

التشخيص المصلي والجزيئي لفايروس تقزم واصفرار الشعير Barley yellow dwarf virus وسلالته وانتشارها في العراق

ميسر مجيد جرجيس
أستاذ

عبدالقادر خضير عباس
الباحث

قسم وقاية النبات – كلية الزراعة – جامعة بغداد

mysirem@yahoo.com

Kader_khudyer@yahoo.com

المستخلص

شخص فايروس تقزم واصفرار الشعير Barley yellow dwarf virus وسلالاته PAV و MAV و RPV باعتماد اختبار إليزا المصلي ELISA وباستخدام مصول مضادة متعددة النسيلة polyclonal و وحيدة النسيلة monoclonal. اشارت نتائج الكشف عن فايروس BYDV وسلالاته الى انتشار الفايروس في أغلب حقول زراعة الشعير في العراق وسجلت محافظة نينوى اعلى نسبة اصابة بلغت 30% تليها محافظة بغداد بنسبة اصابة 26% وكانت اقل نسبة اصابة 8% و 10% في محافظتي النجف وواسط على التتابع وبينت النتائج الى انتشار السلالة PAV وبنسبة بلغت 75% من مجموع الاصابات في العينات العشوائية. شخصت السلالة PAV الاكثر انتشارا باعتماد تقنية Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) وبطريقتين، طريقة استخلاص الحامض النووي الرايبوي RNA الكلي من النباتات المصابة و Total Ribonucleic acid extraction و طريقة Immunocapture Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (IC-RT-PCR) في الكشف عن الفايروس من الطريقة التقليدية (RT-PCR).

الكلمات المفتاحية: الشعير، اليزا، RT-PCR، IC-RT-PCR

*البحث مستل من اطروحة دكتوراه للباحث الاول

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences – 46(6): 977-983, 2015

Abbas & Jarjees

SEROLOGICAL AND MOLECULAR DIAGNOSIS OF BARLEY YELLOW DWARF VIRUS AND ITS STRAINS AND SPREAD THE STRAINS IN IRAQ

A. k. Abbas
Researcher

M. M. Jarjees
Prof.

Dept. of plant protection-coll. of agric. - Univ. of Baghdad

ABSTRACT

Barley yellow dwarf virus (BYDV) and its strain PAV, MAV and RPV have been diagnosed by ELISA technique using polyclonal and monoclonal antibodies. The results showed the spread of BYDV in most of barley fields in Iraq. Nineveh governorate recorded the highest infection rates 30% then Baghdad governorate 26% the less infection rates 8% and 10% were in Al-Najaf and Wasit respectively, the results also showed the spread of PAV strain with the rate 75% from the total infected random samples. The most prevalent strain PAV was diagnosed using Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) technique following two methods, total ribonucleic acid extraction from the infected plant method and Immunocapture Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (IC-RT-PCR). The results showed the efficiency of the (IC-RT-PCR) method in the detection of the virus from the traditional method (RT-PCR).

Key Words: Barley, ELISA, RT-PCR, IC-RT-PCR.

