مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية - سلسلة العلوم الزراعية المجلد (18) العدد (4) 1996
Tishreen University Journal for Studies and Scientific Research -Agricultural Science Series Vol. (18) No (4) 1996

تشخيص بعض الفيروسات المنقولة بواسطة بذور الفول في منطقة اللاذقية

الدكتور سليم راعي*
الدكتور عماد إسماعيل*
أمين هزاع**
عبده علي عزعزي**

☐ الملخّص ☐

جمعنا بذور فول من عدد من البقاليات في مدينة اللاذقية بواقع /200/ غرام من كل بقالية فحصلنا على 4 كيلو غرام. وخلطت هذه الكمية جيدا وأخذنا منها بشكل عشوائي 1500 بذرة. ثم حصلنا على 3 كيلو غرام من بذور الفول من المؤسسة العامة لإكثار البذار - فرع اللاذقية وأخذنا منها بشكل عشوائي 1500 بذرة للدراسة، وعقمنا بذور المصدرين كل على حدة بواسطة هيدروكلوريد الكالسيوم التجاري 1% لمدة 24 ساعة وغسلت جيداً بالماء الجاري، وزرعت في أحواض بلاستيكية وبعد الإنبات وعندما أصبحت البادرات بطول 25 سم جمعنا أوراق كل 25 نبات واعتبرت بمثابة مجموعة مستقلة لوحدها وكان عدد المجموعات التي حصلنا عليها 53 مجموعة من المؤسسة العامة لإكثار البذار و53 مجموعة من السوق المحلية وبذلك يكون المجموع الكلي لكلا المصدرين 106 مجموعات.

فحصنا العينات باستخدام اختبار Enzyme linked – Immunosorbent Assay (ELISA) وذلك بهدف تحديد نسبة وجود فيروس تلون بذور الفول Broad bean stain comovirus (BBSV) وفيروس الموزاييك الأصفر في الفاصولياء Bean yellow mosaic potyvirus (BYMV)، وفيروس موزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور Pea seed – borne mosaic potyvirus (PSbMV)، ولقد أثبت هذا الاختبار وجود هذه الفيروسات الثلاثة في بذور السوق المحلية وبذور المؤسسة العامة لإكثار البذار وكانت نسبة تواجد هذه الفيروسات في بذور كلا المصدرين كما يلي:

فيروس BBSV 0.65% في بذور السوق المحلية و0.39% في بذور المؤسسة العامة لإكثار البذار.

فيروس BYMV 0.39% في بذور السوق المحلية و0.31% في بذور المؤسسة العامة لإكثار البذار.

فيروس PSbMV 0.76% في بذور السوق المحلية و0.31% في بذور المؤسسة العامة لإكثار البذار.

---

* مدرس في قسم وقاية النبات - كلية الزراعة- جامعة تشرين - اللاذقية - سورية.
** مهندس زراعي - اليمن

مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية – سلسلة العلوم الزراعية المجلد (18) العدد (4) 1996
Tishreen University Journal for Studies and Scientific Research –Agricultural Science Series Vol. (18) No (4) 1996

Diagnosis of Seed-Borne Viruses on Broad Bean Seeds in Lattakia Destrict

Dr. Salim RAAI*
Dr. Imad ISMAIL*
Amin HAZZAH**
Abda Ali AZAZI**

❐ ABSTRACT ❐

Broad bean seeds were collected locally from twenty supermarkets (200g/supermarket). A study sample of 1500 seeds was randomly taken out of the composed sample. Another study sample of 1500 seeds wase taken out of 3Kg of seeds presented from the General Organization for Seed Multiplication (GOSM)/ Lattakia branch. Samples for study were sterelized for 24h in 1% calicium hypochloride, and were thoroughly washed with water .Sterilized seeds have been sawed in plastic pots. Samples for testing(a foiaTof 106 groups, 53 groups from GOSM and 53 groups form local market) have been collected in groups (25seedlings/group). Samples were tested using Enzyme Linked -ImmunoSorbent Assay) ELISA (to determined the percentage of broad bean stain comovirus) BBSV ،(bean yellow mosaic potyvirus) BYMV (and pea seed- borne mosaic poty virus) PSbMV .(The results showed: 0.65% BBSV in local seeds and %0.39in GOSM seeds; 0.39% BYMV in local seeds and 0.31% in GOSM seeds and PSbMV 0.76% in local seeds and 0.31% in GOSM seeds.

* Lecturer at Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.
** Agricultural Engineer – Yemen.

المقدمة:

يعتبر محصول الفول Vicia faba L. من أهم وأرخص مصادر الحريرات والبروتينات النباتية وأقلها تكلفة لنسبة عالية من السكان في معظم بلدان العالم النامي.

