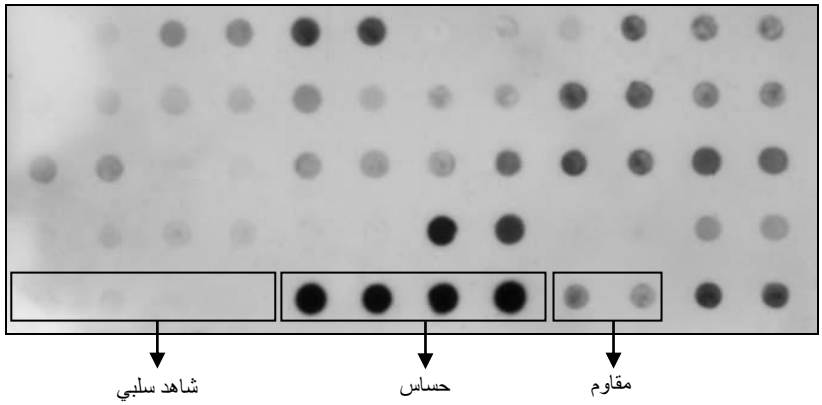
يمكن استخدام أي من الجينات المكملة للحمض النووي الريبي المنزوع الأوكسجين [Complementary DNA (cDNA) clones] في أي منطقة محددة من المجين الفيروسي كواسم للكشف عن الفيروس في العصارة النباتية. لإنتاج كلون cDNA، في العادة يتم تحويل RNA الفيروسي إلى سلسلة مزدوجة من DNA ومن ثم استنساخه في نواقل مناسبة (Sambrook *et al.*, 1989). المميزات الرئيسية للحمض النووي المستنسخ هي النقاء، على أن استخدام النواقل في الاستنساخ يؤمن تواجد مستمر ويحفظ cDNA، حيث يمكن استخدامه في أي

وقت ويمكن تزويد المختبرات المختلفة به لاستخدامه في تشخيص الفيروسات، مما يوفر نتائج إختبارات موحدة.

إن اختيار طريقة التعليم/الوسم تتعلق بطبيعة الواسم الذي سيستخدم. إن واسم الحمض النووي من نوع DNA يمكن أن ينتج عن طريق nick translation أو random primed labelling أو PCR، في حين أن واسم RNA يمكن تحضيره من خلال النسخ المخبري (Palukaitis, 1984). خلافاً لواسم DNA، فإن واسم RNA للسلسلة المفردة يستطيع التهجين فقط مع القطعة المستهدفة بدون إعادة الإلتحام وأن هجين RNA:RNA هو أكثر استقراراً من هجين DNA:RNA أو DNA:DNA. ومع ذلك، فان احتمال تدهور واسم RNA بسبب التلوث بأنزيم RNAase خلال عملية التهجين والتكاليف العالية لتكوين مثل هذه الواسمات جعلت استخدام الواسمات للحمض النووي DNA أوcDNA أكثر شيوعاً في الإختبارات التشخيصية.

تستخدم النظائر المشعة مثل P^{32} لتعليم واسمات الحمض النووي والكشف عنها عن طريق التصوير الاشعاعي وهي تعتبر الأكثر كفاءة أو حساسية في الكشف وتسمح بتحديد أو مقارنة كمية الفيروس الموجودة في العينات. إلاّ أن للنظائر المشعة عمر قصير لذا يلزم تحضير الواسم خلال فترة وجيزة من الإستعمال، كما يمكن أن يكون لاستخدامها خطر على الصحة العامة إذا تم استعمالها بطريقة غير مناسبة، ولذلك تتطلب اجراءات مكثفة ومكلفة لتلبية إجراءات السلامة. في السنوات الأخيرة، تم التغلب على مثل هذه المشاكل عن طريق التعليم بمواد غير مشعة (Dietzgen *et al.*, 1994؛ Eweida *et al.*, 1990؛ Mas *et al.*, 1993؛ Singh & Singh, 1995؛ Wesley *et al.*, 1996) سواء باستخدام biotin/streptavidin (Langer *et al.*, 1981) أو استخدام نظام digoxigenin (DIG)/antiDIG (Höltke *et al.*, 1995). هناك بعض المساوئ لاستخدام biotin/streptavidin، مثل وجود biotin في العينات وربط streptavidin بطريقة غير متخصصة على الأوجه الصلبة مثل أغشية النايلون، مما يؤدي إلى صعوبة قراءة النتائج. لهذا، فإن نظام DIG/antiDIG يستخدم على نطاق واسع للكشف عن العديد من الفيروسات حيث يمكن تحضير الواسم وخزنه لمدة تزيد عن سنة دون أن يؤثر ذلك سلباً على دقة الكشف. في هذا النظام تتعرض الأغشية بعد التهجين الى إضافة الأجسام المضادة antiDIG المربوطة بالأنزيم (سواء alkaline phosphatase أو horseradish peroxidase)، ثم الكشف عن التفاعل عن طريق استخدام المادة الكاشفة المناسبة التي تؤدي إما إلى ترسيب الناتج (الكشف عن طريق اللون) أو انطلاق ضوء عن طريق تفاعل كيميائي يكشف عنه عن طريق التصوير الاشعاعي (Höltke *et al.*, 1995) (شكل 4).

وتجدر الإشارة أنه أحياناً يمكن الإستغناء عن استخراج الحمض النووي باتباع طريقة بصمة النسيج النباتي والتهجين واستخدام نظام الكشف digoxigenin (DIG)/antiDIG (Abou-Jawdah *et al.*, 1996).



شكل 4. التركيز النسبي لفيروس تجعد الأوراق الأصفر للبندورة/الطماطم (TYLCV) في نباتات الجيل الثالث عن طريق تهجين الحمض النووي باستخدام طريقة التفاعل الكيميائي الذي يكشف عنه بالتصوير الشعاعي.

