فيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1: مداه العائلي، تنقيته، تفاعلاته السيرولوجية، طرق انتقاله وانتشاره على المحاصيل البقولية في سورية

صفاء غسان قمري[1]، خالد محي الدين مكوك[1] وبسام بياعة[2]

(1) مختبر الفيروسات، قسم الأصول الوراثية، المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (إيكاردا)، ص.ب. 5466، حلب، سورية، البريد الالكتروني <S.KUMARI@cgiar.org>؛ (2) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة حلب، حلب، سورية.

الملخص

قمري، صفاء غسان، خالد محي الدين مكوك وبسام بياعة. 2001. فيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1: مداه العائلي، تنقيته، تفاعلاته السيرولوجية، طرق انتقاله وانتشاره على المحاصيل البقولية في سورية. مجلة وقاية النبات العربية. 19: 65-72.

لوحظت في حقول العدس في جنوبي سورية أعراض توحي بإصابة فيروسية، تضمنت اختزالاً في النمو والتفافاً للأوراق كان مترافقاً مع تبرقش الأوراق وذبول القمم أو موتها. كانت نسبة تردُّد هذه الأعراض مرتفعة في حقول العدس بمحافظة درعا حيث تمت مشاهدتها سنوياً منذ عام 1994. أظهرت اختبارات النقل أن العامل الممرض ينتقل من العدس إلى العدس، وإلى البازلاء والفول بوساطة الإعداء الميكانيكي وبواسطة حشرات منّ البازلاء الأخضر (*Acyrthosiphon pisum* Harris) ومنّ الدراق الأخضر (*Myzus persicae* Sulzer) بالطريقة المستمرة. أظهر الرحلان الكهربائي باستخدام هلام البولي أكريلاميد (SDS-PAGE) متبوعاً باختبار وصمة وسترن (Western blot) أن الوزن الجزيئي للغلاف البروتيني لهذا الفيروس هو 22 كيلو دالتون. كما أظهرت الاختبارات السيرولوجية مثل اختبار بصمة النسيج النباتي (TBIA) واختبار Western blot أن هذا الفيروس متشابه سيرولوجياً مع فيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 (*Pea enation mosaic virus-1*، PEMV-1)، جنس *Enamovirus*، عائلة *Luteoviridae*) وبناءً على نتائج المدى العائلي، الأعراض، طرائق الانتقال والتفاعلات السيرولوجية لهذا الفيروس أمكن تصنيفه على أنه فيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1. تم تنقية هذا الفيروس من نباتات بازلاء مصابة به جهازياً، وأمكن الحصول على 1-2 مغ من الفيروس النقي لكل كيلو غرام من الأنسجة المصابة. وأظهر المسح الحقلي خلال الفترة ما بين 1997-2001 أن فيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 منتشر على نحو واسع في كافة مناطق زراعة العدس في سورية (المناطق الشمالية، الوسطى والجنوبية)، وبلغت نسبة الإصابة به في بعض الحقول أكثر من 50%. كما بينت النتائج أن فيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 يؤثر في إنتاجية العدس والبازلاء، فقد سبب خسارة في الإنتاج تراوحت ما بين 16% في المدخل الوراثي ILL 7706 و 50% في المدخل الوراثي ILL 6031.

كلمات مفتاحية: فيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1، عدس، سورية.

المقدمة

يعد العدس (*Lens culinaris* Med.) من أهم مصادر البروتينات النباتية وأقلها تكلفة لنسبة عالية من السكان في جميع أنحاء العالم. يحتل هذا المحصول المكانة الأولى بين المحاصيل البقولية في سورية من الناحية الاقتصادية والمساحة المزروعة، والتي وصلت في موسم 2000/1999 إلى حوالي 150,000 هكتاراً (6). وقد تدنت إنتاجية هذا المحصول في السنوات الأخيرة في مناطق زراعته الرئيسة من سورية، حيث كانت في عام 1996 حوالي 1076 كغ/هـ، في حين وصلت إلى 504 كغ/هـ في عام 2000 (6). وتعتبر إصابة المحصول بالآفات والأمراض المختلفة ومنها الفيروسات إحدى الأسباب الكامنة وراء هذا التراجع. ولقد أشير سابقاً إلى وجود 11 فيروساً تصيب العدس طبيعياً في سورية (10، 13، 20، 22). وتم مؤخراً عزل فيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 (*Pea enation mosaic virus-1*، PEMV-1)، جنس *Enamovirus*، عائلة *Luteoviridae*) من العدس (23). إذ لوحظت أعراضه في حقول العدس في جنوب سورية سنوياً منذ عام 1994، وازدادت نسبة تردده في بعض الحقول حتى وصلت إلى درجة وبائية في المواسم 95/1994، 98/1997 و 2001/2000.

سجل فيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 طبيعياً على عدد من المحاصيل البقولية في العالم (8)، حيث سجل بشكل وبائي على كل من الحمص، العدس والبازلاء في شرق واشنطن وشمال أيداهو في الولايات المتحدة الأمريكية عام 1990 (15)، وعلى العدس في أوروبا (31)، والبازلاء في إيران (12). كما سجل على الفول في عدد من دول منطقة غرب آسيا وشمال أفريقيا ومنها سورية (19). ينتقل هذا الفيروس بالطريقة الميكانيكية وبوساطة أنواع مختلفة من حشرات المنّ بالطريقة المثابرة (المستمرة)، ويعتبر منّ البازلاء الأخضر (*Acyrthosiphon pisum* Harris) أكفأ أنواع المنّ في نقل هذا الفيروس (8). كما وجد أنه ينتقل بوساطة بذور البازلاء بنسبة لا تتجاوز 1.5% (30).

لا تتوافر في سورية، دراسات أكاديمية حول هذا الفيروس، ولذلك فقد هدف هذا البحث إلى دراسة مدى انتشار فيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 على محصول العدس والمحاصيل البقولية الأخرى المرافقة له في سورية. ودراسة بعض خواص عزلة محلية من هذا الفيروس تم عزلها من نبات عدس من مدينة درعا/ جنوب سورية خلال عام 1995. وتتضمن هذه الدراسة تحديد طرائق الانتقال، التفاعلات السيرولوجية/المصلية، المدى العائلي، إنتاج مصل مضاد لهذه العزلة

ودراسة تأثير فيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 في إنتاجية محصول العدس والبازلاء ونسبة انتقاله في بذور أصناف مختلفة من هذين المحصولين.