*Part of Ph.D. thesis of the first author

المقدمة

يعد نبات الشعير واحداً من اقدم أفراد العائلة النجيلية الذي تمتد مناطق زراعته لتضم المعتدلة والجافة وكذلك المالحة والقلوية منها، ونال الشعير اهتماما كبيرا لما له من أهمية اقتصادية كونه مادة غذائية مهمة للإنسان والحيوان (17). توسعت زراعة هذا المحصول بشكل كبير في السنوات الاخيرة ورافق هذا التوسع انتشار عدد من الافات و الامراض ومن بين اهم تلك الامراض هي الامراض الفايروسية ويعد مرض تقزم واصفرار الشعير واحداً من تلك الامراض اذ ينتشر في جميع مناطق زراعة الشعير في العالم ويسبب خسائر كبيرة تتراوح بين 5-85 % اعتمادا على سلالة الفايروس وتوفر الحشرة الناقلة وحساسية الصنف المزروع ووقت حدوث الإصابة (6) ينتقل هذا الفايروس بعدة انواع من حشرة المن وله مدى عائلي واسع مما جعله من اخطر الامراض الفايروسية على محاصيل الحبوب. الخطوة الأولى في إدارة المرض هو التشخيص الدقيق، اذ تتداخل أعراض المرض مع تلك التي تسببها العوامل الحيوية وغير الحيوية الأخرى. لذلك فإن التشخيص الذي يعتمد على الاعراض الظاهرية لا يمكن الاعتماد عليه اذ، يتطلب التشخيص المختبري بتقنيات حديثة. الاختبار الأكثر استخداما لتأكيد الإصابة هو اختبار اليزا المصلي Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) باستخدام مصل وحيدة النسيلة monoclonal ومتعددة النسيلة polyclonal (24). وفي ظل التطور السريع والمستمر في مجال استخدام مؤشرات الدنا في السنوات الأخيرة ساعد في الكشف عن أنواع حديثة وعديدة من تلك المؤشرات التي تعتمد على واحد من الإنجازات البارزة والذي تحقق قبل نهاية الألفية الثانية ألا وهو ابتكار تقانة تضاعف سلسلة الدنا Polymerase Chain Reaction (PCR) من قبل Mullis عام (1986) التي أحدثت ثورة هائلة في التقانات الإحيائية وجعلت التنبؤ قائما باستحداث طرائق أخرى في هذا المجال. اذ تستند هذه التقانة على مضاعفة أي جزء من الدنا مهما كان صغيرا خارج الجسم الحي *in vitro* بوجود انزيم بلمرة الدنا DNA Polymerase وبادئات Primers (25). الهدف من البحث التعرف على مدى انتشار فايروس تقزم واصفرار الشعير وسلالاته بالعراق لندرة الدراسات

التشخيصية للفايروس الذي يعتبر من اخطر الفايروسات على محاصيل الحبوب في العالم والتعرف على افضل التقنيات الحديثة في التشخيص.

المواد والطرائق

جمع العينات: جمعت عينات من مناطق مختلفة من حقول الشعير المنتشرة في العراق وشمل الجمع ثلاث مناطق رئيسية، المنطقة الشمالية (نينوى، اربيل والسليمانية) والمنطقة الوسطى (بغداد وديالى والكوت والنجف) وشمل الجمع نوعيين من العينات، عشوائية بواقع 50 عينة لكل حقل وعينات مستهدفة ظهرت عليها اعراض تشبه اعراض الإصابة بفايروس BYDV وبواقع 20 عينة من كل حقل، وضعت العينات العشوائية في اكياس بلاستيكية وثبت عليها مكان وتاريخ الجمع وحفظت في حافظات مبردة لحين ايصالها الى المختبر حيث حفظت بعد ذلك بدرجة حرارة -20°م لحين اجراء الفص السيرولوجي عليها. اما العينات التي ظهرت عليها اعراض مرضية فقد قلعت مع مجموعتها الجذرية وزرعت في أصص بلاستيكية بقطر 20 سم وارتفاع 30 سم ثم نقلت إلى أقفاص خشبية محاطة بطبقتين من الململ موضوعة داخل الظلة الخشبية.

تشخيص الفايروس باختبار اليزا وتحديد سلالاته:

ستخلصت عصارة النباتات التي جمعت من المحافظات المشمولة بالدراسة بسحق 1 غم من اوراق النباتات في هاون خزفي مع 5 مل من محلول الاستخلاص العام General extraction buffer مجهز من شركة Agdia اعتمدت تقنية اختبار اليزا المصلي غير المباشر Triple antibody (TAS) sandwich والتي هي طريقة محورة للطريقة التي وصفها (9) في تشخيص فايروس تقزم واصفرار الشعير ولجميع العينات سواء التي جمعت بصورة عشوائية او تلك التي ظهرت عليها اعراض إصابة وباستخدام مصل مضادة متعددة النسيلة مجهزة من قبل شركة Agdia واجري الفحص طبقا لتعليمات الشركة المجهزة فحصت العينات التي اعطت تفاعلاً موجباً في الاختبار السابق باستخدام مصل مضادة وحيدة النسيلة موجه ضد السلالات PAV و MAV و RPV واستخدمت التقنية نفسها السابقة الذكر للكشف عن تلك السلالات دونت النتائج باستخدام قارئ اطباق اليزا.

