

استخدام وجهي غشاء النيتروسيلايلوز في اختبار بصمة النسيج النباتي المناعي للكشف عن فيروس الموزاييك الأصفر للفاصولياء وامكانية انتقاله ميكانيكياً من الأغشية إلى نباتات العائل

محمد الخلف¹، صفاء غسان قمري²، أمين عامر حاج قاسم¹، خالد محي الدين مكوك² وصلاح الشعبي³
(1) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة حلب، حلب، سورية؛ (2) المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (إيكاردا)، ص.ب. 5466، حلب، سورية؛ (3) الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، دوما، دمشق، سورية.

المخلص

الخلف، محمد، صفاء غسان قمري، أمين عامر حاج قاسم، خالد محي الدين مكوك وصلاح الشعبي. 2009. استخدام وجهي غشاء النيتروسيلايلوز في اختبار بصمة النسيج النباتي المناعي للكشف عن فيروس الموزاييك الأصفر للفاصولياء وامكانية انتقاله ميكانيكياً من الأغشية إلى نباتات العائل. مجلة وقاية النبات العربية، 27: 91-94.

أجريت دراسة لمعرفة إمكانية استخدام وجهي أغشية النيتروسيلايلوز في اختبار بصمة النسيج النباتي المناعي (TBIA)، وذلك بطباعة مقاطع لنباتات من الفول والعدس والبازلاء مصابة بفيروس الموزاييك الأصفر للفاصولياء (BYMV، جنس *Potyvirus*، عائلة *Potyviridae*) بالطريقة المعتادة على وجه واحد للغشاء فقط كشاهد للمقارنة، وعلى كلا الوجهين، وعلى الوجه الثاني من غشاء طبعت على وجهه الأول مقاطع لنباتات مصابة في وقت سابق ولكن غير مفحوصة سيرولوجياً وأغشية أخرى كانت قد فحصت سابقاً. كما تم دراسة إمكانية نقل فيروس الموزاييك الأصفر للفاصولياء بالطريقة الميكانيكية من أغشية نيتروسيلايلوز طبعت عليها مقاطع نباتات إلى نبات العائل. خلصت النتائج إلى إمكانية الكشف عن فيروس الموزاييك الأصفر للفاصولياء في مقاطع نباتات الفول والعدس والبازلاء وبشكل واضح، مقارنة بالشاهد، عند طباعة النباتات المراد فحصها على كلا وجهي أغشية النيتروسيلايلوز سواء كانت الأغشية مفحوصة أو غير مفحوصة سيرولوجياً/مصلياً. يمكن بهذه الطريقة توفير حوالي 50% من كلفة الإختبار، إضافة إلى توفير الجهد والوقت اللازم لانجازه. كما أشارت النتائج إلى عدم إمكانية نقل فيروس BYMV ميكانيكياً من الأغشية التي تحمل مقاطع النباتات المصابة إلى نباتات عائل سليمة، وبالتالي فإن أغشية النيتروسيلايلوز التي تحمل طبقات نسيجية من نباتات مصابة لا تعتبر وسيلة تسمح بانتقال الفيروس من بلد إلى آخر.

كلمات مفتاحية: TBIA، BYMV، اختبارات سيرولوجية، عدوى ميكانيكية.

المقدمة

Nanovirus، عائلة *Nanoviridae* (1). بالإضافة لسهولة نقل أغشية النيتروسيلايلوز المطبوع عليها العينات ما بين مواقع متباعدة بواسطة البريد العادي أو الجوي.

أمكن في دراسة سابقة تخفيض كلفة اختبار TBIA، وذلك باستخدام أوراق عادية بدلاً من أوراق النيتروسيلايلوز غالية الثمن، إلا أن قراءة التفاعل كانت أقل وضوحاً عند الكشف عن الفيروسات التي توجد في الأوعية الناقلة للنباتات وبتركيز قليلة مثل فيروس FBNYV والفيروسات التابعة لعائلة الإصفرار *Luteoviridae* (6). لذلك فقد هدف هذا البحث إلى دراسة إمكانية استخدام وجهي غشاء النيتروسيلايلوز وذلك عن طريق طبع الأجزاء النباتية المراد اختبارها على وجهي الغشاء بأن واحد، سواء كان الغشاء جديداً أو تم استخدام أحد وجهيه في وقت سابق، في محاولة لتقليل التكاليف واختصار الجهد والوقت اللازم لإجراء الاختبار.