مواد البحث وطرائقه

1. المسح الحقلي

جمعت عينات نباتية خلال الفترة ما بين 1997-2001 من مناطق مختلفة في المحافظات الجنوبية والوسطى والشمالية من سورية. تم خلال عملية المسح جمع 789 عينة عدس و 1211 عينة من محاصيل بقولية علفية مختلفة (.*Medicago* sp.، *Trifolium* sp، *Lathyrus* sp.، *Pisum* sp.، *Vicia sativa* L. و *Vicia ervilia* (L.) Willd.) تبدي أعراضاً تشبه الأعراض التي تحدثها الإصابات الفيروسية (إصفرار، تبرقش، موزاييك وتقزم). فحصت جميع العينات باختبار بصمة النسيج النباتي (TBIA) (18) للكشف عن فيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1.

2. المصل المضاد والعزلة الفيروسية المستخدمة

تم استخدام المصل المضاد (E154) المنتج ضد عزلة هولندية لفيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 والمتحصل عليه من الدكتور لوت بوس، معهد وقاية النبات، فاجننغن، هولندا.

استخدمت العزلة الفيروسية SL243-95 والمعزولة من نبات عدس من مدينة درعا، سورية، وقد تم المحافظة عليها عن طريق إكثارها على نباتات بازلاء "صنف سوري محلي" بواسطة العدوى بحشرات منّ البازلاء الأخضر. وقد تم تناول هذه العزلة بشكل مفصل في هذه الدراسة.

3. دراسة كفاءة النقل الحشري

استعملت ثلاثة أنواع من حشرات المنّ لتحديد مدى وكفاءة نقلها لفيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 (العزلة SL243-95)، وهذه الأنواع هي: منّ البازلاء الأخضر، منّ الدراق الأخضر (*Myzys persicae* Sulzer)، ومنّ الفول (*Aphis fabae* Scopoli). وضعت حشرات المنّ على أوراق مصابة بالفيروس لمدة 12 ساعة لاكتساب الفيروس، ثم نقلت إلى نباتات عدس سليمة معزولة ضمن أقفاص مانعة لدخول الحشرات وذلك بمعدل 5 حشرات لكل نبات. تركت الحشرات على النباتات السليمة لمدة 24 ساعة قبل أن ترش بمبيد حشري متخصص بحشرات المنّ هو بيريمور (Pirimicarb) وبمعدل 0.5 غ مادة تجارية/ليتر لقتل جميع حشرات المنّ. فحصت النباتات المعداة مصلياً بعد أربعة أسابيع من العدوى باختبار بصمة النسيج النباتي للكشف عن فيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1.

4. المدى العائلي

تمت دراسة المدى العائلي لفيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 على أهم المحاصيل الاقتصادية البقولية الغذائية (العدس، الفول، الحمص والبازلاء)، وأهم المحاصيل البقولية العلفية في سورية وهي: الفصة/الجت (.*Medicago sativa* L)، (.*Medicago arabica* (L Huds.، البرسيم تحت الأرضي (.*Trifolium subterraneum* L)، البرسيم الأبيض (.*Trifolium repens* L)، البيقية (.*Vicia sativa* L)، البيقية النربونية (.*Vicia narbonensis* L) وبازلاء الزهور/ الجلبان العطري (.*Lathyrus odoratus* L). تم إعداء جميع هذه الأنواع النباتية ميكانيكياً بالعزلة الفيروسية SL243-95، ثم فحصت بعد أربعة أسابيع من العدوى باستخدام اختبار بصمة النسيج النباتي للكشف عن وجود فيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1.

5. عزل الفيروس وإنتاج مصل مضاد له وتقدير فعاليته

تم تنقية فيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 من المجموع الخضري لنباتات بازلاء معداة اصطناعياً بالعزلة SL243-95. حصدت النباتات المعداة بعد 20-25 يوماً من الإعداء، وعزل الفيروس باتباع الطريقة الموصوفة من قبل Mahmood و Peters (25) مع بعض التعديلات. وتتلخص تلك التعديلات بما يلي: (أ) بعد تركيز الفيروس بإضافة 6% من مادة polyethylene glycol (PEG) تم تركيز الفيروس مرة أخرى وذلك بوضع الرائق على طبقة من محلول سكري (سكروز) بتركيز 20% وبحيث تكون طبقة السكروز مساوية لطبقة الرائق الحاوي على الفيروس، ثم أخضع بعدها لعملية طرد مركزي بسرعة 60,000 دورة بالدقيقة ولمدة 90 دقيقة وباستخدام جهاز الطرد المركزي من النوع Beckman والرأس الدوار TY65، وذلك بقصد تمرير الفيروس عبر طبقة السكروز ومن ثم ترسيبه للتخلص من بعض المواد التي تبقى عالقة في طبقة السكر، ومن ثم أخذ الراسب. (ب) ذوب الراسب الحاوي على الفيروس بمحلول منظم من خلات الصوديوم عياريته 0.15 ودرجة حموضته 6.1 وترك عند درجة حرارة 4 °س لمدة ساعتين مع التحريك، ثم وضع المستخلص النهائي على أنبوب ذو تراكيز متدرجة من السكروز، بلغت من القمة إلى القاعدة 10-50% (ذوب السكروز بمحلول منظم من خلات الصوديوم)، ثم أجري طرد مركزي بسرعة 37,000 دورة بالدقيقة ولمدة ساعتين وباستخدام جهاز الطرد المركزي من النوع Beckman والرأس الدوار SW41.

تم فصل منطقة الفيروس النقي المتكون باستخدام جهاز الفصل (ISCO density gradient fractionator) عند موجة بطول 254 نانومتراً. وتمت مقارنة الأنبوب الحاوي على مستخلص النبات المصاب مع الأنبوب الحاوي على مستخلص النبات السليم. تم تحديد تركيز الفيروس النقي المتحصل عليه عن طريق قراءة المستخلص النهائي عند الموجة 260 نانومتراً، ثم حفظ الفيروس النقي عند درجة حرارة -20 °س لحين حقنه بالأرنب.