2- تغليف اطباق اليزا بالاجسام المضادة للفايروس: اضيف 100 مايكروليتر من مخفف الاجسام المضادة لفايروس تقزم واصفرار الشعير الى انابيب ال PCR وحضنت لمدة 4 ساعات على درجة حرارة الغرفة في حاوية بلاستيكية حافظة للرطوبة.

3- اضافة العينات: غسلت انابيب ال PCR- المحضنة سابقا بمحلول 1x PBST (Phosphate buffer saline) Tween مرتين عن طريق املاء الانابيب بالمحلول وتقريغها بسرعة جففت الانابيب للتخلص من بقايا المحلول عن طريق استعمال ورق التنشيف، اضيف 100 مايكروليتر من مستخلص العينات الى كل انبوبة من انابيب ال PCR ووضعت الانابيب في حاوية حافظة للرطوبة وحضنت في الثلاجة على درجة حرارة 4°م لفترة 18 ساعة.

4- غسل الانابيب: غسلت الانابيب كما في الخطوة السابقة ثم وضع مزيج تفاعل RT-PCR الى الانابيب وعرضت الانابيب الى درجة حرارة 80 درجة سليزية لتحطيم الغلاف البروتيني والسماح للحامض النووي بالتححرر ثم عرض الخليط الى عملية تبريد سريع بعد ذلك وضعت الانابيب في جهاز البلمرة الحراري باستعمال برنامج الطريقة السابقة نفسها (27).

النتائج والمناقشة

تشخيص فايروس تقزم واصفرار الشعير BYDV باعتماد تقنية اختبار اليزا

أظهرت نتائج الفحص السيرولوجي باعتماد تقنية اختبار اليزا وجود و انتشار فايروس BYDV في جميع المحافظات التي شملتها الدراسة (بغداد و نينوى و اربيل و سلیمانیه و النجف و واسط) اذ تراوحت نسبة الاصابة بين 8-30% و لوحظت اعلى نسبة اصابة في محافظة الموصل اذ بلغت 30% تلتها محافظة بغداد بنسبة اصابة 26% وكانت اقل نسبة اصابة في المحافظات الجنوبية اذ بلغت نسبة الاصابة 8% و 10% في محافظتي النجف و واسط على التتابع جدول (1).

تشخيص سلالات الفايروس باعتماد تقنية اختبار اليزا: اظهرت نتائج الفحص السيرولوجي باعتماد تقنية اختبار اليزا وباستعمال مصول مضادة وحيدة النسلة وجود سلالات الفايروس الثلاث وفي جميع المحافظات التي شملتها الدراسة جدول (2). و كانت السلالة PAV اكثر السلالات انتشارا اذ كانت النسبة المئوية لوجودها في العينات المصابة والتي

التشخيص باستخدام الطرائق المعتمدة على PCR: تم اعتماد تقنية RT-PCR في تشخيص الفايروس وبطريقتين طريقة استخلاص الحامض النووي الرايبوي (RNA) الكلي من النباتات المصابة Total Ribonucleic acid extraction و طريقة Immunocapture Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (IC-RT- PCR) باستخدام اختبار اليزا لتوفير قالب من الحامض النووي الفايروسي. انتخبت السلالة الاكثر وجوداً في الحقول و جرى استخلاص الحامض النووي الفايروسي لها باستخدام عدة استخلاص مجهزة من شركة BIONEER واستخدم مباشرة في تفاعلات PCR وحسب تعليمات الشركة المجهزة. استخدمت تقنية الاستنساخ العكسي (RT) Reverse transcription في تصنيع شريط مكمل cDNA من الحامض النووي الفايروسي (RNA) باستخدام عدة خاصة مجهزة من شركة BIONEER (Accu Power Rocketscript RT-PCR) (Premix وحسب تعليمات الشركة المجهزة وكما يأتي: مزج 2 مايكروليتر من البادئ المتخصص (TGTGTCTGG CTTTGTGATGCT)C1F1 (GAGTGCGATAGG GGCTGTT)C1R2 (8) مع 3 مايكروليتر من الحامض النووي الفايروسي الذي تم تنقيته في الفقرة السابقة بتركيز 50 نانوغرام اضيف المزيج الى مكونات خليط التفاعل الرئيس ثم اكمل الحجم الى 20 مايكروليتر بالماء المقطر المعقم مزجت المحتويات جيداً ثم وضعت في جهاز البلمرة الحراري على وفق البرنامج الاتي:

step	Temperature	time	cycles
cDNA synthesis	70°C	10 min	1
Pre-denaturation	95°C	2 min	1
Denaturation	95°C	30 sec	40
Annealing	60°C	30 sec	
extension	72°C	30 sec	
Final extension	72°C	7 min	1

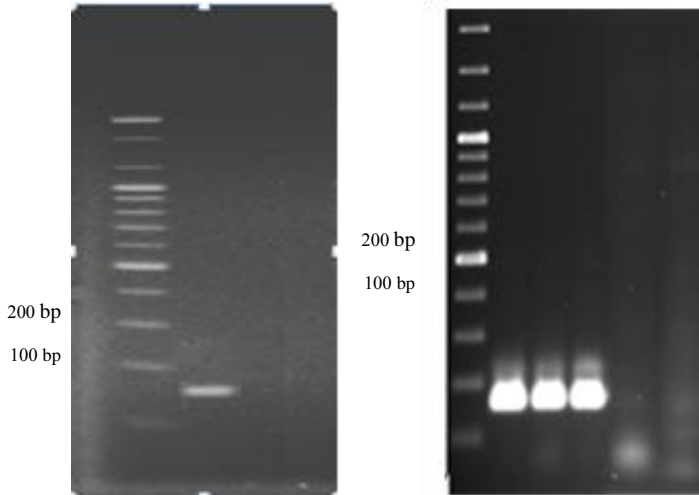
حضر هلام الاكروز بتركيز 1.5% حملت العينة الناتجة من التفاعل السابق في الحفر مع الدليل الحجمي ولمدة 2-3 ساعة صبغ الهلام بصبغة بروميد الاثيديوم وفحص تحت الاشعة فوق البنفسجية UV-light صور الهلام باستخدام جهاز تصوير الهلام.

تقنية (IC-RT-RCR):

1- استخلاص العصارة النباتية: استخلصت عصارة نباتات الشعير التي سبق واطهرت تفاعلاً موجياً في اختبار اليزا بطريقة الاستخلاص نفسها عند الكشف عن الفايروس.

التشخيص بالاعتماد على تقنية RT-PCR:

انتج زوج البادئات المستخدم في هذه الدراسة C1F1 و C1R2 حمزة مفردة ذات وزن جزيئي 156 زوجاً قاعدياً في كلا الطريقتين المتبعة في الكشف عن الفايروس وظهرت طريقة Immunocapture RT-PCR فعالية اكبر في الكشف عن الفايروس من طريقة استخلاص الحامض النووي الفيروسي (شكل 1).



(ب) (أ)

شكل 1. الترحيل الكهربائي لنواتج تضخيم الحامض النووي

الفيروسي للسلالة PAV باستعمال تقنية RT-PCR.

أ- طريقة IC-RT-PCR. 1, 2, 3 عينات مصابة بالسلالة PAV 5, 4 عينات سليمة.

ب- طريقة استخلاص الحامض النووي الكلي. 1 عينة مصابة بالسلالة PAV 3, 2 عينات سليمة

من ملاحظة نتائج الكشف عن الفايروس وسلالاته في العراق يتضح لنا انتشار هذا الفايروس وبفارق كبيرة عن الدراسات السابقة إذ بلغت نسبة الاصابة بالفايروس 16.57% في جميع المحافظات المدروسة وتفوقت محافظة نينوى على جميع المحافظات بنسبة اصابة 30% وهي نسبة عالية قياساً بالدراسات السابقة إذ ذكر (12) ان نسبة الاصابة بالفايروس في المناطق الوسطى والشمالية بلغت 1% وبين (2) ان نسبة الاصابة بالفايروس في كلا النوعين (العشوائية و المتحيزة) من العينات في جميع محافظات العراق بلغت (17.5 و 24%) و (11.5 و 14.4%) لمحصولي الحنطة والشعير وللموسمين 2002-2003 و 2003-2004 على

جمعت بصورة عشوائية من الحقول 75% في حين كانت النسبة المئوية لوجود السلالتين MAV و RPV 5.17% و 18.96% على التوالي.

