الكشف عن فيروس تقزم فول الصويا في بعض المحاصيل البقولية الغذائية بواسطة إختبارات اليزا المختلفة

هدى محمد عدنان نعسان[1]، خالد محي الدين مكوك[2] وأمين عامر حاج قاسم[1]

(1) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة حلب، حلب، سـورية؛ (2) مخبر الفيروسات، برنامج الأصول الوراثية، المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (إيكاردا)، ص.ب. 5466، حلب، سورية.

الملخص

نعسان، هدى محمد عدنان، خالد محي الدين مكوك و أمين عامر حاج قاسم. 1997. الكشف عن فيروس تقزم فول الصويا في بعض المحاصيل البقولية الغذائية بواسطة إختبارات اليزا المختلفة. مجلة وقاية النبات العربية. 15(2): 74-79.

تم الكشف عن فيروس تقزم فول الصويا في مستخلصات كل من نباتات الفول والعدس والبازلاء وبطريقتي TAS-ELISA و DAS-ELIS وباستعمال أجسام مضادة وحيدة ومتعددة الكلون وأعطت كلتا الطريقتين نتائج جيدة. كما تم الكشف عن فيروس تقزم فول الصويا في التخفيف 64/1 لمستخلص عصارة نباتات العدس وفي التخفيف 8/1 لمستخلص نبات البازلاء بطريقة DAS-ELISA . وبدارسة تركيز فيروس تقزم فول الصويا بعد فترات مختلفة من إجراء العدوى، وجد أن تركيز الفيروس كان أعلى ما يمكن بعد عشرة أيام من إجراء العدوى. وعند مقارنة ثلاثة إختبارات اليزا مختلفة TAS-ELISA، DAS-ELISA و DAC-ELISA في الكشف عن فيروس تقزم فول الصويا، أظهر إختبار TAS-ELISA حساسية أكبر في الكشف عن الفيروس تلاه اختبار DAS-ELISA في حين لم يتم الكشف عن الفيروس عند استعمال اختبار DAC-ELISA. تم تحسين أداء اختبار TAS-ELISA باستعمال محاليل منظمة مع بعض الإضافات لها مثل Tween 20 وحليب خالي الدسم لاستخلاص الفيروس من العينة المصابة. كما تم اختصار الفترة الزمنية لاختبار TAS-ELISA إلى ست ساعات دون أن تتأثر حساسيته في الكشف عن الفيروس. كما تم الكشف عن فيروس تقزم فول الصويا في حشرات منّ البازلاء الأخضر (*Acyrthosiphon pisum*) باختباري TAS-ELISA و DAS-ELISA باستعمال المحلول المنظم الفوسفاتي ذي العيارية 0.2 مولار ودرجة حموضته 6.

كلمات مفتاحية: محاصيل بقولية، فيروس تقزم فول الصويا، SbDV، اخبارات اليزا، TAS-ELISA.

المقدمة

وصف فيروس تقزم فول الصويا لأول مرة من قبل Tamada عام 1969 في اليابان حيث وجد في هوكايدو (Hokkaido) وشمال مناطق الهنشو (Hansho) (11). أما في سورية، فقد وجد فيروس تقزم فول الصويا على نبات العدس (*Lens culinaris* Med.) في شمال سورية عام 1994 (9).

ينتقل هذا الفيروس حصراً بواسطة عدد من حشرات المنّ ومنها منّ البازلاء الأخضر (*Acyrthosiphon pisum* Harris) بالطريقة المثابرة (غير المتكاثرة) (5).

تعتبر الاختبارات السيرولوجية (المصلية) وخاصة اختبارات ELISA من أهم الطرق للكشف عن الفيروسات وتحديدها. كما يعتبر اختبار اليزا بالاحتواء الثلاثي للفيروس بالأجسام المضادة (TAS-ELISA) الذي يعتمد على استعمال ثلاثة أنواع من الأجسام المضادة من أهم اختبارات اليزا، لأنه يستطيع أن يفرق بين العزلات والسلالات الفيروسية لاستخدام أجسام مضادة وحيدة الكلون فيه. وان لاختبار TAS-ELISA أهمية كبيرة في الكشف عن الفيروسات التابعة لمجموعة الاصفرار وذلك لوجود علاقات سيرولوجية كبيرة بين العزلات والسلالات الفيروسية التابعة لهذه المجموعة. كما تتميز هذه المجموعة بقلة تركيز المحتوى الفيروسي في العوائل النباتية وذلك لوجودها في الأوعية الناقلة النباتية، وان استخلاصها من النسيج النباتي يتطلب محاليل استخلاص خاصة لذلك.