ويتميز محصول الفول بغنى بذوره بالبروتين حيث تصل نسبته إلى 35% وفي سوقه 10% وفي السيلاج 3%. ويتميز أيضاً بغناه بالحمض الأميني الليسين[1].

ويستخدم الفول أخضراً وجافاً في غذاء الإنسان وكعلف مركز هام في تغذية الحيوان ويعتبر الفول المزروع من أجل إنتاجه الحبي في سورية ثاني محصول بقولي بعد العدس حيث بلغت المساحة المزروعة به في موسم 1989-1990 حوالي 9.2 ألف هكتار[2،3] وهذه المساحة أخذت بالتقلص عاماً بعد عام بسبب منافسة المحاصيل المروية أو بسبب الإصابة بالآفات والأمراض المختلفة وخاصة الفيروسية وربما للسببين معاً، ولذلك كان الهدف من بحثنا الكشف عن بعض الفيروسات التي تصيب الفول والتي تنتقل بواسطة بذوره.

لقد ذكر بأن الفول يصاب طبيعياً بـ32 فيروساً في مختلف مناطق العالم[4]. وأثبتت دراستنا عن وجود ثلاث فيروسات منتشرة على محصول الفول وهي فيروس تلون بذور الفول Broad bean stain comovirus (BBMV) وفيروس الموزاييك الأصفر في الفاصولياء Bean yellow mosaic potyvirus (BYMV)، وفيروس موزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور – Pea seed borne mosaic poty virus (PSbMV) والتي تصيب الفول وتنتقل عن طريق بذوره.

مواد وطرق البحث:

تم إجراء التجارب في مخابر قسم وقاية النبات – كلية الزراعة جامعة تشرين وفي مخبر الأمراض الفيروسية في المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة – ايكاردا – حلب – سورية.

1- البذور المستخدمة ومصادرها:

آ- السوق المحلية: جمعنا بذار فول من عدد من البقاليات في مدينة اللاذقية بواقع 200 غرام من كل بقالية وخلطت البذور جميعاً بعضها مع بعض بشكل جيد وأخذنا منها بشكل عشوائي 1500 بذرة.

ب- المؤسسة العامة لإكثار البذار: حصلنا على 3 كيلو غرام بذور فول من المؤسسة العامة لإكثار البذار وخلطت بشكل جيد وأخذنا منها بشكل عشوائي 1500 بذرة.

2- تعقيم البذور:

عقمنا بذور كلا المصدرين بواسطة هيدروكلوريد الكالسيوم التجاري 1% لمدة 24 ساعة ثم غسلناها جيداً بالماء الجاري.

3- زراعة البذور:

زرعنا بذور فول المؤسسة العامة لإكثار البذار وبذور فول السوق المحلية كلاً على حدة في أحواض بلاستيكية بواقع 50 بذرة في كل حوض وبذلك كان مجموع الأحواض المستخدمة هو 60 حوضاً بلاستيكياً وتم تغطية هذه الأحواض بواسطة الأقفاص الشبكية الناعمة لمنع دخول الحشرات ولتحاشي حصول عدوى من مصدر خارجي.

4- جمع العينات وحفظها:

جمعنا عينات كل مجموعة من 25 نبات بشكل عشوائي واعتبرت بمثابة مجموعة مستقلة ووضعت في كيس نايلون وحفظت ضمن ثلاجة حتى موعد الاختبارات اللاحقة. وبذلك يكون قد أصبح لدينا 106 مائة وست مجموعات أي 53 مجموعة من المؤسسة العامة لإكثار البذار و53 مجموعة من السوق المحلية.

5- الأمصال المضادة والاختبارات السيرالوجية:

حصلنا على الأمصال المضادة لكل من فيروس تلون بذور الفول، وفيروس الموزاييك الأصفر في الفاصولياء، وفيروس موزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور من مخبر الأمراض الفيروسية النباتية في ايكاردا – حلب – سورية وتم الكشف عن هذه الفيروسات بواسطة:

اختبار الاليزا Enzyme linked Immunosorbent assay = ELISA.

بالطريقة المباشرة Double Antibody Sandwish ELISA = DAS- ELISA وذلك حسب الخطوات التالية:

آ- استخلصت العصارة النباتية من أوراق العينات باستخدام جهاز طحن العينات Teka Tissue Homogenizer – Extractor وذلك بعد إضافة 25 ملليتر من محلول موقي فوسفاتي عيار 0.2 وذو pH = 6.0 لكل مجموعة.

ب- استخدم الجاماغلوبيولين (Immunoglobulin G = IgG) في تغطية كل حفرة من حفر أطباق الاليزا بـ200 ميكرو ليتر بتركيز 1 ميكرو غرام من محلول التغطية Cauting buffer.

جـ- حضنت الأطباق على درجة حرارة 37°م لمدة أربع ساعات.