2.4. التفاعل المتسلسل للبوليمراز (PCR)

تحسنت كثيراً حساسية الإختبارات التشخيصية اعتماداً على الحمض النووي بعد تطوير التفاعل المتسلسل للبوليمراز (PCR) (Mullis *et al.*, 1986). إن إختبار PCR يسمح بتسريع انتاج الحمض النووي المستهدف بشكل تسلسلي في المختبر. إن السرعة والتخصص، والحساسية الفائقة لإختبار PCR جعلته ملائماً للكثير من مجالات البحوث في علم الأحياء. ولقد أصبح هذا الإختبار منذ اكتشافه من أهم الإختبارات التشخيصية للأمراض النباتية الفيروسية إذ أنه يسمح بتكثيف انتاج الحمض النووي المستهدف ولو كان بتركيز منخفض جداً (Candresse *et al.*, 1998a؛ Hadidi *et al.*, 1995؛ Henson & French, 1993).

لانتاج أو استنساخ الحمض النووي نحتاج الى زوج من البادءات تكون كل واحدة منها مكونة من حوالى 15–22 نيكليوتيدة مكملة للحمض النووي المراد انتاجه في منطقتين مختلفتين ومتعاكستين، وبذلك يمكن انتاج أو استنساخ منطقة المجين الواقعة بينهما. في معظم الحالات يجب استخراج الحمض النووي قبل البدء بإختبار PCR. يتكون إختبار PCR من ثلاث خطوات: (1) تغيير طبيعة الحمض النووي (denaturation) عن طريق رفع درجة الحراره (عادة 94–95 °س) لفصل سلسلتي الحمض النووي DNA عن بعضها البعض، (2) التصاق (annealing) البادءات مع سلاسل الحمض النووي DNA المستهدفة والمقابلة لهم (إن درجة حرارة الالتصاق تعتمد على نوع النيكليوتيدات المكونة للبادئ وطوله، وعادة ما تتراوح ما بين 45–65 °س) و (3) تمدد (extension) كل بادئ عبر المنطقة المستهدفة (تكون عادة عند درجة حرارة

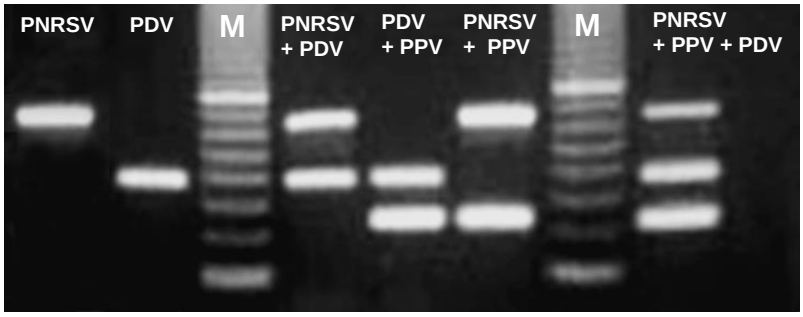
72 °س) باستخدام انزيم النسخ لسلسلة DNA (مثلTaq polymerase). كل سلسلة من الحمض النووي في الدورة الواحدة ستكون بمثابة قالب لتكوين حمض نووي DNA جديد في الدورة القادمة. وهذا يؤدي إلى زيادة هائلة في ناتج PCR يعتمد على عدد الدورات المستخدمة. تكرر الخطوات الثلاثة السابقة عدد من المرات (بين 30 و 40 مرة) في جهاز Thermocycler حتى يستنسخ كمية كافية من المنتج المراد. وبالتالي فإن جزيء واحد سيتم تضخيمه $2^{ن}$ مرة بعد "ن" دورة، أي حوالى 3.4×10^{10} مرة في 35 دورة إذا ما افترض أن الكفاءة 100%. في العادة تكون الكفاءه بحدود 65–85%، ويمكن للمرء أن يتوقع أن يكون اجمالي الناتج التجميعي مابين $1.65^{ن}$ و $1.85^{ن}$ (Krawetz 1989). وهكذا في ساعات قليلة، فإن السلسلة المستهدفة تتكاثر أو تنتج بكميات هائلة ويمكن الكشف عن الناتج عن طريق تمريره بواسطة الرحلان الكهربائي عبر هلام من الآجار، ثم صبغه بواسطة بروميد الاثيديوم وتعريضه للأشعة فوق البنفسجية لكشف الحمض النووي المنتج. هناك أجهزة PCR متوفرة تجارياً والتي يمكن استخدامها لتحليل عينات كثيرة في آن واحد، مما يجعل هذه الأجهزة مناسبة للتشخيص الروتيني.

هذا الإختبار ينطبق مباشرة على الفيروسات ذات الحمض النووي الريبي المنزوع الاوكسجين (مثل الأنواع التابعة للأجناس *Cauliomvirus*، *Geminivirus*، *Badnavirus*، *Nanovirus*)؛ ولكن لتشخيص الفيروسات النباتية التي تملك غالبيتها حمض نووي ريبي (RNA) يجب تحويله إلى سلسلة مكملة من DNA (cDNA) بواسطة النسخ العكسي (Reverse Transcription = RT) قبل البدء بإختبار PCR لتكوين قطعة مناسبة من الحمض النووي DNA المستهدف لاحقاً للتضخيم. في الدورات الأولى لإختبار PCR، تكون سلسلة الحمض النووي المكملة من قالب cDNA، ولكن بعد ذلك فإن التفاعل سيتشكل من السلسلة المزدوجه للحمض النووي DNA كما هو موصوف أعلاه. هذه العملية من التضخيم تسمى التفاعل المتسلسل للبوليمراز مع النسخ العكسي (RT-PCR). إن الناتج النهائي للحمض النووي المضخم يمكن تمريره عبر هلام الآجار بواسطة الرحلان الكهربائي.