تم إنتاج المصل المضاد ضد العزلة SL243-95 وذلك بحقن أرنب أبيض (من النوع النيوزيلاندي) سبع حقنات بالعضل وبفاصل أسبوع بين الحقنة والأخرى. احتوت كل حقنة على

0.5 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 حقنتان داعمتان بعد أربعة وسبعة أسابيع من الحقنة السابعة. أخذ المصل المضاد من الأرنب بعد أسبوع من الحقنة السابعة عن طريق جمع دمه من خلال نزف أذنه أسبوعياً وبمعدل 35-40 مل في كل مرة ولمدة عشرة أسابيع. وضع الدم مباشرة في البراد عند درجة حرارة 4 °س لمدة 12 ساعة لتخثيره ثم أخضع لطرد مركزي لفصل المصل المحتوي على الأجسام المضادة.

ولدراسة كفاءة المصل المضاد المتحصل عليه تم استخدام اختبار بصمة النسيج النباتي، حيث تم تحضير تخفيفات مختلفة من المصل المضاد تدرجت من 1:500 حتى 1: 2048 × 10^3 وذلك لسحبات الدم الثمانية الأولى. استعمل في الاختبار نبات بازلاء مصاب واحد مقارنة بنبات سليم واحد أيضاً.

5. تقدير حجم الغلاف البروتيني للفيروس بواسطة اختبار وصمة وسترن (Western blot)

لتقدير حجم الغلاف البروتيني للفيروس، تم فصل البروتينات بالرحلان الكهربائي باستخدام هلام البولي أكريلاميد (SDS-PAGE) (17) تبعه اختبار وصمة وسترن (Western blot). حيث تم سحق النباتات بالسائل الآزوتي ومن ثم طحنت بمحلول منظم Laemmli، ثم أخضعت لطرد مركزي 14,000 دورة بالدقيقة لمدة 5 دقائق؛ جمع الرائق بعدها حيث تم غليه لمدة 5 دقائق. عرض بعدها المستحضر للرحلان الكهربائي وباستخدام الهلام تركيز 12%. بعد عملية الرحلان الكهربائي تم نقل البروتينات المفصولة إلى أغشية النيتروسيليلوز (ذات ثقوب 0.45 ميكروميتر) عن طريق الرحلان الكهربائي الأفقي باستخدام تيار شدته 100 فولت ولمدة ساعة وباستعمال الخلية Electroblotting in a mini-transfer-blot system (Sigma B2157)، ومن ثم فحصت أغشية النيتروسيليلوز باختبار Western blot وباستعمال المصل المضاد E154 طبقاً للطريقة الموصوفة من قبل قمري وآخرون (16).

6. تقويم فقد الغلة واختبارات الانتقال بالبذور

أجريت تجربة حقلية خلال الموسم الزراعي 2000/1999 في محطة ايكاردا، حلب، سورية لدراسة تأثير فيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 في إنتاجية 6 مدخلات وراثية من العدس هي: ILL 4000، ILL 5714، ILL 6031، ILL 7700، ILL 7706 و ILL 7521؛ وصنفين من البازلاء هما: الصنف المحلي السوري وصنف Kleine Rheinlanderin. صممت التجربة بتصميم القطاعات العشوائية الكاملة، وبثلاثة مكررات. وكانت القطعة التجريبية مؤلفة من أربعة خطوط طول كل منها 1.5 متراً، والمسافة بين الخطوط 30 سم وبين النباتات 5 سم. تم إعداء النباتات بالفيروس في طور ما قبل الإزهار بواسطة حشرات منّ البازلاء الأخضر وباستخدام العزلة الفيروسية SL243-95. رشت التجربة أسبوعياً وبشكل دوري بمبيد حشري (Supracide) لتقليل فعالية الحشرات. حصدت القطع التجريبية عند مرحلة النضج، وأخذت أوزان البذور بعد جفافها، وقدرت نسبة الفقد بالغلة مقارنة مع الشاهد السليم.

استخدمت نباتات تجربة تقويم الفقد في الغلة السابقة لدراسة مدى انتقال فيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 في البذور، حيث استعملت البذور الناتجة من نباتات مصابة بالفيروس، وقد تم فحص 1000 بذرة من كل صنف. زرعت البذور ضمن صواني خاصة لتنبيت البذور ووضعت تحت ظروف البيت الزجاجي عند درجة حرارة 20-25°س. وبعد إنبات البذور أخذت البادرات (البذور المنبتة) ووضعت ضمن مجموعات شملت كل منها 20 بادرة، وتم فحصها باختبار بصمة النسيج النباتي للكشف عن فيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1.

النتائج والمناقشة

1. المسح الحقلي

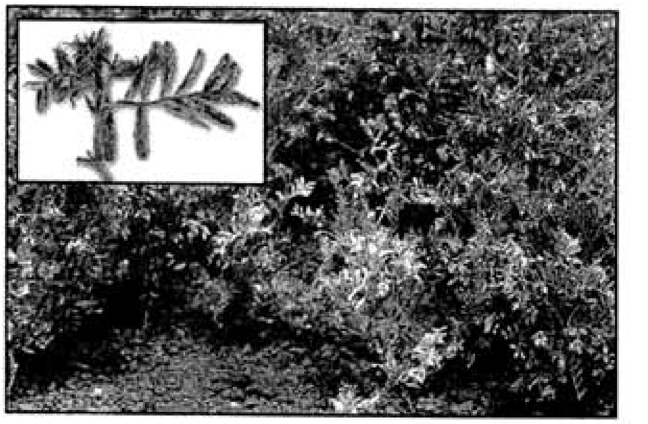
بينت الاختبارات المصلية/السيرولوجية (اختبار بصمة النسيج النباتي) لـ 789 عينة عدس و 1211 عينة مجموعة من محاصيل بقولية علفية مختلفة كانت تحمل أعراضاً توحي بإصابة فيروسية أن حوالي 50% من عينات العدس المفحوصة و60% من عينات المحاصيل البقولية العلفية المرافقة لزراعة العدس كانت مصابة بفيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 (جدول 1). وجدت أعلى نسبة لوجود فيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 في العينات المفحوصة في البازلاء والجلبان حيث وصلت نسبة وجود الفيروس فيهما 89.5 و 71.1%، على التوالي. والجدير ذكره هنا أن نسبة الإصابة بالفيروس في الموسم الزراعي 2001/2000 قد بلغت مستوى وبائياً في بعض حقول العدس، البازلاء والجلبان في المنطقة الشمالية من سورية ووصلت إلى أكثر من 50%. كما تم الكشف عن هذا الفيروس على نباتات الحمص ولم تذكر النتائج على هذا المحصول لقلة عدد العينات المجموعة. ويمكن أن يرجع هذا الانتشار الكبير للفيروس في موسم 2001/2000 إلى الظروف الجوية السائدة، حيث وصلت كمية الأمطار إلى حوالي 400 مم في المنطقة الشمالية بالإضافة إلى أن درجات الحرارة كانت أعلى من معدلاتها الطبيعية، مما زاد من نشاط حشرات المنّ وبالتالي فعاليتها في نشر الفيروسات حيث أنه من المعروف أن معظم عزلات فيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 تنتقل في الطبيعة بحشرات المنّ (9). وقد تمثلت أعراض فيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 على العدس باختزال في النمو والتفاف للأوراق كان مترافقاً مع تبرقش الأوراق وذبول القمم أو موتها (شكل 1). وفي هذه الدراسة تم تسجيل فيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 لأول مرة على محصولي الحمص والجلبان في سورية، وربما على محصول الحمص في منطقة غرب آسيا، وقد تم نشر هذا التسجيل في دراسة منفصلة

