مقارنة كفاءة طرائق مختلفة من إختبار إليزا (ELISA) في الكشف عن فيروسي موزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور وتلون بذور الفول في عصارة نباتات العدس

صفاء غسان قمري وخالد محي الدين مكوك

مخبر الفيروسات – المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (ايكاردا)، ص. ب. 5466، حلب، سورية.

الملخص

قمري، صفاء غسان وخالد محي الدين مكوك. 1993. مقارنة كفاءة طرائق مختلفة من إختبار إليزا (ELISA) في الكشف عن فيروسي موزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور وتلون بذور الفول في عصارة نباتات العدس. مجلة وقاية النبات العربية. 11 (2):91-86

تمت تنقية عزلتين محليتين لفيروسي موزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور (PSbMV) وتلوّن بذور الفول (BBSV) اللذين يصيبان محصول العدس في سورية. حقنت المادة النقية من الفيروسين في أرانب، وتم إنتاج أمصال مضادة لهما ذات نوعية جيدة. استخدمت الأمصال المضادة المنتجة لمقارنة كفاءة خمسة طرائق مختلفة من اختبار إليزا (ELISA) في الكشف عن الفيروسات في عصارة نباتات العدس. استخدم في كل إختبار 20 تخفيفاً من 1\10 حتى 1\5,242,880. أظهرت النتائج أن إختبار إليزا المعدل بواسطة التضخيم الإنزيمي (EA-ELISA) كان أكثر الإختبارات حساسية حيث مكن استخدامه من الكشف عن وجود فيروس تلوّن بذور الفول في تخفيف العصارة 1\2,621,440 وفيروس موزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور في التخفيف 1\40,960، تلاه الإختباران PNC-ELISA (إختبار إليزا المستند على إنزيم البنسيليناز) و I-ELISA (إختبار إليزا غير المباشر) ثم إختبار DAS-ELISA (اختبار إليزا المباشر). وكان إختبار Dot-blot ELISA أقل هذه الإختبارات حساسية حيث استطاع كشف فيروس تلوّن بذور الفول في التخفيف 1\20,480 وفيروس موزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور في التخفيف 1\2,540.

كلمات مفتاحية: عدس، فيروسات، بقوليات، إختبارات سيرولوجية، ELISA.

المقدمة

يعتبر محصول العدس (*Lens culinaris* Medikus) من أهم مصادر البروتينات النباتية في جميع أنحاء العالم. ويصاب محصول العدس في الطبيعة باحد عشر فيروساً تنتشر في مختلف مناطق زراعته في العالم (1, 8). يعتبر فيروسا موزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور (pea seed-borne mosaic potyvirus = PSbMV) وتلوّن بذور الفول (broad bean stain comovirus = BBSV) من الفيروسات المهمة التي تصيب محصول العدس في سورية (5, 8).

تعتبر الإختبارات السيرولوجية أكثر الإختبارات المستعملة في الكشف عن الفيروسات شيوعاً، كما يعد إختبار إليزا (ELISA) الذي كتب عنه في عام 1977 (2) أهم هذه الإختبارات، ثم جرت عليه عدة تعديلات منذ ذلك الحين. وشملت هذه التعديلات تغييراً في نوع الإنزيم المستعمل مثل إختبار إليزا المستند على انزيم البنسيليناز (PNC-ELISA) بدلاً من إنزيم الفوسفاتاز القلوي (Alkaline phosphatase) (13). كما شمل التعديل نوع المواد الكيميائية المستعملة وطريقة طحن العينات. وكان أحدث هذه التعديلات هو إختبار إليزا المعدل بواسطة التضخيم الإنزيمي (EA-ELISA) (11).

يهدف هذا البحث إلى إنتاج أمصال مضادة ذات نوعية جيدة لفيروسين يصيبان محصول العدس في سورية هما: فيروس موزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذوروفيروس تلوّن بذور الفول، ودراسة

كفاءة خمسة طرق مختلفة من إختبارات إليزا في الكشف عنهما في عصارة نباتات العدس وذلك باستخدام الأمصال المضادة المنتجة.