إضافة الى فائدته كإختبار تشخيصي، فإن PCR يمكن أن يستخدم أيضاً بالاشتراك مع تقنيات أخرى مثل restriction fragment length polymorphism (RFLP) أو دراسة تسلسل النيوكليوتيدات في سلسلة الحمض النووي DNA المضخمة لدراسة الاختلافات مابين الفيروسات على المستوى الجزيئي (Almond *et al.*, 1992؛ Candresse *et al.*, 1995؛ Tenllado *et al.*, 1994). واستناداً إلى معلومات تسلسل النيوكليوتيدات لعدد من الفيروسات المختلفة، فإنه يمكن تصميم بادئات يمكن استخدامها في إختبارات PCR للكشف والتفريق مابين الفيروسات على مستوى الفصيلة أو الجنس أو حتى على مستوى السلالة (شكل 5) (Robertson *et al.*, 1991؛ Omunyin *et al.*, 1996)، أو الكشف عن فيروسات (إثنين أو أكثر) ليس بينها علاقة في عينة واحدة عن طريق استخدام مزيج من البادئات

الفيروسية (Multiplex PCR) (شكل 6) (Bariana *et al.*, 1994؛ Hauser *et al.*, 2000؛ Minafra & Hadidi, 1994؛ Nassuth *et al.*, 2000؛ Shalaby *et al.*, 2002؛ Smith & Van de Velde, 1994). ويمكن استخدام تقنية PCR بفعالية في دراسات الأوبئة وبرامج التربية لإنتاج نباتات مقاومة للفيروس، وخاصة في الحالات التي يصعب اكتشافها في التقنيات الأخرى (Candresse *et al.*, 1998b؛ Harrison *et al.*, 1997؛ Rush *et al.*, 1994).

مع أن مزايا RT-PCR تفوق سلبياته، فانه يجب توخي الحذر اثناء القيام بتفاعلات PCR، لما لها من حساسية عالية و قوة تضخيم هائلة، وذلك من أجل تجنب التفاعلات الكاذبة الناتجة عن التلوث. بعض هذه المشاكل يمكن التغلب عليها مع اتباع التدابير والعناية الكافية لتجنب التلوث الخارجي الناتج عن الجو المحيط، كما أن استخدام الشواهد السلبية والايجابية مع العينات المفحوصة في كل إختبار PCR تعطي فكرة عن مدى نجاح الإختبار (Kwok & Higuchi, 1989).

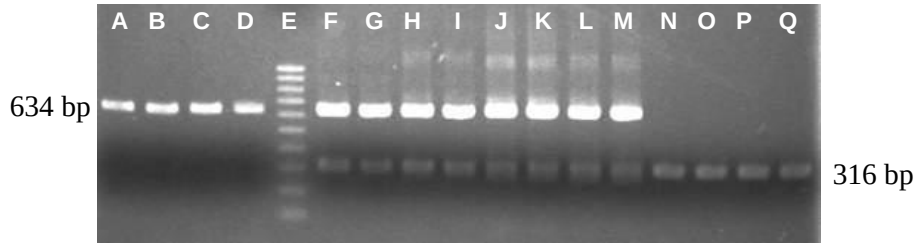


شكل 5. الكشف عن ثلاثة فيروسات تصيب أشجار الفاكهة بواسطة Multiplex PCR. حجم القطعة المضخمة لفيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/البرقوق (PNRSV) = 650 قاعدة آزوتية، لفيروس تقزم الخوخ/البرقوق (PDV) = 320 قاعدة آزوتية، وفيروس جدري الخوخ/البرقوق (PPV) = 220 قاعدة آزوتية.

تم تطوير اسلوب جديد يجمع بين المزايا التقنيه لإختبار PCR مع مزايا الإختبار السيرلوجي (اليزا)، يدعى Immunocapture-RT-PCR (IC-RT-PCR)، للكشف عن عدد من الفيروسات النباتية (Nolasco *et al.*, 1993؛ Wetzel *et al.*, 1992). في هذا الإختبار، يتم تركيز جسيمات الفيروس أولاً على سطح صلب (سواء في انابيب الطرد المركزي الصغيرة أو في أطباق اليزا) باستخدام أجسام مضادة متخصصة بالفيروس. يتم الافراج عن الجسيمات الفيروسية وتحرير الحمض النووي RNA الفيروسي ثم تضخيمه بإختبار RT-PCR. ويؤدي هذا إلى زيادة حساسية الإختبار، وتخفيف المشاكل التي يمكن أن تحدث خلال استخلاص RNA إلى الحد الأدنى. إن اسلوب IC-RT-PCR هو خيار مفيد بديل عن RT-PCR للكشف عن الفيروسات في المواد النباتية

والحشرات الناقلة للفيروسات (Candresse *et al.*, 1998a؛ James *et al.*, 1997؛ Jain *et al.*, 1998؛ Latvala *et al.*, 1997؛ Mumford & Seal, 1997).

وقد سمحت تقنية الـ RT-PCR بإستنساخ جينات الغطاء البروتيني لعدد من الفيروسات (التي يصعب إستخراجها وتنقيتها لإنتاج أمصال) وإنتاج بروتيين غطاء هذه الفيروسات في المختبر *in vitro* ومن ثم استعمالها لإنتاج أمصال مضادة يمكن استعمالها في إختبارات ELISA للكشف عن هذه الفيروسات (Abou-Jawdah *et al.*, 2004؛ Hourani & Abou-Jawdah, 2003).



شكل 6. الكشف عن فيروس تجعد الأوراق الأصفر للبندورة/الطماطم (TYLCV) باستخدام زوجين من البادئات TYc138/TYv2337 و TYc138/TYm2664 التي تضخم قطعتين بحجم 634 قاعدة أزوتية و 316 قاعدة أزوتية للعزلتين TYLCV-IL و TYLCV-Mld، على التوالي. A إلى D عينات TYLCV-IL، N إلى Q: عينات TYLCV-Mld، F إلى M: عينات مختلطة، E= شاهد (سلم 100 قاعدة آزوتية).