(24)، حيث تم التعرف على الفيروس بواسطة المجهر الالكتروني، الاختبارات السيرولوجية، تحديد الوزن الجزيئي للغلاف البروتيني، اختبار Western blot والنقل الحشري.

جدول 1. الكشف المصلي/ السيرولوجي عن وجود فيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 (PEMV-1) في عينات العدس وبعض الأنواع البقولية العلفية والمجموعة من عدة مناطق في سورية خلال الفترة ما بين 1997-2001 وكانت تظهر أعراض توحي بإصابة فيروسية.

Table 1. Serological detection of *Pea enation mosaic virus-1* (PEMV-1) in lentil and different forage legumes samples showing virus-like symptoms collected from different regions of Syria during 1997-2001.

نسبة الإصابة بالفيروس Infection with PEMV (%)	عدد العينات المصابة بالفيروس No. of samples infected with PEMV-1	عدد العينات المفحوصة No. of samples tested	المحصول البقولي Legume crop
52.6	515	789	العدس (*Lens culinaris* Medik.)
49.4	239	484	*Medicago* sp.
68.5	61	89	*Trifolium* sp.
71.1	96	135	*Lathyrus* sp.
89.5	94	105	*Pisum* sp.
58.4	187	320	*Vicia sativa* L.
62.8	49	78	*Vicia ervilia* (L.) Willd.



شكل 1. أعراض فيروس موزاييك وزاوئد البازلاء-1 في حقل عدس قرب مدينة درعا، سورية.

Figure 1. Field symptoms of *Pea enation mosaic virus-1* infection on lentil plants near Dara'a, Syria.

وقد توافقت نتائج هذه الدراسة مع نتائج دراسات أخرى، كانت قد ذكرت أن بعض الأنواع العلفية البقولية التابعة لأجناس *Medicago* sp.، *Trifolium* sp.، *Lathyrus* sp. و *Vicia* sp. تصاب طبيعياً بفيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 (4، 26، 27). ولم تشر هذه المراجع إلى أن فيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 تمت ملاحظته طبيعياً على النوع *Vicia ervilia* (L.) Willd.، مما يعتقد بأن هذا هو أول تسجيل لهذا الفيروس على النوع *Vicia ervilia* في سورية وربما في العالم.

2. دراسة كفاءة النقل الحشري

عند تقويم كفاءة ثلاثة أنواع من حشرات المنّ في نقل فيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1، وجد أن أكثر أنواع المنّ كفاءة في نقل الفيروس كان منّ البازلاء الأخضر (80%)، تلاه منّ الدراق الأخضر (43%)، في حين لم يستطع منّ الفول نقل هذا الفيروس. وقد توافقت نتائج هذه الدراسة مع نتائج دراسات عديدة (2، 3، 5، 14، 29)، وقد ذكرت دراسة تمت في إنكلترا أن منّ الدراق الأخضر ومنّ البازلاء الأخضر ينقلا فيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 بنسبة 85%، في حين أن منّ الفول لا ينقله (3)، وهي نتيجة مماثلة لنتائج هذا البحث من حيث كفاءة منّ البازلاء الأخضر ولكن مختلفة في نسبة كفاءة منّ الدراق الأخضر، حيث كان منّ الدراق الأخضر أقل كفاءة في نقل العزلة السورية، ويمكن أن يعود هذا إلى اختلاف في العزلات الفيروسية. ولم تتفق الكثير من الدراسات على النوع الأكثر كفاءة في نقل فيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1، ولكن يعتقد بأن منّ البازلاء الأخضر هو أكثر الأنواع كفاءة وأكثرها انتشاراً في الطبيعية. ويمكن أن يعزى الانتشار الوبائي لفيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 في الطبيعية إلى زيادة تكاثر ونشاط منّ البازلاء الأخضر، حيث تمت ملاحظته في حقول العدس والبازلاء بشكل كبير في موسم 2000/ 2001.

3. المدى العائلي

عند دراسة المدى العائلي لفيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 على أهم المحاصيل البقولية الغذائية والعلفية في سورية، بينت النتائج أن هذا الفيروس يصيب معظم هذه المحاصيل. يبين جدول 2 المحاصيل القابلة للإصابة بفيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1. وقد اختلفت الأعراض من محصول لآخر وتراوحت ما بين تبرقش مع تقزم (العدس)، تبرقش مع ظهور زوائد (البازلاء والفول)، وصغر حجم الأوراق (البيقية النربونية) (شكل 2). وقد تطابقت نتائج المدى العائلي لهذه الدراسة مع نتائج دراسات سابقة من حيث قابلية الأنواع المختبرة للإصابة بفيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 (4، 7، 26).

جدول 2. أهم المحاصيل البقولية الغذائية والعلفية التي وجدت حساسة للإصابة بفيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1.

