

وجود فيروسات البطاطس/البطاطا في مناطق الزراعات الرئيسية في السعودية

خالد عبد الله الهديب

قسم زراعة الأراضي القاحلة، كلية العلوم الزراعية والأغذية، جامعة الملك فيصل، الإحساء،
المملكة العربية السعودية، البريد الإلكتروني: kalhudaib@kfu.edu.sa

الملخص

الهديب، خالد عبد الله. 2018. وجود فيروسات البطاطس/البطاطا في مناطق الزراعات الرئيسية في السعودية. مجلة وقاية النبات العربية، (2)36: 114-122.

تعد البطاطس/البطاطا رابع محصول من حيث الأهمية الغذائية عالمياً بعد القمح والذرة والأرز. تزرع البطاطس/البطاطا في المملكة العربية السعودية، خلال السنة في موسمي الربيع والخريف، وتعد الفيروسات هي المسببات المرضية الأكثر تأثيراً في إنتاج البطاطس وأن أكثر الفيروسات انتشاراً على مستوى العالم على هذا المحصول هي فيروس التفاف أوراق البطاطس/البطاطا [Potato leaf roll virus (PLRV)، جنس *Polerovirus*، عائلة *Luteoviridae*]، فيروس البطاطس/البطاطا Y [Potato virus Y (PVY)، جنس *Potyvirus*، عائلة *Potyviridae*]، فيروس البطاطس/البطاطا M [Potato virus M (PVM)، جنس *Carlavirus*، عائلة *Potyviridae*]، فيروس البطاطس/البطاطا A [Potato virus A (PVA)، جنس *Potyvirus*، عائلة *Potyviridae*]، فيروس البطاطس/البطاطا S [Potato virus S (PVS)، جنس *Carlavirus*، عائلة *Flexiviridae*]، وفيروس البطاطس/البطاطا X [Potato virus X (PVX)، عائلة *Potexvirus*، عائلة *Flexiviridae*]. تم الكشف عن وجود الفيروسات في حقول البطاطس في ست مناطق زراعية هي الرياض، القصيم، تبوك، حائل، الجوف و حرض، حيث تم جمع 1524 عينة من هذه المناطق، ظهرت عليها أعراض الإصابة الفيروسية بما فيها التفاف الأوراق، والتبرقش، والتقرم، الاصفرار، تجعد الأوراق وموت العروق. فحصت العينات باستخدام إختبار الاليزا وكذلك اختبار تفاعل البوليمراز المتسلسل مع النسخ العكسي RT-PCR وقد كان فيروس PVY أكثر الفيروسات انتشاراً تلاه AMV ثم PLRV. أظهرت النتائج المتحصل عليها أن اختبار RT-PCR كان أكثر دقة وحساسية ويمكن ان يكشف الإصابة الفيروسية في التركيزات المنخفضة. كما تم استخدام هذا الإختبار بخطوة واحدة (One step RT-PCR) للكشف المتزامن عن فيروسات البطاطس/البطاطا.

كلمات مفتاحية: البطاطس/البطاطا، المملكة العربية السعودية، AMV، PLRV، PVX، PVY.

المقدمة

من شهر نيسان/أبريل وحتى نهاية أيار/مايو. وتزرع العروة الخريفية بتقاوي محلية بداية من شهر آب/أغسطس وحتى منتصف تشرين الأول/أكتوبر ويتم حصاد هذه العروة في تشرين الثاني/نوفمبر وحتى نهاية كانون الثاني/يناير. وقد بلغت مساحة اجمالي المناطق المنزرعة بمحصول البطاطس في عام 2016 17082 هكتار بانتاجية حوالي 440716 طن (Statistical Yearbook, 2016).

تصاب البطاطس، مثل معظم محاصيل الخضر التي تتكاثر خضرياً، بالعديد من الأمراض التي تقلل الانتاج منها الأمراض الفطرية والبكتيرية والفيروسية والنيماتودية. كذلك وجد العديد من الفيروسات والفيوتوبلازما التي تصيب البطاطس، وهناك أكثر من 40 فيروساً ممرضاً للبطاطس (Salazar, 1996). ولحسن الحظ فإن عدداً قليلاً من هذه الفيروسات ذات أهمية اقتصادية على الرغم من أن هذه الفيروسات غير المؤثرة اقتصادياً إلا انها تسبب خسائر فادحة في بعض الظروف. تعد

يعد محصول البطاطس/البطاطا من المحاصيل الاستراتيجية والتي تعد مصدراً اقتصادياً مهماً على مستوى العالم وهي مصدر للدخل في كثير من بلدان العالم. كما أنها تعد من المحاصيل المهمة داخل المملكة العربية السعودية والتي يعتمد عليها الكثير من عمليات التصنيع مثل تصنيع رقائق البطاطس. و تعد الأمراض الفيروسية بالإضافة إلى الأمراض الفطرية من أهم العوامل المحددة لإنتاج محصول البطاطس في الكثير من أنحاء العالم وهذا ينعكس على أهمية تطوير طرائق التشخيص المبكر للكشف عن هذه الأمراض.

تزرع البطاطس/البطاطا في السعودية خلال موسمي الربيع والخريف حيث يتم زراعة تقاوي البطاطس المستوردة في الفترة من أوائل كانون الثاني/يناير وحتى نهاية شباط/فبراير ويتم حصاد هذه العروة بداية

مختلفة شرق المملكة وقد تم تحليل النتائج النيوكليوتيدى لجين الغلاف البروتينى لهذه الفيروسات ومقارنته بغيرها من العزلات بينك الجينات (AI-Saikhan et al., 2014). تم سابقاً تعريف عزلتين من فيروس موزاييك AMV على البطاطس (AI-Saleh et al., 2014). هدفت هذه الدراسة إلى حصر فيروسات البطاطس/البطاطا في أهم مناطق زراعتها على مستوى المملكة وتطوير طرائق التشخيص الجزيئي للكشف عنها.