أخيراً، تم ابتداع إختبار للكشف عن الفيروسات وقياسها، يدعى Real-time quantitative PCR (Dietzgen *et al.*, 1999؛ Eun *et al.*, 2000؛ Mumford *et al.*, 2000؛ Roberts *et al.*, 2000). بالاضافة إلى حساسية ودقة هذا الإختبار، فله مزايا أخرى إذا ما قورن بـ RT-PCR و PCR؛ فهو يسمح بالحصول على النتائج بسرعة أكبر دون الحاجة إلى تمرير المنتج عبر هلام الآجار بواسطة الرحلان الكهربائي ويمكن من تحديد مقدار الفيروس في العينة ويقلل من التلوث بمادة بروميد الأيثيديوم، يوفر المعالجة بعد PCR، وله طاقة انتاجية أعلى. ولكن هذا الإختبار يتطلب تكلفة أعلى ومعدات خاصة وكواشف أغلى مقارنة بإختبار PCR.

5. استنتاجات عامة

هناك مجموعة واسعة من التقنيات أو الإختبارات، كما ورد أعلاه، متاحة حالياً للكشف عن الفيروسات النباتية. هذه التقنيات مفيدة للمسح الحقلي للأمراض الفيروسية ورصد الأمراض في المحاصيل، والدراسات الوبائية، وتطبيق أنظمة الحجر الزراعي، ولبرامج التربية لانتخاب نباتات مقاومة للفيروسات. إن استخدام مجموعة مختلفة من الإختبارات يؤدي إلى زيادة الحساسية والدقة، ويوسع نطاق تطبيقات فعالة لتشخيصها وتطوير استراتيجيات مكافحة مناسبة لتخفيف الخسائر الناجمة عن العديد من الأمراض الفيروسية المدمرة (Martin *et al.*, 2000).

تعتبر الإختبارات التي تعتمد على الحمض النووي وسيلة جيدة وحساسة للكشف عن الفيروسات، إلا أن نجاحها يعتمد إلى حد كبير على توفر الامكانيات المخبرية والمهارات الفنية للعاملين، والتي يصعب توفرها في كثير من الأحيان. ولكن المزايا التي توفرها مثل هذه الإختبارات تشجع على رصد الموارد الضرورية لإنشاء المختبرات التي تسمح باستخدامها. إلا أنه في حال عدم وجود مثل هذه المختبرات المجهزة هناك خيارات بديلة، حيث يمكن طبع العينات المراد فحصها على أغشية النيلون أو النيتروسيليلوز ومن ثم إرسالها إلى مختبرات مركزية داخل البلد أو خارجه التي تتوفر فيها الامكانيات اللازمة لاستكمال الإختبارات.

ومع ذلك، من المهم أن نضع في الاعتبار أن الإختبارات المرتكزة على الأحماض النووية والإختبارات السيرولوجية تعطي في كثير من الأحيان نتائج مماثلة من حيث الحساسية والدقة، ولهذا فإن الإختبارات السيرولوجية هي الأسلوب المفضل للكشف عن الفيروسات في العديد من البلدان، لأن الإختبارت الجزيئية التي تعتمد على الأحماض النووية تكلفتها عالية وتحتاج إلى مختبرات متخصصة.

إن تطبيق المعايير الدولية في عصر "عولمة" الزراعة والصحة النباتية يلعب دوراً هاماً في تسهيل تبادل البذور وتبادل الأصناف في العالم بما فيها المنطقة العربية. وبالتالي فإن اتباع إجراءات لإنتاج مواد اكثار نباتية "خالية من الفيروس" عملية ضرورية جداً (Frison *et al.*, 1990؛ Spiegel *et al.*, 1993). ويجب الإشارة هنا، إلى أن اي نتيجة إيجابية سواء في الإختبارات السيرولوجية أو في الإختبارات البيولوجية الجزيئية لا يعني بالضرورة وجود فيروس بحالة نشطة من الناحية البيولوجية، وأن الفيروس ينتقل عن طريق البذور (Johansen *et al.*, 1994؛ Konaté & Barro, 1993؛ Konaté & Neya, 1996). لذلك في حالات خاصة، حيث المادة الوراثية المتبادلة ذات قيمة زراعية مرتفعة، يمكن إجراء إختبارات اضافية عليها لتأكيد النتائج قبل اتخاذ قرار برفض البذور. إن هذه الاجراءات ذات أهمية للحجر الصحي والتي يجب توحيدها عبر المنطقة العربية على أساس اقليمي.

بيد أن جميع هذه الأنشطة تتطلب تطوير المهارات وتوفير الخبرات الكافية لتفعيل واجراء الإختبارات التشخيصية في بيئات مختلفة من المنطقة العربية وتفسير النتائج دون أي غموض. ينبغي تنظيم دورات تدريبية قصيرة الأجل وبشكل منتظم حول مختلف طرائق التشخيص وبالتالي تطوير المهارات والمعارف للعاملين في مراكز البحوث والإرشاد الزراعي على كشف وتحديد الفيروسات والفيرويدات النباتية. ويعتبر مشاركة العلماء المختصون في مثل هذه الدورات من مختلف المؤسسات داخل وخارج المنطقة العربية، وذوي الخبرة في مختلف مجالات البحوث النباتية الفيروسية أمراً هاماً لتحقيق هذا الهدف. ومن المهم للمؤسسات البحثية المشاركة في برامج تحسين المحاصيل في المنطقة العربية أن تواصل جهودها لتعزيز القدرات في مجال بحوث الأمراض الفيروسية في البرامج الوطنية. ومن المهم أيضاً أن تكون الاستراتيجيات طويلة الاجل ومنسقة وتركز على الأمراض الفيروسية التي تصيب مختلف المحاصيل في المنطقة العربية، وخاصة تلك التي لم تدرس بشكل كاف حتى الآن. وكذلك من المهمّ نشر وتعميم المعلومات التشخيصية ليستخدمها العلماء في مختلف المؤسسات.

