

## المحاضرة رقم (1)

### نشأة وتاريخ علم الفايروسات النباتية

نشأ علم الفايروسات Plant Virology بجهد أنساني خلاق ومتواصل واقترن تطوره كغيره من العلوم التطبيقية بالتقانات المتيسرة لدراسة الفايروسات، وتأخرت ولادة هذا العلم لغاية نهاية القرن التاسع عشر رغم أن الأمراض الفايروسية النباتية منتشرة منذ عهود سحيقة وحفظت لنا السجلات التاريخية العديد من الوثائق المكتوبة والمصورة التي دلت على وجود تلك الأمراض فقد وصف " كلوسياس" Closius سنة 1576 أزهار التيوليب المصابة بأعراض "الإنفصال اللوني" Color breaking وهو مرض فايروسي معروف الآن ويسببه فايروس الإنفصال اللوني للتيوليب (TBV) الذي يعود للجنس *Potyvirus* ويسبب أعراض تبرقش على بتلات الأزهار ويجعلها مخططة باللونين الأحمر والأصفر مما يكسبها جمالا إضافيا لذلك تدافع المعجبون لاقتنائها وقتئذ بمبالغ طائلة في أوروبا، وقد رسم الفنان " بوشار" Boschaert سنة 1619 لوحة زيتية رائعة اسمها " باقة أزهار" Bouquet of flowers تظهر جمالية أزهار التيوليب المصابة واللوحة محفوظة الآن في متحف " ركس" Rinks في أمستردام ، (الشكلين 1-1 و 2-1) وأصبح هذا المرض في القرن السابع عشر ظاهرة سميت Tulipmania وسبب خسائر كبيرة للمزارعين مما أثر في الاقتصاديين الألماني والهولندي بسبب اعتمادهما على إنتاج تلك الأزهار وعرف مربو التيوليب الألمان بان هذا المرض ينتقل إلى الأبطال السليمة بإجراء عملية تركيب بين بصلة مصابة وأخرى سليمة إذ نشر "بيلاجريف" Belgrave وصفا لذلك وربما تكون هي إحدى أولى المحاولات للنقل الخضري لفايروسات النبات، كذلك عرفت الأمراض التي تصيب البطاطا والتي انتشرت في أوروبا في سنة 1765 وسببت تدهورا في إنتاجية هذا المحصول مما أدى إلى ترك المزارعين لزراعته لمدة عشر سنوات من انتشاره ونشرت حينها العديد من المقالات في وصفه وأطلقت عليه تسميات عديدة منها التدهور Degradation والضعف الإنتاجي Running-out والشيخوخة Senility، ونشر "أندرسون" Anderson سنة 1778 نتائج دراسته لهذه الأعراض ذاكرة بان الدرنات المأخوذة من نباتات مصابة تعطي نباتات مصابة وان البطاطا المزروعة في جنوب بريطانيا كانت أسوأ من تلك التي زرعت في الشمال وذلك بسبب انتشار حشرات المن في الجنوب أكثر من انتشارها في الشمال وان المرض هو معدي واوصى بمكافحته عن طريق إتلاف النباتات المصابة.



الشكل (1-1): الصورة الزيتية التي رسمها الرسام بوشار " Boschaert سنة 1619 والتي اسماها " باقة أزهار " Bouquet of flowers ووثق فيها إصابة أزهار التبوليب بالفايروس وهي المؤشرة بالسهم.

الشكل مقتبس من Gibbs و Harrison (1980).



الشكل (2-1): زهرة التيوليب المصابة بمرض الانفصال اللوني.

بدأ علم فايروسات النبات بدايته الحقيقية بالبحث الذي نشره "ماير" Mayer سنة 1885 (الشكل 1-3) عن مرض موزائيك التبغ الذي انتشر على محصول التبغ في ألمانيا وسبب خسائر كبيرة للمزارعين وهو الذي أطلق لأول مرة مصطلح "موزائيك" Mosaic على تلك الأعراض (بالترجمة الألمانية Mosaik Krankheit) واستمرت دراسته لخمس سنوات وكانت أهم نتائجه هي إمكانية نقل مسبب المرض من النباتات المصابة إلى السليمة بسحب عصير الأوراق المصابة بأنابيب شعرية زجاجية معقمة وحقتها في العرق الوسطي للأوراق السليمة وبذلك اثبت أن المسبب المرضي هو عامل معدي قابل للانتقال Transmissible agent لكنه اخطأ في التفسير إذ اعتبره نوعا من البكتريا الصغيرة الحجم كما وجد أن عصير النبات المصاب فقد قدرته المعدية عند ترشيحه خلال طبقة مزدوجة من ورق الترشيح وكذلك عند تسخينه لبضع ساعات عند 80 م ونفى أن يكون المسبب نوعا من الفطريات لعدم إمكانية عبوره خلال ورق الترشيح، ثم أعقبه الروسي "إيفانوفسكي" Ivanovsky الذي عمل على ذات المرض ونشر بحثه سنة 1892 بعد تكليفه من الحكومة الروسية بدراسته بسبب الخسائر التي سببها على محصول التبغ في منطقة القرم Crimea في روسيا وكرر تجارب ماير وأيده في إمكانية نقل المسبب وتلفه بالحرارة وتوصل لنتائج جديدة أهمها أن العصير لا يفقد قدرته المعدية بعد ترشيحه خلال طبقة مزدوجة من ورق الترشيح وانه بقي محتفظا بقدرته المعدية بعد ترشيحه بواسطة مرشح شامبرلانند Chamberland filter candle الذي يمنع مرور أي نوع من البكتريا ولهذا السبب سميت الفايروسات سابقا "الرواشح"

**Filterable agents** ولكنه اخطأ في التفسير وذكر أن المسبب هو نوع من السموم البكتيرية أو نوع صغير جدا من البكتريا التي عبرت هذا النوع من المرشحات، وعمل الباحث الهولندي " بايرنك" Beijerinck (الشكل 1-3) على المرض ذاته ونشر بحثه سنة 1898 والذي ضم نتائج هامة وهي احتفاظ عصير النبات المصاب بقدرته المعدية بعد ترشيحه بمرشحات خزفية **Porcelain filters** إذ بقي الراشح معقما ولم تنمو فيه أية فطريات أو بكتريا وفشل في عزل أي نوع من أنواع البكتريا من ذلك العصير ثم اختبر قابلية انتشار العصير في ثقب الاكار واستنتج بان المسبب المرضي لا يمكن أن يكون كائنا مجهريا خلويا لان ثقب الاكار لا تسمح له بالانتشار لذلك أطلق مصطلح " السائل الحي المعدي " **Contagium vivum fluidum** على هذا المسبب ثم استعمل كلمة "فايروس" **Virus** لتمييزه عن بقية الكائنات الطفيلية، علما بان العالم "باستور" هو أول من أطلق كلمة فايروس سنة 1892، واثبت بايرنك بان هذا المسبب ينتقل بالأوعية الناقلة للنبات وبالتركيب كما اثبت تكاثره في النباتات المصابة وذلك من خلال التلقيح المتوالي **Serial transmission** لمجموعة متتالية من النباتات ووجد أن المسبب بقي محتفظا بقدرته المعدية حتى بعد تجفيف أوراق التبغ المصابة لمدة سنتين وكذلك في التربة الملوثة لنفس المدة ولكنه فقد قدرته المعدية بعد معاملته بالفورمالين وبالغليان ونفى أن يكون المسبب أي نوع من البكتريا، وهكذا فتحت البحوث المذكورة الباب أمام مزيد من الدراسات التي أرست دعائم هذا العلم فقد توالى الدراسات التي ركزت على الأعراض المرضية وطرق نقل هذا المسبب، وتم وصف المزيد من الأمراض الفايروسية النباتية خلال العقود الثلاثة الأولى من القرن العشرين ودراسة علاقتها مع الناقلات الحشرية، وكذلك أجريت دراسات لمعرفة شكل هذا الكائن باستعمال الأشعة السينية **X-Ray** وبعض التقانات الضوئية، كما تناولت الدراسات المدى العائلي للفايروسات والعوامل الفيزيائية والكيميائية المؤثرة على فاعليتها.

**المصدر: فايروسات النبات ، أ.د. نبيل عزيز قاسم 2011**

## محاضرة رقم (2)

### نظريات النشوء والتطور

أثارت الفايروسات النباتية والأمراض التي تسببها اهتمام الباحثين بعد الدراسات الرائدة التي أجريت في نهاية القرن التاسع عشر ونتيجة لصغر حجم الفايروسات وعدم إمكانية رؤيتها بالمجاهر الضوئية المتوفرة وقتئذ وكذلك لاستحالة عزلها وتنميتها على بيئات زرعية خارج النسيج النباتي الحي مما يسهل دراستها كالفطريات والبكتيريا، فقد فشل الباحثون في تلك الفترة المبكرة من نشوء علم الفايروسات في معرفة ماهية هذه الكائنات لذلك وضعت العديد من الفرضيات لتفسير ماهية هذا الكائن والتي تأثرت بالمكتشفات الحديثة من الطفيليات وخاصة البكتيريا باعتبارها أصغر الكائنات الدقيقة المكتشفة حينها حيث بحث واضعوا هذه الفرضيات عن تقديم تفسير علمي لأسباب هذه الأمراض بما كان متوفرا عندهم من إمكانات علمية وعملية إلا أن كل هذه الفرضيات سقطت اليوم ولم تعد مقبولة علميا وذلك بعد التقدم العلمي الكبير الذي مر به علم الفايروسات والذي كشف الكثير من أسرار هذا الكائن الغريب.

#### 1.2. الفرضيات السابقة التي وضعت لتفسير ماهية الفايروسات النباتية

وضعت عدة فرضيات لتفسير ماهية فايروسات النبات في بواكير نشوء علم الفايروسات وجميعها لم تعد مقبولة اليوم وهي (1) الفرضية الإنزيمية وهي التي اقترحها "ود" Wood سنة 1899 مقترضا أن الفايروس هو إنزيم غريب يفرزه طفيل ما وبنى فرضيته استنادا على ملاحظته بزيادة كمية الإنزيمات المؤكسدة في خلايا نباتات التبغ المصابة بفايروس موزائيك التبغ (TMV) (2) الفرضية البكتيرية وهي التي تبناها ماير و ايفانوفسكي في نهاية القرن التاسع عشر بعد انجازهما لبحوثهما على فايروس موزائيك التبغ مفترضين أن المرض الذي يسببه هذا الفايروس يعود إلى بكتيريا صغيرة جدا تعبر المرشحات البكتيرية ولا تشاهد بالمجهر الضوئي (3) فرضية البروتوزوا (الحيوان الأولي) والتي اقترحها "ايفانوفسكي" سنة 1903 معتقدا أن الأمراض الفايروسية تسببها أنواع من البروتوزوا نتيجة رؤيته للأجسام الضامة المسماة "الأجسام السينية" X-bodies التي شاهدها بالمجهر الضوئي في الخلايا المصابة بفايروس موزائيك التبغ واعتقد أنها بروتوزوا (4) فرضية السم الراشح

والتي وضعها "بايرنك" سنة 1899 مقترضا أن المسبب هو مادة سامة غير خلوية دائبة في الماء تعبر المرشحات البكتيرية أطلق عليها مصطلح "السائل الحي المعدي" *Contagium vivum fluidum* أو "السم الراشح" Filterable virus

(5) الفرضية الفسلجية والتي وضعها "داجر و كارير" Duggar & Karrer سنة 1921 مقترضين أن المسبب هو مادة كيميائية ايضية نباتية ناتجة عن اختلال فسلجي في خلايا النبات المريضة.

#### 2.2. نشوء الفايروسات

أثار أصل الفيروسات وتطورها النشوي Evolutionary development (يستعمل أيضا مصطلح Phylogeny) جدلا واسعا لدى الباحثين وذلك لعدم وجود أدلة مادية ملموسة عنها وهي الأحافير أو المتحجرات Fossils كما هو الحال مع الكائنات الأخرى حيث أن الأحافير هي السجلات التاريخية المحفوظة في الأرض لأجساد الكائنات والتي تدل على كيفية تطور الكائنات الحية، ولإزالة أصل الفيروسات لغزا أمام الباحثين لذلك وضعت عدة فرضيات تفسر نشوء وتطور الفيروسات إلا أن كل هذه الفرضيات هي تكهنات غير مستندة على أدلة علمية دامغة بل على ملاحظات في التشابه التركيبي لمكونات الفيروسات مع بعض المكونات الخلوية والتماثل النسبي في آليات التضاعف والنشاط الحيوي للفيروسات مع بعض الآليات الخلوية، وفيما يلي وصف لهذه الفرضيات الثلاثة.

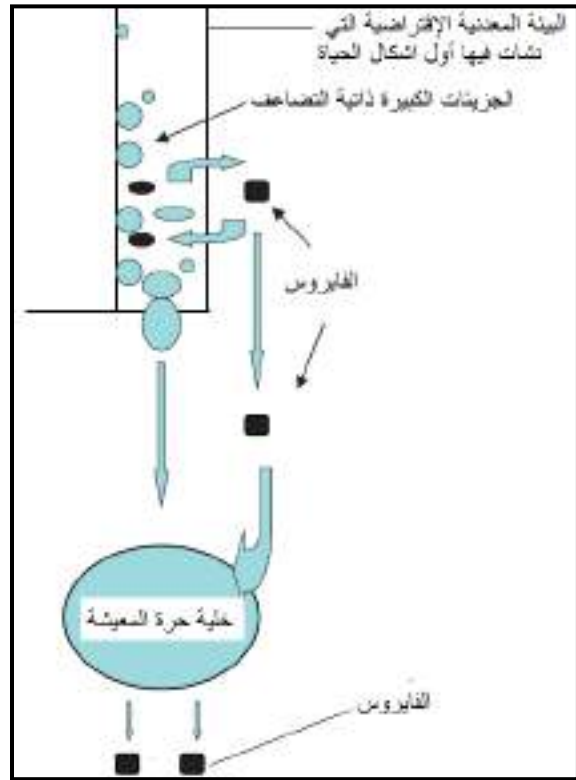
### 1.2.2. فرضية استقلالية الفيروسات

تفترض هذه الفرضية بان الفيروسات ظهرت كجزيئات رايبية RNA molecules وجدت قبل نشوء الخلايا على سطح الأرض أي في فترة العالم قبل الخلوي Precellular world، حيث يعتقد انه قبل ظهور الخلايا البدائية كانت هناك مرحلة حدث فيها تطور للمواد غير الحية إلى جزيئات عضوية و بروتينات وأحماض نووية رايبية وهذا يعني ظهور الجزيئات الرايبية قبل الخلايا الأولية، وامتلكت هذه الجزيئات قابلية التضاعف الذاتي Self-replication، واقتُرحت هذه الفرضية أن الحياة نشأت وتطورت في بيئة معدنية توفرت فيها ظروف خاصة من جو دافئ ورطوبة مهدت لنشوء الحياة وبذلك ظهر الحامض النووي الرايبي RNA السلفي للفيروسات والذي تطور منه أشكال الحياة وهكذا ووفق هذه الفرضية فان الفيروسات نشأت من تجميع لعناصر أولية معدنية ذاتية التضاعف وربما نشأت الخلايا الأولية بنفس الطريقة أو تطورت من الفيروسات، (الشكل 2-1) كما تفترض هذه الفرضية أن الكائنات الحية لم تنبثق من البكتريا الأولية Primitive bacterium ولكن من "كائن أولي غير خلوي سلفي مشترك" سمي Last Universal Common Ancestor LUCA والذي انفصل عنه الفيروس الأولي، (الشكل 2-2) إلا أن هذه الفرضية يرفضها أغلب المهتمين بنشوء وتطور الحياة فهي ضعيفة الحجة وذلك لأن كل الفيروسات هي متطفلات اجبارية على الخلايا الحية مما يعني حتمية وجود الخلايا قبل الفيروسات.

ويبين الشكل (2-3) أن الخلايا حقيقية النواة قد ظهرت على الأرض في مرحلة متأخرة بعيدة عن مرحلة ظهور الخلايا بدائية النواة المتمثلة بالبكتيريا والاراكيا Arachaea، لذا فان التدرج الزمني التطوري Evolutionary timescale للفيروسات المتطفلة على الخلايا حقيقية النواة هو احدث بكثير من مثيله للفيروسات المتخصصة على الخلايا بدائية النواة.

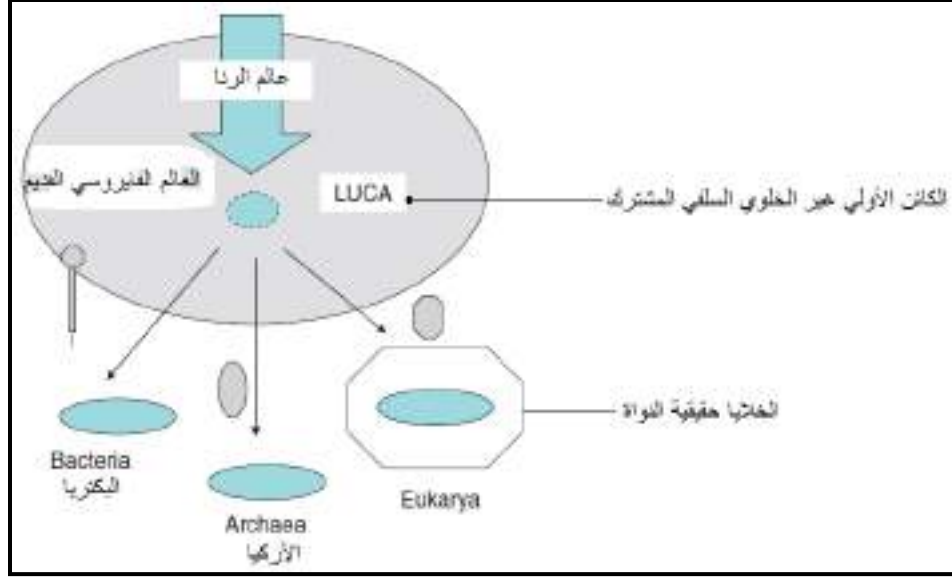
أما الفيروسات المتطفلة على اللبائن الحديثة والطيور فيفترض أنها انحدرت من تلك التي كانت متطفلة على الدياتنوصورات، وبذلك فان هذه الفرضية تفترض أن الفيروسات هي كائنات طفيلية

مستقلة لم تتطور من كائنات عضوية متطفلة لذا فهي تمثل مرحلة هامة من مراحل تطور المادة الحية حيث يعتقد انه في بواكير نشوء الحياة على الأرض وقبل إيجاد الكائنات الخلية ظهر أولا الحامض النووي الرايبى RNA والذي طُوّر بعد ذلك النشاطات الإنزيمية الريبية Ribozymes ثم امتلك قدرة التضاعف الذاتي، وبذلك كانت الفايروسات هي أول الكائنات التي وضعت على عتبة الحياة بشكل جزيئات ريبية والتي تمكنت من التطفل حال ظهور الخلايا ثم اكتسبت جينات غطاؤها البروتيني وبذلك ظهر أول فايروس نباتي بقدرة الخالق البارئ المصور، إن إحدى المفاهيم التي اعتمدت عليها هذه الفرضية هي الصلة الوثيقة القائمة بين الحامض النووي الفايروسي وجينوم العائل حيث يبدوا وكان خلايا العائل تفضل أن يتحكم بها الجينوم الفايروسي بدلا من أن تخضع لأحماضها النووية. إن الإجابة المعتادة عند الباحثين المختصين بالتطور عن السؤال " من أين جاءت الفايروسات ؟ هو : لا نعرف!.



الشكل (1-2): فرضية نشوء الفايروسات والخلايا من البيئة المعدنية ذاتية التضاعف، ثم تطفلها في مرحلة لاحقة على الخلايا حرة المعيشة.

الشكل مقتبس من Roossinck (2008).



الشكل (2-2): فرضية نشوء الحياة من الحامض النووي الرايبوسيمي، ثم نشوء الفايروسات الأولية منه، وكذلك نشوء الكائن الأولي غير الخلوي السلفي (LUCA) الذي نشأت منه الكائنات الخلوية الأولية.

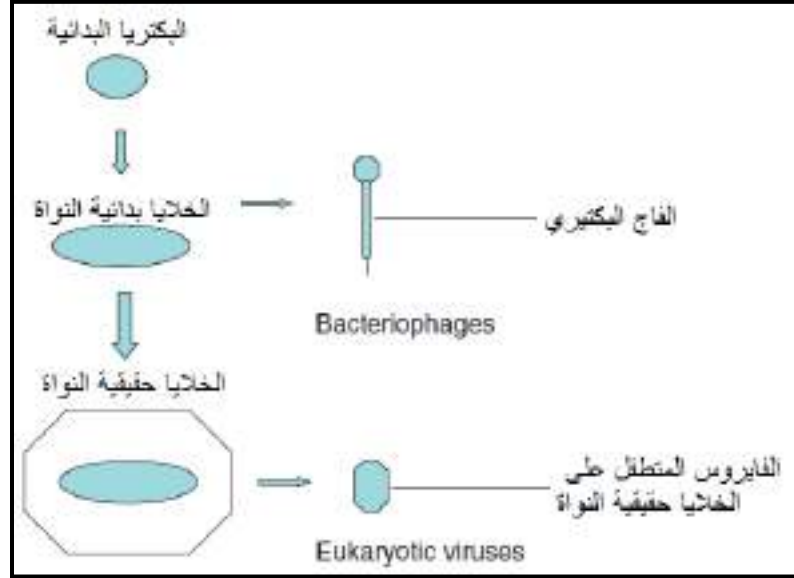
الشكل مقتبس من Roossinck (2008).