جدول 1. النسبة المئوية للاصابة بسلالات فايروس تقزم واصفرار الشعير في المحافظات المدروسة.

مناطق جمع العينات	طريقة جمع العينات	عدد العينات المفحوصة	عدد العينات المصابة	النسبة المئوية للاصابة %
الموصل	عشوائية	50	15	30
	متحيزة	20	12	60
اربيل	عشوائية	50	8	16
	متحيزة	20	10	50
سليمانية	عشوائية	50	6	12
	متحيزة	20	7	35
بغداد	عشوائية	50	13	26
	متحيزة	20	9	45
ديالى	عشوائية	50	7	14
	متحيزة	20	7	35
الكوت	عشوائية	50	5	10
	متحيزة	20	5	25
النجف	عشوائية	50	4	8
	متحيزة	20	6	30
المجموع	عشوائية	350	58	16.57
	متحيزة	140	56	40.0

جدول 2. النسبة المئوية للاصابة بسلالات فايروس تقزم واصفرار الشعير في العينات.

نوع العينات	عشوائية	متحيزة	المجموع
عدد العينات الكلي	350	140	490
عدد العينات المصابة	58	56	114
عدد العينات المصابة بالسلالة PAV	44	42	86
نسبة الاصابة بالسلالة PAV	75.86%	75%	75.43%
عدد العينات المصابة بالسلالة MAV	3	2	5
نسبة الاصابة بالسلالة MAV	5.17%	3.57%	4.38%
عدد العينات المصابة بالسلالة RPV	11	12	23
نسبة الاصابة بالسلالة RPV	18.96%	21.42%	20.17%

ويلاحظ في كلا الحالتين (العينات العشوائية والعينات المتحيزة) سيادة السلالة PAV على السلالتين الاخريتين إذ بلغت نسبة وجودها 75.43% من مجموع العينات المصابة MAV بنسبة وجود 4.38%.

بغياح المحصول ولاسيما الذرة الصفراء التي تعقب زراعة الحنطة والشعير في نهاية الربيع والعكس يحدث في بداية الخريف اذ ينتقل الفايروس من الذرة الصفراء الى محصولي الحنطة والشعير فضلاً عن نمو نباتات الادغال نوات الفلقة الواحدة التي تكون مصدراً للإصابة الأولية للفايروس (20). ان الزراعة المبكرة لمحصولي الحنطة والشعير في المناطق الوسطى عنه في المناطق الشمالية تهيئ ظروفاً جويةً ملائمةً لانتاج مستعمرات كبيرة من حشرات المن الحاملة للفايروس وبالتالي حدوث إصابة مبكرة للنباتات وانتشارها بالحقل (15 و 23). اما انخفاض نسبة الإصابة بالمحافظات الجنوبية فيعود الى قلة المساحة المزروعة بالمقارنة مع المحافظات الشمالية وقلّة نسبة الإصابة بالدول المجاورة مثل ايران والسعودية (13). كذلك فان الاجواء الحارة والجافة تعيق من نشاط وتكاثر حشرات المن الناقلة للفايروس. اشارت النتائج انتشار السلالة PAV بصورة كبيرة في جميع المحافظات المدروسة اذ بلغت نسبة الإصابة بها في العينات العشوائية من مجموع الاصابات 75.43% بالمقارنة مع السلالتين الاخرتين RPV و MAV اللتان بلغ نسبة الإصابة بهما 20.17 و 4.38% على التتابع وتعد هذه النتيجة غير مفاجئة نظراً لانتشار هذه السلالة في جميع انحاء العالم (11) وفي ايران اشار (4) الى ان السلالة الاكثر انتشاراً هي السلالة PAV و ذكر (3) ان السلالة PAV هي السلالة السائدة في مصر و اشار (21) و (5) ان السلالة PAV الاكثر انتشاراً في دول الشرق الاوسط (الاردن وسوريا) ودول المغرب العربي (تونس، الجزائر والمغرب). من الاسباب الاخرى التي ادت الى انتشار السلالة PAV هو انتقالها باكثر من نوع من انواع حشرات المن وبكفاءة عالية (7).