مواد وطرائق البحث

عزل وتنقية الفيروسات: تم تنقية فيروس موزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور، من المجموع الخضري لنباتات بازلاء معداة اصطناعياً بالعزلة SL1-92، المعزولة من نبات عدس جمع من محطة بحوث ازرع، محافظة درعا، سوريا. حُصدت النباتات المعدية بعد 15–20 يوماً من الإعداء، وعزل الفيروس باتباع طريقة مكوك ومشاركوه (9) . أما فيروس تلوّن بذور الفول فقد تم تنقيته من أوراق فول معداة اصطناعياً بالعزلة SL23-91، المعزولة من نبات عدس جمع من موقع تل حديا، حلب، سوريا. وحصدت أوراق النباتات المصابة بعد 24–28 يوماً من الإعداء. ثم عزل الفيروس تبعاً للطريقة الموصوفة سابقاً (7).

إنتاج الأمصال المضادة: تم إنتاج الأمصال المضادة لكل من الفيروسين PSbMV وBBSV، بحقن أرنب أبيض (من النوع النيوزيلاندي) بخمسة حقنات بالعضل وبفاصل أسبوع بين الحقنة والأخرى. احتوت كل حقنة على 1–2 مغ فيروس نقي، تم تحضيرها بخلط كمية متساوية من محضر الفيروس النقي مع مادة زيتية حاملة، من النوع الكامل (Freund's complete adjuvant) في الحقنة الأولى، ومن النوع غير الكامل (Freund's incomplete adjuvant) في باقي الحقنات. أعطيت للأرنب حقنة داعمة بعد 7 أسابيع من الحقنة الخامسة. أخذ المصل المضاد (Antiserum) من الأرنب بعد أسبوع من الحقنة الخامسة عن طريق جمع دمه من خلال نزف أذنه اسبوعياً وبمعدل 35–40 مل في كل مرة ولمدة 12 أسبوعاً. وضع الدم مباشرة في البراد عند درجة حرارة 4 °م لمدة 12 ساعة لتخثيره ثم أخضع لطرد مركزي لفصل المصل المحتوي على الأجسام المضادة.

إختبارات اليزا (ELISA): قورنت خمسة اختبارات مصلية/ سيرولوجية (ELISA) للكشف عن فيروسي تلون بذور الفول وموزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور في عصارة نباتات العدس المصابة، لتحديد الإختبار الأكثر حساسية. استخدم في كل اختبار 20 تخفيفاً من العصارة النباتية تدرجت بين 1\10 و 1\5,242,880، كما استخدمت تخفيفات مماثلة من عصارة نباتات عدس سليمة كشاهد للمقارنة . أجريت الإختبارات باستخدام أطباق ELISA من نوع Dynatech Immulon وأغشية نيتروسيلليلوز.

(أ) الإختبارات التي أجريت باستخدام أطباق ELISA: تم اجراء أربعة اختبارات سيرولوجية وهي: إختبار إليزا المباشر (Double antibody sandwich method = DAS-ELISA) (2)؛ إختبار إليزا غير المباشر (Indirect-ELISA=I-ELISA) (6)؛ إختبار إليزا المستند على إنزيم البنسيليناز (Penicillinase-based enzyme linked immunosorbent assay = PNC-ELISA) (13) وإختبار إليزا المعدل بواسطة التضخيم الإنزيمي = ELISA with enzyme amplification) EA-ELISA) (11).