### 2.2.2. الفرضية التراجعية أو الاختزالية

هي الفرضية التراجعية Reduction hypothesis التي تفترض ان الفايروسات كانت كائنات خلوية عضوية طفيلية ثم تراجعت نتيجة تطفلها المطلق على العائل لتتخلى عن معظم تراكيبها وتحفظ فقط بالحامض النووي الذي يحمل صفاتها الوراثية مع غطاء يحميه، أي أنها نشأت بتطور تراجعى إختزالي Reductive evolution وبذلك نشأت الفايروسات البكتيرية من جينومات الخلايا بدائية النواة Procaryotes ونشأت بقية الفايروسات ومنها الفايروسات النباتية من جينومات الخلايا حقيقية النواة Eucaryotes، (الشكل 2-3). واعتمدت هذه النظرية على مبدأ أن التطفل الداخلي الخلوي Intracellular parasitism للفايروسات في خلايا عوائلها هي ظاهرة شائعة في متطفلات أخرى وهي الفايوتوبلازما والركتسيا وليست صفة خاصة بالفايروسات وحكرا عليها ولكن يبدوا أن الفايروسات واصلت اعتمادها على الكائنات العائلة ففقدت معظم تراكيبها واحتفظت فقط بمادتها الوراثية، كذلك استندت هذه الفرضية على ندرة وجود الفايروسات المتطفلة على النباتات عارية البذور والنباتات البدائية مما يوحي بان الفايروسات النباتية ظهرت مع ظهور النباتات الأحداث وهي النباتات مغطاة البذور على الكرة الأرضية أي قبل 100 – 140 مليون سنة، كذلك فان حركة القارات في العصور الجيولوجية السحيقة ربما ساعدت على توزيع الأنواع الفايروسية وناقلاتها، وبذلك فإن هذه الفرضية قد انطلقت من الفكرة التي تقول بان الفايروسات هي متطفلات على الخلايا عليه فان المنطق يقول بعدم وجود أي فايروس قبل نشوء الخلايا على سطح الأرض علما بان هناك أدلة على وجود الخلايا الحية على الأرض قبل ما يقرب من 4 بليون سنة،

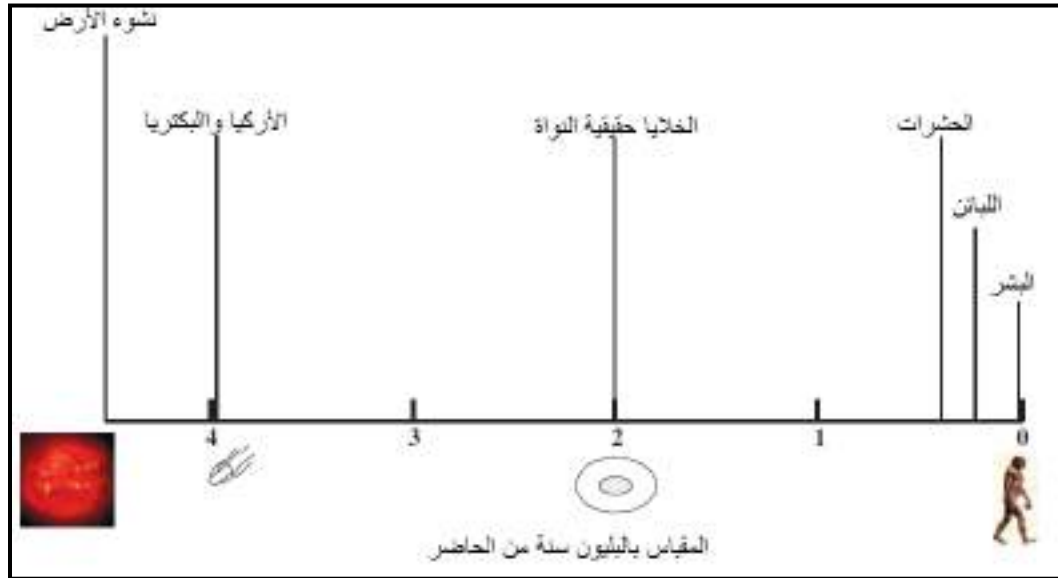


(الشكل 2-4) عليه فهي تفترض أن أسلاف الفيروسات هي مكونات الخلايا والتي تمثل الأسلاف الجزيئية Molecular precursors للفيروسات الحالية، أو أنها إنحدرت من الكائنات المجهرية المتطفلة داخل الخلايا.



الشكل (2-3): نشوء الفيروسات النباتية من الخلايا الأولية حقيقية النواة ونشوء الفيروسات البكتيرية (الفاجات) من الخلايا بدائية النواة.

الشكل مقتبس من Roossinck (2008).



الشكل (2-4): المدى الزمني Timeline لتاريخ الارض والذي يبين التواريخ التقريبية المقدره  
ببلايين السنين لنشوء الكائنات الحية.

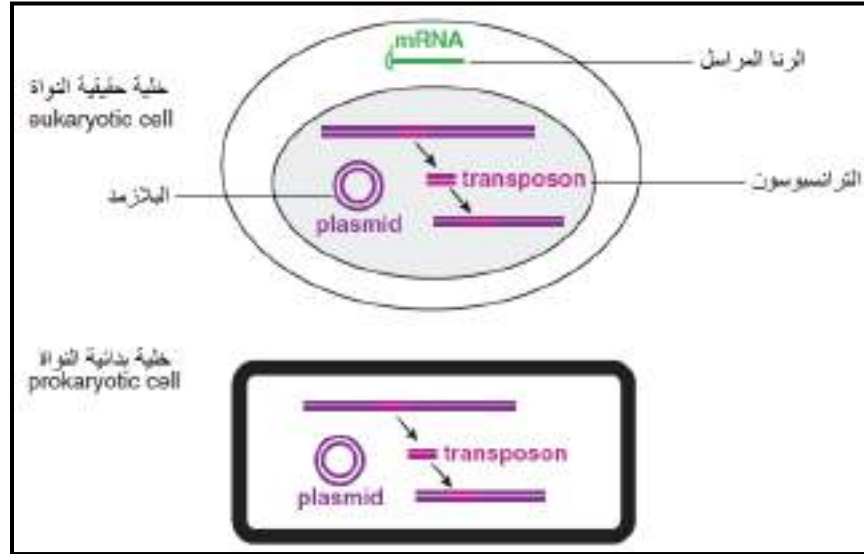
الشكل مقتبس من Carter و Saunders (2007).

### 3.2.2. فرضية التطور من العضيات والمكونات الخلوية

يطلق عليها أيضا فرضية الهروب Escape hypothesis والتي تفترض أن أسلاف الفايروسات قد نشأت من أجزاء لمواد وراثية خلوية هربت من سيطرة الخلية حيث تشظت جينومات الخلايا السلفية البدائية الرايبيية وكونت كروموسومات شبه مستقلة Semiautonomous chromosomes والتي بدأت بالتضاعف بشكل مستقل لتنتقل بين الخلايا ولقد انتج تكاثر الخلايا السلفية البدائية الرايبيية في بداية نشوء الحياة مزيجا من الذرية بعضها يمتلك نظامي الكروموسومات والرايبيوسومات والتي تطورت إلى الخلايا الأولية، والآخرى تمتلك إما الكروموسومات أو الرايبيوسومات، والآخرى لم تستمر بالحياة فيما تمكنت تلك التي تمتلك الكروموسومات على البقاء نتيجة تطفلها على الخلايا وهي أسلاف الفايروسات، وقد تكون أسلاف الفايروسات هي العضيات الداخلية للخلايا أي الأسلاف الجزيئية والتي تمتاز باستقلاليتها النسبية عن الخلية لأنها تمكنت من تطوير قابليتها في التضاعف الذاتي بشكل مستقل عن سيطرة الخلية وبالتالي أصبحت طفيليات على تلك الخلايا وتوجد أدلة قوية على أن المايوتوكونديريا والكوروبلاستات في الخلايا حقيقية النواة هي منبثقة من الخلايا بدائية النواة ثم أصبحت عضيات Organelles مستقلة داخل الخلايا حيث كانت أصلا متطفلة عليها ثم أصبحت متعايشة معها ثم فقدت قدرتها على انجاز العديد من وظائفها الحيوية وفقدت جيناتها التي تشفر معظم بروتيناتها التي استغنت عنها وبالتالي تخلت عن آلية تخليق البروتين وتحولت إلى فايروسات، كذلك تفترض ان الأسلاف المرشحة للفايروسات هي الجزيئات الرايبيية المراسلة mRNA وجزيئات البلازميد Plasmids والترانسبوسونات Transposones وهي جزيئات الدنا DNA المستقلة (الشكل 2-5) إذ يلاحظ أن جينومات العديد من الفايروسات الرايبيية موجبة التوجه ssRNA (+) المتطفلة على الخلايا حقيقية النواة تمتلك خصائص الأحماض الرايبيية المراسلة لتلك الخلايا، فهناك تماثل في النهاية 5 لجينوم فايروسات Tobamoviruses و Reoviruses مع الأحماض الرايبيية المراسلة للخلايا التي تتطفل عليها حيث أن كلاهما يمتلك نهاية مغطاة وعديدة الادينيل Capped end and Polyadenylated وبذلك فهي تماثل تركيب الأحماض المراسلة لخلايا عوائلها، وهناك اعتقاد بان الفايروسات ذات جينوم الدنا قد انحدرت من البلازميد والذي يطلق عليه أيضا اسم "الربلكون" Replicon" أو يسمى "العامل الكروموسومي الإضافي" Extrachromosomal factor وهو جزيئة الدنا الحلقية التي توجد في أنواع من الخلايا حقيقية أو بدائية النواة ويتراوح حجمها بين 1- 200 كيلو قاعدة (kb) Kilo base ووجد أن البلازميدات البكتيرية تحمل الجينات المتخصصة بإنتاج الزوائد البروتينية المتخصصة Sex pilus التي تربط كل خليتين بكتيريتين عند التزاوج مما يسمح بعبور البلازميد من الخلية الواهة إلى الخلية المستقبلية لذلك هناك رأي يقول بان الفاجات البكتيرية الخيطية Tailed phages ربما إنحدرت من البلازميدات أو من الزوائد البروتينية الجنسية، ولكن بالمقابل هناك رأي يقول بان الزوائد الجنسية هي التي انحدرت من الفاجات.

أما الترانسبوسونات Transposons فهي تعاقبات لجزيئة دنا متحركة موجودة في جينومات الخلايا حقيقية وبدائية النواة ولها قدرة الحركة من جزء من الجينوم إلى جزء آخر بآلية القطع واللصق Cut & Past mechanism، وربما تطورت الفايروسات بهذه الطريقة حيث اكتسبت خلال تطورها بعض جينات جينوم العائل وبضمنها جينات الكابسيد وإنزيم البوليميريز، (الشكل 2-5) أما السلف الآخر المحتمل جدا لنشوء الفايروسات فهي الترانسبوسونات العكسية Retrotransposons وهي تعاقبات شبيهة بفايروسات الاستنساخ العكسي Retrovirus-like sequence موجودة في جينومات الخلايا حقيقية النواة وتتكون من جينات تشفر إنزيم الاستنساخ العكسي Transcriptase وإنزيم التكامل Integrase لذلك يعتقد أنها أسلاف فايروسات الاستنساخ العكسي، علما بان الترانسبوسونات العكسية توجد في الجينومات البشرية والحيوانية واللافقارية وفي النباتات والفطريات.

يتبين مما سبق أن هناك ثلاث مسارات محتملة لنشوء وتطور الفايروسات وهي (1) أنها جزيئات راببية RNA وجدت قبل نشوء الخلايا على سطح الأرض (2) تطورت من كائنات مجهرية دقيقة (3) تطورت من مكونات خلوية.



الشكل (2-5): المكونات الخلوية الجينية في الخلايا حقيقية النواة وبدائية النواة المتوقعة ان تكون أسلافاً للفايروسات.

الشكل مقتبس من Carter و Saunders (2007).

3.2. آليات تطور الفايروسات بعد النشوء

تخضع الفيروسات كغيرها من الكائنات الحية إلى حتمية التغير الوراثي والتطور لتستطيع التكيف مع البيئات الجديدة، لذا فإن التغيير الذي حصل للفيروسات بعد نشوئها ربما حصل وفق إحدى المسارات الآتية:

### 1.3.2. التطور بالتطفير

تحصل الطفرات Mutations بسبب تغير يحصل عند تضاعف الحامض النووي مما يسبب ظهور أفراد مغايرة للأباء ثم يعقب ذلك حصول الانتخاب الطبيعي بين تلك الأفراد الجديدة Natural selection، وبذلك فإن الطفرة الأصلح هي التي ستبقى وتظهر حالة التلاؤم Fitness الأفضل مع البيئة، (لمزيد من التفاصيل أنظر الفصل الثالث عشر، التغيرات).

### 2.3.2. التطور بإعادة الارتباط الجيني بين سلالات فيروسية

إعادة الإرتباط الجيني Recombination هي عملية ارتباط قطع من جينوم سلالتين فيروسيتين مختلفتين تؤدي إلى إنتاج جينوم جديد من الجينومين الأبوين وهذا يحصل في الفيروسات عند حدوث الإصابة الخليطة للنبات بسلالتين لنفس النوع الفيروسي معا ويسمى الفيروس الجديد المنتج "الفيروس المُشكّل" Recombinant virus.

### 3.3.2. التطور بإعادة التشكيل الجينومي بين سلالات فيروسية

إعادة التشكيل Reassortment هي نوع خاص من آلية إعادة الارتباط أعلاه والتي تحصل في الفيروسات ذات الجينوم المقسم الذي تكون كل قطعه الجينومية معبأة في جسيمة فريون واحدة كما في فيروسات Reoviruses و Bunyaviruses، فإذا ما أصيبت الخلية بوقت واحد بسلالتين لفيروس معين فإن الفريونات الوليدة (الذرية) قد تحوي على مزيج من قطع جينومية هجينة اكتسبتها من الجينومين الأبوين، ويسمى الجينوم الجديد "المُتشكّل" Reassortant genome، (لمزيد من التفاصيل أنظر الفصل الثالث عشر، التغيرات).

### 4.3.2. التطور باكتساب جينات خلوية

أدى اكتشاف التماثل بين بعض البروتينات الفيروسية والخلوية إلى هذا الاستنتاج وهو قيام الفيروسات باصطياد جينات العائل، وهذا ما حصل مع بعض الفيروسات البشرية وهي فيروسات الإستنساخ العكسي Retroviruses إلا أنه لم يلاحظ ذلك لحد الآن مع الفيروسات النباتية.

أدت آليات التطوير الوراثي التي ذكرت أعلاه إلى نشوء العديد من الفيروسات الجديدة التي لم تكن موجودة سابقا وذلك نتيجة لإصابة أنواع جديدة من العوائل وهذا ما حصل مع بعض الفيروسات البشرية مثل فيروس نقص المناعة Hiv-1, Hiv-2 وهو غير مستبعد حصوله مع الفيروسات النباتية حيث تتوفر العديد من الأدلة على أن فيروس الذبول المبقّع للطماطة (TSWV) هو أحد

الفايروسات الناشئة والمتطورة حديثا خاصة وأنه أصبح أحد الفايروسات الخطرة وبائيا على العديد من المحاصيل الاقتصادية في السنوات الأخيرة.

### محاضرة رقم (3)

#### التركيب الكيماوي لجسيمة الفايروس ( كيمياء الفايروس)

تمكن الباحثون بعد تطويرهم لتقانات تنقية الفايروسات وعزل الكثير من أنواعها بشكل محاليل تحوي الجسيمات الفايروسية النقية المفصولة عن المكونات النباتية وبلورتها بشكل أملاح نقية من تحليل المكونات المعدنية للفايروس ومعرفة العناصر الأساسية المكونة لها ونسبها التقريبية والتي تتباين حسب نوع الفايروس حيث يحتوي رماد الفايروس على 50% كربون وهو العنصر السائد و4% فسفور و2% كبريت، أما العناصر الغازية المكونة له فهي 18% نتروجين و 19% أوكسجين و7% هيدروجين وإن بعض أنواع الفايروسات لا تحوي كبريت وهي التي يتكون غطاؤها البروتيني من أحماض امينية لا يدخل الكبريت في تركيبها، إن العناصر الستة التي ذكرت هي المكونة للبروتينات والأحماض النووية والكاربوهيدرات والليبيدات وهي المركبات التي تتكون منها الفايروسات البسيطة والمعقدة وهي ذات العناصر التي نجدها لهذه المكونات في كل الكائنات الحية الأخرى.

#### 2.3. المكونات التركيبية والوظيفية للفايروسات.

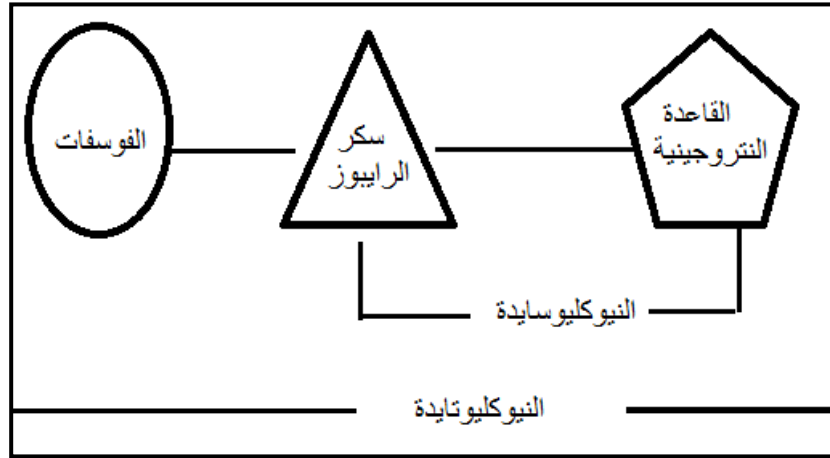
##### 1.2.3. الأحماض النووية الفايروسية وتركيبها الكيماوي

لا تختلف الأحماض النووية الفايروسية Viral nucleic acids في تركيبها العام عن الأحماض النووية الخلوية الموجودة في كل الكائنات الحية، توجد الأحماض النووية في الفايروسات على أربعة أنواع هي (1) الحامض النووي الرايبي مفرد الخيط Single strand RNA ومختصره ssRNA (2) الحامض النووي الرايبي المزدوج الخيط Double strand RNA ومختصره dsRNA (3) الحامض النووي منقوص الأوكسجين مفرد الخيط Single strand DNA ومختصره ssDNA (4) الحامض النووي منقوص الأوكسجين مزدوج الخيط DNA Double strand ومختصره dsDNA، وبذلك يظهر نوعين من الأحماض النووية الغريبة التي لا توجد في الكائنات الحية وهما ssDNA وdsRNA.

تمثل الفايروسات ذات الحامض الرايبي مفرد الخيط ssRNA viruses حوالي 60% من فايروسات النبات المكتشفة، وهي على نوعين حسب نوع تصرف حامضها النووي واستراتيجيته عند التضاعف وهما (1) الفايروسات الرايبي مفردة الخيط موجبة التوجه sense ssRNA viruses (+) وهي الفايروسات التي يسلك حامضها النووي سلوك الحامض النووي المراسل mRNA بعد دخوله إلى خلية النبات العائل ويكون قادرا مباشرة على تشفير جيناته واطهار فعلها لذلك يسمى "الخيط المشفر أو الخيط الموجّه" (2) Sense strand or coding strand الفايروسات الرايبي مفردة الخيط سالبة التوجه (-) sense ssRNA viruses وهي الفايروسات التي يسلك حامضها النووي سلوك الخيط القالب Template strand أي الخيط المكمل للخيط الموجب الحامل للجينات لذلك يسمى أيضا "الخيط

المرافق التخليقي " Codogenic strand لأنه يحمل التعاقب المكمل للخيط الموجب لذلك فهو عند دخوله إلى النبات لا يتمكن من إحداث الإصابة بل يخلق الخيط الموجب القادر على إحداثها، ويشكل الحامض النووي نسبة 15 – 45 % من كتلة الفايروسات الايزومترية فيما تنخفض نسبته في الفايروسات العصوية إلى 5% من كتلتها.

الحامض النووي الفايروسي سواء كان من نوع الرنا RNA أو الدنا DNA هو مركب ذو وزن جزيئي عالي يتألف من سلاسل غير متفرعة لوحدات بنائية متكررة هي "النيوكليوتيدات" Nucleotides والتي تسمى أيضا "النيوكليوتيدات الأحادية" Mononucleotides وبذلك فإن الحامض النووي هو مكوثر (بولمر) Polymer مكوّن من النيوكليوتيدات المتعاقبة والتي تمثل الوحدة البنائية والوظيفية للحامض النووي. تتكون النيوكليوتايدة من ثلاث مكونات هي (1) القواعد النتروجينية (2) سكر الرايبوز في الرنا أو سكر الرايبوز منقوص الأكسجين في الدنا (3) الفوسفات، (الشكل 3-1) وفيما يلي وصف لهذه المكونات:



الشكل (3-1): مخطط عام للمكونات الثلاثة الأساسية للنيوكليوتايدة.