6. المراجع

فجلة، جابر، يحيى الفحام ومرفت فتح الله. 2007. فيروس موزاييك البرسيم الحجازى/الجت: مداه العائلي، تنقيته، طرق انتقاله وتفاعلاته السيرولوجية. مجلة وقاية النبات العربية، 25: 71.

قمري، صفاء غسان وخالد مكوك.1993. مقارنة كفاءة طرائق مختلفة من إختبار اليزا (ELISA) في الكشف عن فيروسي موزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور وتلون بذور الفول في عصارة نباتات العدس. مجلة وقاية النبات العربية، 11: 86-91.

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

Abou-Jawdah, Y., H. Sobh, N. Cordahi, H. Kawtharani, G. Nemer, D.P. Maxwell and M.K. Nakhla. 2004. Immunodiagnosis of *Prune dwarf virus* using antiserum produced to its recombinant coat protein. Journal of Virological Methods, 121: 31-38.

Abou-Jawdah, Y., K.H. Soubra and W.A. Shebaro. 1996. Evaluation of the reaction of tomato genotypes to tomato yellow leaf curl geminivirus in Lebanon. Phytopathologia Mediterranea, 35:91-99.

Adams, A.N. 1978. The detection of plum pox virus in Prunus species by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Annals of Applied Biology, 90: 215–221.

Almond, N., S. Jones, A.B. Heath and P.A. Kitchin. 1992. The assessment of nucleotide sequence diversity by the polymerase chain reaction is highly reproducible. Journal of Virological Methods, 40: 37–44.

Al-Moudallal, Z., D. Altschuh, J.P. Briand and M.H.V. van Regenmortel. 1984. Compartive sensitivity of different ELISA procedures for detecting monoclonal antibodies. Journal of Immunological Methods, 68: 35-43.

Avrameas, S. 1972. Enzyme markers: their linkage with proteins and use in immunhistochemistry. Histochemistry Journal, 47: 321–330.

Baker, K.K., D.C. Ramsdell and J.M. Gillett. 1985. Electron microscopy: current applications to plant virology. Plant Disease, 69: 85–90.

Ball, E.M. 1974. Serological tests for the identification of plant viruses. American Phytopathological Society Monograph. 31 pp.

Banttari, E.E. and P.H. Goodwin. 1985. Detection of potato viruses S, X, and Y by enzyme-linked immunosorbent assay on nitrocellulose membranes (dot-ELISA). Plant Disease, 69: 202–205.

Bariana, H.S., A.L. Shannon, P.W.G. Chu and P.M. Waterhouse. 1994. Detection of five seedborne legume viruses in one sensitive multiplex polymerase chain reaction test. Phytopathology, 84: 1201–1205.

Bock, K.R. 1982. The identification and partial characterization of plant viruses in the tropics. Tropical Pest Management, 28: 399–411.

Candresse, T., G. Macquaire, M. Lanneau, M. Bousalem, L. Quiot-Douine, J.B. Quiot and J. Dunez. 1995. Analysis of plum pox potyvirus variability and development of strain-specifi c PCR assays. Acta Horticulturae, 386: 357–369.

Candresse, T., M. Cambra, S. Dallot, M. Lanneau, M. Asensio, M.T. Gorris, F. Revers, G. Macquaire, A. Olmos, D. Boscia, J.B. Quiot and J. Dunez. 1998b. Comparison of monoclonal antibodies and polymerase chain reaction assays for the typing of isolates belonging to the D and M serotypes of plum pox potyvirus. Phytopathology, 88: 198–204.

Candresse, T., R.W. Hammond and A. Hadidi. 1998a. Detection and identification of plant viruses and viroids using polymerase chain reaction (PCR). Pages 399–416. In: Control of plant virus diseases. A. Hadidi, R.K. Khetarpal and K. Koganezawa (eds.). APS Press, St. Paul, MN, USA.

Chirkov, S.N., A.M. Olovnikov, N.A. Surguchyova and J.G. Atabekov. 1984. Immunodiagnosis of plant viruses by a virobacterial agglutination test. Annals of Applied Biology, 104: 477-483.

Clark, M.F. 1981. Immunosorbent assays in plant pathology. Annual Review of Phytopathology, 19: 83–106.

Clark, M.F. and A.N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology, 34: 475– 483.

Clark, M.F. and M. Bar-Joseph. 1984. Enzyme immunosorbent assays in plant virology. Pages 51–85. In: Methods in virology. K. Maramorosch and H. Koprowski (eds.). Academic Press, New York, USA.

Cooper, J.I. and M.L. Edwards. 1986. Variations and limitations of enzyme-amplified immunoassays. Pages 139–154. In: Developments and applications in virus testing. R.A.C. Jones and L. Torrance (eds.). Association of Applied Biologists, Wellesbourne, UK.

Derrick, K.S. 1973. Quantitative assay for plant viruses using serologically specific electron microscopy. Virology, 56: 652–653.

Dietzgen, R.G., J.E. Thomas, G.R. Smith and D.J. Maclean. 1999. PCR-based detection of viruses in banana and sugarcane. Current Topics in Virology, 1: 105–118.

Dietzgen, R.G., Z. Xu and P.-Y. Teycheney. 1994. Digoxigenin-labeled cRNA probes for the detection of two potyviruses infecting peanut (*Arachis hypogaea*). Plant Disease, 78: 708–711.