د- غسلت الأطباق خمس مرات بمحلول الغسيل – Phosphate buffered saline

(PBST) tween 20 وهو محلول فوسفاتي موقي ذو pH = 9.4 بفاصل خمس دقائق بين الغسلة والأخرى.

هـ- أضيف لكل حفرة 200 ميكرو ليتر من العصارة النباتية المراد اختبارها والتي سبق استخلاصها بنسبة وزن واحد من النسيج النباتي إلى 10 حجوم من محلول الاستخلاص المستعمل وهو المحلول الموقي الفوسفاتي (0.2 عيارية و pH = 6.0) ووضعت كل عينة في حفرتين متجاورتين واستخدم في كل طبق ثمان حفر موزعة في أماكن مختلفة من الطبق تحوي عصارة نبات فول سليم خال من الإصابة الفيروسية (شاهد سليم) وخصصت أربع حفر أخرى اثنتان منها تحوي عصارة نبات فول مصاب بالفيروس (شاهد مصاب) والأخريان تحتويان على محلول الاستخلاص.

و- حضنت الأطباق لمدة 16 ساعة على درجة حرارة 4°م.

ز- غسلت الأطباق كما ورد في الخطورة رقم /4/.

ح- أضيف لكل حفرة 200 ميكرو ليتر من الأجسام المضادة لفيروس تلون بذور الفول والمرتبطة بأنزيم الفوسفاتيز Alkaline phosphatase والمخففة حتى 1000/1 بواسطة محلول الربط Conjugate buffer (طبق رقم 1)، وأضيف لكل حفرة 200 ميكرو ليتر من الأجسام المضادة لفيروس الموزاييك الأصفر في الفاصولياء والمرتبطة بأنزيم الفوسفاتيز المذكور سابقاً والمخففة 1000/1 بواسطة محلول الربط السابق ذكره أيضاً (طبق رقم 2)، وأضيف لكل حفرة 200 ميكرو ليتر من الأجسام المضادة لفيروس موزاييك البازلاء المنقول بالبذور والمرتبطة بأنزيم الفوسفاتيز والمخففة حتى 1000/1 بواسطة محلول الربط المذكور سابقاً (طبق رقم 3).

ط- حضنت الأطباق على حرارة 37°م لمدة أربع ساعات.

ي- غسلت الأطباق كما ورد في الخطوة /4/.

ك- أضيف لكل حفرة من حفر الأطباق الثلاثة 250 ميكرو ليتر من مادة P-Nitrophenyl phosphate مادة شفافة تتفكك وتعطي لوناً أصفراً بفعل أنزيم الفوسفاتيز القلوي وبتركيز 0.5 ميلغرام من هذه المادة لكل 10 مل من محلول Substrate buffer pH = 9.6 ولقد لزم للطبق الواحد 20 مل Substrate buffer وتحتاج كل 10 مل من Substrate buffer (5 ملغ مادة فعالة) من P-Nitrophenyl phosphate.

ل- وضعت الأطباق على درجة حرارة الغرفة لمدة ساعتين ثم قدرت شدة التفاعل بقياس درجة امتصاص الضوء عند الموجة (405) نانومتر بواسطة جهاز قارئ أطباق الاليزا من النوع Titertek multiscan Plus Mask II من إنتاج شركة Flow

Laboratories. ولقد اعتبرت العينة مصابة بالفيروس عندما كان امتصاصها للضوء عند الموجة (405) نانومتر يفوق امتصاص العينة الشاهد السليم + ثلاثة أضعاف الانحراف المعياري Standard deviation[5-10].

ولقد حسبت نسبة الانتقال باستخدام معادلة [Maury et al, 1985]

$$P = \left[1 - \left(\frac{H}{N}\right)^{\frac{1}{n}}\right] 100$$

حيث:

P: نسبة الانتقال بالبذرة.

H: عدد المجموعات السليمة الغير مصابة.

N: عدد المجموعات الكلي

N: عدد النباتات في المجموعة الواحدة.

النتائج والمناقشة:

أثبتت الدراسة التي قمنا بها بأن مجموعات السوق المحلية ومجموعات المؤسسة العامة لإكثار البذار تحمل فيروس تلون بذور الفول (BBSV)، وفيروس الموزاييك الأصفر في الفاصولياء (BYMV) وفيروس موزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور (PSbMV)، ولكن بنسب مختلفة كما هو موضح في الجدول التالي:

جدول يبين الفيروسات التي تم تشخيصها في بذور الفول من السوق المحلية والمؤسسة العامة لإكثار البذار ونسب انتقالها بواسطة البذور

المصدر / الفيروس	مجموعات السوق المحلية			مجموعات المؤسسة العامة لإكثار البذار		
	عدد المجموعات الكلي	عدد المجموعات المصابة	نسبة الانتقال بالبذرة	عدد المجموعات الكلي	عدد المجموعات المصابة	نسبة الانتقال بالبذرة
BBSV	53	8	%0.65	53	5	%0.39
BYMV	53	5	%0.39	53	4	%0.31
BSbMV	53	1	%0.76	53	4	%0.31