التشخيص بالاعتماد على تقنية PCR:

اشارت النتائج من خلال ملاحظة (الشكل 1) الى كفاءة تقنية IC-RT-PCR في الكشف عن الفايروس من خلال ملاحظة حجم ودرجة وضوح الحزم التي ظهرت، اذ توفر هذه التقنية حساسية ودقة عالية في الكشف عن الاصابات الفايروسية في الانسجة النباتية التي يكون فيها تركيز الفايروس منخفض والتي تحتوي عصيرها الخام على مثبطات فايروسية (27). فعند اجراء تنقية للفايروس فان الكثير من الحامض النووي الفايروسي يفقد في اثناء عملية الاستخلاص لذلك ربما يعطي

التتابع وهذا الانتشار قد يعزى الى عدم اتخاذ اي وسائل او طرق فعالة لمقاومة المرض نظراً لصعوبة تشخيص المرض من المزارعين اذ تتشابه اعراض المرض كثيراً مع اعراض اخرى كنفص العناصر والاصابات الفطرية والبكتيرية كما ان عدداً من العوائل لهذا الفايروس ومن ضمنها المحاصيل الاقتصادية لا تظهر عليها اعراض الإصابة على الرغم من اصابتها وكذلك تأخر ظهور الاعراض بعد الإصابة بالحشرات الناقلة من اسبوعين الى ثلاثة اسابيع لا يمكن المزارعين من التعرف على الإصابة على الرغم من مكافحة الحشرة الناقلة (26) فضلاً عن المدى العائلي الواسع لهذا الفايروس اذ اكدت المصادر انه يصيب جميع محاصيل الحبوب وعدد كبير من نباتات الادغال (18). ان النسبة العالية للإصابة في محافظة نينوى تعود الى الزراعة الواسعة لمحصولي الحنطة والشعير فضلاً عن الزراعة الموحدة اذ انها تزيد من نسبة الإصابة وانتشار المرض (1). كذلك فان حقول الزراعة بالموصل تكون قريبة الى حقول الدول المجاورة التي ينتشر بها المرض مثل سوريا وبوجود الحشرة الناقلة ادى الى زيادة نسبة الإصابة بهذا الفايروس في تلك المحافظة، اما انخفاض نسبة الإصابة نسبياً في محافظتي اربيل والسليمانية عنه في محافظة نينوى فقد يعود الى الجو البارد مقارنة بمحافظة نينوى اذ ان انخفاض درجة الحرارة يقلل من نشاط حشرات المن ومن ثم انخفاض نسبة الإصابة فضلاً عن وجود العوائق الطبيعية التي تفصل بين تلك المحافظات والدول المجاورة مثل ايران (22) قلل من انتشار الفايروس فضلاً عن ان نسبة الإصابة في ايران منخفضة (4). كما ان زيادة معدلات سقوط الأمطار وتقارب مدد هطولها في محافظتي السليمانية واربيل مقارنة بمحافظة نينوى مما يؤدي إلى حدوث عمليات جرف أو غسيل لحشرات المن الناقلة للفايروس من على النباتات وانخفاض اعدادها القابلة لنقل المرض الأمر الذي يؤدي إلى اختزال نسبة الإصابة إلى معدلات متدنية، وهذا التفسير ينسجم مع ما اشار اليه (10) حول جرف الأمطار الغزيرة المتقاربة الهطول لحشرات المن إلى برك ماء صغيرة في الحقل مما يزيد من الخطأ التجريبي عند محاولة قياس الكثافة الحشرية ونسبة الإصابة بالفايروس. اما ارتفاع نسبة الإصابة في محافظة بغداد وديالى فقد تعود بصورة رئيسة الى وجود العوائل الثانوية التي تؤوي الفايروس