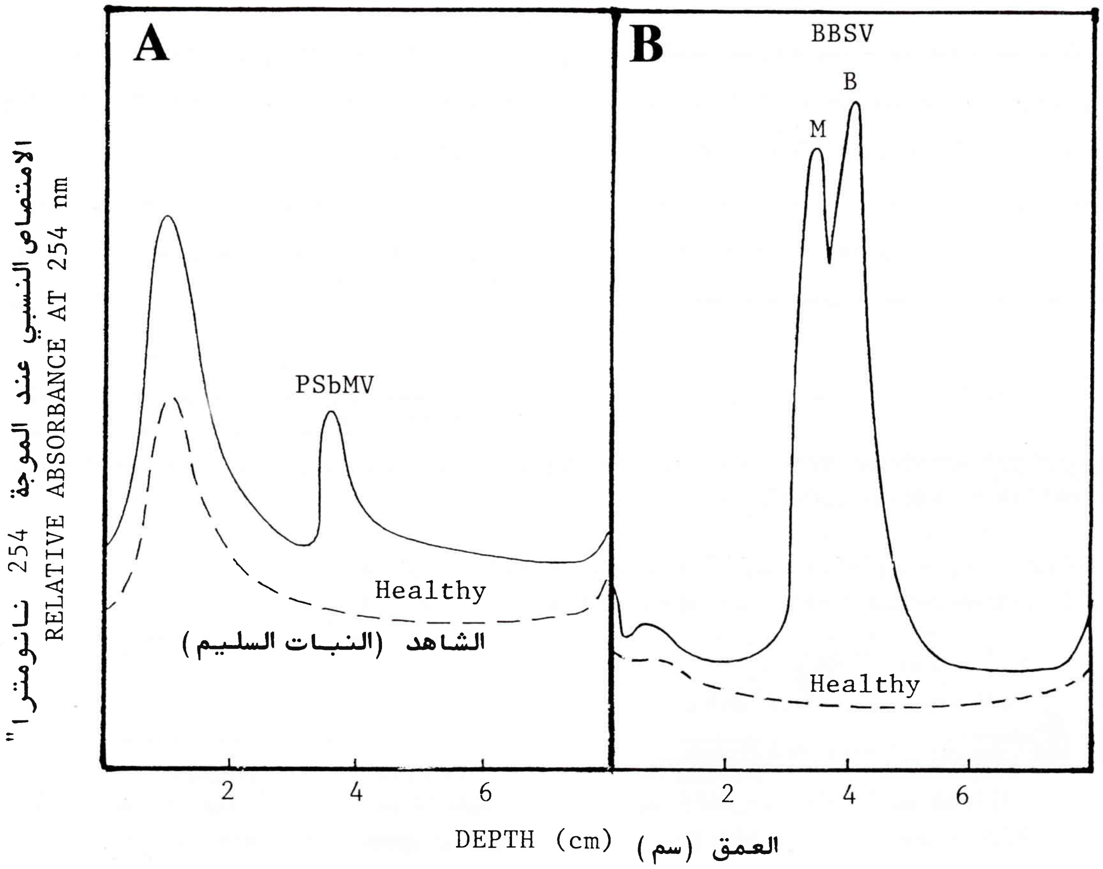
(ب) الإختبارات التي إجريت على أغشية النيتروسيليلوز: تم إجراء إختبار واحد فقط هو إختبار Dot-blot ELISA (4).

استخدم إنزيم الفوسفاتاز القلوي (Alkaline phosphatase) في جميع الإختبارات السيرولوجية السابقة؛ بإستثناء إختبارإليزا المستند على إنزيم البنسيليناز. تمت قراءة أطباق إليزا بعد انتهاء التفاعل على قارئ من النوع Titertek Multiscan Plus Mark II وباستعمال موجات ضوئية مختلفة حسب مادة' التفاعل (Substrate) المستخدمة التي يفككها الإنزيم. قرئت أطباق اختباري DAS-ELISA و I-ELISA على الموجة 405 نانومتراً (A_{405}) بعد 60 دقيقة لاختبار DAS-ELISA وبعد 20 دقيقة لاختبار I-ELISA؛ وقرئت أطباق الإختبار EA-ELISA على الموجة 492 نانومتراً (A_{492}) وبعد 5 دقائق؛ وأطباق اختبار PNC-ELISA على الموجة 450 نانومتراً (A_{450}) وبعد 60 دقيقة، أما إختبار Dot-blot ELISA الذي أجري على أغشية النيتروسيليلوز فقد تمت قراءته بالعين المجردة بعد 15 دقيقة.