Edwardson, J.R., R.G. Christie, D.E. Purcifull and M.A. Petersen. 1993. Inclusions in diagnosing plant virus diseases. Pages 101–128. In: Diagnosis of plant virus diseases. R.E.F. Matthews (ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Eun, A.J.-C., M.-L. Seoh and S.-M. Wong. 2000. Simultaneous quantitation of two orchid viruses by the TaqMan real time RT-PCR. Journal of Virological Methods, 87: 151–160.

Eweida, M., H. Xu, B.P. Singh and M.G. Abouhaidar. 1990. Comparison between ELISA and biotin-labelled probes from cloned cDNA of potato virus X for the detection of virus in crude tuber extracts. Plant Pathology, 30: 623–628.

Farr, A.G. and P.K. Nakane. 1974. Immunohistochemistry with enzyme labeled antibodies: a brief review. Journal of Immunological Methods, 47: 129–144.

Fegla, G.I., I.A. El-Samra, K.A. Noaman and H.A. Younes. 1997. Host range, transmission and serology of an isolate of tomato yellow leaf curl virus from tomato of plastic

houses in northern Egypt. Proceeding of the 1st Scientific Conference of Agricultural Sciences, Faculty of Agriculture, Assiut University, Assiut, 1: 549-567.

Fegla, G.I., I.A. El-Samra, H.A. Younes and M.H. Abd El-Aziz. 2000a. Optimization of dot immunobinding assay (DIA) for detection of tomato mosaic virus (ToMV). Advances in Agricultural Research, 5: 1495-1506.

Fegla, G.I., Y.M. El-Faham, H.A. Younes and M.M. Fath-Allah. 2000b. Detection of alfalfa mosaic Alfamovirus in seeds, seed parts and seedlings of two alfalfa cultivars, Mansoura University Journal of Agricultural Sciences, 25: 7599-7609.

Fegla, G.I., I.A. El-Samra, H.A. Younes and M.H. Abd El-Aziz. 2001. Comparative studies for detection of tomato mosaic Tobamovirus (ToMV), cucumber mosaic Cucumovirus (CMV) and potatoY Potyvirus (PVY). Journal of the Advances in Agricultural Research, 6: 239-253.

Fegla, G.I., M.M. Fath-Allah and H.A. Younes. 2004. Alfalfa mosaic Alfamovirus in alfalfa floral parts, pods and seeds at different stages of development. Mansoura University Journal of Agricultural Sciences, 29: 4931-4939.

Francki, R.I.B. 1980. Limited value of the thermal inactivation point, longevity in vitro and dilution end point as criteria for the characterization, identification, and classification of plant viruses. Intervirology, 13: 91–98.

Fridlund, P.R. 1980. Glasshouse indexing for fruit tree viruses. Acta Horticulturae, 94: 153–158.

Frison, E.A., L. Bos, R.I. Hamilton, S.B. Mathur and J.D. Taylor. 1990. FAO/IBPGR technical guidelines for the safe movement of legume germplasm. Food and Agriculture Organization of the United Nations and International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy.

Garger, S.J., T. Turpin, J.C. Carrington, T.J. Morris, R.L. Jordan, J.A. Dodds and L.K. Grill. 1983. Rapid detection of plant RNA viruses by dot blot hybridization. Plant Molecular Biology Reporter, 1: 21–25.

Gould, A.R. and R.H. Symons. 1983. A molecular biological approach to relationships among viruses. Annual Review of Phytopathology, 21: 179–199.

Graddon, D.J. and J.W. Randles. 1986. Single antibody dot immunoassay: a simple technique for rapid detection of a plant virus. Journal of Virological Methods, 13: 63–69.

Hadidi, A., L. Levy and E.V. Podleckis. 1995 Polymerase chain reaction technology in plant pathology. Pages 167–187. In: Molecular methods in plant pathology. R.P. Singh and U.S. Singh (eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Hamilton, R.I., J.R. Edwardson, R.I.B. Francki, H.T. Hsu, R. Hull, R. Koenig and R.G. Milne. 1981. Guidelines for the identification and characterization of plant viruses. Journal of General Virology, 54: 223–241.

Hampton, R., E. Ball and S. De Boer. 1990. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA.

Harrison, B.D., X. Zhou, G.W. Otim-Nape, Y. Liu and D.J. Robinson. 1997. Role of a novel type of double infection in the geminivirus-induced epidemic of severe cassava mosaic in Uganda. Annals of Applied Biology, 131: 437–448.

Hauser, S., C. Weber, G. Vetter, M. Stevens, M. Beuve and O. Lemaire. 2000. Improved detection and differentiation of poleroviruses infecting beet or rape by multiplex RT-PCR. Journal of Virological Methods, 89: 11–21.

Henson, J.M. and R. French. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. Annual Review of Phytopathology, 31: 81–109.

Hewings, A.D. and C.J. D'Arcy. 1984. Maximizing the detection capability of a beet western yellows virus ELISA system. Journal of Virological Methods, 9: 131–142.

Höltke, H.-J., W. Ankenbauer, K. Mühlegger, R. Rein, G. Sanger, R. Seibl and T. Walter. 1995. The digoxigenin (DIG) system for nonradioactive labelling and detection of nucleic acids: an overview. Cellular and Molecular Biology, 41: 883–905.

Horvath, J. 1993. Host plants in diagnosis. Pages 15–48. In: Diagnosis of plant virus diseases. R.E.F. Matthews (ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Hourani, H. and Y. Abou-Jawdah. 2003. Immunodiagnosis of cucurbit yellow stunting disorder virus using polyclonal antibodies developed against recombinant coat protein. Journal of Plant Pathology, 85: 197-204.

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.

Hu, J.S., D.M. Sether, X.P. Liu and M. Wang. 1997. Use of tissue blotting immunoassay to examine the distribution of pineapple closterovirus in Hawaii. Plant Disease, 81: 1150–1154.