4. Ali, M., R. Gholam., and H. Gholam. 2013. Efficiency of ten populations of *Schizaphis graminum* (Rondani) in the transmission of barley yellow dwarf virus-PAV (BYDV-PAV) in Iran. African Journal of Plant Science Vol. 7(3) : 118-123.
5. Andret-Link, P., and M. Fuchs. 2005. Transmission specificity of plant viruses by vector. Journal of Plant Pathology. 87(3): 153-165.
- 6 Bawden, R .2000. Barley Yellow dwarf virus. Kansas state univ. extension special list plant pathology, Report: 1-4.
7. Boovaraghan, B., B. Dennis., and M.A Joseph. 2003. Barley yellow dwarf virus and Cereal yellow dwarf virus quantification by Real-Time polymerase chain reaction in resistant and susceptible plant. Phytopatho. 93(11): 1386-1392.
- 8 Chomic, A., M. Pearson., G. Clover., K. Farreyrol., D. Saul., J. Hampton Armstrong. 2010. A generic RT-PCR assay for the detection of Luteoviridae. Plant Pathology 59:429-442.
- 9 Clark, M. and A. Adams .1977. Characteristics of micro plate method of enzyme linked immune sorbent assay for the detection of plant viruses. J.Gen Virol.34:475-485.
10. Comeau, A., J. Conin, and F. cheour. 1992. BYDV symptoms and Elisa data in relation to biomass and yield loss. In: Comeau,A. and Makkouk,k. BYDV in west Asia and north Africa. Sayce publishing, Exeter, UK.p:155-168.
11. D'Arcy, C.J. 1995. Symptomatology and host range of barley yellow dwarf. Pages 9-28 in: Barley yellow dwarf: Forty years of progress. C.J. D'Arcy and P.A. Burnett, eds. APS Press, St. Paul.
12. El-muadhidi, M., M. Khaled., G. Safaa, J. Myasser., S. Salou., R. Raed and T. Feras.2001. Survey for legume and cereal viruses in Iraq. Phytopathol.Mediterr. 40: 224–33.
- 13 El-Zoubi, M., A. Almosa, and M. Skaria. 1992. Studies on BYDV in cereal crop in Jordan. In: Comeau,a and Makkouk,k. (eds) .BYDV in west Asia and north Africa. Sayce publishing, exeter, UK .p:91-102.
14. Gawande, S. J., A. Shukla., V.P. Chimote., N. Kaushal., P. Kaundal., I.D. Garg., and

الفحص نتيجة سالبة على الرغم من وجود الفايروس. تعتبر تقنية IC-RT-PCR من التقنيات الهجينة اي تجمع بين تقنيتين الاولى تقنية اليزا المصلي التي توفر قالب من الحامض النووي الفايروسي لعملية التضخيم التي سوف تحدث لاحقا بالتقنية الثانية RT-PCR. ان استخدام تقنية IC-RT-PCR سوف يوفر الجهد والوقت الذي سوف يبذل في تقنية الحامض النووي الكلي من النباتات المصابة اضافة الى عدم الحاجة الى كميات كبيرة من الانسجة النباتية المصابة في سبيل الحصول على تراكيز مناسبة من الحامض النووي الفايروسي (16). ولدقتها العالية وتكاليفها المعقولة فقد اخذت محل الطرق الاخرى في كثير عمليات تشخيص الامراض الفايروسية فقد ذكر (19) ان ستة من نباتات (المنيهوت) Cassava وهي نباتات توكل جذورها في امريكا الجنوبية من مجموع 35 نبات ظهرت تحوي على فايروس Cassava comman mosaic virus (CsCMV) عند فحصها بتقنية IC-RT-PCR سبق وان اعطت تفاعلا ساليا عند فحصها بتقنية اختبار اليزا. وذكر (14) ان تقنية IC-RT-PCR تفوقت على تقنيتي اليزا و RT-PCR من حيث الدقة والحساسية في الكشف عن فايروس واي البطاطا Potato virus Y (PVY) في العصير النباتي المصاب فقد بلغ تركيز الفايروس الذي يمكن لتقنية IC-RT-PCR الكشف عنه 1pg مخفف 5 مرات 10^{-5} و بلغ اقل تركيز للفايروس يمكن لاختبار RT-PCR الكشف عنه 1pg ولكن مخفف 4 مرات 10^{-4} في حين بلغ اقل تركيز للفايروس يمكن لاختبار اليزا الكشف عن الفايروس 10ng مخفف مرتان 10^{-2} .