مواد البحث وطرقه

جمع العينات

تم حصر الأمراض الفيروسية التي تصيب البطاطس في المناطق التي تزرع محصول البطاطس بالمملكة (الرياض، القصيم، تبوك، حائل، الجوف، حرض). وقد تم زيارة العديد من الحقول في أوقات زراعة العروات المختلفة لمحصول البطاطس في ست مناطق مختلفة داخل المملكة وذلك بالتعاون مع وزارة البيئة والمياه والزراعة، وبعض شركات القطاع الخاص. وتم جمع 1524 عينة من البطاطس تحمل أعراض الإصابة بالفيروسات المختلفة تشمل تقزم وتشوه والتفاف أوراق واصفرار وشفافية العروق وغيرها من الأعراض المعروفة نتيجة الإصابات الفيروسية المختلفة (جدول 1).

إختبار الإليزا (ELISA)

تم عمل إختبار الإليزا باستخدام مجموعة البزا للكشف عن فيروسات AMV، PLRV، PVY و PVX وتم الحصول على هذه الكواشف من شركة Bioreba، سويسرا. وتم إختبار تلك الفيروسات بكواشف الإليزا حسب ما أوصت به الشركة المصنعة حيث تم حل الأجسام المضادة في محلول يتكون من كربونات صوديوم ونترات صوديوم وبيكربونات صوديوم بعد ذلك تم إضافة 200 ميكروليتر لكل فتحة من فتحات طبق الإليزا وتم تحضين الطبق لمدة 4 ساعات عند حرارة 30 °س. بعد ذلك تم غسل الطبق 5 مرات ثم أخذ حوالي واحد غرام من أوراق نباتات البطاطس ووضعت في أكياس بلاستيكية مغلقة بطبقة داخلية من الشاش مع إضافة 2 مل من محلول الطحن وتم طحنها بجهاز HOMEX 6 (من شركة BIOREBA، سويسرا). بعدها تم وضع 200 ميكروليتر من العينات المطحونة في كل فتحة بالإضافة إلى شاهد نبات سليم وشاهد موجب لكل فيروس وتم تحضين الأطباق في الثلجة عند حرارة 4 °س. وفي اليوم التالي، تم غسل الأطباق 5 مرات باستخدام محلول الغسيل ثم تم حل الجسم المضاد الثانوي المرتبط بإنزيم الفوسفاتيز وأضيف لكل فتحة في الطبق 200 ميكروليتر وتم تحضينه لمدة 5 ساعات عند درجة حرارة 30 °س في وعاء رطب، ثم تم غسل الطبق 5 مرات. بعد ذلك تم إضافة 200 ميكروليتر من محلول مادة التفاعل وهي عبارة عن محلول

الفيروسات من أخطر مسببات الأمراض على البطاطس (Ross, 1986) وأكثرها انتشاراً مثل فيروس التفاف أوراق البطاطس/البطاطا [Potato leaf roll virus (PLRV)، جنس Polerovirus، عائلة Potyviridae]، فيروس البطاطس/البطاطا Y [Potato virus Y (PVY)، جنس Potyviridae، عائلة Potyviridae]، فيروس البطاطس/البطاطا A [Potato virus A (PVA)، جنس Potyviridae]، فيروس البطاطس/البطاطا M [Potato virus M (PVM)، جنس Carlavirus، عائلة Flexiviridae]، فيروس البطاطس/البطاطا S [Potato virus S (PVS)، جنس Carlavirus، عائلة Flexiviridae]، وفيروس البطاطس/البطاطا X [Potato virus X (PVX)، عائلة Potexvirus، عائلة Flexiviridae] (Valkonen, 2007). كما أن فيروسات PLRV، PVY، PVX هي الأكثر شيوعاً (Lopez et al., 1994؛ Bawden et al., 2008؛ Warren et al., 2005؛ Salazar, 1996). كما أن فيروس موزاييك البرسيم [Alfalfa mosaic virus (AMV)، جنس Alfamovirus، عائلة Bromoviridae] يعد من الفيروسات واسعة الانتشار حيث أنه يصيب أكثر من 150 نوعاً من النباتات العشبية وحوالي 430 نوعاً من النباتات نوات الفلقين ويصيب معظم أنواع النباتات التي تنتمي إلى العائلة الباذنجانية والتي تنتمي إليها البطاطس/البطاطا (Jaspars & Bos, 1980). أما في المملكة العربية السعودية، فقد تم عمل حصر للفيروسات المصاحبة لأمراض البطاطس/البطاطا في شرق وجنوب المملكة باستخدام الإليزا وطريقة الانتشار المزدوج وتم اكتشاف فيروس موزاييك البرسيم وموزاييك الخيار [Cucumber mosaic virus (CMV)، جنس Cucumovirus، عائلة Bromoviridae] بالإضافة إلى فيروسات البطاطس/البطاطا Y، X، M، A وكذلك فيروس التفاف أوراق البطاطس/البطاطا، وفيروس التقزم الأصفر للبطاطس/البطاطا [Potato yellow dwarf virus (PYDV)، جنس Nucleorhabdovirus، عائلة Rhabdoviridae]، وفيروس موزاييك التبغ [Tobacco mosaic virus (TMV)، جنس Tobamovirus، عائلة Virgoviridae]، وفيروس التبغ الحلقي للتبغ [Tobacco ring spot virus (TRSV)، جنس Nepovirus، عائلة Comoviridae]، وفيروس تبغ وذبول الطماطم/البندورة [Tomato spotted wilt virus (TSWV)، جنس Tospovirus، عائلة Bunyaviridae] (AI-Shahwan & Abdalla, 2000). وفي دراسة أخرى تم تعريف ستة عزلات لفيروس PVY بمنطقة الرياض واستخدم في ذلك تفاعل الإليزا وكذلك المجهر الإلكتروني في تعريف تلك العزلات (Sabir, 2012). وتم حديثاً عزل فيروسات PVY، PVX و PLRV باستخدام بادئات متخصصة لجين الغلاف البروتيني من عينات بطاطس مصابة تم جمعها من مناطق