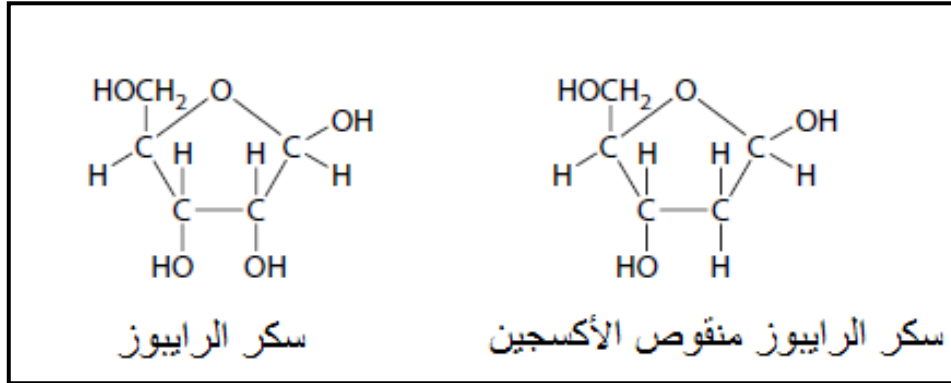


### 1.1.2.3. القواعد النتروجينية

توجد على مجموعتين من المركبات الحلقية غير المتجانسة وهما (1) مجموعة البيورينات Purines والتي تضم قاعدتي الأدينين Adenine ورمزها (A) والكوانين Guanine ورمزها (G) وهما موجودتان في كل من حامضي الرنا والدنا (2) مجموعة البيريميديونات Pyrimidines والتي تضم ثلاث قواعد هي السائتوسين Cytosine ورمزها (C) واليوراسيل Uracil ورمزها (U) والثايمين Thymine ورمزها (T)، توجد القاعدتين السائتوسين واليوراسيل في الرنا، فيما توجد القاعدتين السائتوسين والثايمين في الدنا وبذلك فإن كل حامض نووي يضم أربعة أنواع من القواعد تتكرر بتعاقب معين. لا تمتلك فايروسات النبات أية قواعد نتروجينية غريبة والمسماة " القواعد الصغرى" Minor bases أو القواعد المُستَبَدلة وهي التي توجد بنسب قليلة في الأحماض النووية لبعض الكائنات الحية وفي الرنا الناقل tRNA ومنها القاعدة النتروجينية "5 - هيدروكسي مثيل السائتوسين" 5-hydroxymethyl cytosine والقاعدة النتروجينية "1- مثيل الكوانين" 1-methyl guanine والقاعدة النتروجينية "2- مثيل الأدينين" 2-methyl adenine.

### 2.1.2.3. سكر الرايبوز

سكر الرايبوز Ribose هو سكر خماسي الكربون بنتوزي Pentose وهو موجود في الرنا، أما في الدنا فإنه يكون منقوص الأكسجين حيث تسحب جزيئة أكسجين من موقع ذرة الكربون رقم 2، (الشكل 2-3) يكون الرايبوز في النظام البنائي للحامض النووي بصيغته الحلقية الفيورانية Furane وليس بصيغة هوارث Howarth الحلقية لذلك يسمى أيضا سكر الفيورانوز Furanose.



(ب)

(أ)

الشكل (2-3): (أ) سكر الرايبوز منقوص الأكسجين الموجود في الدنا (ب) سكر الرايبوز الموجود في الرنا.

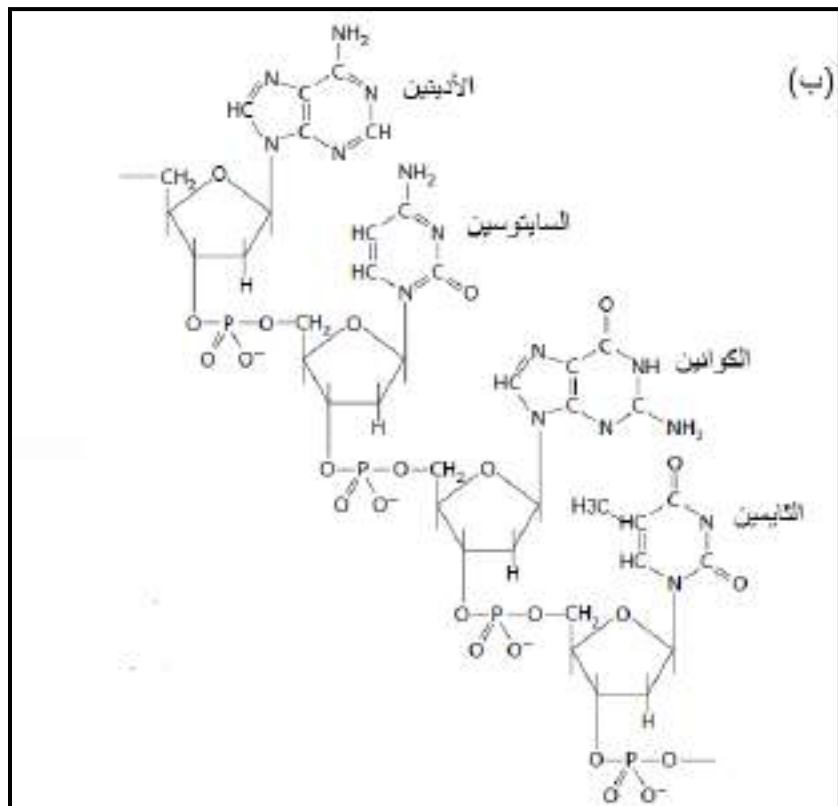
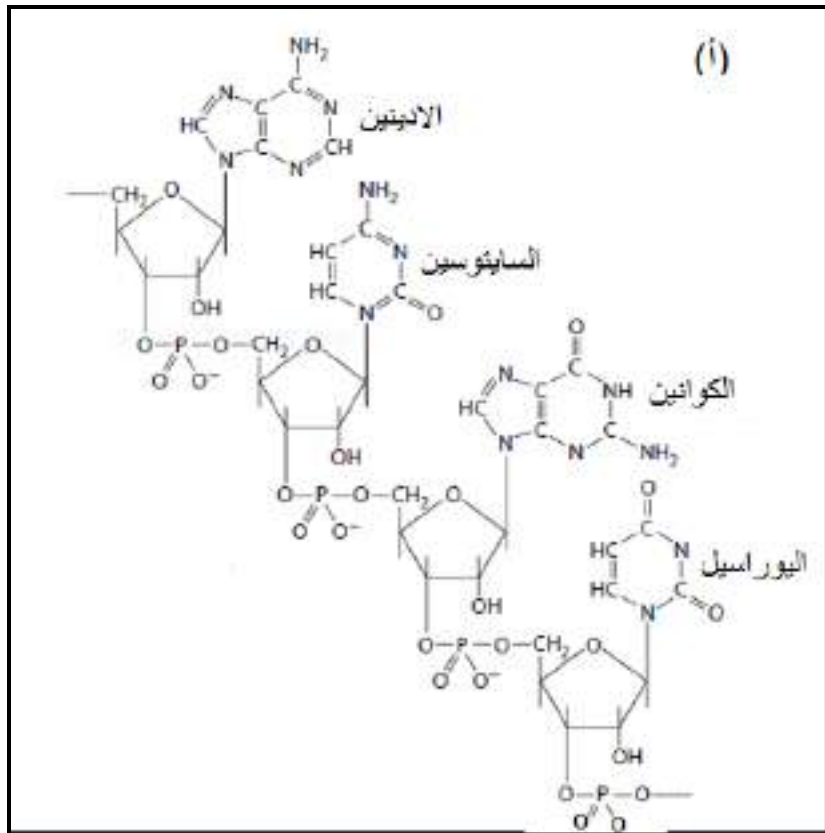
### 3.1.2.3. مجموعة الفوسفات

تشتق مجموعة الفوسفات من حامض الفوسفوريك  $H_3PO_4$  والتي ترتبط بسكر الرايبوز بأصرة الإستر.

#### 4.1.2.3. كيفية بناء النيوكليوتايدة

لغرض بناء النيوكليوتايدة ترتبط القاعدة النتروجينية مع سكر الرايبوز في الرنا، أو ترتبط مع سكر الرايبوز منقوص في الدنا بواسطة أصرة كلايكوسيدية سكرية **glycosidic linkage** وبذلك تتكون النيوكليوسايدة، ثم ترتبط مجموعة الفوسفات مع سكر الرايبوز أو السكر منقوص الأكسجين مع إحدى مجاميع الهيدروكسيل ( $-OH$ ) الطليقة للسكر بواسطة أصرة إستر فتتكون النيوكليوتايدة حيث توجد ثلاثة مواقع محتملة للارتباط في سكر الرايبوز عندما يكون جزءاً من نيوكليوتايدة في الرنا الفايروسي وهي مواقع ذرات الكربون رقم 2 و3 و5، بينما تكون مواقع الارتباط المحتملة هما اثنين فقط في السكر منقوص الأكسجين في الدنا وهما الموقعين 3 و 5 وذلك بسبب سحب جزيئة الأكسجين من الموقع رقم (2) في جزيئة السكر مما يجعله موقعا خاملا غير قادر على التفاعل.

يتم ربط النيوكليوتايدة مع التي تليها بأصرة إستر أيضا والتي تربط الموقع رقم 3 في سكر الرايبوز أو السكر منقوص الأكسجين مع جزيئة الفوسفات في النيوكليوتايدة اللاحقة حيث تتكون أولا سلسلة قصيرة من عدد قليل نسبيا من النيوكليوتايدات القصيرة **Oligonucleotides** التي ترتبط مع بعضها لتكوين عديد النيوكليوتايدات **Polynucleotides** والتي تمثل الحامض النووي، (الشكل 3-3).



الشكل (3-3): التركيب الكيماوي للحامض النووي الفيروسي.

(أ) التركيب الكيماوي لقطعة من الحامض النووي الرايبى الفيروسي ( الرنا) RNA مكونة من القواعد الأربعة وهي الأدينين والكوانين (البورينات) والسائتوسين واليوراسيل (البيريميديئات) وسكر الرايبوز والفوسفات وكيفية ارتباطها بالأصرة الكلايكوسيدية الرابطة بين السكر والقاعدة وأصرتى الإستر الرابطين بين الفوسفات والسكر فى ذات القاعدة وبين كل قاعدتين متجاورتين.

(ب) التركيب الكيماوي لقطعة من الحامض النووي الرايبى الفيروسي منقوص الأوكسجين (الدنا) DNA مكونة من القواعد الأربعة وهي الأدينين والكوانين (البورينات) والسائتوسين والثايمين (البيريميديئات) وسكر الرايبوز والفوسفات.

المصدر: فايروسات النبات ، د. نبيل عزيز قاسم 2011

## محاضرة رقم (4)

### الحوامض النووية والبروتين الفيروسي

#### الحامض النووي الرايبى الفيروسي (الرنا الفيروسي)

يمثل الحامض النووي الرايبى الفيروسي RNA , Viral ribonucleic acid الأحماض النووية الخلوية الرايبية وهو الأقرب إلى الحامض النووي المرسل mRNA تركيبيا ووظيفيا وهو يمثل الجينوم الفيروسي للفايروسات ذات الحامض النووي الرايبى. يوجد هذا الحامض في بعض الفايروسات بشكل قطعة واحدة مكون من جزيئة مفردة خيطية Linear single strand RNA , ssRNA , معبأة في جسيمة فايروسية مفردة كما في فايروس موزائيك التبغ (TMV)، أو يوجد مقسما لأكثر من قطعة توزع بين أكثر من جسيمة كما في فايروس موزائيك الجت (AMV) حيث يتوزع بين أربع جسيمات مستقلة ويحمل كل منها جزءا من الشفرة الوراثية الكاملة للفايروس وفي فايروس موزائيك اللوبيا (CpMV) حيث يتوزع بين جسيمتين مستقلتين.

يوجد الحامض النووي الرايبى في أنواع من فايروسات النبات بشكل حلزوني مزدوج الخيط Double strand RNA , dsRNA شبيه بازواج الدنا الخلوي وهذا ما يلاحظ في فايروسات عائلة Reoviridae حيث ينشطر إلى 10-12 قطعة مزدوجة منفصلة معبأة في جسيمة فايروسية واحدة ولكن قد يحصل في بعض الفايروسات ذات الحامض الرايبى المفرد الخيط ssRNA viruses حصول التفاف جزئي لنفس الخيط أي بدون تكوين النظام الحلزوني فيصبح جزء من الحامض النووي مزدوجا، ويقوم الارتباط المزدوج في الحامض النووي الرايبى على مبدأ ارتباط قاعدة الأدينين مع اليوراسيل بأصرة هيدروجينية مزدوجة، وارتباط الكوانين مع السايروسين بثلاثة أو اصر هيدروجينية.

### 6.1.2.3. الحامض النووي الرايبى الفيروسي منقوص الأكسجين (الدنا الفيروسي)

لا يختلف الحامض النووي الرايبى الفيروسي منقوص الأكسجين (الدنا الفيروسي) Viral Deoxyribonucleic acid , DNA عن مثيله في الخلايا الحية من ناحية التركيب العام والصفات الفيزيائية والكيمائية باستثناء امتلاك بعض الفيروسات للحامض منقوص الأكسجين مفرد الخيط ssDNA والذي لا يوجد في كل الكائنات الحية، أما بقية الفيروسات ذات الدنا المزدوج dsDNA viruses فإن حامضها يماثل الدنا الموجود في الخلايا وبشكل حلزون مزدوج الخيط Double helix ، (الشكل 3-4) والذي يمتاز بتساوي عدد وحدات الأدينين مع عدد وحدات الثايمين وكذلك عدد وحدات السايروسين لعدد وحدات الكوانين، ويعني ذلك إن مجموع وحدات البيورينات مساو دائما لمجموع وحدات البيريميديات، أي  $C+T = A+G$  وهو ما يعرف "مبدأ كاركاف" أو "تكافؤ القواعد" Base equivalent.

يوجد 98% من الدنا الخلوي في نواة الخلية، أما البقية فتوجد في البلاستيدات والميتوكوندريات، ويرتبط الدنا في الخلايا حقيقية النواة ببروتينات تسمى "الهستونات" Histones ويطلق عليه "الكروموسوم"، أما الدنا في البلاستيدات والميتوكوندريات و في الخلايا بدائية النواة Prokaryotes و الفيروسات فلا يحوي الهستونات.

إن الشكل الحلزوني المزدوج للدنا والذي اكتشفه "واتسن و كريك" (Watson & Crick) سنة 1953 يمثل التركيب الثاني للحامض Secondary structure ، (الشكل 3-4) وهو سلسلة حلزونية مزدوجة يمينية التوجه أي يدور الحلزون من اليسار إلى اليمين ويلتف كل خيط حول نفس المحور ولكن وفق تتابع نيوكليوتايدي باتجاهين متعاكسين ومتوازيين Antiparallel sequencing ولهذا النظام الحلزوني ميزاته التالية المتفوقة على نظام الالتفاف العشوائي Random coil وهي (1) يترسب ببطء مقارنة بنظام الالتفاف العشوائي لذلك فهو ذو معامل ترسيب Sedimentation coefficient منخفض (2) ذو نشاط تدوير ضوئي Optical rotation أعلى من التدوير الضوئي لمكوناته كل على انفراد (3) ذو لزوجة أعلى من لزوجة الالتفاف العشوائي (4) اقل امتصاصية للأشعة فوق البنفسجية (UV) مقارنة بامتصاص الالتفاف العشوائي عند الطول الموجي 260 نانومتر (5) تسهل رؤيته بالمجهر الإلكتروني مقارنة بالخيط المفرد. يتم الارتباط في النظام الحلزوني بنوعين من الأواصر التي تربط القاعدتين المتقابلتين في كل خيط وهي الأواصر الهيدروجينية Hydrogen bonds والأواصر الكاره للماء Hydrophobic bonds التي تنشأ بين القواعد المتقابلة لأنها جزيئات حلقيه اروماتية كبيرة مسطحة.

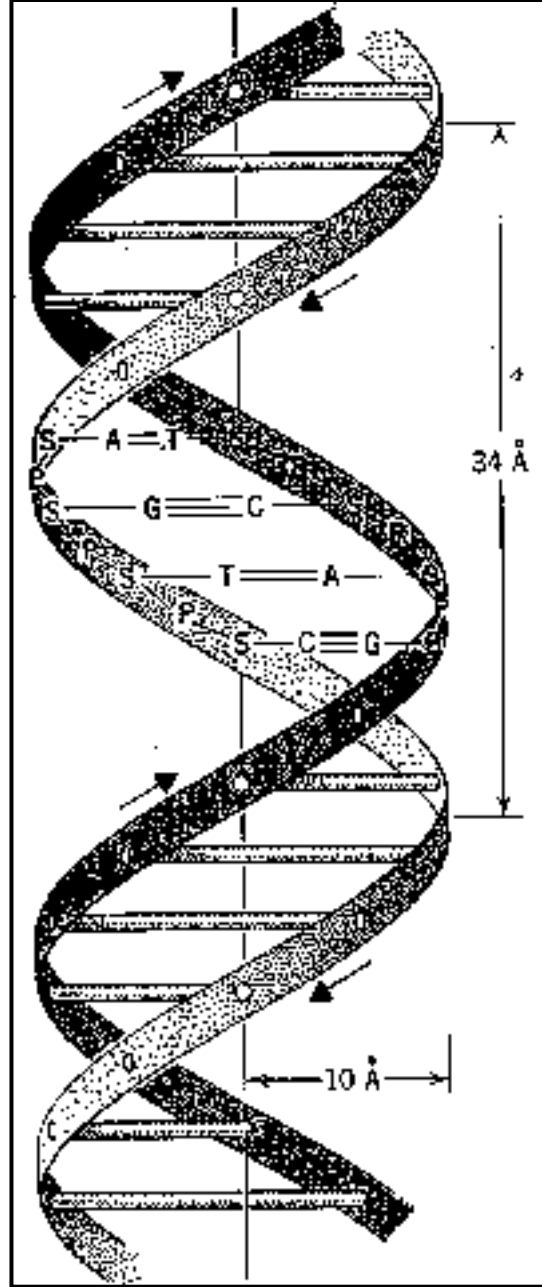
يعبر عن تعاقب النيوكليوتايدات في جزيئة الدنا بالمخطط الرمزي الذي يسمى "العمود الفقري المكوّن من السكر- الفوسفات" Sugar phosphate backbone ، (الشكل 3-5) والذي يمكن استعماله أيضا مع الرنا الفيروسي.

يوجد الدنا في خلايا الكائنات الحية المعقدة وفي الفايروسات البكتيرية بتركيبه الثالثي Tertiary structure وذلك بحصول التواء وتشابك مع الغطاء البروتيني فيأخذ الحامض الشكل المظفور المسمى بالجديلة وهذا لا يحصل في الفايروسات النباتية. يبين الجدول (1-3) المحتوى التقريبي للدنا في الفايروسات و الكائنات الأخرى.

**الجدول (1-3): مقارنة لكمية الدنا في الفايروسات النباتية وأنواع من الكائنات الحية**

الكائن	وزن الدنا بالبيكوغرام* / خلية	مقاسا	عدد أزواج النيوكليوتيدات (بالمليون) لكل جزيئة دنا
اللبائن	6		5500
البرمائيات	7		6500
الأسماك	2		2000
الطيور	2		2000
النباتات الراقية	2,5		2300
الفطريات	0,17 – 0,02		20
البكتريا	0,06 – 0,002		2
الفايروسات			1

\* البيكوغرام =  $10^{-12}$  غم.