النتائج

عزل وتنقية الفيروسات : بعد انتهاء الطرد المركزي لمحتويات الأنابيب ذات التراكيز المتدرجة من السكروز، وبمقارنة نمط الإمتصاص النسبي للأشعة فوق البنفسجية (254 نانومتراً) لدى الأنابيب الحاوية على مستخلص النباتات المصابة مع تلك الحاوية على مستخلص النباتات السليمة، لوحظ وجود عصابة (band) واحدة فقط في الأنبوب الذي يحوي مستخلص نباتات البازلاء المصابة بفيروس موزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور (شكل 1-A). كما وجدت عصابتان (bands) في الأنبوب الذي يحوي مستخلص نباتات الفول المصابة بفيروس تلوّن بذور الفول (شكل 1-B). حيث تمثل هاتان الطبقتان جزيئات الفيروس الوسطى (M) والسفلى (B). تم فصل طبقات الفيروس بجهاز الفصل ISCO density gradient) fractionator) عند الموجة 254 نانومتراً.

تم التأكد من وجود الفيروس النقي في الطبقات الآنفة الذكر



شكل 1. نمط الامتصاص النسبي للأشعة فوق البنفسجية (254 نانومترا") للمادة الفيروسية المستخلصة من نبات البازلاء المصاب بفيروس موزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور (PSbMV) والذي تم طردها مركزيا" في أنابيب سكر متدرجة التركيز عند 24,000 دورة بالدقيقة ولمدة 105 دقائق (A)، وللمادة الفيروسية المستخلصة من نبات الفول المصاب بفيروس تلون بذور الفول (BBSV) والذي تم طردها مركزيا" في أنابيب سكر متدرجة التركيز عند 23,000 دورة بالدقيقة ولمدة ساعتين (B).

Figure 1. UV (254 nm) absorption profiles of purified virus preparation obtained from peas infected with pea seed-borne mosaic potyvirus (PSbMV) after centrifugation on sucrose gradients at 24,000 rpm for 105 min (A) and of purified preparation from faba bean infected with broad bean stain comovirus (BBSV) after centrifugation on sucrose gradients at 23,000 rpm for two hours (B).

بواسطة الإختبارات السيرولوجية (اليزا)، حيث استخدم لهذا الغرض مصل مضاد منتج في هولندا (E210)، مقدم من الدكتور لوت بوس، معهد وقاية النبات، فاجننغن، هولندا، للتعرف على فيروس موزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور؛ ومصل منتج في إيكاردا، حلب، سوريا (SV173-85) للتعرف على فيروس تلوّن بذور الفول. كما استخدم جزء منها لاعداء نباتات بازلاء بفيروس موزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور ولنباتات فول بفيروس تلوّن بذور الفول، فأعطت نتائج إيجابية بعد 20 يوماً من الإعداء. وتم التأكد، بوساطة إختبار إليزا، من أن هذه النباتات قد اصيبت فعلاً. وإضافة لما تقدم، حسبت نسبة مقدار امتصاص المادة الفيروسية النقية للأشعة فوق البنفسجية عند الموجتين 260 و280 فكانت 1.26 لفيروس موزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور و 1.806 لفيروس تلوّن بذور الفول (M:1.74 و B:1.797 قبل خلطهما مع بعضها البعض).

وقد أمكن الحصول على 20–25 مغ فيروس نقي من كل كيلو غرام نباتات مصابة، بالنسبة لفيروس موزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور؛ و 39–40 مغ فيروس نقي من كل كيلو غرام نباتات مصابة بفيروس تلوّن بذور الفول.

فعالية الأمصال المضادة المنتجة: استخدم المصل المضاد (Antiserum) المأخوذ من دم الأرانب المحقونة بكل من فيروسي تلوّن بذور الفول (SL23-91) وموزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور (SL1-92) لعزل وتنقية الجاما غلوبيولين (Immunoglobulin G =IgG) وذلك باتباع الطريقة المقترحة سابقاً (12)، ثم تم ربط IgG بإنزيم الفوسفاتاز القلوي (2) .