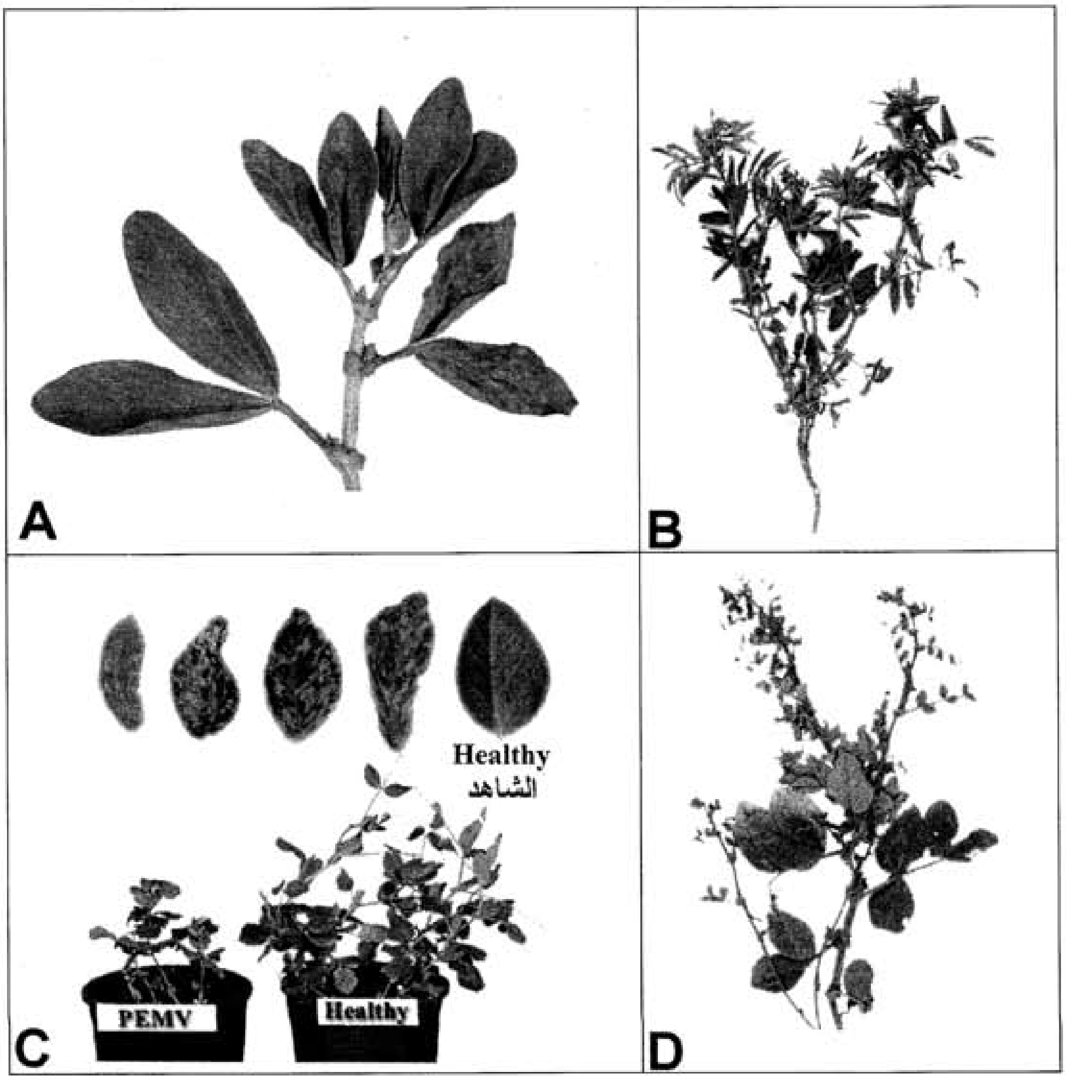
Table 2. The most important food and forage legume species found to be susceptible to *Pea enation mosaic virus-1* infection.

المحاصيل البقولية العلفية Forage legumes	المحاصيل البقولية الغذائية Food legumes
- القصة/ الجت (*Medicago sativa* L.)	- الفول (*Vicia faba* L.)
- *Medicago arabica* (L.) Huds.	- العدس (*Lens culinaris* Medik.)
- البرسيم تحت الأرضي (*Trifolium subterraneum* L.)	- الحمص (*Cicer arietinum* L.)
- البرسيم الأبيض (*Trifolium repens* L.)	- البازلاء (*Pisum sativum* L.)
- البيقية (*Vicia sativa* L.)	
- البيقية النربونية (*Vicia narbonensis* L.)	
- بازلاء الزهور/ الجلبان العطري (*Lathyrus odoratus* L.)	

4. تنقية الفيروس وإنتاج مصل مضاد له

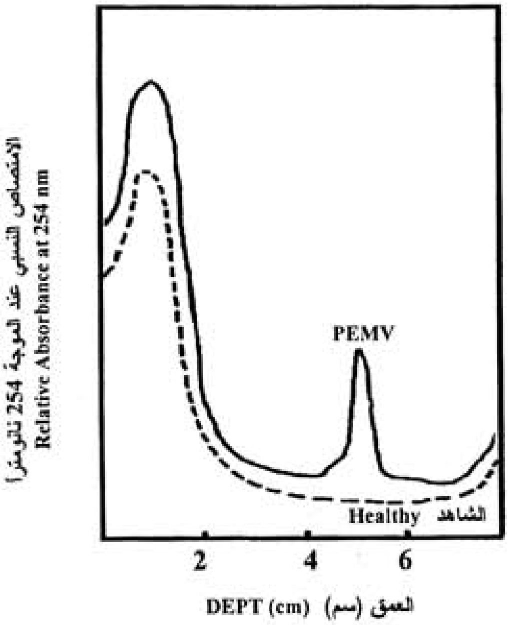
عند تعريض المادة الفيروسية النقية جزئياً للطرد المركزي، بعد وضعها على الأنبوب ذي التراكيز المتدرجة من السكروز، وبمقارنة نمط الامتصاص النسبي للأشعة فوق البنفسجية (254 نانومتراً) للأنبوب الحاوي على مستخلص النباتات المصابة مع ذاك الحاوي على مستخلص النباتات السليمة، لوحظ وجود طبقة (band) واحدة فقط في الأنبوب الذي يحتوي على مستخلص النباتات المصابة، تم فصلها بجهاز الفصل عند الموجة 254 نانومتراً (شكل 3). تم التأكد من وجود الفيروس النقي بواسطة اختبار Dot-blot (21) وباستعمال المصل المضاد E154، كما استعمل جزء منها لاعداء نباتات بازلاء فأعطت نتائج إيجابية بعد 20 يوماً من الإعداء. حسبت نسبة مقدار امتصاص المادة الفيروسية النقية للأشعة فوق البنفسجية عند الموجتين 260 و 280 فكانت 1.69 وهي نسبة قريبة جداً من تلك المعروفة عن هذا الفيروس والتي تبلغ 1.63 (30). وقد أمكن الحصول على 1-2 مغ من الفيروس النقي لكل كيلو غرام من الأنسجة المصابة، وهي أعلى بعدة أضعاف من الكميات المتحصل عليها في دراسات سابقة والتي لم تتجاوز 0.1-0.3 مغ/ كغ نباتات مصابة (11، 30). وقد يعود السبب في هذا الاختلاف إلى طريقة عزل الفيروس أو إلى العزلة الفيروسية المستخدمة.