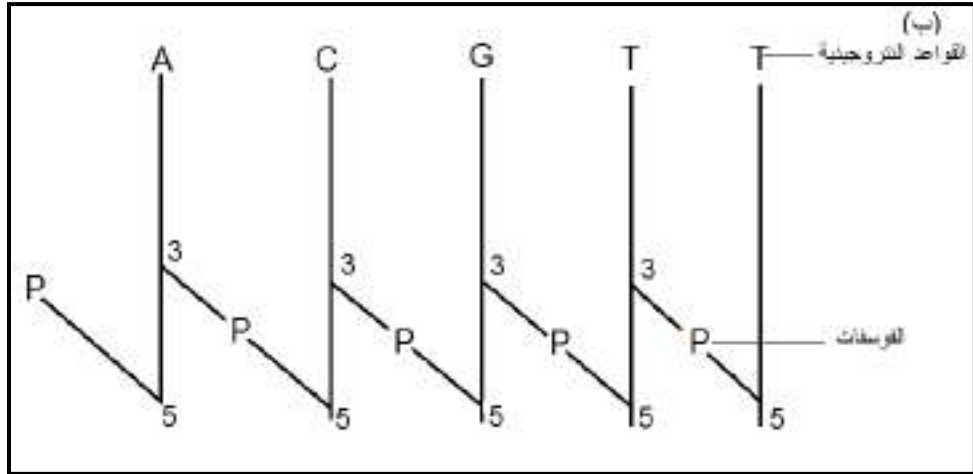
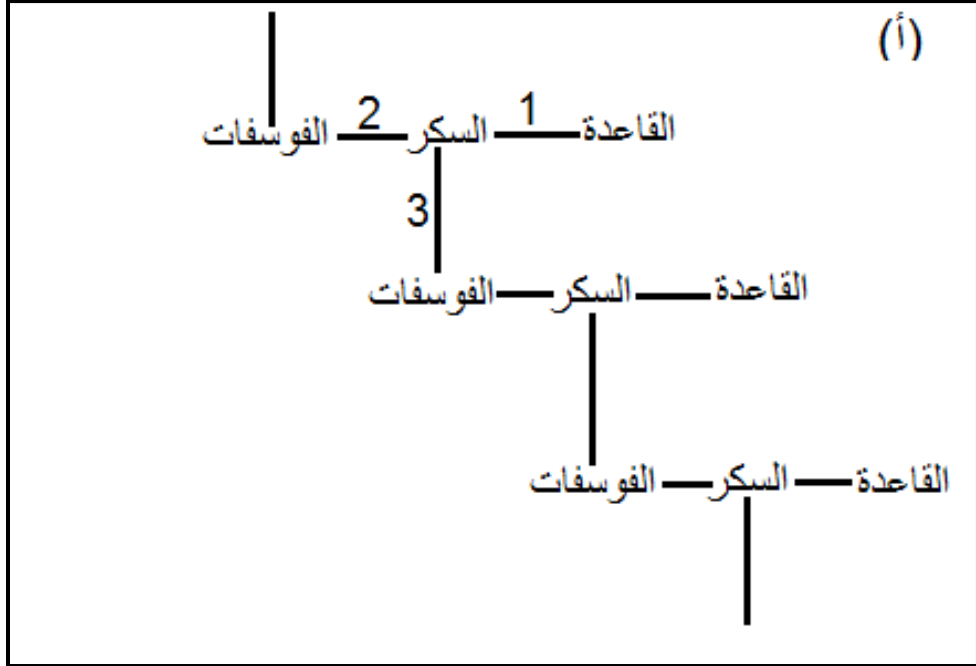
الشكل (3-4): التركيب الحلزوني المزدوج Double helix للدنا المزدوج الخيط.

ترتبط قاعدتي الأدينين (A) والثايمين (T) بأصرتين هيدروجينيتين، وترتبط قاعدتي الكوانين (G) والسايروسين (C) بثلاثة أواصر هيدروجينية، أما الشريطين فيتكون كل منهما من الفوسفات (P) المرتبط بأصرة إستيرية مع سكر الرايبوز منقوص الأكسجين، وأن طول دورة الحلزون ونصف قطره هو 34 و 10 أنكستروم على التوالي.

تنويه: يزدوج الحامض النووي الرايبي dsRNA بنفس النظام باستثناء ارتباط قاعدة الأدينين (A) مع اليوراسيل (U) بدلا من الثايمين (T).



الشكل مقتبس من Conn و Stumpf (1972).



الشكل (3-5): العمود الفقري سكر- فوسفات Sugar-phosphate backbone لجزء من خيط الحامضين الرنا أو الدنا (أ) المخطط العام للعمود الفقري حيث يشير الرقم (1) إلى الأصرة الكلايكوسيدية والرقمين (2 و3) إلى أصرة الإستر.

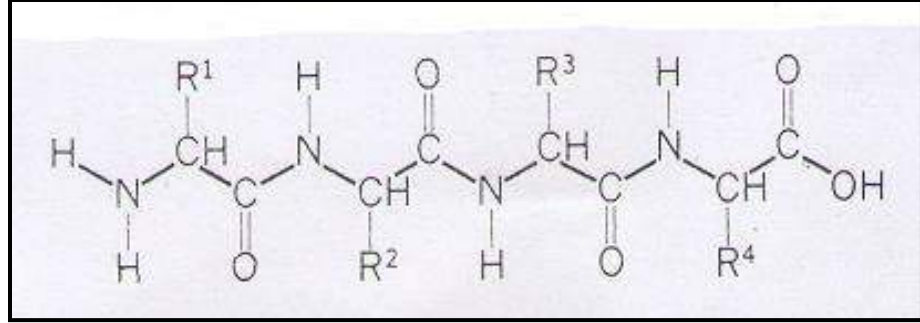
(ب) المخطط الرمزي للعمود الفقري للدنا والذي يقرأ من اليسار إلى اليمين PAPCPGPTPT.

### 2.2.3. البروتين الفيروسي

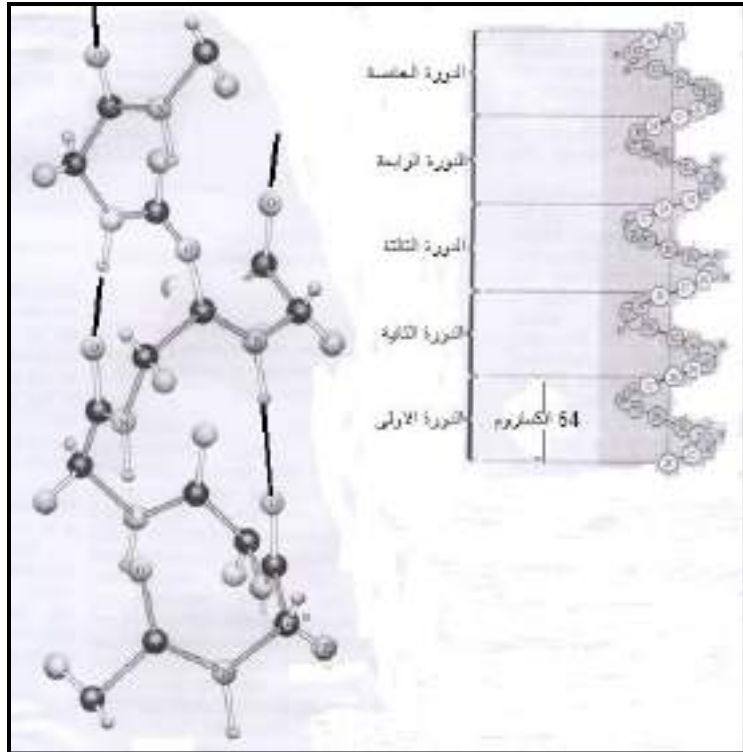
يمثل البروتين الفيروسي تركيباً أي بروتين خلوي فهو مكوثر (بولمر) لوحدات بنائية وظيفية هي الأحماض الأمينية Amino acids ، ويرتبط كل حامض أميني بالذي يليه في سلسلة الببتيد بأصرة ببتيدي Peptide bond والتي تسمى أيضا أصرة الأמיד Amide bond، ويصنف البروتين الفيروسي من نوع الغلوبولين Globulin ويسمى أيضا A-protein تمييزاً له عن بروتينات الكائنات الأخرى. يتم بناء البروتين الفيروسي التركيبي بأربع مستويات هي (1) التركيب الأولي Primary structure حيث تتكون سلسلة ببتيدي مفردة تتعاقب فيها الأحماض الأمينية في تركيب خطي غير متفرع وترتبط ببعضها بالأصرة الببتيدي، (الشكل 3-6) (2) التركيب الثاني Secondary structure حيث يأخذ خيط الببتيد الشكل الحلزوني يميني الاتجاه Right handed alpha helical structure ويثبت هذا التركيب بواسطة الأواصر الهيدروجينية القائمة بين مجموعتي الكربونيل والأמיד، (الشكل 3-7) (3) التركيب الثالثي Tertiary structure حيث يحصل المزيد من الالتفاف والالتواء Coiling and Folding للتركيب الثاني لإعطاء شكلاً معقداً ثلاثي الأبعاد وصلداً للتركيب، (الشكل 3-8) ويثبت هذا التركيب عدة أنواع من الأواصر المبينة في الشكل (3-9) (4) التركيب الرابعي Quaternary structure هو التركيب الذي يجمع قطعتي تركيب ثالثي متمثلتين أو أكثر لتكوين البروتين وإعطائه وظيفته المطلوبة سواء كانت تركيبية أم وظيفية فقد ترتبط وحدتين من التركيب الثالثي بشكل "مثنى" Dimer ، (الشكل 3-8).

تنتج الفيروسات بروتيناتها على وفق الشفرة الوراثية التي يحملها الحامض النووي ويخلق البروتين في رايبوسومات خلية العائل وبنفس آلية تخليق البروتينات الخلوية وبذات الأحماض الأمينية الموجودة في الخلية ولكن لوحظ زيادة نسبة الحامضين الأمينيين السيرين والثريونين في البروتين التركيبي الفيروسي.

تكوّن معظم فيروسات النبات بروتينا تركيبيا بسيطا مكونا من وحدات بروتينية تركيبية Protein subunits متماثلة أو مختلفة ويتراوح الوزن الجزيئي لهذه الوحدات بين 13-110 ألف دالتون فيما تمتلك الفيروسات المغلفة بروتينا يرتبط مع الليبيد ليكوّن الليبوبروتين Lipoprotein، ويرتبط هذا البروتين في بعض الفيروسات مع الكربوهيدرات ليكوّن الكلايكوبروتين Glycoprotein. يحتاج تخليق بروتين فيروسي بحجم متوسط لشفرة بتعاقب 1000 نيوكليوتايدة في خيط نووي مفرد، أو 2000 نيوكليوتايدة في خيط نووي مزدوج.



الشكل (3-6): التركيب الأولي للبروتين Primary structure المتكون من سلسلة الببتيد غير المتفرعة حيث تتعاقب فيها الأحماض الأمينية خيطيا وترتبط بالأصرة الببتيدية التساهمية Peptide bond الرابطة بين ذرتي الكربون والنيتروجين. (C—N)



(ب)

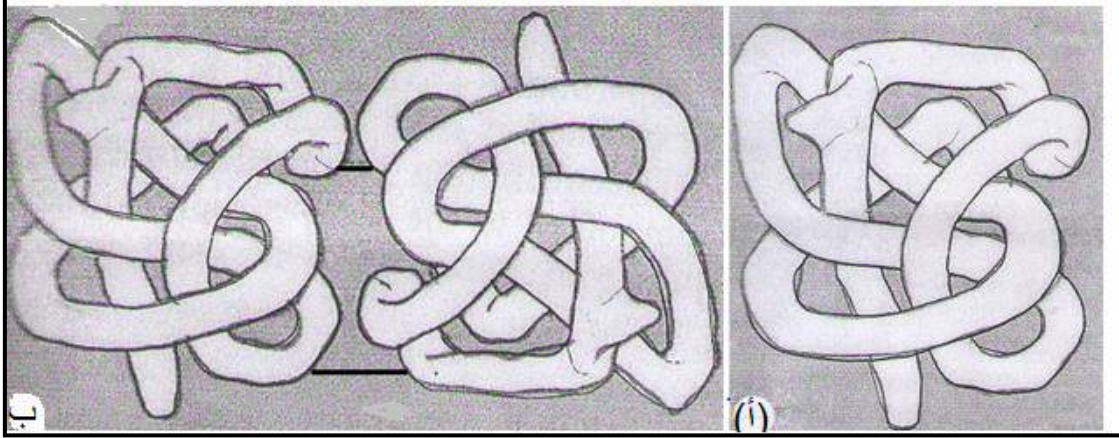
(أ)

الشكل (3-7): التركيب الثاني للبروتين "نوع حلزون ألفا" Alpha – Helix.

(أ) مخطط للتركيب الثاني يبين خمس دورات منه حيث تشير الدوائر المظلمة إلى الذرات التي هي أسفل مستوى الورقة التي تقرأها فيما تشير الدوائر البيضاء إلى الذرات التي هي فوق مستوى الورقة لتخيل الشكل ثلاثي الأبعاد للتركيب.

(ب) شكل مجسم للتركيب الحلزوني للبيتيد من النوع "الحلزون ألفا" يميني الاتجاه **Right handed Alpha - Helix structure** حيث تشير الخطوط الغامقة إلى الأصرة الهيدروجينية التي تثبت التركيب الحلزوني.

الشكل مقتبس من Conn و Stumpf (1972).

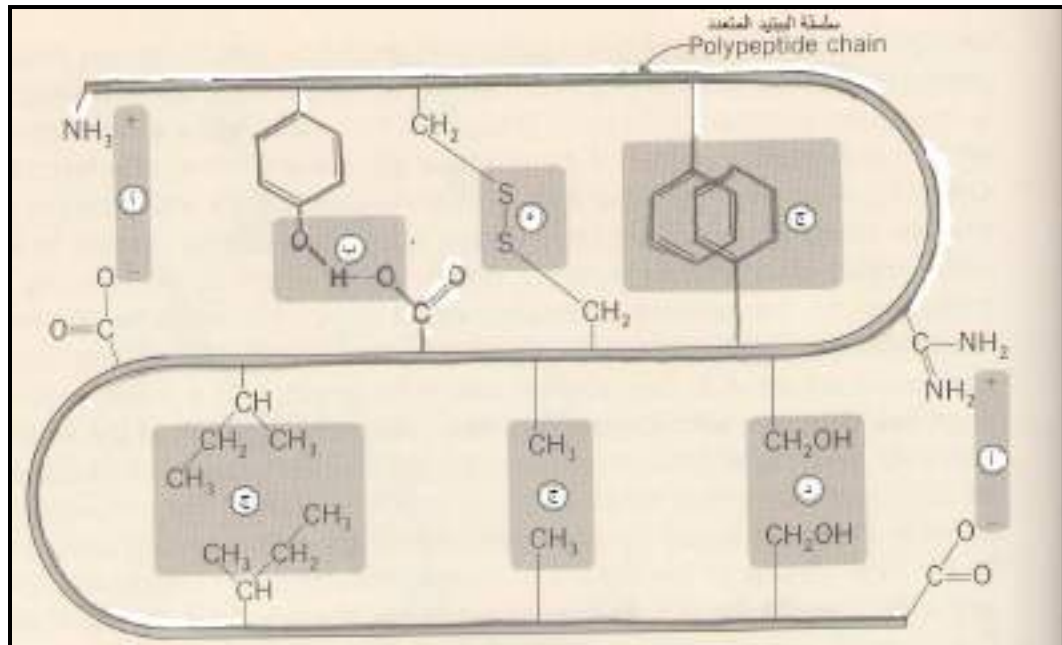


الشكل (3-8): التركيبين الثالثي والرابعي للبروتين الفيروسي.

(أ) التركيب الثالثي للبروتين حيث يلتف البيتيد لتكوين الشكل ثلاثي الأبعاد.

(ب) التركيب الرابعي للبروتين يلاحظ ارتباط مجموعتين متماثلتين من التركيب الثالثي بأواصر أيونية بينها الخطين الغامقين.

الشكل مقتبس من Conn و Stumpf (1972).



الشكل (3-9): الأواصر الرابطة للتركيب الثالثي للبروتين.

(أ) الأصرة الكهربائية المستقرة **Electrostatic bond** بين مجموعة الامين الموجبة وذرة الأكسجين السالبة (ب) الأصرة الهيدروجينية **Hydrogen bond** بين ذرتي الأكسجين في الكربوكسيل والهيدروجين في حامض التايروسين (ج) الأصرة الكاره للماء **Hydrophobic bond** بين حلقتين سداسيتين أو بين مجاميع أثيل ومثيل أو بين مجموعتي مثيل حيث تنشأ هذه الأصرة في الجانب غير القطبي (د) الأصرة ثنائية القطبية **Dipole-dipole bond** (هـ) الأصرة ثنائية الكبريت **Disulfide bond** بين ذرتي كبريت. الأواصر الأربعة الأولى في التركيب هي أواصر غير تساهمية **Noncovalent bonds** والأصرة الأخيرة هي الوحيدة التساهمية **Covalent bond** في التركيب.

## محاضرة رقم (5)

### اشكال وهيكلية الفايروسات النباتية

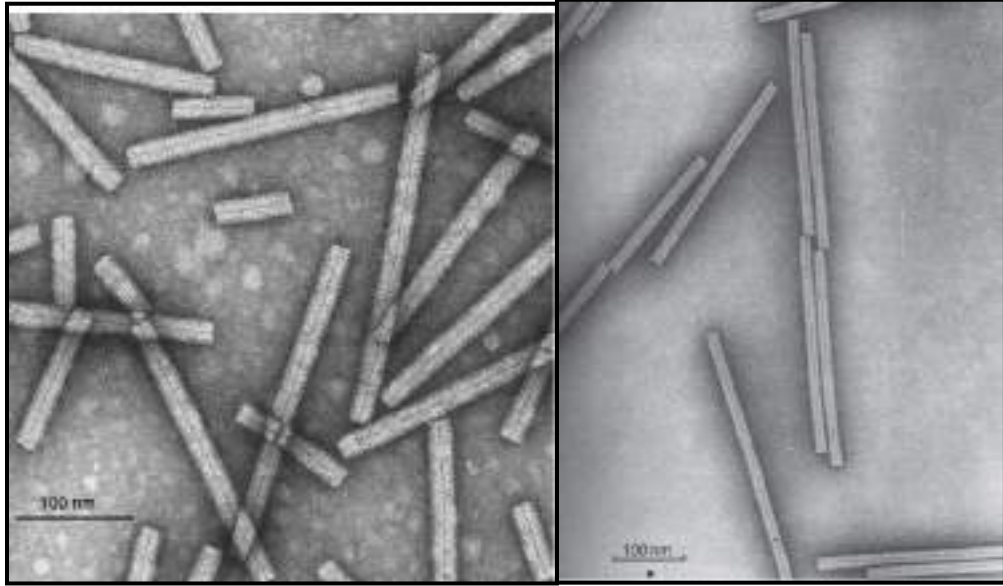
### أشكال وهيكلية فايروسات النبات

. أشكال الفايروسات

تمتلك فايروسات النبات الأشكال الظاهرية Forms التالية والتي تمت رؤيتها بالمجهر الإلكتروني، وفيما يلي وصف لهذه الأشكال:

#### 1.1.4. الفايروسات العصوية الصلدة

تمتاز الفايروسات العصوية الصلدة Rigid rod viruses بشكلها العصوي الأنبوبي المستقيم وهي غير قابلة للانثناء بسبب قوة الأواصر الأيونية بين الوحدات البروتينية لغطائها البروتيني، تتراوح أطوال هذه الفايروسات بين 300- 500 نانومتر أما قطرها فهو بحدود 12 نانومتر ومن أمثلتها فايروس موزائيك التبغ (TMV) وفايروس موزائيك الطماطة (ToMV)، (الشكل 4-1).



(ب)

(أ)

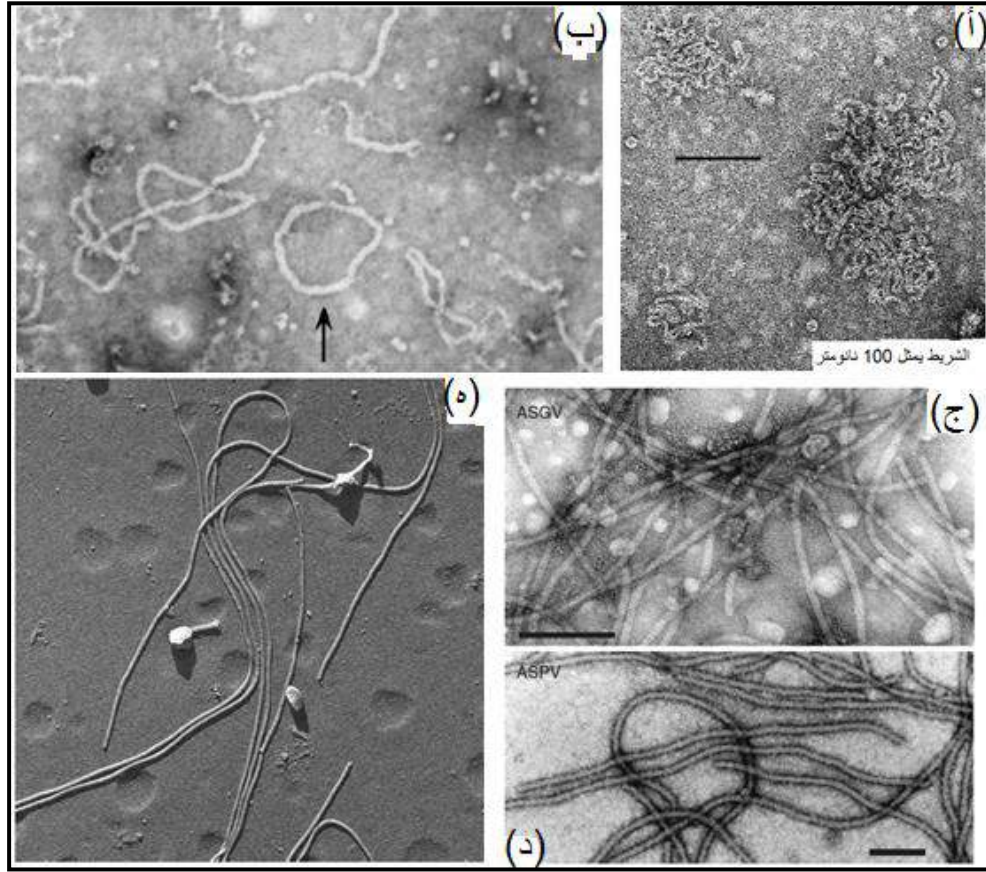
الشكل (4-1): الجسيمات الفايروسية العصوية الصلدة الأنبوبية المشاهدة بالمجهر الإلكتروني والمصبوغة بطريقة الصبغ السالب (أ) لفايروس موزائيك التبغ (TMV) (ب) لفايروس الإصفرار التماوتي لعروق البنجر (BNYVV).