في هذا البحث، تمت دراسة الطرق المثلى في الكشف عن فيروس تقزم فول الصويا في بعض المحاصيل البقولية الغذائية. مع إجراء بعض التعديلات على اختبار TAS-ELISA المستخدم عن طريق استعمال محاليل استخلاص مختلفة، وإختصار الفترة الزمنية له مع المحافظة على فعاليته في الكشف عن الفيروس.

مواد البحث وطرائقه

1. العزلة الفيروسية

استعمل في هذا البحث العزلة SL1-94 المعرفة على أنها فيروس تقزم فول الصويا المعزولة من نبات عدس من شمال سورية (9). حفظت هذه العزلة بإعداء نباتات فول بالنقل المستمر وباستعمال حشرات منّ البازلاء الأخضر داخل البيت الزجاجي على درجة حرارة 10-25 °س.

2. الأمصال المضادة المستخدمة

تم استخدام المصل المضاد متعدد الكلون المنتج ضد العزلة SL1-94 لفيروس تقزم فول الصويا والمتحصل عليه من مخبر الفيروسات، ايكاردا (9). كما تم استعمال المصل

المضاد وحيد الكلون (5G4) الذي يتفاعل مع عدد كبير من الفيروسات التابعة لمجموعة الإصفرار، والذي قدم من الدكتورة لينا كاتول، معهد الكيمياء الحيوية والفيروسات النباتية، براونشفايغ، ألمانيا.

تمت تنقية الجاما غلوبيولين (IgG) من المصل المضاد المتعدد الكلون حسب طريقة Steinbuch & Aurdan (10)، ثم ربطه بإنزيم الفوسفاتاز القلوي وفق Clark & Adam (2).

3. الاختبارات السيرولوجية المستخدمة

تمت دراسة كفاءة أربعة اختبارات سيرولوجية بالكشف عن فيروس تقزم فول الصويا، وهذه الاختبارات هي: (أ) اختبار اليزا بالاحتواء الثنائي للفيروس بالأجسام المضادة (DAS-ELISA)، حسب الطريقة الموصوفة من قبل Clark & Adams (2). (ب) اختبار اليزا مع تغطية الأطباق مباشرة بالفيروس(DAC-ELISA)، حسب الطريقة الموصوفة من قبل Lommel *et al.* (6). (جـ) اختبار اليزا بالاحتواء الثلاثي للفيروس بالأجسام المضادة (TAS-ELISA)، حسب الطريقة الموصوفة من قبل Al Moudallal *et al.* (1).

في جميع الاختبارات السابقة كان تركيز الجاما غلوبيولين المستعملة في تغطية أطباق اليزا بمعدل 1 ميكروغرام/ مل. أما بالنسبة لإنزيم الفوسفاتاز القلوي المرتبط بالأجسام المضادة الخاصة بالفيروس، والأمصال المضادة متعددة الكلون المنتجة في أجسام الماعز ضد الأجسام المضادة للفئران (Anti-Mouse) وضد الأجسام المضادة للأرانب (Anti-Rabbit) فقد استعملت بتخفيف 2000/1. أما المصل المضاد إحادي الكلون (5G4) فقد استعمل بتخفيف 1000/1.

في جميع اختبارات اليزا، تم قياس شدة التفاعل عند موجة طولها 405 نانومترات باستعمال قارئ اليزا من النوع Titertek Multiskan plus وذلك بعد ساعة من إضافة المادة الكاشفة (Substrate) التي يفككها الإنزيم المرتبط (الفوسفاتاز القلوي). اعتبرت العينة مصابة عندما كان امتصاص العينة للضوء عند الموجة 405 نانومترات يفوق امتصاص الشاهد السليم (غير المصاب) + ثلاثة أضعاف قيمة الإنحراف المعياري (Standard deviation).