Hughes, J.d'A. and L.A. Ollennu. 1993. The virobacterial agglutination test as a rapid means of detecting cocoa swollen shoot virus. Annals of Applied Biology, 122: 299–310.

Jain, R.K., S.S. Pappu, H.R. Pappu, A.K. Culbreath and J.W. Todd. 1998. Molecular diagnosis of tomato spotted wilt tospovirus infection of peanut and other field and greenhouse crops. Plant Disease, 82: 900–904.

James, D., P.A. Trytten, D.J. Mackenzie, G.H.N. Towers and C.J. French. 1997. Elimination of apple stem grooving virus by chemotherapy and development of an immunocapture RT-PCR for rapid sensitive screening. Annals of Applied Biology, 131: 459–470.

Johansen, E., M.C. Edwards and R.O. Hampton. 1994. Seed transmission of viruses: current perspectives. Annual Review of Phytopathology, 32: 363–386.

Jones, A.T. 1993. Experimental transmission of viruses in diagnosis. Pages 49–72. In: Diagnosis of plant virus diseases. R.E.F. Matthews (ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Köhler, G. and C. Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature (London), 256: 495–497.

Kolber, M., M. Nemeth and P. Szentivanyi. 1982. Routine testing of English walnut mother trees and group testing of seeds by ELISA for detection of cherry leaf roll virus infection. Acta Horticulturae, 130: 161–172.

Konaté, G. and B.J. Neya. 1996. Rapid detection of cowpea aphid-borne mosaic virus in cowpea seeds. Annals of Applied Biology, 129: 261–266.

Konaté, G. and N. Barro. 1993. Dissemination and detection of peanut clump virus in groundnut seed. Annals of Applied Biology, 123: 623–627.

Krawetz, S.A. 1989. The polymerase chain reaction: opportunities for agriculture. AgBiotech News and Information, 1: 897–901.

Kwok, S. and R. Higuchi. 1989. Avoiding false positives with PCR. Nature, 339: 237–238.

Lange, L. and M. Heide. 1986. Dot immuno binding (DIB) for detection of virus in seed. Canadian Journal of Plant Pathology, 8: 373–379.

Langer, P.R., A.A. Waldrop and D.C. Ward. 1981. Enzymatic synthesis of biotin-labelled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. Proceedings of National Academy of Sciences USA, 78: 6633–6637.

Latvala, S., P. Susi, A. Lemmetty, S. Cox, A.T. Jones and K. Lehto. 1997. Ribes host range and erratic distribution with in plants of blackcurrant reversion associated virus provide further evidence for its role as the causal agent of reversion disease. Annals of Applied Biology, 131: 283–295.

Leong, M.M.L., C. Milstein and R. Pannell. 1986. Luminescent detection method for immunodot, western, and southern blots. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 34: 1645–1650.

Lin, N.S., Y.H. Hsu and H.T. Hsu. 1990. Immunological detection of plant viruses and mycoplasmalike organisms by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. Phytopathology, 80: 824–828.

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.

Makkouk, K. M., H.T. Hsu and S. G. Kumari. 1993. Detection of three plant viruses by dot-blot and tissue-blot immunoassays using chemiluminescent and chromogenic substrates. Journal of Phytopathology, 139:97-102

Martelli, G.P. 1993. Leafroll. Pages 37–44. In: Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis. G.P. Martelli (ed.). ICVG/FAO, Rome, Italy.

Martin, R.R., D. James and C.A. Le'vesque. 2000. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. Annual Review of Phytopathology, 38: 207–239.

Mas, P., J.A. Sanchez-Navarro, M.A. Sanchez-Pina and V. Pallas. 1993. Chemiluminescent and colorigenic detection of cherry leafroll virus with digoxigenin-labeled RNA probes. Journal of Virological Methods, 45: 93–102.

Matthews, R.E.F. 1980. Host plant responses to virus infection. Pages 297–359. In: Comprehensive virology, vol. 16, virus-host interaction, viral invasion, persistence, and diagnosis. H. Fraenkel-Conrat and R.R. Wagner (eds.). Plenum Press, New York, USA.

Maule, A.J., R. Hull and J. Donson. 1983. The application of spot hybridization to the detection of DNA and RNA viruses in plant tissues. Journal of Virological Methods, 6: 215–224.

Maury, Y., C. Duby, J.M. Bossennec 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.

McLaughlin, M.R., O.W. Barnett, P.M. Burrows and R.H. Baum. 1981. Improved ELISA conditions for detection of plant viruses. Journal of Virological Methods, 3: 13–25.

Milne, R.G. 1991. Immunoelectron microscopy for virus identification. Pages 87–120. In: Electron microscopy of plant pathogens. K. Mendgen and D.E. Lesemann (eds). Springer-Verlag, Berlin, Germany.

Milne, R.G. 1993. Electron microscopy of in vitro preparations. Pages 215–251. In: Diagnosis of plant virus diseases. R.E.F. Matthews (ed.). CRC press, Boca Raton, Florida, USA.

Minafra, A. and A. Hadidi. 1994. Sensitive detection of grapevine virus A, B, or leafroll associated III from viruliferous mealybugs and infected tissue by cDNA amplification. Journal of Virological Methods, 47: 175–188.

Mullis, K.F., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 51: 263–273.

Mumford, R.A. and S.E. Seal. 1997. Rapid single-tube immunocapture RT-PCR for the detection of two yam potyviruses. Journal of Virological Methods, 69: 73–79.

Mumford, R.A., K. Walsh, I. Barker and N. Boonham. 2000. Detection of potato mop top virus and tobacco rattle virus using a multiplex real-time fluorescent reverse-transcription polymerase chain reaction assay. Phytopathology, 90: 448–453.