يعدُّ اختبار بصمة النسيج النباتي المناعي (TBIA) (*Tissue bolt immunoassay*)، من الإختبارات السيرولوجية/المصلية المهمة المستخدمة في الكشف عن الفيروسات النباتية، وهو من الإختبارات السهلة والبسيطة كونه يتسم بحساسية عالية، ولا يحتاج إلى تجهيزات مخبرية معقدة وغالية الثمن (2، 3، 4، 5). يستخدم اختبار TBIA للكشف عن الفيروسات النباتية، وذلك بقطع الجزء النباتي المراد اختباره عرضياً، ومن ثم طبعه على أحد وجهي غشاء النيتروسيلايلوز (2). كما يتميز هذا الإختبار بثباتية عالية لبنية الفيروس على تلك الأغشية عند تعرضها لظروف تخزين سيئة ولفترات طويلة ولدراجات حرارة مرتفعة وصلت إلى 80 °س ولمدة 10 أيام، دون أن يؤثر ذلك في حساسية الكشف عن وجود فيروس الموزاييك الأصفر للفاصولياء (BYMV، جنس *Potyvirus*، عائلة *Potyviridae*) وفيروس اصفرار وموت الفول (FBNYV، جنس

مصدر الفيروس والأمصال المستخدمة

استخدمت في هذه التجربة نباتات فول وعدس وبازلاء مصابة بفيروس الموزاييك الأصفر للفاصولياء (عزلة SV205-85)، بالإضافة إلى استخدام نباتات سليمة كشاهد في الاختبار. استخدم في هذا الاختبار مصل مضاد متعدد الكلون منتج في مختبر الفيروسات في المركز الدولي للبحوث الزراعية (إيكاردا)، حلب، سورية، ضد العزلة SV205-85 لفيروس الموزاييك الأصفر للفاصولياء.

طباعة النباتات واختبار بصمة النسيج النباتي المناعي (TBIA)

استخدم في الاختبار أغشية نيتروسيليلوز (قطر مسامها 0.45 ميكرومتر) من إنتاج شركة Scheicher & Schuell. تم طباعة النباتات على هذه الأغشية بإحدى الطرائق التالية: (أ) طباعة النباتات بالطريقة المعتادة على أحد وجهي غشاء النيتروسيليلوز فقط كشاهد للمقارنة؛ (ب) طباعة النباتات على وجهي الغشاء؛ (ج) طباعة مقاطع النباتات على الوجه الثاني من الغشاء الذي يحتوي على بصمة لمقاطع نباتات مطبوعة على وجهه الأول سابقاً ولكن بدون إتمام الإختبار السيرولوجي؛ (د) طباعة مقاطع النباتات على الوجه الثاني من الغشاء الذي يحتوي على مقاطع نباتات مطبوعة على وجهه الأول وتم إختباره سيرولوجياً سابقاً.

استخدم اختبار TBIA بالطريقة الموصوفة سابقاً من قبل مكوك وقمري (2)، حيث تم قطع ساق العينة النباتية بشفرة حادة ومن ثم تم طبعه مباشرة على أغشية النيتروسيليلوز. بالنسبة للأغشية الجديدة، تمت عملية طباعة النباتات على الوجه الأول، ثم غسلت في علبة تحوي على 0.01% سلفيت الصوديوم Na_2SO_3 (Sodium sulfite) لمدة 5 دقائق ثم تركت لتجف تماماً، بعدها تمت طباعة مقاطع لنباتات أخرى على الوجه الآخر. أما بالنسبة للأغشية المطبوع على أحد وجهيها مقاطع نباتات في وقت سابق، فأعيدت الطباعة على الوجه الآخر مباشرة دون المعاملة بمادة سلفيت الصوديوم، ثم استكمل الإختبار بالطريقة الموصوفة سابقاً (2).

إمكانية نقل الفيروس ميكانيكياً من أغشية النيتروسيليلوز إلى العائل النباتي

هدفت هذه التجربة إلى دراسة إمكانية نقل الفيروس ميكانيكياً من مقاطع نباتات مصابة مطبوعة على أغشية النيتروسيليلوز إلى نباتات

سليمة. حيث تم طحن غشاء نيتروسيليلوز مطبوع عليه مقاطع لسوق نباتات فول مصابة بفيروس الموزاييك الأصفر للفاصولياء وذلك بمعدل 5، 10، 15، 20، 25 و 30 طبعة في 1 مل محلول فوسفات البوتاسيوم (KPO_4) عياريته 0.01 مولر ودرجة حموضته (pH) 7.2 مع إضافة مادة خادشة (celite) بنسبة 1%، ثم تم اعداء النباتات السليمة بالمستخلص بالطريقة الميكانيكية. فحص المستخلص السابق باختبار بصمة النقطة (Dot blot) للتأكد من استخلاص الفيروس من أغشية النيتروسيليلوز. فحصت النباتات المعدة بعد 20 يوماً من العدوى الميكانيكية باستخدام اختبار TBIA للتأكد من إصابتها بالفيروس.