وعند دراسة فعالية المصل المنتج باختبار بصمة النسيج النباتي، وجد بأن المصل المنتج ذو نوعية جيدة واستطاع الكشف عن الفيروس بحساسية عالية وكانت الفروقات بين النبات المصاب والنبات السليم كبيرة. كما استطاع هذا المصل عند تخفيفه حتى 2,048,000:1 (سحبة الدم الخامسة) أن يكشف عن فيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 (شكل 4). ويعود سبب زيادة فعالية سحبة الدم الخامسة إلى الحقنة الداعمة التي أعطيت للأرنب قبلها بأسبوع.



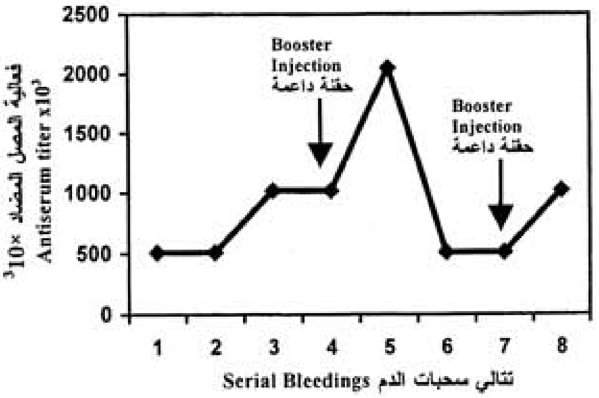
شكل 2. أعراض فيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 على نباتات الفول (A)، العدس (B)، البازلاء (C) والبيقية النربونية (*Vicia narbonensi* L) (D).

Figure 2. Symptoms of *Pea enation mosaic virus-1* infection on faba bean (A), lentil (B), pea (C) and *Vicia narbonensis* L. (D).



شكل 3. نمط الامتصاص النسبي للأشعة فوق البنفسجية (عند الموجة 254 نانومترا) للمادة الفيروسية المستخلصة من نباتات بازلاء مصابة بفيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 والتي تم طردها مركزيا في أنابيب سكر متدرجة التركيز عند 37,000 دورة بالدقيقة ولمدة ساعتين.

Figure 3. UV (254 nm) absorption profiles of purified virus preparation obtained from peas infected with *Pea enation mosaic virus-1* (PEMV-1) after centrifugation on sucrose gradients at 37,000 rpm for 2 hrs.

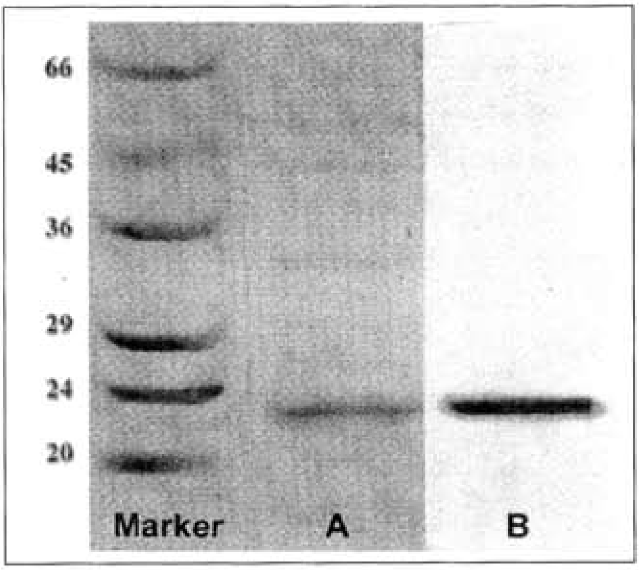


شكل 4. فعالية المصل المضاد لسحبات الدم المختلفة لأرنب محقون بفيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1.

Figure 4. Antiserum titer of different bleedings from a rabbit immunized with purified *Pea enation mosaic virus-1* (PEMV-1).

5. تقدير الوزن الجزيئي للغلاف البروتيني للفيروس بواسطة اختبار وصمة وسترن (Western blot)

عند فصل بروتينات النباتات المصابة بفيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 مقارنة مع النباتات السليمة بالرحلان الكهربائي بواسطة هلام البولي أكريلاميد، وجد بأن هناك بروتين موجود في النباتات المصابة ولكنه غير موجود في النباتات السليمة وزنه الجزيئي حوالي 22 كيلو دالتون. وعندما تم نقل البروتينات المفصولة من الهلام إلى أغشية النيتروسيليلوز ومن ثم فحصها باختبار وصمة وسترن وباستخدام المصل المضاد E154، تفاعل البروتين الذي وزنه الجزيئي 22 كيلو دالتون بقوة (شكل 5)، ويعتقد بأن هذا البروتين هو عبارة عن الغلاف البروتيني للفيروس، وهذا يتوافق مع دراسات سابقة أشارت إلى أن الوزن الجزيئي للغلاف البروتين لفيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 هو 22 كيلو دالتون (30).



شكل 5. حجم الغلاف البروتيني لفيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 (PEMV) المفصول بواسطة الرحلان الكهربائي وباستخدام هلام البولي أكريلاميد (SDS-PAGE) (A) والمفحوص بواسطة اختبار وصمة وسترن (Western blot) بعد نقله من الهلام إلى أغشية النيتروسيلليلوز (B) باستعمال مصل مضاد لفيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1. الأرقام الموجودة على اليسار تمثل الوزن الجزيئي للشاهد (بالكيلو دالتون).