الشكل مقتبس من Mahy و Van Regenmortel (2008).

#### 2.1.4. الفايروسات العصوية المرنة

الفايروسات العصوية المرنة *Flexuous rod viruses* شبيهة بالفايروسات العصوية ولكنها مرنة قابلة للانثناء وهي أطول عادة من الفايروسات العصوية الصلدة وتضم أطول فايروسات النبات المكتشفة وهما فايروسي ترستيزا الحمضيات (CTV) واصفرار البنجر (BYV) اللذين تصل أطولهما إلى 2000 و 1200 نانومتر على التوالي، تتراوح أطوال هذه الفايروسات بين 650-750 و قطر 13 نانومتر، (الشكل 2-4).

يطلق على نوعي الفايروسات العصوية الصلدة والمرنة أيضا "الفايروسات الأنبوبية" *Tubular viruses* وهي تمثل نسبة كبيرة من أنواع فايروسات النبات إذ تشكل ما يقرب من 50% من مجمل الفايروسات المسجلة.

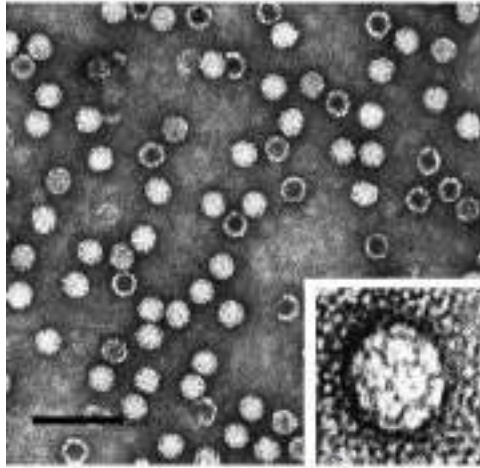


الشكل (2-4): الجسيمات العصوية المرنة المصورة بالمجهر الإلكتروني لخمس أنواع من الفايروسات هي (أ) اجسام خيطية غريبة لفايروس غير مشخص يعود للجنس *Ophiovirus* معزول من نباتات خس (ب) فايروس الورقة البيضاء للرز (RHBV) (ج) فايروس تشقق ساق التفاح (ASGV) (د) فايروس تنقر ساق التفاح (ASPV) (هـ) جسيمات فايروس البطاطا واي (PVY) المصورة بالمجهر الإلكتروني الماسح ووجود جسيمة من الفاج البكتيري لغرض المقارنة الحجمية (الشريط في الشكلين ج و د = 100 نانومتر).

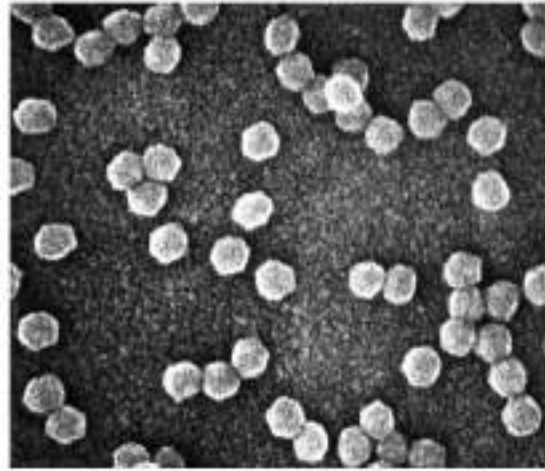
الشكل مقتبس من Mahy و Van Regenmortel (2008).

### 3.1.4. الفايروسات الأيزومترية

تمتاز الفايروسات الأيزومترية Isometrical viruses والمسماة أيضا الفايروسات الكروية Spherical viruses أو الفايروسات البلورية Polyhedral viruses أو الفايروسات العشرينية الأوجه Icosahedral viruses بشكلها البلوري المنتظم المغلق، وتتباين أقطارها بين 25-50 نانومتر وهي تشكل نسبة كبيرة أيضا من أنواع فايروسات النبات، ومن أمثلتها فايروس موزايك الخيار (CMV) و فايروس موزايك القرنابيط (CaMV)، (الشكل 3-4).



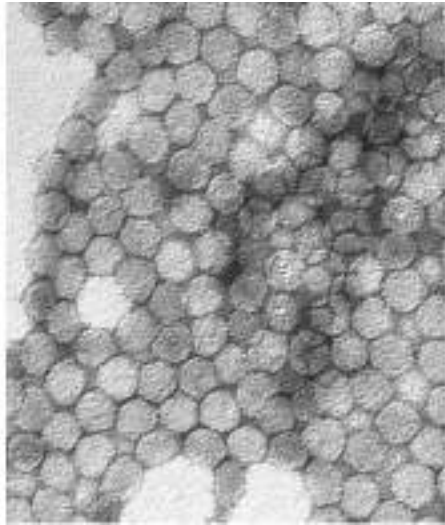
الشريط يمثل 100 نانومتر



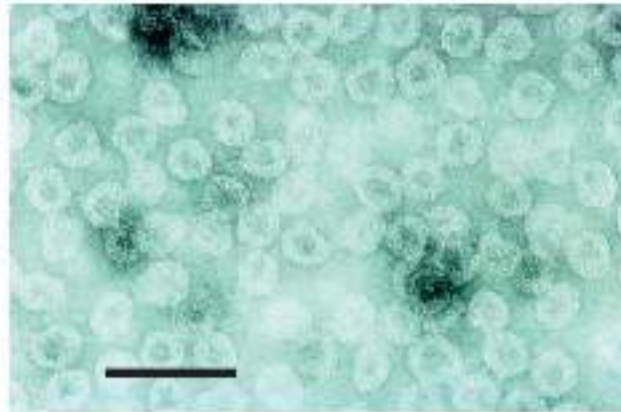
قوة التكبير 20000

(ب)

(أ)



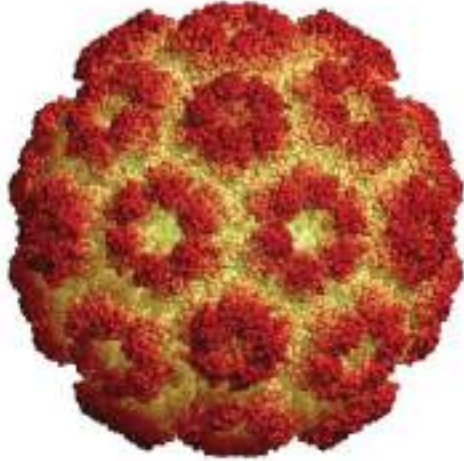
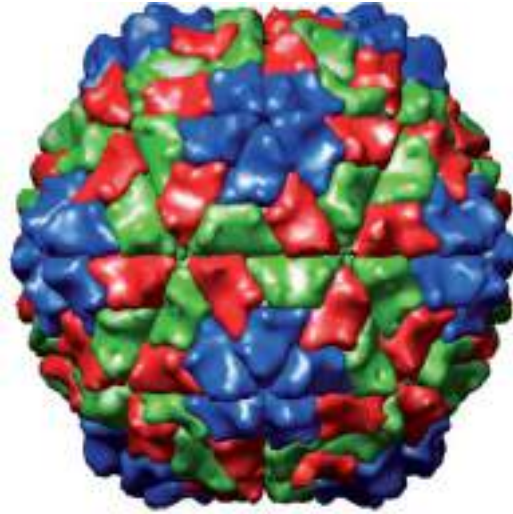
(د)



الشريط يمثل 100 نانومتر

(ج)





(و)

(هـ)

الشكل (3-4): أنواع من الفايروسات الأيزومترية (أ) الجسيمات البلورية لفايروس التقزم الاصفر للشعير (BYDV) (ب) فايروس تبرقش البيلاونا (BeMV) حيث يظهر الشكل الجسيمات الكاملة وعدد من الجسيمات الفارغة من الحامض النووي ذات المركز الغامق بسبب دخول الصبغة فيها، والصورة المكبرة إلى اليمين لجسيمة مكبرة تظهر فيها الكابسوميرات (ج) الجسيمات الكروية لفايروس التقزم الشجيري للعليق (RBDV) (د) الجسيمات البلورية لفايروس التبرقش الاصفر للذرة (MCMV) (هـ) شكل مجسم للتركيب السطحي لفايروس موزائيك البروم يظهر الكابسوميرات الخماسية والسداسية (و) شكل مجسم لكابسيد فايروس التبرقش الاصفر للرز (RYMV) يظهر تكونه من أكثر من نوع من البروتينات وترتيب شبه مكافئ.

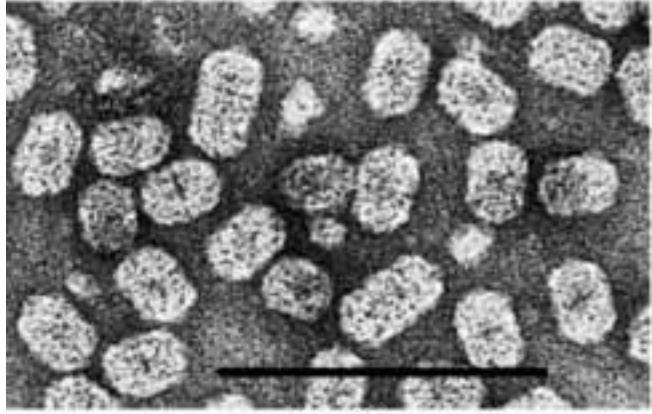
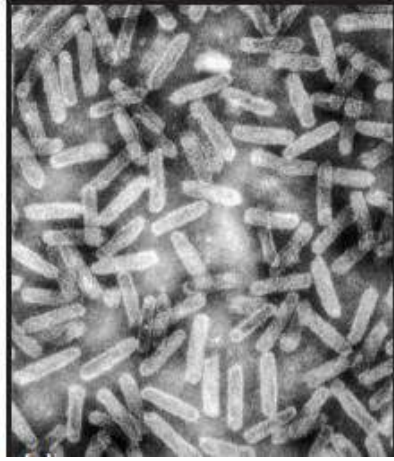
الشكل مقتبس من Mahy و Van Regenmortel (2008).

#### 4.1.4. الفايروسات الباسيلية

تمتاز الفايروسات الباسيلية *Bacillus viruses* بشكلها الأنبوبي العصوي القصير مع نهايات مكورة بشكل نصف دائري، وتتباين في أطوالها وأقطارها حسب نوع الفايروس ومن أمثلتها فايروس موزائيك الجت (AMV) وأفراد الجنس *Badnavirus* بأبعاد  $30 \times 130$  نانومتر، (الشكل 4-4).

#### 5.1.4. الفايروسات الشبيهة بالاطلاقة

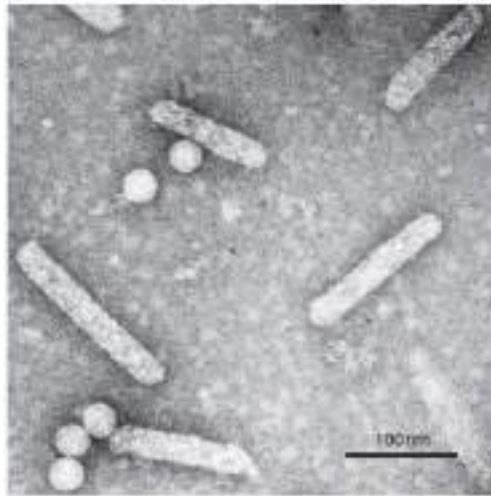
تمتلك الفايروسات الشبيهة بالاطلاقة Bullet-shaped viruses شكلا يماثل كثيرا الشكل الباسيلي إلا أن إحدى النهايتين مستقيمة تماما، وتتباين في أطوالها وأقطارها حسب نوع الفايروس ومن أمثلتها فايروس الأصفرار التماوتي للخس (LNYV)، (الشكل 4-5).



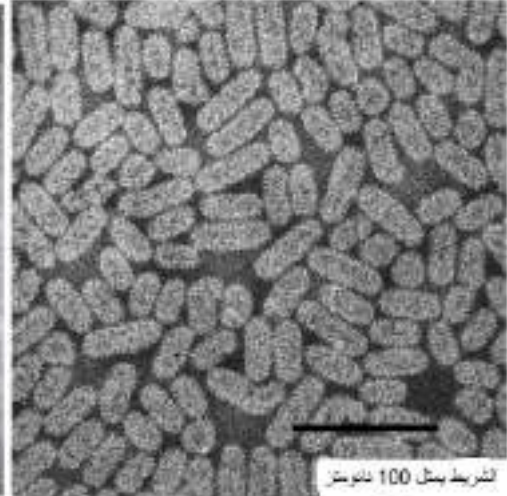
الشريط يمثل 100 نانومتر

(ب)

(أ)



(د)

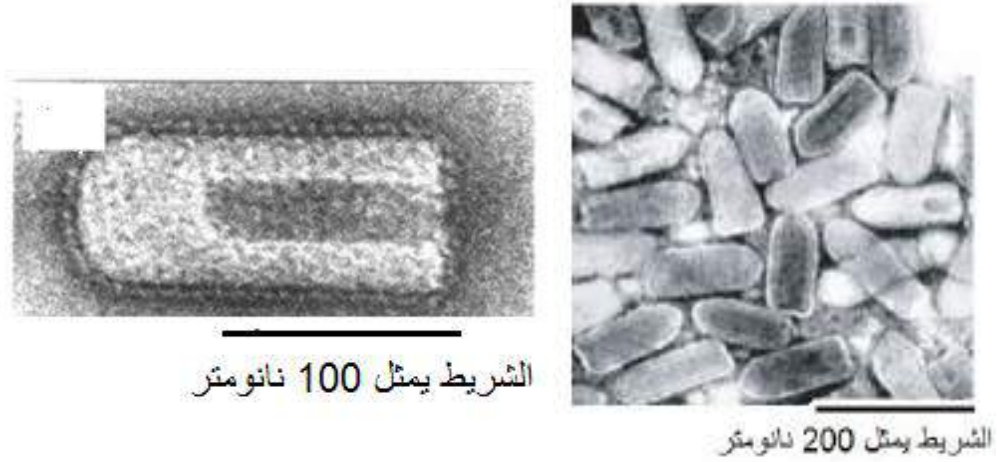


الشريط يمثل 100 نانومتر

(ج)

الشكل (4-4): الجسيمات الباسيلية (أ) لفايروس من الجنس *Ourmiavirus* (ب) لفايروس من الجنس *Badnavirus* (ج) لفايروس موزائيك الجت (AMV) (د) لفايروس تدهور الرز (RTBV) مع ملاحظة وجود عدد من الاجسام الكروية وهي للجسيمات الفايروسية التي صورت من الاعلى.

الشكل مقتبس من Mahy و Van Regenmortel (2008) و Carter و Saunders (2007).



(أ) (ب)

الشكل (4-5): الجسيمات الشبيهة بالاطلاقة المكورة من جهة والمستقيمة من الجهة الأخرى (أ) لفايروس الاصفار التماوتي للخنس (LNYV) (ب) لفايروس التبقع الأحمر لأوراق الليليا (LRLV)، (الشريط يمثل 100 نانومتر).

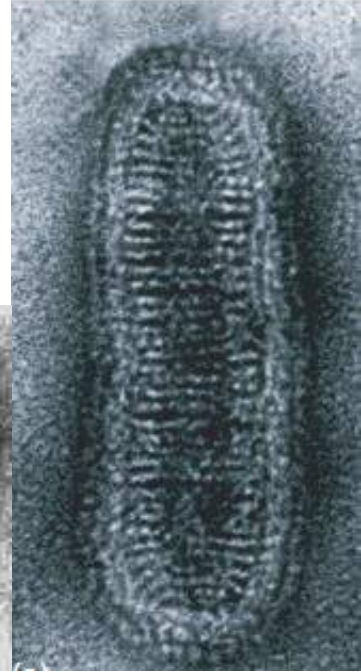
الشكل مقتبس من Carter و Saunders (2007) و Mahy و Van Regenmortel (2008).

#### 6.1.4. الفايروسات المغلفة

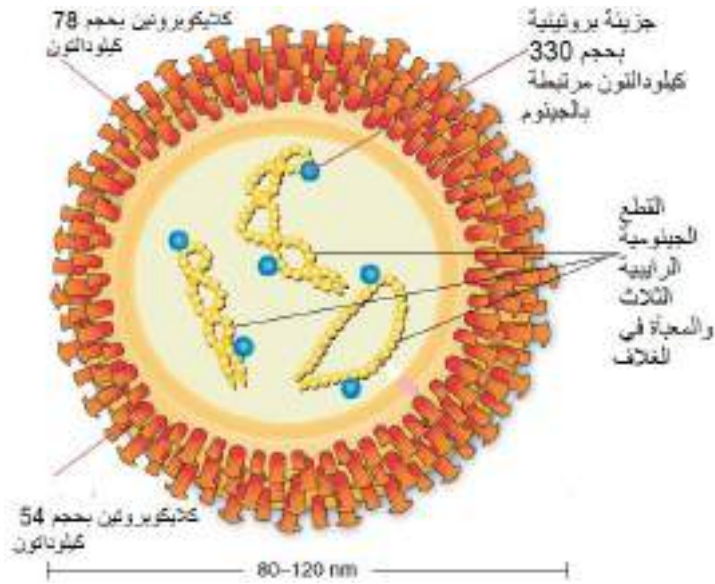
الفايروسات المغلفة *Enveloped viruses* هي فايروسات معقدة التركيب تمتلك غلافا إضافيا *Envelope* ليوبروتيني يحيط بالكابسيد البروتيني الذي قد يأخذ شكلا مغائرا أحيانا للغلاف الخارجي، ومن أهم أمثلتها الأنواع التابعة لعائلة *Rhabdoviridae* التي تمتلك جسيماتها غلافا باسليا أو شبيها بالاطلاقة مكونا من الليبيد التي تبرز منه أشواكا كلايكوبروتينية *Spikes* ويضم داخله نيوكليوكابسيد حلزوني التنظيم، وكذلك الأنواع التابعة لعائلة *Bunyaviridae* وهي فايروسات مغلفة كروية أو متعددة الأشكال *Pleomorphic* ذات أشواك كلايكوبروتينية خارجية منطمة في غلاف ليبيدي مزدوج، (الشكل 4-6). ونظرا لتمائل أغلفة هذه الفايروسات تركيبيا مع الأغشية الخلوية الليبيدية المزدوجة المغلفة للعضيات الخلوية لذا إقترح الباحثون أن الفايروسات المغلفة تكتسب أغلفتها من الأغشية الخلوية الليبيدية المزدوجة وذلك خلال عبورها لها أثناء حركتها في الخلية بآلية التبرعم، الشكل (4-7).