من مادة (para-nitrophenyl-phosphate (p-NPP)) والتي تعطي لوناً أصفر عند تفاعلها مع الانزيم لفترة نصف ساعة في الحضانة عند درجة حرارة 25 °س. وتم قياس شدة اللون على جهاز مقياس طيف خاص (Stat Fax 2100 Microplate Reader) مخصص لفحص الاطباق عند طول موجة 405 نانوميتر.

استخلاص الحمض النووي الريبي RNA

تم عزل الحمض النووي الريبي من نباتات البطاطس المصابة باستخدام مجموعة استخلاص (RNeasy Mini Kit) طبقاً للشركة المنتجة Qiagen وذلك كخطوة أساسية لفحص العينات باختبار تفاعل البوليمراز المتسلسل PCR. كما تم استخدام البادئات الخاصة بالفيروسات قيد الدراسة كما هو موضح في جدول 2.

تفاعل البوليمراز المتسلسل مع النسخ العكسي في خطوة واحدة (One step RT-PCR)

استخدم هذا التفاعل للكشف عن فيروسات البطاطس في المراحل الأولى من الإصابة لنباتات يشبه بإصابتها بفيروسات البطاطس وإعادة فحص العينات التي لم يتم التأكد من خلوها من الإصابة الفيروسية عن طريق اختبار الإليزا نظراً لتركيز الفيروس المنخفض. تم التفاعل باستخدام iScript One-Step qRT-PCR Kit، تم الحصول عليها من شركة Biomatik. وتم الكشف عن نتائج تفاعل RT-PCR بإضافة 5 ميكروليترات من ناتج التفاعل على هلام أجاروز 1% وباستخدام اسم DNA 100 bp من شركة Biomatik وتم تصوير الهلام تحت الأشعة فوق البنفسجية على جهاز Syngene Bio Imagins, IN Genius.

النتائج والمناقشة

اختبار الإليزا

من خلال الفحص باستخدام اختبار الإليزا (جدول 1) وجد أن أعلى نسبة للإصابة كانت في منطقة القصيم بفيروس PVY حيث بلغت 32.8% يليها فيروس AMV بنسبة 13.9% بينما كانت نسبة الإصابة بفيروس PLRV هي 6.9% ولم تظهر أي إصابة بفيروس PVX في جميع العينات المختبرة.

لوحظ من النتائج المتحصل عليها أن نسبة الإصابة الفيروسية بالبطاطس المحلية تراوحت ما بين 93.8% إلى 100% في معظم

الحقول المنزرعة بتقاوي (درنات) محلية في حين أن البطاطس المستوردة المنزرعة بمفردها كانت خالية من الإصابات. بينما ظهرت علي التقاوي المستوردة التي تم زراعتها بجوار التقاوي المحلية الأعراض وبأخذ عينات عشوائية تراوحت نسبة الإصابة من 12.5% وحتى 75% وظهرت إصابة مختلطة من فيروسات PLRV، PVY و AMV في الحقل رقم 2 بمنطقة الشحيحة كما ظهرت إصابة مركبة بفيروس PVY و AMV بالحقل رقم 3 والحقل رقم 5 بمنطقة الشحيحة ولم تظهر أي إصابات بفيروس PLRV بمنطقة البطين بينما ظهرت إصابة مختلطة بالحقلين رقم 7 و 4 كما هو موضح في جدول 1.

تم زيارة ثلاثة حقول 38، 39-A و 39-B تابعة لأحد الشركات الزراعية بمنطقة حرض وقد تم الكشف عن أربعة فيروسات للبطاطس باستخدام طريقة الـ ELISA ويظهر جدول 1 النتائج المتحصل عليها. بينت هذه النتائج خلو البطاطس المستوردة المنزرعة بالحقلين 39-B و 39-A من الإصابات بفيروسات PVY، PVX، PLRV و AMV، بينما أعطت 32 عينة من أصل 94 عينة تم فحصها من البطاطس المحلية بالحقل رقم 38 نتيجة إيجابية مع فيروس PVY وكذلك أعطت 28 عينة نتيجة إيجابية مع فيروس AMV.

أما في منطقة حائل فقد تم فحص 405 عينة بزراعات البطاطس (جدول 1) ولم تظهر أية إصابة فيروسية في الحقل رقم 1 المزروع بتقاوي مستوردة (Elite) بينما كانت التقاوي المحلية من الجيل الثالث (Third generation) مصابة بفيروس PVY بنسبة قدرها 93.3%. كذلك تم اكتشاف 27 عينة مصابة بفيروس PLRV بنسبة قدرها 60%، ووجدت إصابة مختلطة بفيروس PVY + AMV بالحقل رقم 2. وكان إجمالي نسبة الإصابة بفيروس PLRV 21.9%، وسجلت الإصابة بفيروس PVY نسبة قدرها 53.1% وكانت أقل نسبة 9.63% لفيروس AMV. تجدر الإشارة هنا بأن النسب المئوية المذكورة هنا هي نسبة العينات المصابة إلى العينات الكلية التي فحصت ولا يمثل نسبة الإصابة في الحقل.

يتبين من جدول 1 أنه لم تظهر أية إصابة بفيروس PLRV و PVX بمنطقة الرياض بينما بلغت نسبة الإصابة 56.9% بفيروس PVY وكانت نسبة الإصابة بفيروس AMV حوالي 17.4% من العينات التي فحصت، بينما أعطت كل العينات التي تم جمعها من منطقتي الجوف وتبوك نتائج سلبية (جدول 1).