4. الكشف عن الفيروس في تخفيفات وأجزاء نباتية وأوقات مختلفة

تم تحضير التخفيفات التالية: 2/1، 4/1، 8/1، 16/1، 32/1 و 64/1 من عصارة نباتات العدس والبازلاء المصابة بفيروس تقزم فول الصويا ولنباتات الشاهد السليم. استخلصت العصارة النباتية من الأوراق بواسطة محلول منظم فوسفاتي عياريته 0.2 مولار ودرجة حموضته 6.0 pH (0.2 M KPO_4, pH 6)، ومن ثم تم الكشف عن الفيروس باستخدام اختبار DAS-ELISA.

لدراسة تركيز فيروس تقزم فول الصويا في نبات العدس بعد العدوى، فقد تم فحص النباتات بعد 5، 10، 15، 20، 25، 30 و 30 يوم من العدوى. استخلصت العينات النباتية باستخدام المحلول المنظم الفوسفاتي (0.2 M KPO_4, pH 6) وبتخفيف 2/1 وباستخدام اختبار TAS-ELISA.

تم فحص الأجزاء النباتية المختلفة (جذر، تاج، أوراق سفلية، ساق وقمة نامية) لكل من نباتات الفول والعدس وذلك بعد 10 أيام من العدوى. وقد استخدم المحلول المنظم 0.2 M KPO_4, pH 6 وبتخفيف 2/1، عند استخدام الطرق السيرولوجية الثلاثة التالية: DAS-ELISA، TAS-ELISA و DAC-ELISA.

5. دراسة كفاءة المحاليل المنظمة لاستخلاص الفيروس

تمت مقارنة محلولين منظمين في استخلاص فيروس تقزم فول الصويا من نباتات فول مصابة؛ الأول محلول منظم فوسفاتي عياريته 0.2 مولار ودرجة حموضته 6.0 pH، والثاني محلول ملحي فوسفاتي (PBS) عياريته 0.1 مولار ودرجة حموضته 7.4 pH مضافاً إليه مادة Tween 20 بنسبة 0.05% و2% من مادة Polyvinylpyrolydone (PVP) (PBST, pH 7.4+2%PVP). وقد تم تحضير التخفيفات التالية: 2/1، 4/1، 8/1، 16/1، 32/1 و 64/1 باستخدام المحلولين المنظمين السابقين، واستخدم لذلك اختبار TAS-ELISA.

أضيفت مواد مساعدة مختلفة إلى المحلول المنظم الفوسفاتي الأول (0.2M KPO_4, pH 6) مثل مادتي Tween 80 و Tween 20 بنسبة 0.5% وحليب خالي الدسم بنسبة 0.1% وعليه تمت المقارنة باستخدام اختبار TAS-ELISA بين ستة محاليل منظمة هي:

1. المحلول المنظم الفوسفاتي (0.2M KPO_4, pH 6) .
2. المحلول المنظم 0.2M KPO_4, pH 6 + Tween 80.
3. المحلول المنظم 0.2M KPO_4, pH 6 + Tween 20.
4. المحلول المنظم 0.2M KPO_4, pH 6 + Tween 80 + حليب خالي الدسم.
5. المحلول المنظم 0.2M KPO_4, pH 6 + Tween 20 + حليب خالي الدسم.
6. المحلول المنظم 0.2M KPO_4, pH 6 + حليب خالي الدسم.

وفي هذا الاختبار تم استخدام مستخلص نباتات الفول والعدس بتخفيف 2/1 وباستخدام اختبار TAS-ELISA.

6. الكشف عن الفيروس في حشرات منّ البازلاء الأخضر

غذيت حشرات بالغة من منّ البازلاء الأخضر الناقلة لفيروس تقزم فول الصويا على نباتات فول مصابة بالفيروس لمدة 24 ساعة لاكتساب الفيروس. ثم طحنت خمس وعشر حشرات منّ في 150 ميكروليتر من المحلول المنظم الفوسفاتي ($0.2M\ KPO_4$, pH 6) ضمن أنابيب صغيرة ذات سعة 1.5 مل وبواسطة قضيب زجاجي، وثفلت العينات المطحونة عند سرعة 8000 دورة/ دقيقة ولمدة 10 دقائق. وللمقارنة استعمل حشرات منّ خالية من الفيروس كشاهد. ومن ثم تم الكشف عن الفيروس فيها بإجراء اختباري TAS-ELISA و DAS-ELISA.