استخدم اختبارإليزا المباشر (DAS-ELISA) لمقارنة فعالية المصل المنتج في هذا البحث للعزلة SL1-92 لفيروس موزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور مع المصل المنتج في هولندا (E210)؛ والمصل المنتج للعزلة SL23-91 لفيروس تلوّن بذور الفول

مع المصل الذي سبق انتاجه في سورية (SV173-85)، حيث إستعمل في هذا الإختبار IgG بتركيز 1 ميكروغرام/ مل والإنزيم المرتبط به بتخفيف 1\1000. وأوضحت هذه المقالة أن المصل المنتج للعزلة SL23-91 يماثل في فعاليته المصل الخاص بالعزلة SV173-85، في حين تفوق قليلاً المصل المنتج للعزلة SL1-92 على المصل الخاص بالعزلة E210.

الكشف عن الفيروسات باستخدام إختبارات إليزا: لدى استخدام خمسة إختبارات إليزا للكشف عن فيروسي تلوّن بذور الفول وموزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور الموجودة في 20 تخفيفاً (من 1\10 حتى 1\5,242,8801) من عصارة نباتات العدس المصابة، وجد أن إختبار EA-ELISA كان أكثر هذه الإختبارات حساسية حيث أمكن كشف وجود فيروس تلوّن بذور الفول في

جدول 1. الكشف عن فيروسي موزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور (PSbMV) وتلون بذور الفول (BBSV) في عصارة نباتات العدس المصابة بإستخدام خمسة أنواع* من إختبار إليزا (ELISA).

Table 1. Detection of pea seed-borne mosaic potyvirus (BBSV) and broad bean stain comovirus (BBSV) in lentil leaf extracts by five different variants of the ELISA* test.