جدول 1. عدد حقول البطاطس/البطاطا التي تم زيارتها في المناطق المختلفة من المملكة العربية السعودية وعدد العينات المختبرة باستخدام إختبار إليزا والنتائج الإيجابية والسلبية التي تم الحصول عليها.

Table 1. Number of fields visited in different locations in Saudi Arabia and potato samples collected and tested by ELISA with positive and negative results obtained.

نسبة الإصابة *(%) Infection rate (%)*	عدد العينات المصابة بأكثر من فيروس Number of samples with mixed infection	عدد العينات المصابة Total number of infected samples	عدد العينات المصابة بفيروس No. of samples infected with				عدد العينات المختبرة Number of samples tested	Field #	رقم الحقل Location	الموقع Location		
			AMV	PVX	PVY	PLRV						
			Qaseem region									
0.0	0	0	0	0	0	0	48	Field 1	حقل 1	Botain	بطين	
0.0	0	0	0	0	0	0	48	Field 2	حقل 2			
0.0	0	0	0	0	0	0	48	Field 3	حقل 3			
100.0	13	48	13	0	48	0	48	Field 4	حقل 4			
0.0	0	0	0	0	0	0	48	Field 5	حقل 5			
14.6	0	7	1	0	6	0	48	Field 6	حقل 6			
100.0	9	48	9	0	48	0	48	Field 7	حقل 7			
12.5	6	6	0	0	6	0	48	Field 1	حقل 1	Shehia	شحية	
100.0	40	48	20	0	48	40	48	Field 2	حقل 2			
100.0	0	48	12	0	36	0	48	Field 3	حقل 3			
12.5	0	6	0	0	6	0	48	Field 4	حقل 4			
93.8	25	45	25	0	45	0	48	Field 5	حقل 5			
44.4	97	256	80	0	243	40	576	12	Total	Total	المجموع	
			(13.9%)		(42.2%)	(6.9%)						
			Hard region									
0.0	0	0	0	0	0	0	47	Field 39-A	حقل 39 أ			
0.0	0	0	0	0	0	0	47	Field 39-B	حقل 39 ب			
63.9	0	60	28	0	32	0	94	Field 38	حقل 38			
31.9	0	60	28	0	32	0	188	3	Total	Total	المجموع	
			(14.9%)		(17.2%)							
			Hail Region									
0.0	0	0	0	0	0	0	45	Field 1	حقل 1			
93.3	22	42	2	0	42	27	45	Field 2	حقل 2			
100.0	11	54	12	0	52	15	54	Field 3	حقل 3			
100.0	9	30	10	0	28	0	30	Field 4	حقل 4			
100.0	6	30	7	0	26	13	30	Field 5	حقل 5			
26.7	0	8	0	0	8	0	30	Field 6	حقل 6			
73.3	5	22	3	0	17	6	30	Field 7	حقل 7			
57.1	2	12	0	0	9	3	21	Field 8	حقل 8			
86.7	3	26	2	0	25	4	30	Field 9	حقل 9			
6.6	1	2	0	0	0	2	30	Field 10	حقل 10			
0.0	0	0	0	0	0	0	30	Field 11	حقل 11			
83.3	5	25	3	0	8	19	30	Field 12	حقل 12			
61.9		251	39	0	215	89	405	12	Total	Total	المجموع	
			(9.6%)	(0.0%)	(53.1%)	(21.9%)						
			Riyadh region									
96.0	6	48	10	0	38	0	50	Field 1	حقل 1			
62.8	8	59	15	0	44	0	94	Field 2	حقل 2			
74.3		107	25	0	82	0	144	2	Total	Total	المجموع	
			Tabuk region									
0.0	0	0	0	0	0	0	46	Field 1	حقل 1			
0.0	0	0	0	0	0	0	87	Field 2	حقل 2			
0.0	0	0	0	0	0	0	133	2	Total	Total	المجموع	
			Jouf region									
0.0	0	0	0	0	0	0	52	Field 1	حقل 1			
0.0	0	0	0	0	0	0	26	Field 2	حقل 2			
0.0	0	0	0	0	0	0	78	2	Total	Total	المجموع	
44.2		674	172	0	572	129	1524	33	Total	Total	المجموع الكلي	
			(11.3%)	(0.0%)	(37.5%)	(8.5%)						

* تمثل النسبة المئوية نسبة العينات المصابة إلى العينات الختبرة والتي تم جمعها بناءً على الأعراض الظاهرية، وليست عينات عشوائية.

* The infection rate represent percent of infected samples of collected symptomatic samples and not random samples.

جدول 2. زوج البادئات التي تم استخدامها في الكشف عن الفيروسات في عينات البطاطس/البطاطا.

Table 2. Primer pairs used for the detection of viruses in potato samples.

Reference	المرجع	حجم الناتج المتوقع Expected amplicon size (bp)	Nucleotide Sequences	التسلسل النيوكليوتيدي	البادئات Primers	الفيروس Virus
Peiman & Xie, 2006		390	5'- GGAAATGTCAATGGT-3' 5'- GGGGTCCAACCTCATAAGC-3'		PLRVF PLRVR	PLRV
Rigotti & Gugerli, 2007		530	5'-CCAGTCAAACCCGAACAAAGG-3' 5'- GGCATAGCGTGCTAAACCCA-3		CP2+ CP1-	PVY
Shalaby <i>et al.</i> , 2002		750	5'-GATAGAATTTCAGATGACTACACCAGCCAACACC-3' 5'-TACGCGTCGGTTCATGGACGTAGTTATGGTGG-3'		PVX-CPv PVX-CPc	PVX
Peiman & Xie, 2006		565	5'- YACTGCAGGCGCAACTCC-3' 5'- GTCGTTGGATTGYGCCCT-3'		PVXF PVXR	
Xu & Nie, 2006		351	5'-CCATCATGAGTTCTTCACAAAAG-3' 5'-TCGTACAGTCATCAGTGAGAC-3'		AMV F AMV R	AMV

العينات التي تم اختبارها بال ELISA والتي أعطت نتائج سلبية تم اختبارها مرة أخرى باستخدام تفاعل البوليمراز المتسلسل مع النسخ العكسي (RT-PCR) باستخدام البادئات المذكورة في جدول 2.