7. اختبار TAS-ELISA المختصر

تم دراسة فترات تحضين مختلفة عند الدرجة 37 °س للمواد المضافة إلى طبق اليزا في المراحل المختلفة لاختبار TAS-ELISA للكشف عن الفيروس المدروس، لاختيار فترة التحضين المناسبة لإختصار الاختبار بدون التأثير على حساسيته. كما استعاض بمادة PVA (Polyvinyl Alcohol) عن الحليب غير الدسم في عملية التغطية.

النتائج والمناقشة

1. الكشف عن الفيروس في تخفيفات وأوقات وأجزاء نباتية مختلفة

تم الكشف عن فيروس تقزم فول الصويا في تخفيفات مستخلص نبات العدس حتى التخفيف 64/1، في حين لم يكشف عنه سوى في التخفيف 8/1 في مستخلص نبات البازلاء وبفروق معنوية بين قراءة اليزا للنبات المصاب وقراءة اليزا للنبات السليم. مما يشير إلى أن تركيز الفيروس في نبات العدس كان أعلى مما هو عليه في نبات البازلاء (جدول 1).

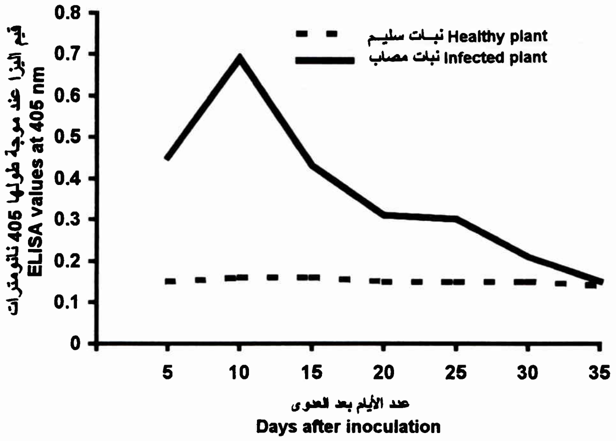
وعند دراسة تركيز فيروس تقزم فول الصويا في نباتات العدس، بعد 5 إلى 35 يوماً من إجراء العدوى، وجد أن تركيز الفيروس كان أعلى ما يمكن بعد عشرة أيام من العدوى (شكل 1)، لذلك تم حصاد النباتات المصابة بعد 7-10 أيام من إعدائها عند اجراء الاختبارات السيرولوجية المختلفة بهدف الحصول على أكبر كمية ممكنة من الفيروس. وهذه النتيجة تتماشى مع ما تم نشره سابقاً حول تركيز سلالة التقزم لفيروس تقزم فول الصويا (SbDV-D) في النبات حيث كان تركيز الفيروس أعلى ما يمكن بعد عشرة أيام من العدوى، وبقي التركيز مستقراً على المستوى نفسه لعشرة أيام آخرى على الأقل، أي حتى 17 يوماً (4).

وعند مقارنة إمكانية الكشف عن فيروس تقزم فول الصويا في الأجزاء المختلفة لكل من نباتات الفول والعدس وبثلاثة طرق سيرولوجية مختلفة (TAS-ELISA، DAS-ELISA و DAC-ELISA)، تبين أن أعلى تركيز للفيروس كان في ساق النبات المصاب مقارنة مع باقي الأجزاء الأخرى المدروسة (جدول 2). ولسهولة استخدام ساق النبات لذلك ينصح باستخدام ساق النباتات في اختبار بصمة النسيج النباتي (TBIA) بالطريقة الموصوفة سابقاً من قبل Makkouk & Kumari (8) للحصول على أعلى حساسية في الكشف عن الفيروس.

جدول 1. الكشف عن فيروس تقزم فول الصويا (SbDV) في التخفيفات المختلفة لمستخلص نباتات العدس والبازلاء بواسطة اختبار DAS-ELISA.

Table 1. Detection of soybean dwarf luteovirus (SbDV) in different dilutions of lentil and pea extracts by DAS-ELISA.

التخفيفات Sample dilution	قيم اليزا عند موجة طولها 405 نانومترات ELISA values at 405 nm: عدس مصاب Infected lentil	بازلاء مصاب Infected pea	نبات سليم Healthy
2:1	0.65	0.37	0.25
4:1	0.32	0.26	0.19
8:1	0.31	0.25	0.19
16:1	0.27	0.22	0.19
32:1	0.22	0.17	0.16
64:1	0.22	0.15	0.15



شكل 1. الكشف عن تركيز فيروس تقزم فول الصويا (SbDV) في نبات العدس بعد فترات مختلفة من إجراء العدوى بواسطة اختبار TAS-ELISA.