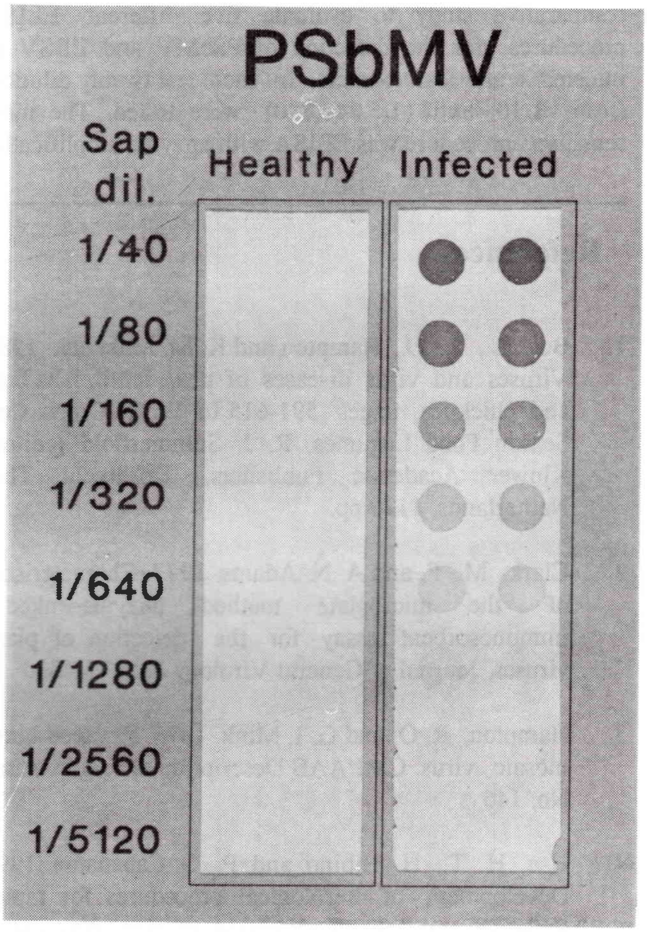
قيم إليزا (ELISA) المأخوذة عند طول موجات مختلفة ونوع الإختبار المستعمل ELISA values taken at different wavelength and the type of test used										
القراءة بالعين** Visual reading		450 نانومترا" 450 nm		492 نانومترا" 492 nm		405 نانومترا" 405 nm				
Dot-blot ELISA بعد 15 دقيقة After 15 min		PNC-ELISA بعد 60 دقيقة After 60 min		EA-ELISA بعد 5 دقائق After 5 min		I-ELISA بعد 20 دقيقة After 20 min		DAS-ELISA بعد 60 دقيقة After 60 min		
BBSV	PSbMV	BBSV	PSbMV	BBSV	PSbMV	BBSV	PSbMV	BBSV	PSbMV	التخفيف المستخدم
+++	+++	1.85	1.64	0.57	1.04	1.45	1.24	1.34	0.56	10\1
+++	+++	1.80	1.58	0.84	0.99	1.31	1.04	1.33	0.45	20\1
+++	+++	1.79	1.60	1.20	0.94	1.22	0.91	1.31	0.44	40\1
+++	+++	1.77	1.60	1.80	0.89	1.20	0.74	1.30	0.42	80\1
+++	+++	1.78	1.64	1.85	0.70	1.14	0.62	1.19	0.38	160\1
+++	+++	1.75	1.71	2.20	0.65	1.01	0.58	0.99	0.37	320\1
+++	++	1.77	1.56	2.37	0.49	0.99	0.50	0.76	0.29	640\1
+++	+	1.74	1.52	2.40	0.38	0.89	0.39	0.70	0.25	1280\2
++	±	1.75	1.11	2.31	0.29	0.89	0.28	0.46	0.15	2560\1
++	-	1.75	0.56	2.26	0.27	0.83	0.19	0.31	**0.07**	5120\1
+	-	1.68	0.20	2.17	0.20	0.79	**0.11**	0.20	0.03	10240\1
±	-	1.69	**0.09**	2.10	0.11	0.60	0.03	0.18	0.02	20480\1
-	-	1.59	0.03	1.75	**0.08**	0.47	0.02	0.12	0.00	40960\1
-	-	1.18	0.00	0.97	0.01	0.40	0.00	**0.08**	0.00	81920\1
-	-	0.79	0.00	0.48	0.00	0.28	0.00	0.01	0.00	163840\1
-	-	0.67	0.02	0.39	0.00	0.19	0.00	0.00	0.00	327680\1
-	-	0.41	0.01	0.31	0.00	0.15	0.00	0.00	0.00	655360\1
-	-	**0.30**	0.00	0.20	0.00	**0.12**	0.00	0.00	0.00	1310720\1
-	-	0.19	0.01	**0.09**	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	2621440\1
-	-	0.08	0.00	0.02	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	5242880\1
-	-	0.18-0.03	0.07-0.00	0.01-0.00	0.00	0.05-0.00	0.00	0.00	0.00	تخفيفات الشاهد السليم

* DAS-ELISA = إختبار إليزا المباشر (double antibody sandwich ELISA)
I-ELISA = إختبار إليزا غير المباشر (Indirect- ELISA)
PNC-ELISA = إختبار إليزا المستند على إنزيم البنسيليناز (Penicillinase-based ELISA)
EA-ELISA = إختبار إليزا المعدل بواسطة التضخيم الإنزيمي (ELISA with enzyme amplification)

** تمت القراءة بواسطة العين المجردة: إشارة + تعني النتيجة إيجابية وهي الكشف عن وجود الفيروس. واشارة – تعني النتيجة سلبية وهي عدم الكشف عن الفيروس.

** Visual reading: (+) means positive (virus detected) and (-) means negative (virus not detected)

التخفيف 2,621,440\1 وفيروس موزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور في التخفيف 40,960\1، تلاه إختبار PNC-ELISA، فإختبار I-ELISA ثم إختبار DAS-ELISA. وكان اختبار Dot-blot ELISA أقل هذه الإختبارات حساسية حيث لم ينجح في كشف فيروس تلوّن بذور الفول سوى عند التخفيف 20,480\1 وفيروس موزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور عند التخفيف 2,560\1 (جدول 1، شكل 2).