استخدام تفاعل البوليمراز المتسلسل مع النسخ العكسي في خطوة واحدة تم اختيار عدد من العينات التي تم فحصها باختبار الإليزا وأعطت نتائج سلبية وبعضها أعطى نتائج إيجابية بواقع 10 عينات سلبية و 10 عينات إيجابية لكل موقع ولكل فيروس كما هو موضح في جدول 3. تم استخدام مجموعة من البادئات وهي CP1- مع CP2+ للكشف عن فيروس PVY و PVXF مع PVXR للكشف عن فيروس PVX وكذلك PLRVF مع PLRVR للكشف عن فيروس PLRV. يتضح من جدول 3 أن كل العينات التي أعطت نتائج إيجابية باختبار الإليزا أعطت نتائج إيجابية باختبار RT-PCR مع كل الفيروسات المختبرة. كما أظهرت النتائج أن هناك بعض العينات التي أعطت نتائج سلبية في اختبار الإليزا و أعطت نتائج إيجابية في اختبار RT-PCR مما يدل على أن هذا الاختبار كان أكثر دقة وأكثر حساسية حيث أمكنه الكشف عن التركيزات المنخفضة للفيروس في النبات وهذا يتفق مع ما أشار إليه بعض الباحثين سابقاً (Dietzgen, 2002؛ Spiegel & Martin, 1993)، حيث أوضحوا أنه على الرغم من التكلفة العالية لتفاعل RT-PCR إلا أن الكشف عن الفيروسات النباتية بهذه الطريقة يعد أكثر حساسية من اختبار الإليزا. وقد وجد أن إجمالي 6 عينات من أصل 40 عينة تم اختبارها (كانت قد أعطت نتيجة سلبية باختبار الإليزا) أعطت نتيجة إيجابية باختبار تفاعل البوليمراز المتسلسل لفيروس PLRV ونسبة 15% بواقع 3 عينات من

من الملاحظ أن الإصابة بفيروس PVY كانت مرتفعة ويرجع ذلك إلى انتقاله بواسطة المنّ بالطريقة غير الباقية، حيث أنه لا يحتاج إلى فترة حضانه ويمكن للحشرة أن تصبح قادرة على إحداث العدوى بعد ثواني من التغذية على نبات مصاب ومن ثم التغذية على نبات سليم لمدة ثواني، بينما في حالة فيروس PLRV فإنه يلزم أن تتغذى الحشرة على النبات المصاب من 1.5 إلى 15 دقيقة ولا تستطيع نقل الفيروس إلا بعد فترة من 8 إلى 72 ساعة وهي الفترة التي تلزم لحضانه الفيروس (Lacomme *et al.*, 2017؛ Mowry & Ophus, 2006)، وكلا الفيروسين من أخطر الفيروسات التي تصيب البطاطس حيث أن PVY بمفرده قد يسبب خسارة تصل إلى 80% (Nie *et al.*, 2011) كما أن الإصابة بفيروس PLRV قد تؤدي إلى خسارة تصل إلى 60% (Wang *et al.*, 2005)، ويتوقف ذلك على وقت حدوث الإصابة ودرجة تحمل الصنف ونوع السلالة الفيروسية وكذلك درجة الحرارة.

أشارت النتائج المتحصل عليها إلى أن اختبار الإليزا من الإختبارات الجيدة والفعالة في الحصر المبدي لفيروسات البطاطس في الحقل وهذا يتفق مع ما ذكر سابقاً (Chinestra *et al.*, 2010؛ Khan *et al.*, 2003) حيث أشير إلى أن اختبار الإليزا من الإختبارات الجيدة والفعالة في الحصر المبدي لفيروسات البطاطس. من ناحية أخرى فإن اختبار الإليزا قد لا ينجح في حالة الكشف عن الفيروس في المراحل الأولى من الإصابة أو في حالة الكشف عن الفيروس في تقاوي البطاطس نتيجة التركيز المنخفض للفيروس. وقد تم تأكيد ذلك من خلال فحص درنات لنباتات مصابة حيث أظهر إختبار الإليزا نتيجة سلبية في حين أظهر إختبار RT-PCR نتيجة إيجابية للعينات نفسها. لذلك فإن بعض

التي تمت زيارتها بموسم 2015. وتوضح الأشكال 1، 2، 3، 4 بعض نتائج تفاعل البوليمراز المتسلسل لفيروسات PVY، PLRV و AMV. أعطت جميع أزواج البادئات افضل النتائج عند حرارة التصاق 58 °س. لذلك يعد برنامج RT-PCR الذي استخدم في هذه الدراسة ذو فائدة وفعالية وقابل للتطبيق للكشف عن الاربع فيروسات التي تصيب البطاطس في تفاعل RT-PCR واحد (شكل 4). وقد تم الكشف عن العديد من فيروسات البطاطس في تفاعل RT-PCR واحد في العديد من الدراسات السابقة (Agindotan & Perry, 2008؛ Al-Saikhan *et al.*, 2014؛ Maoka *et al.*, 2010).