Figure 1. Soybean dwarf luteovirus (SbDV) concentration in lentil was evaluated at different intervales after inoculation by TAS-ELISA.

جدول 2. دراسة تركيز فيروس تقزم فول الصويا (SbDV) في الأجزاء المختلفة لنباتات العدس والفول باستخدام اختبارات TAS-ELISA و DAS-ELISA و DAC-ELISA.

Table 2. Soybean dwarf luteovirus (SbDV) concentration was evaluated in different parts of lentil and faba bean by TAS-ELISA, DAS-ELISA and DAC-ELISA.

الجزء النباتي Plant part	قيم اليزا عند موجة طولها 405 نانومترات ELISA values at 405 nm — نبات العدس Lentil plant: مصاب Infected	سليم Healthy	نبات الفول Faba bean plant: مصاب Infected	سليم Healthy
TAS-ELISA				
قمة نامية Growing point	1.4	0.2	1.2	1.3
ساق Stem	2.5	0.2	1.8	1.3
أوراق سفلية Lower leaves	1.7	0.2	1.7	1.3
تاج Crown	2.8	0.2	1.5	1.3
جذر Root	2.8	0.2	0.4	1.3
DAS-ELISA				
قمة نامية Growing point	1.1	0.3	0.5	0.3
ساق Stem	2.1	0.3	1.6	0.3
أوراق سفلية Lower leaves	1.4	0.3	1.6	0.3
تاج Crown	1.9	0.3	1.1	0.3
جذر Root	1.6	0.3	0.6	0.3
DAC-ELISA				
قمة نامية Growing point	0.3	0.1	0.1	0.1
ساق Stem	0.2	0.1	0.2	0.1
أوراق سفلية Lower leaves	0.2	0.1	0.1	0.1
تاج Crown	0.1	0.1	0.1	0.1
جذر Root	0.1	0.1	0.1	0.1

وأظهرت النتائج أنه يمكن الكشف عن فيروس تقزم فول الصويا بسهولة عند استعمال اختباري TAS-ELISA و DAS-ELISA ولو أن حساسية اختبار TAS-ELISA كانت أعلى في الكشف عن الفيروس من حساسية اختبار DAS-ELISA. وهذا يتوافق مع ماتم نشره سابقا عن بعض الفيروسات التابعة لمجموعة الإصفرار والتي ينتمي إليها الفيروس المدروس، حيث أظهر اختبار TAS-ELISA حساسية أكبر في الكشف عن فيروس التفاف أوراق الفول (BLRV)، فيروس احمرار أوراق البرسيم الأرضي (SCRLV) وفيروس الإصفرار الغربي للشوندر (BWYV) مقارنة مع اختبار DAS-ELISA (3). ولم نتمكن من الكشف عن فيروس تقزم فول الصويا باستعمال إختبار DAC-ELISA ويعزا ذلك إلى أن تركيز الفيروس في النبات ضئيل جداً، وهذا يوافق دراسة سابقة عن فيروس اصفرار وتقزم الشعير (BYDV) الذي ينتمي لمجموعة فيروسات الاصفرار (7).

2. كفاءة المحاليل المنظمة لإستخلاص الفيروس

بدراسة كفاءة محلولين منظمين لاستخلاص الفيروس من نبات الفول المصاب بتخفيفات مختلفة من 2/1 وحتى 64/1 بواسطة إختبار TAS-ELISA، وجد أن المحلول المنظم الفوسفاتي($0.2M\ KPO_4$, pH 6) كان أفضل من المحلول المنظم PBST, pH 7.4+2%PVP ولمعظم التخفيفات (جدول 3).

جدول 3. مقارنة كفاءة محلولين منظمين لإستخلاص فيروس تقزم فول الصويا (SbDV) من نباتات الفول وباستعمال اختبار TAS-ELISA.

Table 3. The efficiency of two extraction buffers in extracting soybean dwarf luteovirus (SbDV) from faba bean sample by TAS-ELISA.