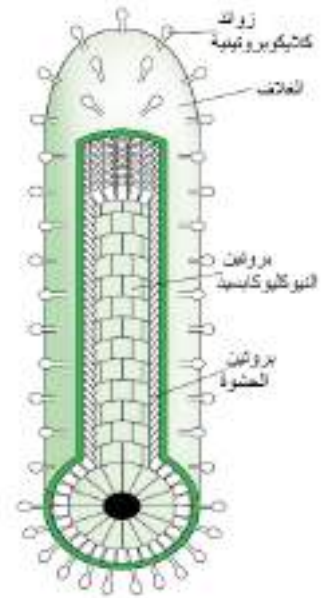
(ب)



(أ)



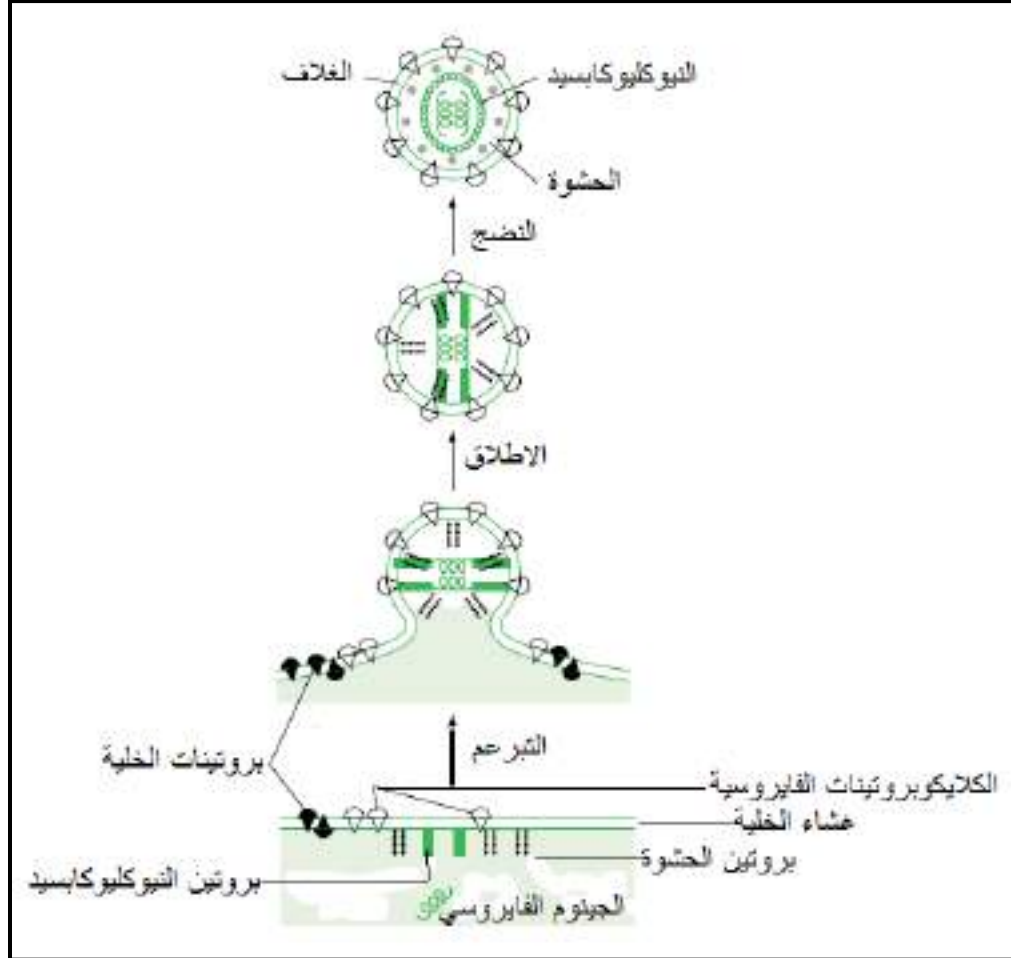
(د)



(ج)

الشكل (4-6): الفايروسات المغلفة (أ) جسيمة مغلفة عصوية معقدة تمثل فايروسات الرابدو Rhabdoviruses مصورة بالمجهر الالكتروني (ب) جسيمة مغلفة كروية معقدة مصورة بالمجهر الالكتروني (ج) مخطط لمقطع في جسيمة لفايروس رابدو المغلفة العصوية (د) مخطط لمقطع في جسيمة لفايروس من فايروسات التوسبو Tospoviruses المغلفة الكروية.

الشكل مقتبس من Mahy و Van Regenmortel (2008) و Cann (2005).



الشكل (4-7): آلية التبرعم Budding التي تفسر تغليف الفايروسات المغلفة بالغلاف الليبيدي المزدوج ذو المنشأ الخلوي خلال عبورها أغشية خلايا العائل.

الشكل مقتبس من Cann (2005).

## محاضرة رقم (6)

### هيكلية فايروسات النبات

#### هيكلية فايروسات النبات

هيكلية فايروسات النبات Architecture of plant viruses هو النظام الذي تترتب به الوحدات البنائية البروتينية لتكوين الكابسيد والكيفية التي يرتبط بها الحامض النووي بتلك الوحدات ونوعية تناظر جسيمات الأنواع الفايروسية، ولغرض فهم هيكلية فايروسات النبات بتنوع أشكالها فإنه يجب معرفة طبيعة الكابسيد الفايروس بأنواعه المختلفة وحسب شكل الفايروس.

. الكابسيد (الغطاء البروتيني)

الكابسيد Capsid هو الغطاء البروتيني للفايروسات Coat or Protein shell وهو تركيب عالي التنظيم يتكون من تجمع هندسي للوحدات البنائية البروتينية يحيط ويرتبط بالحامض النووي وذلك في كل أنواع فايروسات النبات وبذلك يتكون من ارتباطهما الفيزيائي "النيوكليوكابسيد" Nucleocapsid وهو المكون المعقد المتكون من ارتباط الكابسيد بالحامض النووي والذي يمثل كيميائياً "النيوكليوبروتين" Nucleoprotein وهذان المصطلحان يعبران كيمائياً عن الفايروسات النباتية البسيطة، أما في الفايروسات المغلفة فيطلق على النيوكليوكابسيد مصطلح "اللب" Core والذي يغلف بغلاف ليوبروتيني إضافي. إن أول من استعمل مصطلح الكابسيد هو "لوف" (Lowff) في نهاية خمسينات القرن العشرين، وعرفه Casper وآخرون (1962) بأنه الغطاء البروتيني المتناظر الذي يضم الحامض النووي الفايروسي مكوناً النيوكليوكابسيد، ويتكون من وحدات أساسية هي الوحدات البنائية التركيبية.

يتكون كابسيد الفايروسات البسيطة والتي تشكل النسبة الأكبر من فايروسات النبات من وحدات بنائية متماثلة وذلك بسبب محدودية أعداد الجينات الفايروسية مما لا يسمح بتنوع الوحدات البنائية حيث أن تنوع وتعقيد هذه الوحدات يتطلب المزيد من المعلومات الوراثية (الجينات) كذلك فإن هذا التماثل منح الفايروسات ميزة التجميع الذاتي للوحدات البنائية Self assembly عند بناء الكابسيد للوحدات البنائية أي ترتيب تلك الوحدات بطريقة لا تسمح بالخطأ عند البناء حيث ترفض أية وحدة بنائية لا تنسجم مع الترتيب المطلوب وانعكس ذلك على محدودية تصاميم الأشكال الفايروسية التي إنحصرت في الأشكال الخمسة المذكورة، إن هذه المحدودية في الأشكال الفايروسية قد تبدو سلبية تعانيتها الفايروسات ولكنها في الواقع ميزة لها في اتجاهين (1) الاقتصاد في مكونات بناء الغطاء البروتيني أي في الوحدات البنائية (2) كفاءة البناء حيث أن الشكل البلوري هو أكفأ بناء هندسي من ناحية الاستغلال الأمثل للأسطح نسبة إلى الحجم.

تعود محدودية الأشكال الفايروسية إلى (1) أن التركيب الثلاثي للوحدات البنائية مقيد بتتابع الأحماض الامينية فيها، واقترح الباحثون نموذجاً لكيفية تعاقب تلك الأحماض في الوحدة البنائية

أطلق عليه "الصندوق الكربوكسيللي" Carboxy cage والذي تترتب ست مجاميع كربوكسيلية فيه (2) تأثير التركيب الرابعي للبروتين الناتج من التجميع الذاتي للوحدات البنائية عند بناء الكابسيد.

يتكوّن الكابسيد في الفايروسات من المكونات الأساسية التالية:

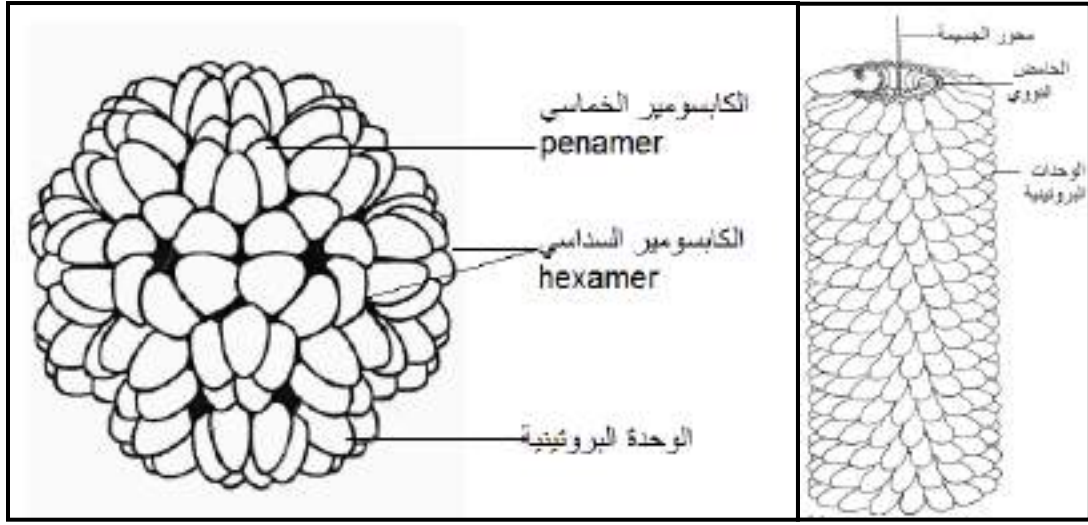
#### 1.1.2.4 الوحدات البنائية التركيبية الأساسية

هي الوحدات الأساسية للكابسيد والتي يصطلح عليها Structural units أو تسمى "الوحدة الشكلية" Morphological units وهي عبارة عن سلسلة ببتيد أحادية الالتفاف Single folded peptide أي تمثل التركيب الثالثي للبروتين، وإذا ما تكونت من نوع واحد من الببتيد عندها تسمى "الوحدة الكيميائية" Chemical unit أو "الوحدة التحتية البروتينية" Protein subunit وهي تمثل فصوص الكابسيد في الهياكل الحلزونية والمكعبية، (الشكل 4-8)، يتكون كابسيد بعض أنواع الفايروسات من وحدات بنائية متماثلة كما في الفايروسات البسيطة لذا يعد الكابسيد في مثل هذه الحالة "مكوثر متجانس" Homopolymer أو Multipleredundants وذلك لتكرار نسخ متماثلة من الوحدات البنائية فيه، أما في الفايروسات الأكثر تعقيدا فيتكون الكابسيد من وحدات بنائية غير متماثلة أي مكوّنة من أكثر من نوع من البروتين ليكوّن "مكوثر غير متجانس" Heteropolymer.

#### 2.1.2.4. الكابسومير

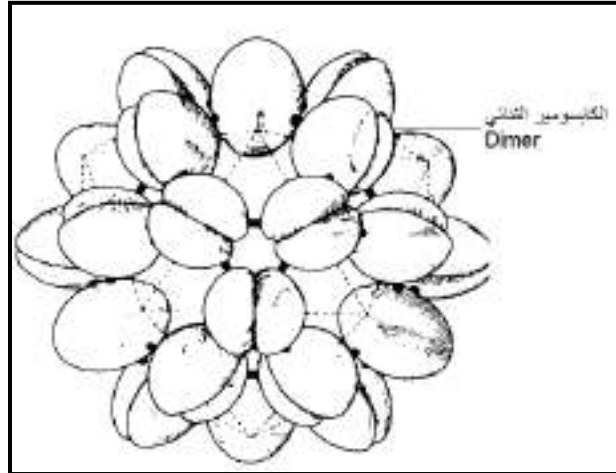
الكابسومير Capsomer والذي يسمى أيضا الوحدة الشكلية Morphological unit هو الوجه المثلي للفايروسات الأيزومترية البلورية ويتكون من تجمع عنقودي منتظم بشكل مثلث متساوي الأضلاع لعدد من الوحدات البنائية التركيبية المتماثلة أو غير المتماثلة، (الشكلين 4-8 و 4-9)، ولا يوجد الكابسومير في الفايروسات الأنبوبية حلزونية التناظر.





(ب)

(أ)

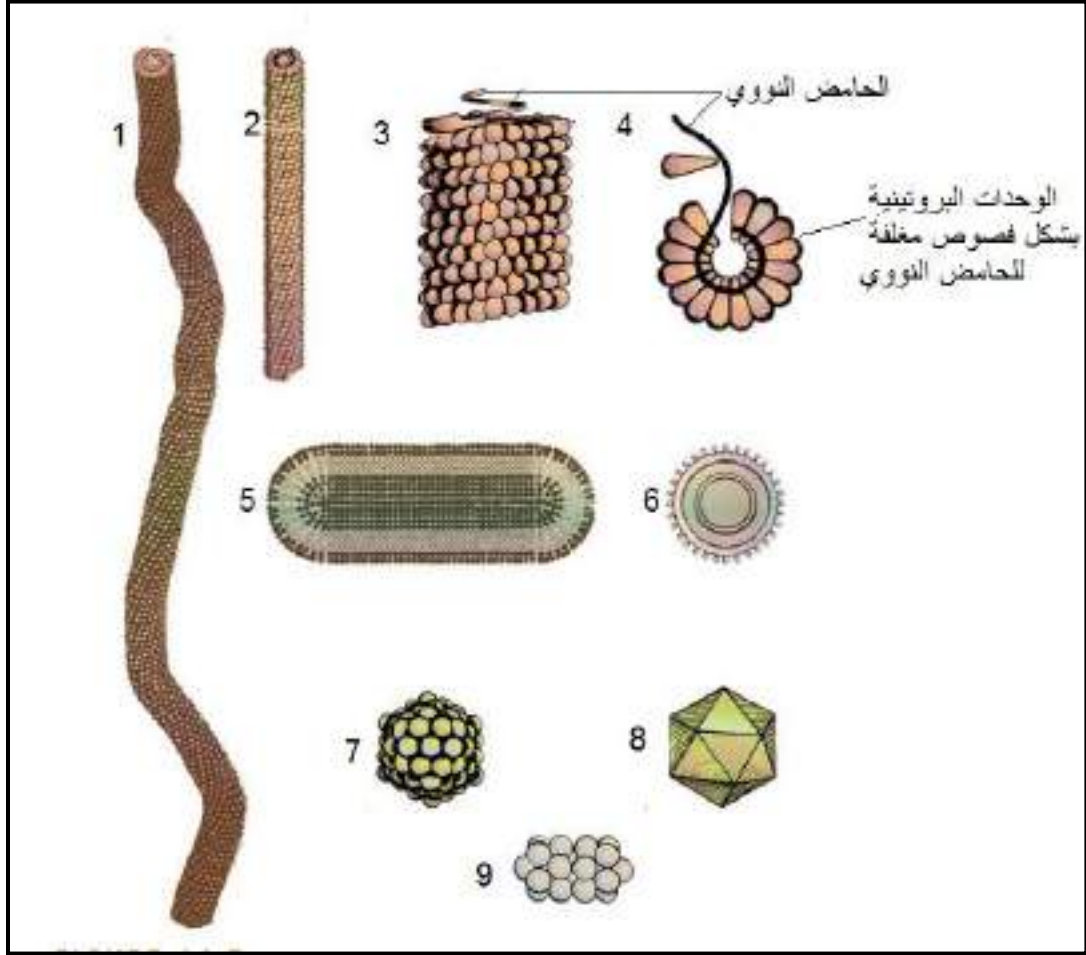


(ج)

الشكل (4-8): هيكلية الفايروسات العسوية المرنة والصلدة والايزومترية وترتيب الوحدات البروتينية الحامية للحامض النووي (أ) مخطط يبين ارتباط الحامض النووي مع الوحدات البنائية البروتينية (الفصوص) في الفايروسات العسوية المرنة والصلدة وان خيط الحامض الحلزوني الواضح أعلى الشكل هو للتوضيح أما في الواقع فانه منظر تماما في الوحدة البنائية البروتينية الأخيرة ولا يظهر منه شيء، فيما يشير محور الجسيمة إلى محور التناظر، لا يوجد كابسومير في هذا الجسم بل إن الفص هو الذي يمثل (ب) مخطط يبين ترتيب الوحدات البنائية البروتينية مكونة كابسوميرات خماسية وسداسية لتكوين البلورة النموذجية الفايروسية عشرينية الوجه

Icosahedron ذات رقم التثليث = 3، ولا يظهر الحامض النووي لانه معبأ داخل البلورة (ج) بلورة فايروس موزائيك الجت (AMV) المكونة من 30 كابسومير من نوع "المثنئى" Dimer.

الشكل مقتبس من Hull (2002).



الشكل (4-9): مخطط عام لهيكلية الفايروسات النباتية (1) فايروس عصوي مرن (2) فايروس عصوي صلد (3) قطعة توضح ارتباط الحامض النووي بالوحدات البروتينية في النوعين السابقين (4) منظر فوقى للعصية الصلدة أو المرنة يبين كيفية ارتباط الحامض النووي بالوحدات البروتينية (5) مقطع في فايروس باسيلي يظهر ترتيب خيط الحامض النووي داخل العصية (6) مقطع عرضي للعصية الباسيلية حيث تمثل الدائرة الخارجية الغطاء البروتيني والدائرة الداخلية الحامض النووي (7) ترتيب الوحدات البروتينية لكابسيد فايروس آيزومتري (8) مخطط هندسي لكابسيد فايروس آيزومتري يبين الأوجه المثلثية الممثلة للكابسوميرات (9) ترتيب الوحدات البروتينية لكابسيد الجسمتين الثنائيتين Geminates المكونة لفيرون فايروسات Geminiviruses.

الشكل مقتبس من Agrios (2005).



#### 2.2.4. أنواع التناظر في فايروسات النبات

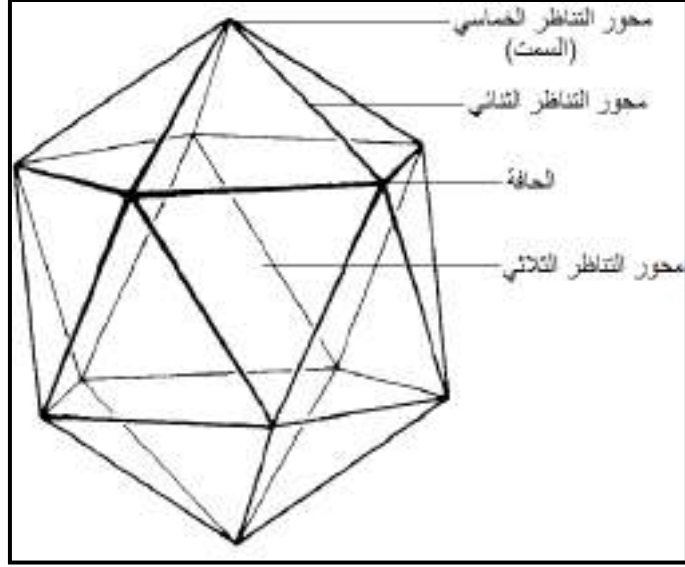
يوجد نوعين رئيسيين من التناظر لفايروسات النبات وهما:

##### 1.2.2.4. التناظر الحلزوني

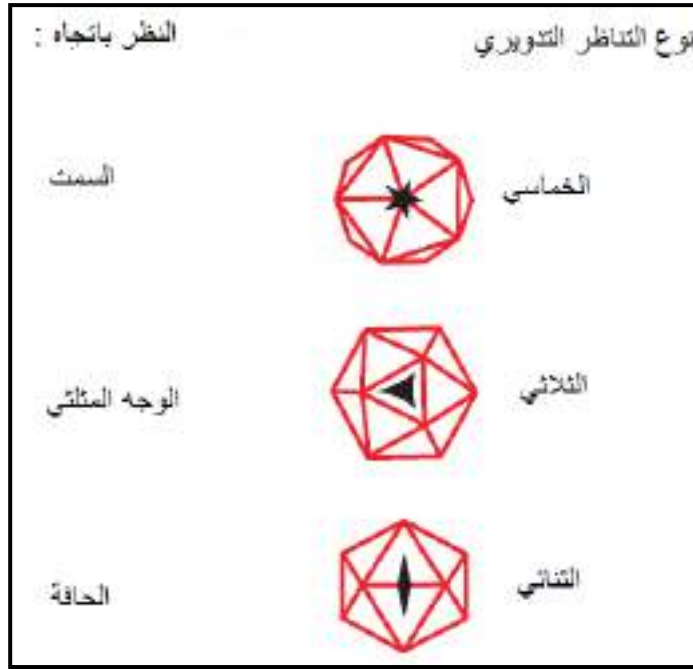
التناظر الحلزوني Helical symmetry هو التناظر الثنائي الذي يميز الفايروسات الأنبوبية بنوعها الصلد والمرن وكذلك الفايروسات الباسيلية وشبيهة الاطلاق. والتناظر الثنائي لأي جسم يعني إنتصاف ذلك الجسم إلى نصفين متماثلين تماما عند مرور خط وهمي في محوره الطولي، (الشكل 4-8 أ).