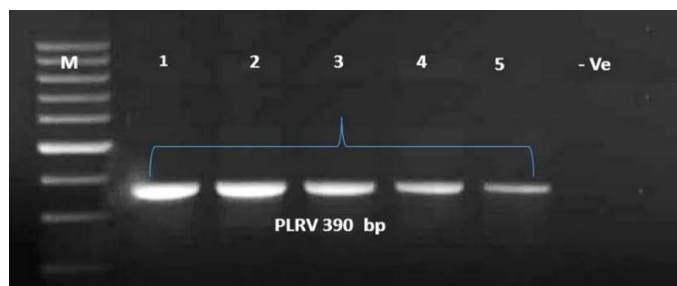
منطقة حائل و 3 عينات من منطقة القصيم. كما لوحظ أن 7 عينات من أصل 40 عينة (كانت قد أعطت نتيجة سلبية باختبار الإليزا) أعطت نتيجة إيجابية لفيروس PLRV بهذا الاختبار وهي من مناطق القصيم (3 عينات) وحائل (3 عينات) والرياض (عينة واحدة). كما كانت هناك 6 عينات من أصل 40 أعطت نتيجة إيجابية باختبار RT-PCR لفيروس AMV من مناطق حرض (3 عينات)، حائل (2 عينة) والرياض (عينة واحدة). لم يكن هناك أية عينات مصابة بفيروس PVX سواء في اختبارات الإليزا أو اختبار RT-PCR وذلك أثناء عملية الحصر للمناطق

جدول 3. نتيجة كشف الفيروسات باختبار RT-PCR في عينات البطاطس/البطاطا التي تم فحصها باختبار الإليزا.

Table 3. Virus detection of ELISA-tested potato samples using RT-PCR.

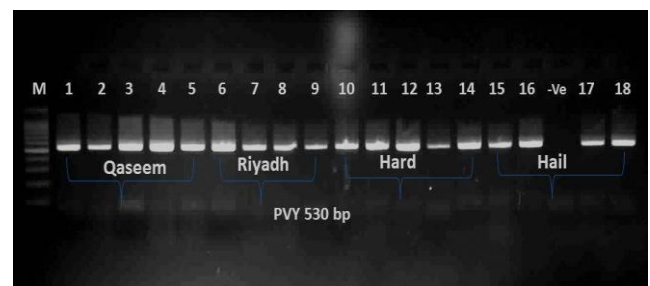
عدد العينات التي أعطت نتائج سلبية باختبار ELISA وإيجابية باختبار RT-PCR				عدد العينات التي أعطت نتائج إيجابية باختباري ELISA و RT-PCR				Region	المنطقة
Number of samples with negative result by ELISA and positive result by RT-PCR				Number of samples with positive result in both ELISA and RT-PCR					
AMV	PVX	PVY	PLRV	AMV	PVX	PVY	PLRV		
3	0	0	0	10	NA	10	10	Hard	حرض
2	0	3	3	10	NA	10	10	Hail	حائل
0	0	3	3	10	NA	10	10	Qaseem	قصيم
1	0	1	0	10	NA	10	10	Riyadh	رياض
6	0	7	6	40	NA	40	40	Total	المجموع

NA = غير مفحوصة (Not tested).



شكل 2. الفصل الكهربائي على هلام الأجاروز 1.5% للحزم الناتجة باستخدام زوج البودائ PLRVF و PLRVR للكشف عن فيروس PLRV. M = سلم 100 زوج قواعد ، -ve هو نبات سليم، والعينات من 1 إلى 5 كانت مصابة.

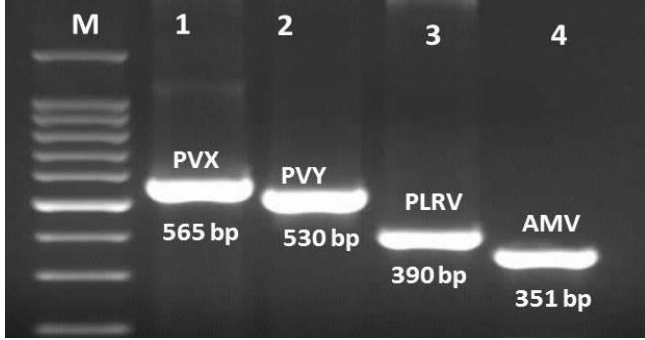
Figure 2. Gel electrophoresis on 1.5% agarose for the amplified fragments of the partial coat proteins of PLRV using PLRVF + PLRVR primer pairs. M= 100bp DNA ladder, Samples from 1 to 5 were infected with PLRV, whereas - ve is a healthy plant sample.



شكل 1. الرحلان/الفصل الكهربائي على هلام أجاروز 1.5% للحزم الناتجة باستخدام زوج البادئات CP2+/ CP1- للكشف عن فيروس PVY. M = سلم 100 زوج قواعد ، -ve هو نبات سليم، العينات من 1 إلى 5 هي عينات مصابة من القصيم ومن 6 إلى 9 عينات مصابة من الرياض ومن 10 إلى 15 عينة مصابة من حرض و 15 إلى 18 عينة مصابة من حائل.

Figure 1. Gel electrophoresis on 1.5% agarose for the amplified fragments of the partial coat proteins of PVY using CP2+/ CP1- primer pairs. M= 100 bp Markers ladder, -ve is a healthy plant, 1 to 5= positive samples from Qaseem, 6 to 9= positive samples from Riyadh, 10 to 14= positive samples from Hard, 15 to 18= positive samples from Hail.

اختبار PCR للكشف عن الإصابات الفيروسية في برامج إنتاج تقاوي البطاطس وغيرها من المحاصيل المستوردة.