Figure 5. Determination of capsid protein molecular weight of the *Pea enation mosaic virus*-1 (PEMV-1) by using SDS-PAGE (A) followed by western blot on a nitrocellulose membrane (B) treated with a PEMV-1 antiserum. The numbers to the left are molecular weight marker (in kDa).

6. تقويم فقد الغلة واختبارات الانتقال بالبذور

أدت إصابة مدخلات وراثية من العدس وأصناف البازلاء بفيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 في طور ما قبل الأزهار إلى فقد بالغلة وقد اختلف هذا الفقد من صنف لآخر وكان المدخل الوراثي ILL 6031 أشد المدخلات تأثراً حيث بلغت نسبة الفقد في إنتاجه 50%، في حين كان المدخل الوراثي ILL 7706 أقل المدخلات الوراثية تأثراً، حيث لم تتجاوز نسبة الفقد في إنتاجه 16% (جدول 3). وهذه الخسارة المحتملة ليس من السهل على المزارع معرفة العامل المسبب لها، وذلك لكون أعراض الإصابة الفيروسية في بعض الأحيان غير واضحة على نباتات العدس نظراً لصغر أوراقه.

جدول 3. إنتاجية مدخلات وراثية من العدس وأصناف من البازلاء في تجربة الإعداء الاصطناعي بفيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 خلال الموسم الزراعي 1999/2000.

Table 3. Seed yields of different lentil and pea genotypes in experimental plots inoculated with *Pea enation mosaic virus-1* (PEMV-1) during the growing season 1999/2000.

المدخلات الوراثية/ الأصناف Genotypes	إنتاج البذور (غرام/م²) Seed Yield (gram/m²) السليم Healthy	المصاب بالفيروس Infected with PEMV-1	نسبة النقص في الغلة Yield loss (%)
المدخلات الوراثية للعدس Lentil Genotypes			
ILL 4400	98.9	* 59.4	39.9
ILL 5714	70.6	56.1	20.5
ILL 6031	33.3	* 16.7	50.0
ILL 7521	66.1	* 48.9	26.1
ILL 7700	62.8	51.1	18.6
ILL 7706	55.6	46.7	16.0
أصناف البازلاء Pea Genotypes			
الصنف المحلي السوري "Syrian Local"	113.3	* 72.8	35.8
Kleine Rheinlanderin	38.3	28.9	24.6

* الاختلافات معنوية مقارنة بالشاهد السليم عند مستوى احتمال 0.05.

* Significantly different from healthy control at P= 0.05.

تم فحص 1000 بذرة منبتة (بادرة) سيرولوجياً من كل من المدخلات الوراثية للعدس الستة وصنفي البازلاء المعداة بفيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1، فأظهرت النتائج السيرولوجية أن فيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 لا ينتقل في بذور العدس أو البازلاء، مع العلم بأن دراسات سابقة ذكرت أن فيروس موزاييك وزوائد البازلاء ينتقل ببذور البازلاء وبنسبة لا تتعدى 1.5% (30)، ويمكن أن يعود السبب في هذا الاختلاف إلى العزلة الفيروسية المستخدمة في هذه الدراسة. ومن النتائج التي عرضت أعلاه يتضح بأن العزلة السورية لفيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1 المدروسة في هذا البحث لا تنتقل بواسطة بذور العدس أو البازلاء.

تشير الملاحظات الحقلية إلى أن هذا الفيروس يشكل مشكلة حقيقية في حقول العدس والبازلاء في سورية، ولهذا فإن الإصابات الشديدة الموجودة في الطبيعية عائدة إلى النشاط الحشري بالدرجة الأولى، كما أن الأعشاب المرافقة للمحصول تسهم بدور في الحفاظ على مصدر العدوى، وعليه فإن توجيه الاهتمام نحو إدارة مجتمعات الحشرات الناقلة والحد من الأعشاب المرافقة للمحصول هما الإجراءان الأوليان للتقليل من الإصابة بهذا الفيروس. كما يجب توجيه الدراسات اللاحقة إلى انتخاب أصناف مقاومة لهذا الفيروس وللعزلات المحلية وبخاصة أن هناك دراسات عديدة حول هذا الموضوع، وقد نجح جزء منها في إيجاد أصناف مقاومة لهذا الفيروس، فقد قام باحثون في روسيا بدراسة مدى مقاومة 500 صنف بازلاء لفيروس موزاييك وزوائد البازلاء-1، فوجدوا بأن هناك ثلاثة أصناف شديدة المقاومة، 9 أصناف مقاومة و 17 صنفاً متوسط المقاومة (28). كما قام فريق آخر في أمريكا بدراسة مدى مقاومة 29 صنفاً من العدس لهذا الفيروس فوجدوا بأن هناك صنفين متحملين فقط لهذا الفيروس (الأول مصدره الهند والثاني من إيران) (1).

Abstract

Kumari, S.G., K. M. Makkouk and B. Bayaa. 2001. ***Pea Enation Mosaic Virus-1*** **Infecting Lentil in Syria, and Further Information on its Host Range, Purification, Serology and Transmission Characteristics. Arab J. Pl. Prot. 19: 65-72.**

A virus disease of lentil, characterized by rolling and mottling of leaves with tip wilting or necrosis and stunted growth, was observed in lentil fields in southern Syria since 1994. Disease incidence was relatively high, almost annually, in lentil fields in Dara'a Governorate. Transmission tests showed that the disease agent can be transmitted mechanically from lentil to lentil, pea and faba bean plants and by aphids (*Acyrthosiphon pisum* Harris and *Myzus persicae* Sulzer) in a persistent manner. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis followed by Western blot showed that the virus capsid protein size was 22 kDa. Serological data, using tissue-blot immunoassay (TBIA) and Western-blot indicated that the virus is serologically similar to *Pea enation mosaic virus*-1 (PEMV-1, genus *Enamovirus*, family *Luteoviridae*). On the basis of host range, symptoms, transmission characteristics and serology, the virus was identified as PEMV-1. The virus was purified from systemically infected peas and yielded 1-2 mg of purified virus per one Kilogram of infected tissue. Surveys conducted during 1997-2001 showed that PEMV-1 was widely distributed in the major lentil-growing areas of Syria, with virus incidence reaching more than 50% in some locations. Results revealed that infection with PEMV-1 caused yield losses in all lentil and pea genotypes. However, the extent of yield losses varied from 16% in ILL 7706 to 50% in ILL 6031.