##### 2.2.2.4. التناظر المكعبي

التناظر المكعبي Cubic symmetry أو التناظر البلوري وهو الذي تمتاز به كل أنواع الفايروسات البلورية أو الكروية أو الايزومترية أو العشريونية الوجه وهو تناظر ثلاثي حيث تمتلك البلورة الفايروسية ثلاثة محاور تدويرية Rotational symmetry وذلك حسب مسقط النظر عند تدوير الجسم البلورية وهي (1) التناظر الثنائي 2-fold symmetry وهو الذي ينصّف البلورة إلى نصفين متماثلين وذلك عند مرور خط وهمي من منتصف الحافة Edge التي تفصل كل مثلثين متجاورين لاثنتين من المخمّسات Pentagons المكونة للبلورة حيث أن كل مُخَمَّس مكون من خمسة مثلثات متساوية الأضلاع تلتقي في نقطة مدببة هي "السمت" Vertex وبذلك يمتلك الجسم البلوري الفايروسي 15 محورا ثنائي التناظر وعند النظر على كل منها عموديا سترى البلورة بجزئها المتماثلين (2) التناظر الثلاثي 3-fold symmetry هو التناظر الذي يقسم البلورة الفايروسية إلى ثلاثة أجزاء متماثلة عند مرور خط وهمي في مركز كل وجه مثلثي حيث تضم البلورة الفايروسية العشريونية الوجه عشرة محاور ثلاثية 3-fold axes عليه عند النظر عموديا على مركز كل وجه مثلثي ستظهر البلورة وكأنها مقسمة إلى ثلاثة أجزاء متماثلة (3) التناظر الخماسي 5-fold symmetry هو التناظر الذي يقسم البلورة الفايروسية إلى خمسة أقسام متماثلة وذلك عند مرور خط وهمي من محور يمر من قمة السمت حيث تضم البلورة ستة محاور خماسية، (الشكل 4-10) توجد الفايروسات البلورية بأشكال مختلفة تتباين في درجة تعقيد بلوراتها وكما مبين في الشكلين (4-3 و 4-9) الذي يظهر مخططات للبلورات الفايروسية العشريونية المكونة من كابسوميرات ثنائية وخماسية وسداسية.



(أ)



(ب)

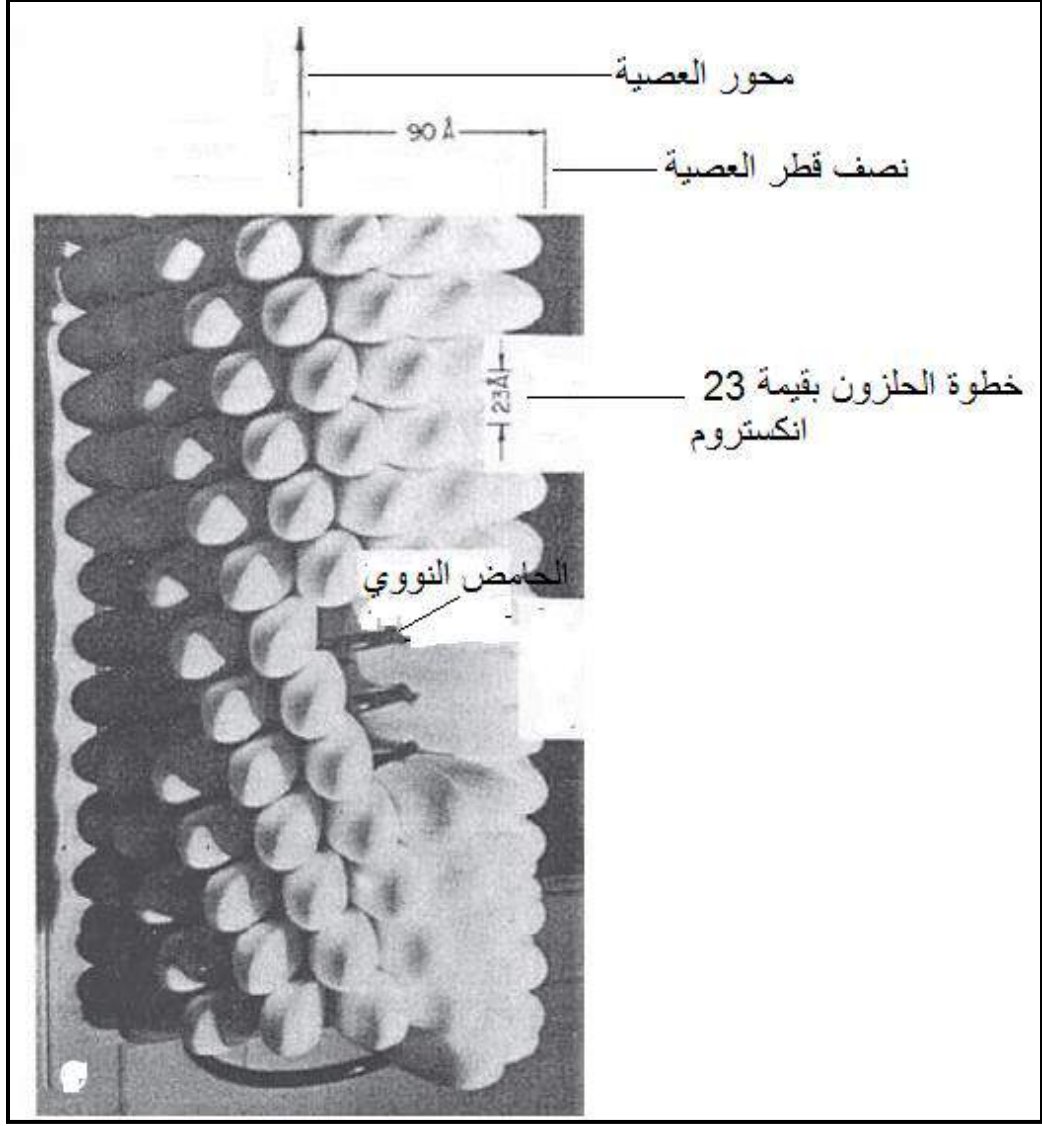
الشكل (4-10): أنواع التناظر في الفايروسات البلورية (أ) الشكل الهندسي لبلورة نموذجية لفايروس عشريني الأوجه Icosahedron وفيها 12 سمت و 20 وجه مثلثي متماثل يبين محاور التناظر الثلاثة وهي: التناظر الثنائي، والتناظر الثلاثي، والتناظر الخماسي (ب) مخطط توضيحي لمحاور التناظر الثلاثة.

الشكل مقتبس من Carter و Saunders (2007) و Hull (2002).

### 3.2.4. كيفية بناء الفايروسات العصوية

يعد فايروس موزائيك التبغ (TMV) أفضل مثالا لتوضيح هيكلية الفايروسات العصوية وكيفية بناؤها فجسيماته عضية حلزونية صلدة بطول وقطر  $18 \times 300$  نانومتر على التوالي ويشكل البروتين 95% من كتلتها والمنتقي هو الحامض النووي، يتكون الكابسيد من 2130 وحدة بروتينية مرتبة حلزونية Helical array بترتيب محكم التنظيم ومماثل للترتيب الحلزوني للحامض النووي بحيث ترتبط ثلاث نيوكليوتايدات مع كل تحت وحدة بروتينية من وحدات الكابسيد، وتبلغ قيمة "خطوة الحلزون" Pitch of helix 2,3 نانومتر، وخطوة الحلزون هي عدد النيوكليوتايدات في الدورة الحلزونية الواحدة والتي يصبح فيها موقع نيوكليوتايدة معينة تماما فوق مسقط النيوكليوتايدة الأولى التي بدأت بها الدورة وتقاس بالمسافة التي تشغلها دورة كاملة من الحلزون في جينوم الفايروسات العصوية وهي صفة تشخيصية لكل فايروس عصوي مرن أو صلدة. تتكون دورة حلزون هذا الفايروس من 49 نيوكليوتايدة وهذا يعني أنه لكي يصبح مسقط النيوكليوتايدة الأخيرة تماما فوق مسقط النيوكليوتايدة الأولى التي بدأ بها الالتفاف فان هذا يتطلب ثلاث دورات حلزونية لكابسيد هذا الفايروس أي 49 نيوكليوتايدة و 16,3 تحت وحدة بروتينية لأن كل واحدة منها ترتبط بثلاث نيوكليوتايدات، (تحت الوحدات البروتينية لا تتجزأ ولكن المسافة التي تشغلها 49 نيوكليوتايدة تساوي مسافة 16,3 تحت وحدة بروتينية) وهكذا يتكرر هذا النظام كل ثلاث دورات لغاية نهاية العضية، (الشكل 4-11) تبتعد مجاميع الفوسفات بحدود 4 نانومتر عن محور العضية ويكون اتجاه دوران الحلزون هو الاتجاه اليميني Right-handed أي من اليسار إلى اليمين، وتكون إحدى نهايتي العضية مقعرة Concave ترتبط بها النهاية 5 للحامض النووي أما النهاية الأخرى فهي محدبة Convex وترتبط بها النهاية 3، ويبلغ قطر القناة المركزية المجوفة للعضية 4 نانومتر.

تتنظم سلسلة الحامض النووي بأحكام في الحلزون متداخلة مع كل الوحدات البروتينية وتبقى منطمة في الودعتين النهائيين الأولى والأخيرة من دون أن تظهرا منهما. تتكون الوحدة البروتينية لهذا الفايروس من 158 حاض أميني وتأخذ النسبة الأكبر من هذا البروتين شكل التركيب الثاني Secondary structure حيث تكوّن ما يقرب من 50% من الأحماض الامينية الداخلة في بناء الوحدة البروتينية أربعة تراكيب حلزونية من النوع "ألفا"  $\alpha$  - helix و 10% من النوع "بيتا"  $\beta$  - helix فيما تشكل بقية الأحماض الامينية الدورات العكسية Reverse turns، (الشكل 4-12) وتكون النهايتين الكربوكسيلية والامينية للبروتين باتجاه السطح الخارجي للجسيمة.



الشكل (4-11): مجسم توضيحي يبين هيكلية جسيمة (عصية) فايروس موزائيك التبغ (TMV) وخطوة الحلزون ونصف قطر الجسيمة بقيمة 90 انكستروم.

الشكل مقتبس من Hull (2009).

## محاضرة رقم (7)

### استجابة النباتات العائلة للإصابة الفايروسية

تستجيب النباتات للإصابة الفايروسية بمدى واسع من الأعراض التي تتأثر بنوع الفايروس وسلالاته ونوع العائل والظروف البيئية وخاصة الحرارة والضوء وموعد الإصابة. تستغرق الأعراض الفايروسية للظهور في النباتات العشبية بين عدة أيام إلى عدة أسابيع وقد تستغرق سنة أو أكثر للظهور في النباتات المعمرة وأشجار الفاكهة والغابات. تخفض الإصابة الفايروسية من كمية الحاصل أو تؤدي إلى فقده تماما ويعرف ذلك "بفشل المحصول" Crop failure وذلك بتأثيرها على حيوية النبات Plant viability. تتباين الفايروسات في مداها العائلي (المدى المضيفي) Host range فهناك أنواع واسعة المدى العائلي ومنها فايروس خشخشة التبغ (TRV) الذي يصيب ما يقرب من 400 نوعا نباتيا تنتمي إلى 50 عائلة نباتية، وتوجد بالمقابل فايروسات محدودة المدى العائلي ومنها فايروس تبرقش قرنات الفاصوليا (BPMV) الذي يصيب البقوليات فقط، وإن المدى العائلي للفايروسات هو علاقة وراثية بين الفايروس وعائله النباتي، كذلك فإن الإصابات الفايروسية هي تعبير منظور Macroscopic expression لحالات غير طبيعية تحصل في النباتات مما يسبب ظهور مدى واسع من الأعراض التي تتغير بتباين الظروف البيئية وخاصة الضوء والحرارة وعمر النبات، كما تتباين الأعراض الفايروسية على نفس النبات الفرد المصاب بدءا من وقت ظهور الأعراض لغاية تكاملها مسببا ذلك ما يعرف بمصطلح "مُتَّصلة الأعراض" Syndrome أي تطور الأعراض مع الزمن.

#### 1.5. أنواع أعراض الأمراض الفايروسية

تسبب الفايروسات عند إصابتها لنباتاتها العائلة نوعين رئيسيين من الأعراض وهما:

##### 1.1.5. الأعراض الخارجية

الأعراض الخارجية External symptoms هي الأعراض المرئية التي تظهر على النباتات المصابة وتقسم إلى الأنواع التالية:

##### 1.1.1.5. الأعراض الموضعية

الأعراض الموضعية Local symptoms هي الأعراض المعبرة عن الإصابات الموضعية والتي تظهر وتتطور قرب موقع الإصابة أي في منطقة دخول الفايروس، وهي أعراض قليلة الظهور مع أغلب الإصابات الفايروسية لان ظهورها يعني مقاومة النباتات للفايروسات ومنعها من الحركة إلى الخلايا السليمة المجاورة لمنطقة الدخول، أو يفسر ظهورها بان الأنسجة المصابة قد تكون أنسجة في المرحلة التطورية أو الايضية النشطة غير المتميزة حيث تكون الخلايا في حالة من النشاط



الايضي الشديد الذي لا يسمح للفايروسات بالتضاعف، أو أن جرعة الفايروس التي دخلت إلى النبات منخفضة جدا لا تكفي لإحداث الإصابة الجهازية. تظهر الأعراض الموضعية بحالات متنوعة أشهرها أعراض البقع الموضعية الميتة Necrotic local lesions أو البقع الموضعية المصفرة

Chlorotic local lesions، (الملحق 3).

عادة ما يتحدد الفايروس الذي يسبب البقع الموضعية الميتة بمنطقة البقعة ولا ينتشر جهازيا أما مع البقع الموضعية المصفرة فإن الفايروس قد يستمر بالانتشار خارج البقعة إلى الخلايا المجاورة ليصبح لاحقا جهازيا الانتشار. إن عدد البقع الموضعية التي تظهر على الأوراق الملقحة هو مؤشر لتركيز الفايروس في اللقاح الفايروسي وهذا مفيد في تقييم نتائج التنقية واختبارات الخواص الفيزيائية للفايروسات ودراسة تركيزها في أنسجة النبات لذلك أصبحت هذه الطريقة إحدى أهم أدوات الاختبار الحيوي الكمي للفايروسات كما أن البقع الموضعية هي مهمة جدا لفصل السلالات التي تعود لنوع فايروسي معين، إن ظهور البقع الموضعية هو ليس حصرا على الأوراق وإن كان هو الأكثر شيوعا بل يمكن أن تظهر بدرجة أقل على الجذور والبذور مصاحبة لبعض الإصابات الفايروسية، كذلك فإن ظهور البقع الموضعية هو تعبير عن آليات الدفاع النباتية في النباتات المقاومة وخاصة حالة "الحساسية المفرطة" Hypersensitive reaction حيث يسبب الفايروس بعد دخوله للنبات استحثاثا للاستجابة الخلوية تؤدي إلى تحلل نوى الخلايا ثم موت مجموعة الخلايا المصابة المكونة للبقعة مما يمنع تقدم الفايروس جهازيا في النبات.

#### 2.1.1.5. الأعراض الجهازية

الأعراض الجهازية Systematic symptoms هي الأعراض التي تظهر وتتطور بعد تحرك الفايروس جهازيا في النبات ووصوله إلى الأنسجة التي يتطفل عليها عبر الأوعية الناقلة، وتظهر هذه الأعراض بعد عدة أيام من الإصابة في النباتات الحولية بشكل أعراض معتدلة Mild symptoms في بداية الإصابة وهي تمثل الأعراض الابتدائية Primary symptoms ثم تتحول إلى أعراض حادة Acute or sever symptoms أو تسمى "الصدمة" Shock بعدها تتحول إلى أعراض مزمنة Chronic symptoms وأحيانا يموت النبات دون إظهار الأعراض المزمنة، تظهر الأعراض الجهازية بانواع عديدة ومتنوعة وهي:

أ- أعراض تغيرات اللون

تغيرات اللون Discoloration هي إحدى أكثر الأعراض ظهورا مع الإصابات الفايروسية الجهازية حيث تؤثر الإصابة على الصبغات النباتية وخاصة الكلوروفيل، وتظهر هذه الأعراض بأشكال متنوعة أهمها أعراض "الموزائيك" Mosaic وهو تداخل لمساحات غير منتظمة صفراء أو خضراء فاتحة أو حمراء أو بيضاء مع مساحات تحمل اللون الطبيعي الأخضر على نصل الورقة وهناك حدود واضحة بين المساحات اللونية، ويشمل هذا التغير اللوني خلايا البشرة والقشرة في

الأوراق حيث تسبب الإصابة تكثف وتحلل كلوروبلاستات الخلايا المصابة ويعتقد أن الإصابة بالموزائيك تحصل في وقت مبكر من نشوء الورقة حيث يصيب الفايروس الخلايا المنشأة للورقة وقبل تطور وانسباط النصل، عليه فالخلايا الأولية المصابة ستعطي المناطق المصابة بعد انسباط النصل فيما ستعطي الخلايا الأولية السليمة المناطق غير المصابة من النصل. قد يسبق ظهور الموزائيك أنواع أخرى من أعراض تغيرات اللون وهي أعراض "شفافية العروق" Vein clearing أو تسمى "اصفرار العروق" Vein chlorosis والتي تنطور لاحقا الى موزائيك كما تصاحب أعراض الموزائيك الشديد عادة أعراض "التنقُّط" Blistering وهي بروز المناطق الخضراء الداكنة للنصل وتقبيها بشكل "فقاعات" Blisters وانخفاض مستوى المناطق المصابة وذلك بسبب توقف نموها واستمراره في المناطق السليمة من النصل.

من أعراض تغيرات اللون المهمة هي "التبرقش" Mottling , Mottle وهي أعراض تشابه الموزائيك لذلك يستخدم المصطلحين خطأ كمترادفين إلا أن هناك فرقا بينهما إذ يمتاز التبرقش بكثرة انتشار المساحات اللونية على الورقة المصابة وصغر تلك المساحات وصعوبة ملاحظة حدود فاصلة بين المساحات الخضراء السليمة وتلك المصابة.

تظهر تغيرات اللون مع بعض الإصابات الفايروسية أيضا بشكل أعراض "تحزم العروق" Vein banding حيث تظهر عروق الورقة المصابة والأنسجة المحيطة بها باللون الأخضر الداكن مع تحول بقية النصل إلى الأخضر الفاتح أو الأصفر.

أما أعراض "البقع الحلقية" Ring spots فهي من أعراض تغيرات اللون المهمة التي تصاحب بعض الإصابات الفايروسية وعلى الأوراق خاصة وبدرجة أقل على الثمار حيث تظهر بشكل بقع منتظمة كبيرة المساحة نسبيا ذات مركز اصفر عادة تحيطه هالة خضراء أو حمراء وقد يموت مركز البقعة أحيانا وبشكل حلقات متحدة المركز.

تظهر على أوراق النباتات النجيلية وغيرها من رقيقة الأوراق ذات التعريق المتوازي الطولي أو العرضي، أعراض "التخطيط" Streak وهي خطوط مصفرة تمتد طوليا أو عرضيا حسب نوع التعريق وبشكل متقطع بموازية عروق الورقة، وإذا كانت الخطوط مستمرة يطلق على التخطيط مصطلح Stripe أو Striate.

وتعد أعراض الاصفرار Yellowing or Chlorosis إحدى أهم أعراض تغيرات اللون حيث تسبب الإصابة الفايروسية اختفاء لون الأوراق الأخضر تماما أو جزئا كبيرا منه بسبب تحلل الكلوروفيل.

توجد أنواع من أعراض تغيرات اللون هي أقل ظهورا مع الإصابات الفايروسية مقارنة مع الأعراض التي ذكرت آنفا ومنها أعراض "الابيضاض" Blanching وهي تلون النسيج المصاب باللون الأبيض وكأنه لم يتعرض إلى أشعة الشمس، وكذلك أعراض الاحمرار Reddening أو التلون الوردي Purpling والتي تتسبب عن تشجيع الإصابة الفايروسية لتكوين صبغات

الانثوسيانينات أو الكاروتينويدات، كما تظهر حالة التلون البني Browning النادرة وتصاحب بعض الفايروسات ومنها فايروس التلون البني المبكر للبزاليا (PEBV)، وكذلك أعراض التلون البرونزي Bronzing بسبب حصول موت سطحي لخلايا البشرة.

إن أعراض تغيرات اللون هي واسعة الانتشار وتصاحب الإصابة بعدد كبير من أنواع الفايروسات لعوائلها النباتية كما ارتبطت أسماء الكثير من الفايروسات بأسماء تلك الأعراض.

تظهر أعراض تغيرات اللون أيضا على الأعضاء الأخرى من النبات وان كانت أكثر شيوعا على الأوراق حيث تظهر على الأزهار والثمار والأفرع و الجذور، ومنها أعراض التلون الزهري المعروفة بأعراض "الإنفصال اللوني" Color breaking على أزهار التبوليب والمتسببة عن الإصابة بفايروس الانفصال اللوني للتبوليب (TBV) ويسبب فايروس الموزائيك الشديد للسوسن (ISMV) و فايروس موزائيك الخيار (CMV) أعراض موزائيك على بتلات أزهار السوسن والأوركيد والكلايولس مما يؤثر على قيمتها التسويقية. كذلك تظهر أعراض تغيرات اللون على ثمار العديد من أنواع النباتات ومنها تلون ثمار الطماطة عند الإصابة بفايروس موزائيك الطماطة (ToMV) والذبول المبغ للطماطة (TSWV)، (الملحق 3).