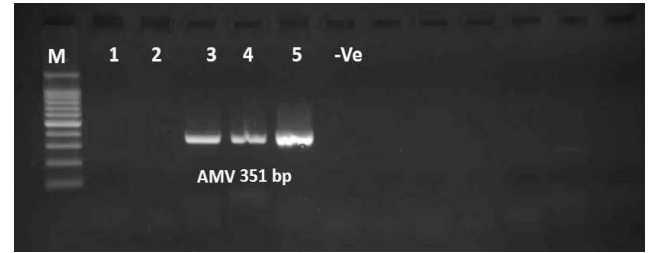


شكل 4. يوضح ناتج تفاعل البوليمراز المتسلسل على هلام الأجاروز 1% عند استخدام بادئات CP2+/CP1-، PVXF/PVXR، PVY، PLRV/PLRV لتضخيم أجزاء من جين الغلاف البروتيني لفيروسات البطاطس. M = سلم 100 زوج قاعدي، PVX=1، PVY=2، PLRV=3، AMV=4.

شكل 4. يوضح ناتج تفاعل البوليمراز المتسلسل على هلام الأجاروز 1% عند استخدام بادئات CP2+/CP1-، PVXF/PVXR، PVY، PLRV/PLRV لتضخيم أجزاء من جين الغلاف البروتيني لفيروسات البطاطس. M = سلم 100 زوج قاعدي، PVX=1، PVY=2، PLRV=3، AMV=4.

شكر وتقدير

يتقدم الباحث بالشكر والتقدير لمدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية على دعمها للبحث (رقم ات-32-95)، كذلك وزارة البيئة والمياه والزراعة لتعاونها في الحصول على العينات، ولجميع العاملين بوحدة الأقات وأمراض النباتات بكلية العلوم الزراعية والأغذية، جامعة الملك فيصل، المملكة العربية السعودية.



شكل 3. الفصل الكهربائي على هلام أجاروز 1.5% للحزم الناتجة عن استخدام زوج البادئات AMVR+AMVF للكشف عن فيروس AMV. M= سلم 100 زوج قواعدي، -ve هو نبات سليم، 1 لم يتم حقنها بعينة، 2 هي نبات سليم، العينات من 3 إلى 5 مصابة بفيروس AMV.

Figure 3. Gel electrophoresis on 1.5% agarose for the amplified fragments of the partial coat proteins of AMV using AMVF + AMVR primer pairs. M= 100bp DNA ladder, 1= empty well, 2= healthy plant; 3, 4 and 5= samples infected with AMV, -ve is a healthy plant sample.

دلت النتائج المتحصل عليها في هذه الدراسة على أن كلا من اختبارات إليزا أو RT-PCR يمكن استخدامها للكشف عن فيروسات البطاطس بينما في حالة تقاوي البطاطس وعندما يكون تركيز الفيروس منخفضاً قد لا يؤدي اختبار الإليزا الغرض ولا بد من استخدام RT-PCR. وقد ذكر باحثون سابقاً (Mumford et al., 1996)؛ أن اختبار الإليزا قد لا يكون الأنسب في ظل التركيزات المنخفضة من الفيروس ولهذا أكدوا على ضرورة الكشف الدقيق للفيروسات باستخدام تفاعل RT-PCR وبخاصة في حالة الكشف عن فيروسات البطاطس التي تستخدم كتقاوي كأحد الوسائل الفعالة للحد من انتشار المرض وتجنب الخسائر الناتجة عنه ولذلك يوصى بإدراج

Abstract

Alhudaib, K.A. 2018. Occurrence of potato viruses in the major potato growing areas in Saudi Arabia. Arab Journal of Plant Protection, 36(2): 114-122.

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is the fourth largest staple food crop worldwide after wheat, maize, and rice. In Saudi Arabia, potato is cultivated during the spring and fall growing seasons. Viruses are the most devastating pathogens on potato, and the most widespread viruses on potatoes around the world are *Potato leaf roll virus* (PLRV, genus *Potyvirus*, family *Luteoviridae*), *Potato virus Y* (PVY, genus *Potyvirus*, family *Potyviridae*), *Potato virus A* (PVA, genus *Potyvirus*, family *Potyviridae*), *Potato virus M* (PVM, genus *Carlavirus*, family *Flexiviridae*), *Potato virus S* (PVS, genus *Carlavirus*, family *Flexiviridae*) and *Potato virus X* (PVX, genus *Potexvirus*, family *Flexiviridae*). Field inspection of potato fields was carried out in 6 regions, Hail, Hard, Jouf, Qaseem, Riyadh and Tabuk. A total of 1524 samples that showed symptoms of virus infection such as rolling, mosaic, stunting, yellowing, leaf curl, and vein necrosis were collected from all regions. All samples were initially tested using ELISA and selected samples were tested by RT-PCR. Results obtained indicated that PVY was the most detected virus followed by AMV and PLRV. The RT-PCR test was more accurate and sensitive than ELISA. All primer pairs for RT-PCR were used under similar conditions, and the annealing temperature of 58°C gave the best amplification products for all primers used in this study. RT-PCR conditions described in this study are considered useful, sufficient, applicable, and effective and allow simultaneous detection of the four potato viruses in one-step RT-PCR.

Keywords: Potato, Saudi Arabia, AMV, PLRV, PVY, PVX.