Key words: *Pea enation mosaic virus-1*, lentil, Syria.

Corresponding author: *Safaa G. Kumari, Virology Laboratory, Germplasm Program, ICARDA, P.O. Box 5466, Aleppo, Syria, e-mail <S.KUMARI@cgiar.org>.*

References

المراجع

1. **Aydin, H., F.J. Muehlbauer and W.J. Kaiser.** 1987. Pea eantion mosaic virus resistance in lentil (*Lens culinaris*). Plant Disease, 71:635-638.
2. **Bath, J.E. and R.K. Chapman.** 1966. Efficiency of three aphid species in the transmission of pea enation mosaic virus. J. Econ. Entomol., 59:631-634.
3. **Cockbain, A.J. and C.L. Costa.** 1973. Comparative transmission of bean leaf roll and pea enation mosaic viruses by aphids. Annals of Applied Biology, 73: 167-176.
4. **Cockbain, A.J. and A.J. Gibbs.** 1973. Host range and overwintering sources of bean leaf roll and pea enation mosaic virus in England. Annals of Applied Biology, 73: 177-187.

5. **Cockbain, A.J., P. Jones and R.D. Wood.** 1986. Transmission characteristics and some other properties of bean yellow vein-banding virus, and its association with pea enation mosaic virus. Annals of Applied Biology, 108:59-69.
6. **FAO.** 2000. Food Agriculture Organization of the United Nations, "Statistical Databases" <http://apps.fao.org//>.
7. **Hagedorn, D.J.** 1957. Host range and inoculation studies on pea enation mosaic virus. Phytopathology, 47:14.
8. **Hagedorn, D.J.** 1996. Pea enation mosaic enamovirus: Ecology and Control, pp. 345-356. In: The Plant Viruses, volume 5: Polyhedral Virions and Bipartite RNA Genomes. B.D. Harrison and A.F. Murant (Editors). Plenum Press, New York.
9. **Hampton, R.O.** 1984. Pea enation mosaic virus. In: Compendium of Pea Diseases, pp. 32-33. D.J. Hagedorn, ed. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
10. **Hassan, H.T., K.M. Makkouk, A.A. Haj Kassem.** 1999. Viral diseases on cultivated legume crops in Al-Ghab Plain, Syria. Arab Journal of Plant Protection, 17(1):17-21.
11. **Izadpanak, K. and J. Shepherd.** 1966. Purification and properties of pea enation mosaic virus. Virology, 28:463-476.
12. **Kaiser, W.J., G.M. Mossahebi and M. Okhovat.** 1971. Alternate hosts of viruses affecting food legumes in Iran. Iranian J. Pl. Path., 7: 25
13. **Katul, L., H. J. Vetten, E. Maiss, K. M. Makkouk, D. E. Lesemann and R. Casper.** 1993. Characteristics and serology of virus-like particles associated with faba bean necrotic yellows. Annals of Applied Biology, 123:629-647.
14. **Kennedy, J.S., M.F. Day and V.F. Eastop.** 1962. A conspectus of aphids as vectors of plant viruses. Commonwealth Institute of Entomology, London.
15. **Klein, R.E., R.C. Larsen and W.J. Kaiser.** 1991. Virus epidemic of grain legumes in Eastern Washington. Plant Disease, 75: 1186.
16. **Kumari, S.G., K.M. Makkouk, L. Katul and H.J. Vetten.** 2001. Polyclonal Antibodies to the Bacterially Expressed Coat Protein of *Faba Bean Necrotic Yellows Virus*. Journal of Phytopathology, 149:543-550.
17. **Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, London, 227:680-685.
18. **Makkouk, K.M. and S.G. Kumari.** 1996. Detection of ten viruses by the tissue-blot immunoassay (TBIA). Arab Journal of Plant Protection ,14: 3-9.
19. **Makkouk, K. M., L. Bos, O.I. Azzam, S. Kumari and A. Rizkallah.** 1988. Survey of viruses affecting faba bean in six Arab countries. Arab Journal of Plant Protection, 6: 53-61.
20. **Makkouk, K. M., S. G. Kumari and R. Al-Daoud.** 1992. Survey of viruses affecting lentil (*Lens culinaris*) in Syria. Phytopathologia Mediterranea, 31:188-190.
21. **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
22. **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. Phytopathologia Mediterranea, 36:135-144
23. **Makkouk, K.M., S.G. Kumari and B. Bayaa.** 1999. First report of pea enation mosaic virus affecting lentil (*Lens culinaris* Medik.) in Syria. Plant Disease, 83(3):303.
24. **Makkouk, K.M., S.G. Kumari and D.-E. Lesemann.** 2001. First Record of *Pea Enation Mosaic Virus* Naturally Infecting Chickpea and Grasspea Crops in Syria. Plant Disease, 85(9): 1032.
25. **Mahmood, K. and D. Peters.** 1973. Purification of pea enation mosaic virus and the infectivity of its components. Neth. J. Pl. Path., 79: 138-147.
26. **McEwen, F.L. and W.T. Schroeder.** 1956. Host range studies on pea eantion mosaic virus. Plant Disease Reptr. 40: 11.
27. **McWhorter, F.P. and W.C. Cook.** 1958. The hosts and strains of pea enation mosaic virus. Plant Disease Reptr. 42:51-60.
28. **Muntyanu, S.K., T.D. Verderevskaya, V.V. Rozhkovan, E.G. Vetrova and A.I. Vereshchaka.** 1985. Evaluation of pea varieties for susceptibility to pea enation mosaic virus. Nauchnoteknicheski Byulletin Vsesoyuznogo Selektsionno-geneticheskogo Instituta, 4: 57 (in Russian).
29. **Nault, L.R.** 1975. Tests for transmission of pea enation mosaic virus by oligophagous mustard and grain aphids. Phytopathology, 65:496.
30. **Peters, D.** 1982. Pea enation mosaic virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, Commonweath Agricultural Bureaux/Association of Applied Biologists, No. 257
31. **Vovlas, C. and G. L. Rana.** 1972. Le virose delle piante ortensi in Puglia. VII. *Lens esculenta* Moench., Ospite naturale del virus del mosaico con enasioni del pisello. Phytopathologia Mediterranea, 11: 97-102.