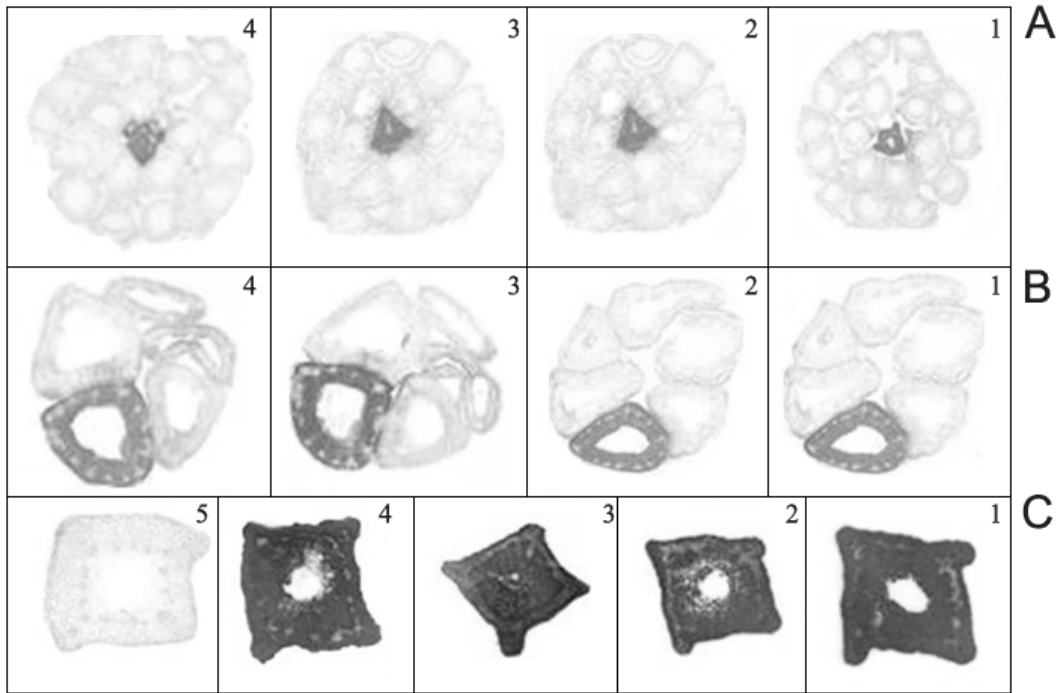
النتائج والمناقشة

كفاءة اختبار بصمة النسيج النباتي المناعي (TBIA)

أشارت نتائج اختبار TBIA، إلى إمكانية الكشف عن فيروس الموزاييك الأصفر للفاصولياء، بشكل جيد، عند طباعة نسيج النباتات المصابة على وجهي غشاء النيتروسيليلوز سواء كان الغشاء جديداً أو مطبوعاً في وقت سابق بنباتات مصابة (مع أو بدون إتمام الإختبار سيرولوجياً) (شكل 1). بهذه الطريقة أمكن توفير حوالي 50% من كلفة الاختبار إضافة إلى توفير الجهد والوقت اللازمين لإنجازه، وإلى تخفيض الأجر البريدي عند شحن أوراق النيتروسيليلوز من مواقع لا تتوفر فيها هذه التقنية إلى مواقع أخرى لاختبارها سيرولوجياً.

نقل الفيروس ميكانيكياً من أغشية النيتروسيليلوز إلى العائل النباتي أظهرت النتائج عدم إمكانية نقل فيروس الموزاييك الأصفر للفاصولياء ميكانيكياً من أغشية النيتروسيليلوز إلى النباتات السليمة (العائل النباتي)، مع العلم بأنه لم يتم الكشف عن وجود الفيروس باختبار بصمة النقطة في المستخلص الناتج من طحن الطباعات النسيجية على غشاء النيتروسيليلوز. وهذه النتيجة مفيدة لمديريات الحجر الزراعي، حيث يمكن ارسال عينات نباتية مطبوعة على أغشية النيتروسيليلوز من بلد إلى آخر لفحصها بدون أن تشكل أي قلق أو خطر من انتشار الفيروسات من موقع لآخر.