Corresponding author: Khaled Abdallah Alhudaib, Plant Protection Department, College of Agricultural and Food Sciences, King Faisal University, Al-Hassa, Saudi Arabia, email: kalhudaib@kfu.edu.sa

- Agindotan, B. and K.L. Perry.** 2008. Macroarray detection of eleven potato-infecting viruses and Potato spindle tuber viroid. *Plant Disease*, 92: 730-740.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-92-5-0730>
- Al-Saikhhan, M.S., K.A. Alhudaib and A.M. Soliman.** 2014. Detection of Three Potato Viruses Isolated from Saudi Arabia. *International Journal of Virology*, 10: 224-234.
<https://doi.org/10.3923/ijv.2014.224.234>
- Al-Saleh, M. A., Amer, M. A., Al-Shahwan, I. M., Abdalla, O. A., and Shakeel, M. T.** 2014. Molecular characterization of two Alfalfa mosaic virus isolates infecting potato crop in Central Region of Saudi Arabia. *International Journal of Agriculture and Biology*, 16: 976-980.
- Al-Shahwan, I.M. and O. Addalla.** 2000. Viruses associated with potato diseases in the East and South of the Kingdom of Saudi Arabia. *Journal of King Saud University, Agricultural Sciences*, 2: 121-127.
- Bawden F.C., B. Kassanis and F.M. Roberts.** 2008. Studies on the importance and control of potato virus X. *Annals of Applied Biology*, 35: 250-265.
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1948.tb07366.x>
- Chinestra, S.C., C. Facchinetti, N.R. Curvetto and P.A. Marinangeli.** 2010. Detection and frequency of lily viruses in Argentina. *Plant Disease*, 94: 1188-1194.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-07-09-0419>
- Dietzgen, R. G.** 2002. Application of PCR in Plant virology. Pages 471–500. In: *Plant viruses as molecular pathogens*. J.A. Khan and J. Dijkstra (eds.). USA: The Haworth Press.
- Jaspars, E.M. and L. Bos.** 1980. Alfalfa mosaic virus. No. 229 in: *Descriptions of Plant Viruses*. Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol., Kew, England.
- Khan, S.M., M.I. Hoque, R.H. Sarker and H.P. Muehlbach.** 2003. Detection of important plant viruses in *in vitro* regenerated potato plants by double antibody sandwich method of ELISA. *Plant Tissue Culture*, 13: 21-29.
- Lacomme, C., J. Pickup, A. Fox, L. Glais, B. Dupuis, T. Steinger and S. Modic.** 2017. Transmission and Epidemiology of Potato virus Y. Pages 141-176. In: *Potato virus Y: biodiversity, pathogenicity, epidemiology and management*. Springer, Cham.
- Lopez, L., R. Muller, E. Balmori, G. de la Riva, N. Ramirez, V. Doreste, M. Lopez, S. Perez, P. Oramas and G. Selman-Housein.** 1994. Molecular cloning and nucleotide sequence of the coat protein gene of a Cuban isolate of *Potato leafroll virus* and its expression in *Escherichia coli*. *Virus Genes*, 9: 77-83.
<https://doi.org/10.1007/BF01703437>
- Maoka, T., Sugiyama, S., Maruta, Y. and Hataya, T.** 2010. Application of cDNA macroarray for simultaneous detection of 12 potato viruses. *Plant Disease*, 94: 1248-1254.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-12-09-0787>
- Mowry, T.M. and J.D. Ophus.** 2006. Influence of the *Potato leafroll virus* and virus-infected plants on the arrestment of the aphid, *Myzus persicae*. *Journal of Insect Science*, 6: 1-8.
https://doi.org/10.1673/2006_06_22.1
- Mumford, R.A., I. Barker and K.R. Wood.** 1996. An improved method for the detection of *Tospoviruses* using the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 57: 109-115.
[https://doi.org/10.1016/0166-0934\(95\)01975-8](https://doi.org/10.1016/0166-0934(95)01975-8)
- Nie, B., M. Singh, A. Sullivan, R. P. Singh, C. Xie, and X. Nie.** 2011. Recognition and molecular discrimination of severe and mild PVY^o variants of *Potato virus Y* in potatoes in New Brunswick, Canada. *Plant Disease*, 95: 113-119.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-04-10-0257>
- Peiman, M. and C. Xie.** 2006. Sensitive detection of potato viruses, PVX, PLRV and PVS, by RT-PCR in potato leaf and tuber. *Australasian Plant Disease Notes*, 1: 41-46. <https://doi.org/10.1071/DN06017>
- Rigotti, S. and P. Gugerli.** 2007. Rapid identification of potato virus Y strains by one-step triplex RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 140: 90-94.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.11.002>
- Ross, H.** 1986. *Potato Breeding-Problems and Perspectives*. Verlag Paul Parey, Berlin and Hamburg.
- Sabir J.S.M.** 2012. Identification of six potato virus Y isolates from Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology*, 11: 9709-9715.
<https://doi.org/10.5897/AJB11.3797>
- Salazar, L.F.** 1996. *Potato viruses and their control*. International Potato Center, Lima Peru, 214 pp.
- 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.
- Spiegel, S. and R.R. Martin.** 1993. Improved detection of potato leafroll virus in dormant potato tubers and microtubers by the polymerase chain reaction and ELISA. *Annals of Applied Biology*, 122:493-500.
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1993.tb04052.x>
- Statistical Yearbook (Saudi Arabia).** 2016. Issue Number 52, <https://www.stats.gov.sa/en/864>.
- Valkonen, J.P.T.** 2007. Viruses: Economical losses and Biotechnological Potential. Pages 619-639. In: *Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives*. D. Vreugdenhil (ed.). Elsevier, B.V. Books.
- Wang, X.M., L.P. Jing and H. Yi.** 2005. Advances in breeding of potato virus-resistant cultivars. *Chinese Potato Journal*, 19: 285-289.

Warren, M., K. Krüger and A.S. Schoeman. 2005. Potato virus Y (PVY) and potato leaf roll virus (PLRV): Literature review for potatoes in South Africa. Department of Zoology and Entomology, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, University of Pretoria.

Received: November 30, 2017; Accepted: March 26, 2018

Xu, H. and J. Nie. 2006. Identification, characterization, and molecular detection of *Alfalfa mosaic virus* in potato. *Phytopathology*, 96: 1237-1242.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-1237>

تاريخ الاستلام: 2017/11/30؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2018/3/26