تبين لنا النتائج التي حصلنا عليها من خلال الجدول السابق بأن بذور الفول التي حصلنا عليها من المؤسسة العامة لإكثار البذار والسوق المحلية تحمل فيروس تلون بذور الفول (BBSV)، وفيروس الموزاييك الأصفر في الفاصولياء (BYMV) وفيروس موزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور (PSbMV) وأوضحت هذه النتائج بأن نسبة انتقال الفيروس (BBSV) 0.65% في بذور السوق المحلية و0.39% في بذور المؤسسة العامة لإكثار البذار وفيروس PBYMV بنسبة 0.39%

في بذور السوق المحلية وبنسبة 0.31% في بذور المؤسسة العامة لإكثار البذار وفيروس (PSbMV) بنسبة 0.76% في بذور السوق المحلية وبنسبة 0.31% في بذور المؤسسة العامة لإكثار البذار.

بناء على ما تقدم نستخلص ما يلي:

- إن انتقال مجموعة من الفيروسات بوساطة بذار الفول الموزعة على المزارعين بواسطة المؤسسة العامة لإكثار البذار أو بواسطة بذار الفول التي تباع في البقاليات والمحلات التجارية تشكل خطراً كبيراً على إنتاجية وحدة المساحة من الفول سواء كان الغرض هو الإنتاج الحبي أو الاستهلاك الأخضر أو التصنيع العلفي خاصة عند تكرار استخدام بذار المحصول السابق للزراعة في العام القادم. وهذا ما يحصل عند مجموعة لا بأس بها من المزارعين.
- إن استخدام بذار حامل وناقل للعدوى الفيروسية يؤدي إلى اتساع رقعة المصادر الطبيعية للعدوى الفيروسية وحفظها وتخزينها في العوائل النباتية وخاصة البرية المعمرة سيما الفيروسات المنتقلة بواسطة النواقل الحشرية.
- ضرورة الأخذ بعين الاعتبار أهمية إنتاج واستخدام البذار السليمة الخالية من العدوى الفيروسية والتطبيق الكامل والصارم لإجراءات الحجر الزراعي وعدم السماح بتوزيع مواد إكثار نباتية إلا بعد استكمال الشروط الفنية والصحية المتعلقة بها.
- إن وضع برامج للسيطرة على المجتمعات الحشرية الناقلة للعدوى الفيروسية يساهم بشكل فعال وكبير في مكافحة الإصابات الفيروسية.

REFERENCES المراجع

[1]- Vavilov, p.p., 1975 Rostenevodstvo M. Kolos. P. 191-194.

[2]- المكتب المركزي للإحصاء، رئاسة مجلس الوزراء في سورية 1990 "تقرير عن تطور مساحة وإنتاج الحبوب والبقول الجافة" 1985-1989 دمشق. سورية صفحة 108-109.

[3]- مديرية الزراعة والإصلاح الزراعي في اللاذقية. أرشيف قسم الإحصاء 1993.

[4]- Franz, N. "Virus and similar diseases in tropical and subtropical areas". Eschborn 1981.

[5]- Clark, M.F. and A.N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of Enzyme – Linked Immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General virology 34: 475-483.

[6]- Hampton, R.O. and G.I. Mink. 1975. Pea seed – borne mosaic virus. CMI/AAB. – Descriptions of plant viruses. No.146.

[7]- Makkouk, k.M. and O.I. Azzam, 1986. Detection broad been stain virus in lentel seed groups. Len News letter 13(2): 37-38.

[8]- Makkouk, K.M.L. BOS, O.I. Azzam, L. Katul and A. Rizkallah. 1987. Broad been stain virus: Identification, detectability, with ELISA in faba bean leaves and seed, occurrence in west Asia and North Africa and possible wiled hosts. Netherlands Journal of plant pathology 93: 97-106.

[9]- Makkouk, K.M., S.G. Kumari and L. BOS. 1992 pea seed – borne mosaic virus: Occurrence in faba bean (Vicia faba L.) and lentil (Lens culinaris Med.) in west Asia and North Africa, further information on host rang, purification, serology, transmissions characteristics. Netherlands Journal of plant pathology. (In press).

[10]- Makkouk, K.M, D.E. Lesemann and N.A. Haddad. 1982. Bean yellow mosaic virus from broad bean in Lebanon: incidence, host rang, purification and serological properties. Zeitschrift fur pflanzenkrankheiten und pflanzenschutz 59-66.

[11]- Maury, Y., C. Duby, J. M. Bossenec and G. Boudazin (1985), Group analysis using ELISA determination of the level of transmission of soybean mosaic virus in soybean seed. Agronomie 5: 405-415.