تخفيفات العصارة النباتية Sample dilution	قيم اليزا عند موجة طولها 405 نانومترات ELISA values at 405 nm — المحلول المنظم 0.2M KPO4,pH 6: نبات مصاب Infected plant	نبات سليم Healthy plant	المحلول المنظم PBST, pH7.4+2%PVP: نبات مصاب Infected plant	نبات سليم Healthy plant
2:1	2.26	0.30	1.31	0.26
4:1	2.5	0.29	0.99	0.25
8:1	2.26	0.28	0.75	0.24
16:1	1.71	0.27	0.80	0.23
32:1	0.85	0.27	0.98	0.23
64:1	0.47	0.26	0.77	0.22

وعند إضافة المواد المساعدة المختلفة إلى المحلول المنظم الفوسفاتي ($0.2M\ KPO_4$, pH6) بهدف زيادة فعاليته في استخلاص الفيروس، وجد أن إضافة مادة Tween 20 بنسبة 0.5% مع حليب خالي الدسم بنسبة 0.1% تعطي أعلى قراءة اليزا لمستخلص نبات الفول، بينما كانت أعلى قراءة اليزا لمستخلص نباتات العدس عند إضافة Tween 20 بنسبة 0.5% (جدول 4).

جدول 4. مقارنة كفاءة ستة محاليل منظمة لإستخلاص فيروس تقزم فول الصويا (SbDV) من نباتات العدس والفول بإختبار TAS-ELISA.

Table 4. The effect of six extraction buffers in the detection of soybean dwarf luteovirus (SbDV) by TAS-ELISA.

المحاليل المنظمة Buffers	قيم اليزا عند موجة طولها 405 نانومترات ELISA values at 405 nm — نبات العدس Lentil plant — المصاب Infected	نبات العدس Lentil plant — السليم Healthy	نبات الفول Faba bean plant — المصاب Infected	نبات الفول Faba bean plant — السليم Healthy
A*	0.42	0.20	0.91	0.19
B	0.45	0.15	0.65	0.15
C	0.48	0.15	0.56	0.18
D	0.40	0.16	0.88	0.17
E	0.47	0.20	1.21	0.22
F	0.27	0.18	0.82	0.16

* A= 0.2MKPO_4، pH 6؛ B= A + Tween 80؛ C= A + Tween 20؛ D= A + Tween 80 + حليب غير دسم؛ E= A + Tween 20 + حليب غير دسم؛ F= A+ حليب غير دسم.

* A= 0.2 MKPO_4, pH 6; B = A + Tween 80; C= A + Tween 20; D = A + Tween 80 + non fat milk; E= A + Tween 20 + non fat milk; F = A + non fat milk

3. الكشف عن الفيروس في حشرات المنّ

تم الكشف عن فيروس تقزم فول الصويا في حشرات منّ البازلاء الأخضر باختباري TAS-ELISA و DAS-ELISA وبوجود خمس وعشر حشرات منّ وذلك عند إستعمال المحلول المنظم الفوسفاتي (0.2M KPO_4, pH 6)، حيث كانت قراءة اليزا للمنّ الحامل للفيروس أعلى مقارنة مع قراءة اليزا للمنّ الخالي من الفيروس (الشاهد) وفي كلا الاختبارين.

4. اختبار TAS-ELISA المختصر

تم إختصار الفترة الزمنية لاختبار TAS-ELISA من يومين إلى ست ساعات دون أن تتأثر حساسيته في الكشف عن فيروس تقزم فول الصويا، وذلك باختصار فترات التحضين المختلفة عند الدرجة 37 °س للمواد المضافة إلى طبق اليزا (جدول 5). حيث كانت قيم اليزا للنبات المصاب والنبات السليم في إختبار TAS-ELISA المختصر 0.563 و 0.079 وفي اختبار TAS-ELISA العادي (غير المختصر) 0.915 و 0.191، على التوالي.

جدول 5. فترات التحضين عند درجة حرارة 37 °س في مراحل الاختبار المختلفة عند استعمال اختبار TAS-ELISA العادي والمختصر للكشف عن فيروس تقزم فول الصويا (SbDV).

Table 5. Incubation periods at 37° C of the different steps when using the regular and shortened TAS-ELISA for the detection of soybean dwarf luteovirus (SbDV).