شكل 2. نتائج اختبار Dot-blot ELISA –الذي تم على أغشية النيروسيليلوز– لتخفيفات متعددة من عصارة نباتات العدس المصابة بفيروس موزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور (PSbMV).

Figure 2. Dot-blot ELISA on nitrocellulose membrane with various dilutions of leaf extracts from pea seed-borne mosaic potyvirus (PSbMV) -infected lentil.

المناقشة

مكنت هذه الدراسة من تنقية عزلتين فيروسيتين إحداهما لفيروس تلوّن بذور الفول (SL23-91) والأخرى لفيروس موزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور (SL1-92). وكانت النسبة بين امتصاص الأشعة فوق البنفسجية عند الموجة 260 والموجة 280 للمادة الفيروسية لعزلة فيروس موزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور تساوي 1.26 التي تعتبر مرتفعة قليلاً عمّا هو معروف (1.14-1.18) لهذا الفيروس (3). إلاّ أن هذا الفرق البسيط لم يؤثر في جودة المادة النقية المتحصل عليها بدليل أنها أدت الى إنتاج مصل مضاد لهذا الفيروس ذو نوعية جيدة عندما حقنت في الأرنب. أما فيما يتعلق بالمادة الفيروسية التي تم تنقيتها لعزلة فيروس تلوّن بذور الفول فقد كانت تلك النسبة للجزئيات الوسطى M=1.74 وللجزئيات السفلى B=1.79، وهي نسب قريبة جداً من تلك المعروفة لأحد أفراد مجموعة Comovirus التي يتبعها فيروس تلوّن بذور الفول (M=1.70 و B=1.77) (10).

تم في هذه الدراسة الحصول على 20–25 مغ فيروس نقي لكل كيلوغرام واحد من نباتات بازلاء مصابة بفيروس موزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور، و 39–40 مغ فيروس نقي لكل كيلو غرام واحد من نباتات فول مصابة بفيروس تلوّن بذور الفول، وتمثل هذه الأرقام كميات أعلى قليلاً من تلك التي تم الحصول عليها في دراسات سابقة (7 ,9). ويمكن أن تكون هذه الإختلافات في كمية الفيروسات النقية عائدة إلى نوع النباتات التي تم إكثار الفيروس فيها وعزله منها أو الى العزلة الفيروسية المستخدمة.

وجد في هذا البحث أن إختبار إليزا المستند على إنزيم البنسيليناز (PNC-ELISA) أكثر حساسية من إختبار إليزا المباشر (DAS-ELISA) المعتمد في أكثر المخابر، حيث استطاع أن يكشف عن وجود فيروس تلوّن بذور الفول في التخفيف 1,310,720\1 وفيروس موزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور في التخفيف 20,480\1، في حين لم يتمكن إختبار DAS-ELISA من كشف وجود فيروس تلوّن بذور الفول سوى في التخفيف 81,920\1 وفيروس موزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور في التخفيف 5,120\1. وعليه يمكن استبدال إختبار DAS-ELISA باختبار PNC-ELISA لأن الأخير أكثر حساسية وأقل تكلفة (تكلفة الانزيم ومادة التفاعل المستعملين باختبار PNC-ELISA أقل من مثيلاتها اللازمة لاختبار إليزا المباشر). كما يمكن الإستعاضة عن اختبار إليزا المعدل بواسطة التضخيم الإنزيمي (EA-ELISA) باختبار PNC-ELISA حيث أن الإختبار الأول مرتفع التكاليف، ولايتفوق في الحساسية على إختبار PNC-ELISA إلا قليلاً.