مما سبق، يمكن أن يتم إضافة ميزة جديدة إلى ميزات اختبار TBIA الكثيرة الموصوفة في الدراسات السابقة (1، 2، 6)، الذي أضحى من أكثر الاختبارات السيرولوجية سهولة وقلّة في التكاليف، ليس فقط للدول النامية وإنما للدول المتطورة أيضاً.



شكل 1. الكشف عن فيروس الموزاييك الأصفر للفاصولياء (BYMV)، باستخدام اختبار بصمة النسيج النباتي المناعي (TBIA) في مجموعة نباتات من العدس (A)، مجموعة نباتات من البازلاء (B)، ونبات فول (C) مصابة؛ 1= نباتات طبعت على وجه واحد من غشاء نيتروسيليلوز جديد، 2= نباتات طبعت على وجهي غشاء جديد، 3= نباتات طبعت على الوجه الثاني من غشاء مطبوع على وجهه الأول نباتات ولم يتم إختباره سيرولوجياً بعد، 4= نباتات طبعت على الوجه الثاني من غشاء مطبوع على وجهه الأول نباتات وتم إختباره سيرولوجياً في وقت سابق، 5= مقطع لنبات فول سليم.

Figure 1. Detection of *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) by Tissue blot immunoassay (TBIA) in infected lentil group (A), pea group (B) and faba bean plant (C); 1= plants printed on one side of new nitrocellulose membrane (NCM), 2= plants printed on both sides of NCM, 3= plants printed on the other side of a processed and/or un-processed NCM already printed with plant tissues on one side, 4= plants printed on the other side of processed NCM, 5= stem blot of healthy faba bean plant.

Abstract

Al-Khalaf, M., S.G. Kumari, A.A. Haj Kasem, K.M. Makkouk and S. Al-Chaabi. 2009. Use of the Two Faces of Nitrocellulose Membrane in Tissue Blot Immunoassay for the Detection of *Bean yellow mosaic virus* and the Possibility of its Mechanically Transmitted from the Printed Membrane to the Host Plant. *Arab Journal of Plant Protection*, 27: 91-94.

The possibility of using both sides of the nitrocellulose membrane (NCM) by Tissue blot immuno assay (TBIA) for the detection of *Bean yellow mosaic virus* (BYMV, genus *Potyvirus*, family *Potyviridae*) was investigated. Faba bean, lentil and pea plants infected with BYMV were printed on (i) one side of NCM, (ii) on both sides of NCM, and (iii) on the other side of a processed and/or un-processed NCM already printed with plant tissues on one side. The results showed that BYMV can be easily detected in faba bean, lentil and pea plants by TBIA using both sides of the membrane for processed and un-processed NCM. The use of both sides of the NCM reduced the cost of testing by 50%. The results also showed that the virus can not be transmitted mechanically from the printed infected blots on NCM to a healthy plant, and consequently, it does not permit the movement of the virus from one location to another distant location.

Keywords: TBIA, BYMV, serological tests, mechanically inoculation.

Corresponding author: Safaa G. Kumari, ICARDA, P.O. Box 5466, Aleppo, Syria, Email: s.kumari@cgiar.org

References

النباتي المناعي في الكشف عن الفيروسات النباتية. مجلة وقاية النبات العربية، 25: 69-67 (ملخص).

1. عطار، نوران، صفاء قمرى وخالد مكوك. 2007. تأثير درجات الحرارة والتخزين في كفاءة اختبار بصمة النسيج

5. **Makkouk K.M. and A. Comeau.** 1994. Evaluation of various methods for the detection of barley yellow dwarf luteovirus by the tissue-blot immunoassay and its use for BYDV detection in cereals inoculated at different growth stages. *European Journal of Plant Pathology*, 100: 71–80.
6. **Makkouk, K.M. and S.G. Kumari.** 2002. Low-cost paper can be used in tissue-blot immunoassay for detection of cereal and legume viruses. *Phytopathologia Mediterranea*, 41: 275-278.

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

3. **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.
4. **Lin N.S., Y.H. Hsu and H.T. Hsu.** 1990. Immunological detection of plant virus and a mycoplasma like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membrane. *Phytopathology*, 80: 824–828.

Received: June 2, 2008; Accepted: September 4, 2008

تاريخ الاستلام: 2008/6/2؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2008/9/4