Nassuth, A, E. Pollari, K. Helmeczy, S. Stewart and S.A. Kofalvi. 2000. Improved RNA extraction and one-tube RT-PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extracts. Journal of Virological Methods, 90: 37–49.

Navot, N., R. Ber and H. Czosnek. 1989. Rapid detection of tomato yellow leaf curl virus in squashes of plants and insect vectors. Phytopathology, 79: 562–568.

Nolasco, G., C. de Blas, V. Torres and F. Ponz. 1993. A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtitre plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. Journal of Virological Methods, 45: 201–218.

Noordam D. 1973. Identification of plant viruses, methods and experiments. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, The Netherlands. 207 pp.

Omunyin, M.E., J.H. Hill and W.A. Miller. 1996. Use of unique RNA sequence-specific oligonucleotide primers for RT-PCR to detect and differentiate soybean mosaic virus strains. Plant Disease, 80: 1170–1174.

Ouchterlony, O. 1962. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis II. Progress in Allergy 6: 30–154.

Owens, R.A. and T.O. Diener. 1984. Spot hybridization for the detection of viroids and viruses. Pages 173–189. In: Methods in Virology Vol. VII. K. Maramorosch and H. Koprowski (eds). Academic Press, New York, USA.

Palukaitis, P. 1984. Detection and characterization of subgenomic RNA in plant viruses. Pages 259–317. In: Methods in Virology Vol. VII. K. Maramorosch and H. Koprowski (eds.). Academic Press, New York, USA.

Polston, J.E., P. Burbrick and T.M. Perring. 1991. Detection of plant virus coat proteins on whole leaf blots. Analytical Biochemistry, 196: 267–270.

Roberts, C.A., R.A. Dietzgen, L.A. Heelan and D.J. Maclean. 2000. Real-time RT-PCR fluorescent detection of tomato spotted wilt virus. Journal of Virological Methods, 88: 1–8.

Robertson, N.L., R. French and S.M. Gray. 1991. Use of group specific primers and the polymerase chain reaction for the detection and identification of luteoviruses. Journal of General Virology, 72: 1473–1477.

Rosner, A., R.F. Lee and M. Bar-Joseph. 1986. Differential hybridization with cloned cDNA sequences for detecting a specific isolate of citrus tristeza virus. Phytopathology, 76: 820–824.

Rush, C.M., R. French and G.B. Heidel. 1994. Differentiation of two closely related furoviruses using the polymerase chain reaction. Phytopathology, 84: 1366–1369.

Rybicki, E.P. and M.B. Von Wechmar. 1982. Enzyme-linked immune detection of plant virus proteins electroblotted onto nitrocellulose paper. Journal of Virological Methods, 5: 267–278.

Sambrook, J., E.F. Fritsch and J. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.

Scott, S.W., P.M. Burrows and O.W. Barnett. 1989. Effects of plant sap on antigen concentrations calibrated by ELISA. Phytopathology, 79: 1175.

Shalaby, A.A., M.K. Nakhla, A.M. Soliman, H.M. Mazyad, A. Hadidi and D.P. Maxwell. 2002. Development of a highly sensitive multiplex reverse transcription polymerase chain reaction (m-RT-PCR) method for detection of three potato viruses in a single reaction and nested PCR. Arab Journal of Biotechnology, 5:275-286.

Singh, M. and R.P. Singh. 1995. Digoxigenin-labelled cDNA probes for the detection of potato virus Y in dormant potato tubers. Journal of Virological Methods, 52: 133–143.

Singh, S. and H. Barker. 1991. Comparison of penicillinase-based and alkaline phosphatase-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of six potato viruses. Potato Research, 34: 451–457.

Smith, G.R. and R. Van de Velde. 1994. Detection of sugarcane mosaic virus and Fiji disease virus in diseased sugarcane using the polymerase chain reaction. Plant Disease, 78: 557–561.

Spiegel, S., E.A. Frison and R.H. Converse. 1993. Recent developments in therapy and virus-detection procedures for international movement of clonal plant germ plasm. Plant Disease, 77: 1176–1180.

Sudarshana, M.R. and D.V.R. Reddy. 1989. Penicillinase-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of Virological Methods, 26: 45–52.

Tenllado, F., I. Garcia-Luque, M.T. Serra and J.R. Diaz-Ruiz. 1994. Rapid detection and differentiation of tobamoviruses infecting L-resistant genotypes of pepper by RT-PCR and restriction analysis. Journal of Virological Methods, 47: 165–174.

Torrance, L. and C.A. Dolby. 1984. Sampling conditions for reliable routine detection by enzyme-linked immunosorbent assay of three ilarviruses in fruit trees. Annals of Applied Biology, 104: 267–276.

van Regenmortel, M.H.V. 1982. Serology and immunochemistry of plant viruses. Academic Press, New York, USA.

van Regenmortel, M.H.V. and M.-C. Dubs. 1993. Serological procedures. Pages 159–214. In: Diagnosis of plant virus diseases. R.E.F. Matthews (ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Walkey, D.G.A., N.F. Lyons and J.D. Taylor. 1992. An evaluation of a virobacterial agglutination test for the detection of plant viruses. Plant Pathology, 41: 462–471.

Wesley, S.V., J.S. Miller, P.S. Devi, P. Delfosse, R.A. Naidu, M.A. Mayo, D.V.R. Reddy and M.K. Jana. 1996. Sensitive broad-spectrum detection of Indian peanut clump virus by nonradioactive nucleic acid probes. Phytopathology, 86: 1234–1237.

Wetzel, T., T. Candresse, G. Macquaire, M. Ravelonandro and J. Dunez. 1992. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. Journal of Virological Methods, 39: 27–37.

Younes, H.A. 1995. Studies on certain virus diseases affecting some vegetable crops under green house conditions. Ph.D. Thesis. Faculty of Agriculture (Saba-Basha), Alexandria University, Egypt. 220 pp.