	مراحل الاختبار TAS-ELISA procedure	فترات التحضين (بالساعة) Incumbation period (hr) — النظامية Regular	المختصرة Shortened
1	الجسم المضاد متعدد الكلون Rabbit polyclonal antibodies	4	0.25
2	إضافة العينة Sample extraction	4	2
3	إضافة مادة التغطية Blocking	ساعة واحدة (حليب خالي الدسم)	دقيقة واحدة بمادة PVA*
4	إضافة المصل إحادي الكلون Mouse monoclonal antibodies	2	1
5	إضافة المصل المضاد متعدد الكلون المرتبط بالإنزيم Goat Anti-mouse	2	1

* PVA= Polyvinyl Alcohol

نتيجة لما سبق، يمكن أن نستخلص مايلي: (أ) أن اختبار TAS-ELISA هو أكثر حساسية في الكشف عن فيروس تقزم فول الصويا من إختبار DAS-ELISA؛ (ب) يمكن اعتماد إختبار TAS-ELISA المختصر الذي يستغرق ست ساعات في حال توفر أجسام مضادة أحادية الكلون أو استعمال اختبار DAS-ELISA في حال وجود الأجسام المضادة المتعددة الكلون؛ (جـ) يمكن إستخدام المحلول المنظم الفوسفاتي (0.2M KPO_4, pH6) كمحلول إستخلاص لفيروس تقزم فول الصويا وكذلك لحشرة منّ البازلاء الأخضر الحاملة للفيروس في اختبارات اليزا المختلفة.

Abstract

Nassan, H.M., K.M. Makkouk and A.A. Haj Kassem. 1997. Detection of Soybean Dwarf Luteovirus (SbDV) in Some Food Legume Crops by Using Different ELISA Variants. Arab J. Pl. Prot. 15(2):74-79.

Soybean dwarf luteovirus (SbDV) was detected by DAS-ELISA and TAS-ELISA in lentil, faba bean and pea by using different polyclonal and monoclonal antibodies.The highest concentration of the virus was found in faba bean and lentil stems at ten days after inoculation. When different Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) variants were compared, TAS-ELISA was the most sensitive. To improve detection efficiency further many extraction buffers were compared. It was possible to shorten the TAS-ELISA procedure to six hours without significant loss in its detection sensitivity. The virus was detected in *A. pisum* when extracted in 0.2M phosphate buffer.

Key words: Legumes, soybean dwarf luteovirus, SbDV, ELISA, TAS-ELISA.

References

المراجع

1. **Al Moudallal, Z., D. Altschuh, J.P. Briand and M.H.V. Van Regenmortel**. 1984. Comparative sensitivity of different ELISA procedures for detecting monoclonal antibodies. Immuno. Methods 68:35-43.
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. **Fortass, M., F.V. Wilk, R.W. Goldbach, L. Bos and JF JM van den Heuvel.** 1995. Diversity of luteoviruses infecting faba bean (*Vicia faba* L) in Morocco, and their detection by the polymerase chain reaction. Agronomie 16:61-68.
4. **Hewings, A.D., V.D. Damsteegt and S.A. Tolin.** 1986. Purifiction and some properties of two strains of soybean dwarf virus. Phytopathology 76: 759-763.
5. **Johnstone, G.R. & P.L. Guy.** 1986. Epeidemiology of viruses persistantly transmitted by aphids. Proceedings of the Workshop on Epidemiology of Plant Virus Diseasees. IX/4.
6. **Lommel, S.A., A.H. Mc Cain and T.J. Morris.** 1982. Evalution of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Phytopathology 71:1018-1022
7. **Makkouk, K.M. and S.G. Kumari.** 1993. Production of antisera for sensitive detection of two cereal viruses by different ELISA variants. RACHIS 12: 24-27.
8. **Makkouk, K.M. and S.G. Kumari.** 1996. Detection of ten viruses by the tissue-blot immunoassay (TBIA). Arab J. Pl. Prot. 14(1):3-9.
9. **Makkouk, K.M., V. Damsteegt, G.R. Johnstone, L. Katul, D.-E. Lesemann and S.G. Kumari.** 1997. Identification and some properties of soybean dwarf luteovirus affecting lentil in Syria. Phytopath. medit. 36:135-144.
10. **Steinbuch, M. and R. Aurdan.** 1969. The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid. Archives of Biochemistry and Biophysics 134: 279-284.
11. **Tamada, T**. 1970. Aphid transmission and host range of Soybean dwarf virus. Ann. Phytopathology. Soc. Japan 36: 266-274.