REFERENCES

1. Jarjees, M. M., R.A. Al-ani., A. A. Al-hiti. 1990. Plant pathology. Dar al-Hikma for Printing and Publishing.569 pp.
2. Al-fahad, M. A. 2006. Studies diagnostic, econ - omically consequence and resistance for barley yellow dwarf virus BYDV Luteovirus (Luteo - viridae) on wheat and barley crops in Iraq. Doctoral thesis, collage of agriculture. Baghdad Uni. 180pp.
3. Aboul-Ata, A.E., G. Anfoka., M. Zeidan., H. Czosnck., , R.H. Smith. 2010. Diagnosis of cereal viruses in the Middle East. International Journal of virology.6 (3):126-137.

21. Li, J., W. Maosen., Z. wenwei., , X. Hong., and C. Zuomin. 2001. Construction of plant expression vectors and wheat genetic transformation with BYDV single and double coat protein genes .J of agricultural Biotech - nology.9(2):23-27
22. Mamluk, O., L. Cetin., H. Braun, N. Bolat., L. Bertschinger., , K. Makkouk., A. Yildirim., E. Sarri., N. Zencirci., S. Albustan., S. cali., S Beniwal., and F. Dusunceli. 1997. Current status of wheat and barley diseases in the central Anatolian plateau of Turkey. *Phytopathology.Medit* .36-167-181
23. Marki, S. 2001. Pest management plant disease – BYDV Manitoba agriculture soil and groups branch. *Short communication*. 1:1-2
24. Miller, W. A., S.J. Liu., R. Beckett .2002. Barley yellow dwarf virus:Luteoviridae or Tombusviridae? *Molecular plantPathology*. 3 (4):177-183.
25. Mohan, M. 1991. RFLP in plant breeding Workshop handbook. International center of genetic engineering and biotechnology, New Delhi.
26. Report on plant disease .1989. Barley yellow dwarf virus disease of small grain. University of Illinois extension. college of agriculture, consumer and environmental sciences. RPD No.101.
27. Vincent, M. 2009. Immunocapture PCR for pant viruses detection. *Plant pathology*.508:1-13.
- K.P. Chimote. 2011. Development of pcr-based techniques for the detection of immobilized potato virus y virions. *Journal of Plant Pathology* . 93 : 127-132.
15. Hagan, A., p. Mask., and R.Gudauskas. 2002. Wheat disease. Auburn Alabama Univ. publication ANR-543.
- 16 Haggag, S., M. Zein., H. Hussein., H. A. Hussein., and M. Kazutaka .2008. The utilization of monoclonal antibodies in immunocapture RT-PCR and dot blotting immunobinding assays for the detection of Cucumber mosaic virus. *Arab J. Biotech*. 11:95-106.
17. Harlan, J. R. 1979. Barley. In Simmonds NW (eds.) *Evolution of crop plant*, P.93-98, Longman Inc., New York.
18. Huth, W. 2000. Viruses of Gramineae in Germany – a short over view. *Journal of pant diseases and protection*.107, 406–414.
19. Jaqueline, M., R. C. Patrícia., B. Taise., U. F. Cassiele., H.S. Marcelo., R. S. Eliezer., J.B. Arildo., M.R. Álvaro .2011. Immunocapture RT-PCR detection of *Cassava common mosaic virus* in cassava obtained from meristem-tip culture in Paraná state. *Tropical plant pathology*, vol.36, 5: 271-275.
20. Juliet, M., and R. Arash. 2014. barley yellow dwarf virus in Idaho cereal crops. University of Idaho extension. Publication CIS-1210.