كما وجد في هذا البحث أن إختبار Dot-blot ELISA قريب من حيث الحساسية من إختبار DAS-ELISA، ولذلك يمكن استعماله في المخابر التي لاتتوافر فيها الإمكانات لاجراء اختبارات إليزا العادي (التي تجرى على أطباق إليزا)، لكونه يتفوق على هذه الأخيرة بسهولة استخدامه، وباختصار الوقت، ولا يحتاج إلى أجهزة مرتفعة الثمن لقراءة التفاعل حيث تتم قراءة التفاعل بالعين المجردة.

Abstract

Kumari, S. G. and K. M. Makkouk. 1993. Evaluation of different ELISA procedures for the detection of pea seed-borne mosaic potyvirus and broad bean stain comovirus in lentil leaf extracts. Arab J. Pl. Prot. 11 (2): 86-91

Local lentil isolates of pea seed-borne mosaic potyvirus (PSbMV) and broad bean stain comovirus (BBSV) from Syria were purified. The purified preparations were injected into rabbits and antisera with good quality were obtained. These antisera were used in a comparative study to evaluate five different ELISA procedures for the detection of PSbMV and BBSV in infected lentil leaf extracts. In each test twenty dilutions (from 1/10 until 1/5,242,880) were tested. The most sensitive procedure was ELISA with enzyme amplification (EA-ELISA), where BBSV was detected in sap dilution of 1/2,621,440 and PSbMV in sap dilution of 1/40,960, followed by penicillinase ELISA (PNC-ELISA), indirect ELISA (I-ELISA) and double antibody sandwich ELISA (DAS-ELISA). Dot-blot ELISA was the least sensitive, but was able to detect BBSV in sap dilution of 1/20,480 and PSbMV in 1/2,540.

Key words: Lentil, Viruses, legumes, serological tests, ELISA.

References

المراجع

1. Bos, L., R. O. Hampton and K. M. Makkouk. 1988. Viruses and virus diseases of pea, lentil, faba bean and chickpea, pages 591-615 In: World Crops: Cool Season Food Legumes, R. J. Summerfield (editor). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1179 pp.

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

3. Hampton, R. O. and G. I. Mink. 1975. Pea seed-borne mosaic virus. CMI/AAB Description of Plant viruses. No. 146

4. Hsu, H. T., H. Hibino and P. Q. Cabauatan. 1990. Development of serological procedures for rapid, sensitive and reliable detection of rice grassy stunt virus. Plant Disease 74: 695-698.

5. Kumari, S. G., K. M. Makkouk and I. D. Ismail. 1993. Survey of seed-borne viruses in lentil in Syria and their effects on lentil yield. Arab Journal of Plant Protection 11(1): 28-32.

6. Lommel, S. A., A. H. McCain and T. J. Morris. 1982. Evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Phytopathology 71: 1019-1022.

7. Makkouk, K. M., L. Bos, O. I. Azzam, L. Katul and A. Rizkallah. 1987. Broad bean stain virus: identification, detectability with ELISA in faba bean leaves and seeds, occurrence in West Asia and North Africa and possible wild hosts. Netherlands Journal of Plant Pathology 93: 97-106.

8. Makkouk, K. M., S. G. Kumari and R. Al-Daoud. 1992. Survey of viruses affecting lentil (*Lens culinaris* Med.) in Syria. Phytopathologia Mediterranea 31: 188-190.

9. Makkouk, K. M., S. G. Kumari and L. Bos. 1993. Pea seed-borne mosaic virus: occurrence in faba bean (*Vicia faba* L.) and lentil (*Lens culinaris* Med.) in West Asia and North Africa, and further information on host range, transmission characteristics, and purification. Netherlands Journal of Plant Pathology 99: 115-124.

10. Semancik, J. S. 1972. Bean pod mottle virus. CMI/AAB. Descriptions of Plant viruses. No. 108.

11. Stanley, C. J., A. Johannsson and C. H. Self. 1985. Enzyme amplification can enhance both the speed and the sensitivity of immunoassays. Journal of Immunological Methods 83: 89-95.

12. Steinbuch, M. and R. Audran. 1969. The isolation of IgG from mammalina sera with the aid of caprylic acid. Archives of Biochemistry and Biophysics 134: 279-284.

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