#### ب- أعراض التشوهات

تسبب العديد من الفايروسات حالات متنوعة من أعراض التشوه Malformation التي تظهر على أي من أجزاء النبات وخاصة الأوراق، والتشوهات هي أعراض متنوعة وشائعة جدا مع الإصابات الفايروسية ويطلق عليها العديد من المصطلحات، كما ارتبطت أسماء العديد من الفايروسات بنوع التشوه الذي تسببه ومن أعراض التشوه (1) "تجدد الأوراق" Leaf curling , Cupping إذ يتجدد النصل بسبب خلل في النظام الوعائي وخاصة اللحاء ويعاق نقل المواد الغذائية في الأوراق وتتجمع فيها فيتجدد النصل (2) "التفاف الأوراق" Leaf rolling حيث يتحول النصل إلى شكل أنبوبي بالتفافه الى الأعلى وذلك بسبب تراكم النشا نتيجة إعاقة حركة المواد الغذائية في اللحاء (3) "اختزال النصل" أو تسمى "أعراض القيطان" Shoe-string or strap-leaf symptoms وهي شائعة مع العديد من الفايروسات وخصوصا تلك التي تسبب الموزائيك الشديد حيث يختفي معظم النصل ولا يبقى منه إلا العرق الوسطي وجزء من النسيج ويطلق على هذه الأعراض أيضا "ضيق النصل" Leaf narrowing أو "الورقة السرخسية" Fern leaf (4) "التجدد الشديد للأوراق Rugosity هو تشوه وتجدد شديد للنصل بسبب النمو التراجعي (تباطؤ النمو) لأنسجة الورقة حيث يتوقف النمو في بعض مساحات النصل ويستمر في أخرى وعادة ما تظهر هذه الأعراض ملازمة لأعراض الموزائيك أو التبرقش الشديدين والتنفت (5) "البروزات الورقية" Enations هي نموات ورقية زائدة تنبثق من عروق السطح السفلي للاوراق المصابة وتكون إما بشكل نموات خلوية غير منتظمة تسمى Histoid أو نموات خلوية منتظمة تشبه خلايا الورقة الطبيعية تسمى Organoid (6)

"الأورام والعقد" Tumors and Galls هي أورام صلبة القوام تظهر على أجزاء النبات المصابة وخاصة السوق أو الجذور أو الثمار بسبب النمو غير الطبيعي للأنسجة المصابة والتي تحصل فيها ظاهرتي "الانقسام غير المنضبط للخلايا Hyperplasia أو تضخم الخلايا Hypertrophy (7) تشوه الجذور حيث تعمل بعض الفايروسات على إحداث تشوهات في الجذور وتغير في طبيعة التفرعات الجذرية ومن أكثرها وضوحا هي أعراض "الرايزومانيا" Rhizomania وهي عبارة عن تفرعات كثيفة مشوهة للجذر (8) "التواء الأوراق" Epinasty حيث يصبح اتجاه أوراق النباتات المصابة نحو الأسفل وذلك بسبب ازدياد نمو الجزء العلوي من أعناق الأوراق وتباطؤ نمو الجزء السفلي، وهناك حالة معاكسة وهي التواء الأوراق في نموها للأعلى وتسمى Hyponasty وهي ليست أعراضا فايروسية (9) "التورد" Rosetting وهي من أعراض التشوه الشائعة التي تصاحب الكثير من الفايروسات حيث يتقزم النبات وتتقارب نمواته الخضرية فيأخذ المجموع الخضري للنبات شكل الزهرة وذلك بسبب تقزم سلاميات الأفرع نتيجة الخلل الهرموني الذي تسببه الإصابة الفايروسية وعندما تظهر هذه الحالة التشوهية على الأشجار تسمى الأعراض حينئذ "مكنسة الساحرة" Witch's broom (10) تشوهات في الأعضاء الزهرية مما يسبب عقم الأزهار فيحصل إجهاض الأزهار Abortion أي فشل الإخصاب وعدم تكون الثمار (11) هناك العديد من حالات التشوه الأخرى المتنوعة الأقل ظهورا ومنها أعراض تشوه الأوراق المسماة بأعراض "ورقة البلوط" Oak leaf pattern حيث يأخذ النصل شكل ورقة البلوط، وكذلك أعراض "النشطؤ" Proliferation وهي زيادة نشوء النموات الجديدة لأفرع النباتات النجيلية (الاشطاء) Sprouts، (الملحق 3).

#### ج- أعراض التقزم

ينتج التقزم Stunting , Dwarfing عن تباطؤ نمو النبات المصاب فيصبح بأكمله أو بعض أجزائه أقل حجما بكثير من النبات السليم ويوجد نوعين من أعراض التقزم المتسببة عن الإصابات الفايروسية وهما (1) التقزم الكلي للنبات بأكمله (2) التقزم الجزئي وهو الذي يظهر على بعض أجزاء النبات كالأوراق أو الثمار مع احتفاظ بقية النبات بحجمه الطبيعي. إن أعراض التقزم إن لم تصاحبها أعراض تغيرات اللون أو التشوهات فانه ليس بالسهولة الكشف عنها إن لم تقارن مع النباتات السليمة المجاورة، وقد يكون التقزم طفيفا جدا غير محسوس كما في الإصابات الكامنة، وهناك العديد من الفايروسات المسببة للتقزم والتي ارتبط اسمها بهذه الأعراض، (الملحق 3).

#### د- أعراض الذبول

تسبب قلة من الفايروسات أعراض ذبول Wilt نتيجة إصابتها لأوعية الخشب أو اللحاء ومن أشهر حالات الذبول هي التي يسببها فايروس ترستيزا الحمضيات (CTV) الذي يسبب ذبولا سريعا لأشجار الحمضيات حيث يهاجم منطقة التركيب في الساق الرئيسي ويقتل أوعية اللحاء فيها مما يؤدي إلى عدم وصول الغذاء إلى الجذور وموتها ثم موت الشجرة سريعا لذلك يسمى المرض

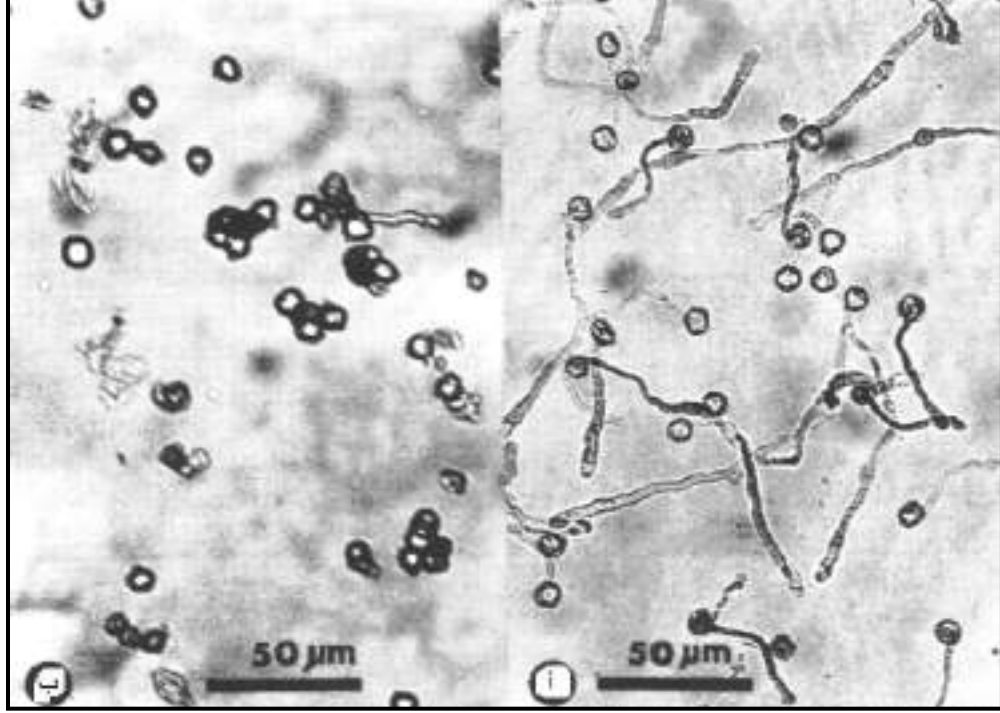
"التدهور السريع" وهناك فيروسات ارتبط اسمها بالذبول ومنها فايروسي ذبول الباقلاء الاول والثاني (BBWV-1 , BBWV-2) وفايروس الأصفرار التماوتي للباقلء (FBNYV) كما تسبب بعض الفايروسات أعراض ذبول موضعية تسبب جفافا موضعيا لبشرة الأوراق وتسمى هذه الأعراض "النقش" أو "التنقُّر" Etching، (الملحق 3).

#### ه- أعراض موت النسيج (النكروزز)

أعراض موت النسيج Necrosis هي قليلة الظهور عادة مع الإصابات الفايروسية ولكن تسبب عدد من الفايروسات حالات متنوعة من موت الأنسجة على الأوراق بشكل لفحات Blights، ويظهر موت النسيج أيضا بشكل خطوط بنية تمتد مع عروق الورقة كما هو الحال عند إصابة البطاطا بفايروس البطاطا واي (PVY) وخاصة السطح السفلي للأوراق والتي تمتد إلى الأفرع أيضا، كذلك يسبب فايروس تكتل قمة البطاطا (PMTV) خطوط ممتاوتة في الدرنة ويلاحظ أن هناك علاقة طردية بين عمق موقع الخط البني في الدرنة وتركيز الفايروس في النبات. تسبب بعض الفايروسات حالات من موت الأنسجة في الجذور كما في إصابة البطاطا الحلوة بفايروس التبرقش الريشي للبطاطا الحلوة (SPFMV) حيث تظهر خطوط فلينية داخلية وتشققات خميرية اللون Russet cracks في الجذور، ومن أعراض موت النسيج الجذري المعروفة هي أعراض "اسوداد الجذر" Blackening الذي يسببه فايروس الموزائيك العادي للفاصوليا (BCMV) على جذور الفاصوليا ويسمى المرض "الجذر الأسود للفاصوليا" Bean black root كما سجلت حالات من موت النسيج النباتي تحصل في سوق الأشجار مصاحبة لبعض الفايروسات وأهمها موت منطقة التركيب في سيقان اشجار صنف التفاح "الأحمر الشهوي" Red delicious عند تركيبه على بعض الأصول حيث تحصل حالة عدم توافق تركيبى Graft incompatibility فتضعف منطقة التركيب سنة بعد أخرى لحين موت الشجرة ويطلق على المرض "الخط البني" Brown line disease أو تدهور التفاح الذي يسببه فايروس التبغ الحلقي للطماطة (ToRSV)، (الملحق 3).

#### و) أعراض متنوعة

تسبب الفايروسات أنواع متنوعة من الأعراض التي لا تندرج تحت أي من الأعراض التي ذكرت آنفا، حيث يسبب فايروس موزائيك فول الصويا (SMV) خفضا لعدد العقد الجذرية، ويسبب فايروس الموزائيك التخطيطي للحنطة (WSMV) إرباك وراثي في النبات بسبب إصابته لحبوب اللقاح يؤدي إلى شنوذ وراثي بعد إخصاب الأزهار في الجيل الناتج فتظهر حالة "تأثير توزيع الشنوذ" Aberrant Ration effect وتسمى إختصارا ER-Effect بسبب تثبيط إنبات حبوب اللقاح، (الشكل 5-1)، كما تسبب بعض الفايروسات موتا سريعا للنباتات وتعرف الحالة بالصدمة Shock.



الشكل (5 - 1): تأثير الإصابة بفايروس التبغ الحلقي للتبغ (TRSV) على إنبات حبوب لقاح نبات فول الصويا بعد 24 ساعة من وضعها في محلول السكروز تركيز 30% (أ) حبوب اللقاح السليمة (ب) حبوب اللقاح المصابة الفاقدة لأنابيب الإنبات

الشكل مقتبس من Hull (2002).

#### 2.1.5. الأعراض الداخلية

الأعراض الداخلية Internal symptoms هي الأعراض التي تسببها الفايروسات على المستويين الخلوي والنسيجي في النباتات المصابة والتي يمكن رؤيتها بالمجهر الضوئي أو الالكتروني.

#### 1.2.1.5. الأعراض على المستوى الخلوي

هي كافة التغيرات التي تحصل داخل الخلايا المصابة بالفايروسات والتي تشاهد بالمجهر الضوئي أو الالكتروني وهي:

أ- تشوه أو تحلل عضيات الخلية

يقصد بعضيات الخلية Organelles المايكوتونديريا والبلاستيدات حيث تحصل تشوهات في المايكوتونديريا أو تتجمع وتتكتل كما هو الحال عند الإصابة بفايروس خشخشة التبغ (TRV)، كما تسبب العديد من الفايروسات تغيرات وتشوهات أو تحلل البلاستيدات وخصوصا مع الفايروسات المسببة لأعراض الموزائيك.

## ب- تغيرات في الجدر الخلوية

تتمثل هذه التغيرات بزيادة في سمكها بسبب ترسيب الكالوس أو ظهور نتوءات داخلية على البطانة الداخلية للجدر ناشئة من البلازموديزمات مع ترسيب مواد جدارية جديدة أو ترسيب مواد كثيفة القوام بينه وبين الغشاء البلازمي تسمى Paramural bodies أو ترسيب كميات كبيرة من بكتات الكالسيوم في الصفيحة الوسطى ولوحظ ذلك في جدران خلايا التبغ البري *N.glutinosa* المصابة بفيروس موزايك التبغ (TMV) في منطقة البقع الموضعية.

### 2.1.5. الأعراض على المستوى النسيجي

هي التغيرات التي تحصل في الأنسجة المصابة بالفايروسات والتي تلاحظ بالمجهرين الضوئي والالكتروني، وتظهر تلك التغيرات النسيجية بشكل حالات "فرط الانقسام الخلوي" Hyperplasia وحالات "تضخم الخلايا" Hypertrophy التي تؤدي إلى تكوين أورام و شفافية العروق. من الأعراض المهمة على المستوى النسيجي هي أعراض تأخر النمو أو اعاقة النمو Hypoplasia والتي تلاحظ في الأنسجة المصابة بالموزايك حيث تكون خلايا نسيج القشرة المصابة اقل تخصصا ويقل سمك النسيج المصاب عن السليم في المناطق الخضراء الداكنة في نفس الورقة، تعمل بعض الفايروسات على اعاقة نمو أنابيب حبوب اللقاح المصابة كما يلاحظ أيضا حصول تغيرات نسيجية في أنسجة الخشب مع بعض الإصابات الفايروسية حيث تظهر أشرطة خشبية مشبعة باللكتين تسمى Endocellular cardoons كما في إصابة العنب بفايروس الورقة المروحية للعنب (GFLV)، كما يسبب فايروس التقزم الأصفر للشعير (BYDV) وبعض فايروسات الاصفار تكوين التايلوسات Tylosis في أوعية الخشب وكذلك موت خلايا اللحاء وتحللها وتراكم الكالوس على الصفائح الغربالية لأنسجة اللحاء. وجد ان الأورام التي يسببها فايروس التورم الجرحي (WTV) سببها النشاط المرستيمي المفرط للحاء الخلايا الباراكيميية أما الأورام التي يسببها فايروس تورم أفرع الكاكو (CSSV) فهي متسببة عن الإفراط في تكوين انسجة الخشب.

### 3.1.5. الأجسام الضامة الفايروسية

يعد ظهور الأجسام الضامة Inclusion bodies من الظواهر المهمة التي تصاحب معظم الإصابات الفايروسية والتي لا تظهر مع أي مسببات مرضية أخرى بل هي حكر على فايروسات النبات، والأجسام الضامة هي أجسام بروتينية فايروسية أو أغلفتها البروتينية وقد تشمل أيضا مكونات نباتية مختلطة مع بروتينات نباتية أو هي تجمعات لجسيمات فايروسية تظهر داخل الخلايا المصابة فقط ولا تظهر في الخلايا السليمة إلا أن عدم ظهورها لا يعني عدم إصابة النبات بالفايروس لأنها لا تظهر مع بعض أنواع الفايروسات، عرفت هذه الأجسام لأول مرة من قبل "أيفانوفسكي" سنة 1903 عند دراسته لفايروس موزائيك التبغ (TMV) في خلايا نبات التبغ، ودرسها أيضا "ماتز" (Matz) سنة 1919 و"كنكل" (Kunkel) سنة 1921 واعتقدوا أنها بروتوزوا أو تراكيب ناتجة عن اختلال العمليات الفسلجية في الخلايا المصابة.

تختلف الأجسام الضامة عما يحيطها من سايتوبلازم وعضيات خلوية في الشكل الظاهري وفي الاستجابة للصبغات النسيجية كما إن شكل وطبيعة الأجسام الضامة هي خاصية تميز كل نوع فايروسي والذي يستمر بتكوينها حتى مع اختلاف العائل فمثلا يكوّن فايروس الموزائيك الأصفر للبرسيم (CIYMV) أجساما ضامة حزمية Banded inclusions وهي عبارة عن تجمعات كثيفة للجسيمات الفايروسية تظهر قرب النواة في كل الأجناس النباتية التي يصيبها هذا الفايروس.

إن الأجسام الضامة هي ليست مجرد نواتج عرضية By-products للإصابات الفايروسية بل قد تشارك في تخليق الفايروس أو منتجاته، ولقد ساهمت دراسة هذه الأجسام سواء من ناحية شكلها وتركيبها وطريقة تطورها في خلايا العائل في فهم آلية الإصابة فضلا عن أهميتها في تشخيص الفايروسات وخاصة في الإصابات الخليطة للنباتات بأكثر من فايروس وذلك لأن كل نوع فايروسي يكون أجساما ضامة مختلفة عن الثاني وذلك اعتمادا على أشكالها وموقعها في الخلية أو في النسيج فقد توجد في السايتوبلازم أو في النواة وبعضها يتكون في خلايا أنسجة الخشب فيما تتكون أخرى في أنسجة اللحاء أو في القمم النامية، كذلك تتكون الأجسام الضامة المرافقة لأجناس الفايروسات *Closterovirus* و *Begomovirus* و *Polerovirus* في الخلايا البارانكيميية لأنسجة اللحاء وبذلك يستفاد منها في تشخيص هذه الأجناس عن غيرها من الفايروسات التي لا تكون هذه الأجسام في اللحاء.



ولقد اعتمدت "اللجنة الدولية لتصنيف الفايروسات" (ICTV) هذه الأجسام كأحد الصفات التصنيفية لفايروسات النبات واعتمدت كصفة تصنيفية أساسية لتصنيف 31 مجموعة فايروسية عند بداية عمل اللجنة ثم اعتمدت في التقرير التصنيفي الذي نشر سنة 1992 كأحد الصفات الرئيسية المستعملة لتصنيف 70 جنسا من فايروسات النبات.

الأجسام الضامة هي تراكيب متغيرة ديناميكية Dynamic entities فهي تنشأ وتتطور وتتغير مع تطور الإصابة ثم تتحلل بمرور الوقت ففي المراحل الأولى للإصابة تكون صغيرة الحجم من الصعب كشفها ثم تكبر في الحجم وتزداد تعقيدا بتقدم الإصابة لحين وصولها لمرحلة النضج، كما تؤثر بعض الظروف البيئية وخاصة الحرارة والضوء والعوامل التغذوية على مدى تطور الأجسام الضامة كذلك تلعب مقاومة العائل دورا في ذلك ففي النباتات المتحملة قد تنضج هذه الأجسام تماما حتى وان كانت الأعراض معتدلة أو طفيفة فيما نجد العكس في النباتات المقاومة حيث يتأخر ظهورها أو يتوقف تطورها، ويلاحظ عموما أن عدم ظهور الأعراض على النبات يؤدي إلى صعوبة ملاحظة الأجسام الضامة الناضجة، وغالبا ما تتوزع الأجسام الضامة بشكل غير منتظم في الخلايا المصابة وبالتالي قد لا تلاحظ عند فحص عينة نسيجية قليلة الخلايا نسبيا أما في المراحل المتأخرة من الإصابة فقد تزداد أعدادها وتتوزع بكثرة داخل الخلايا. يمكن ملاحظة بعض أنواع هذه الأجسام بالمجهر الضوئي خصوصا عند صبغها وان أفضل قوة تكبيرية لفحصها ومعرفة خصائصها هي 1000 مرة، واستعملت العديد من الصبغات النسيجية والخلوية لمشاهدة الأجسام الضامة وفحصها بالمجهر الضوئي ومنها صبغة "الأزور" Azure A للكشف عن النيوكليوبروتينات وهي صبغة قادرة على التمييز بين الأجسام الضامة الحاوية على الرنا وتلك التي تحوي الدنا حيث تصطبغ الأولى باللون الأحمر والثانية بالأزرق وهي لا تصبغ الأجسام البروتينية، وبذلك فان استعمال أنواع مختلفة من الصبغات هي الوسيلة الأفضل للتمييز بين أنواع الأجسام الضامة وذلك اعتمادا على تباين تركيبها، كذلك يمكن التمييز بينها اعتمادا على تباينها الشكلي.

ولغرض الاستفادة من الأجسام الضامة لإغراض التشخيص فانه يجب أن تؤخذ الصفات الآتية بنظر الاعتبار (1) شكل الجسم الضام (2) تركيبه هل هو بروتيني أم نيوكليوبروتيني (3) موقعه داخل الخلوي هل هو في الساييتوبلازم أم في النواة (4) موقعه النسيجي في اللحاء أم في البارانكيما (5) رد فعله اللوني Color reaction اتجاه الصبغات المستعملة.

وضعت العديد من التصنيفات للأجسام الضامة وذلك بسبب التنوع الكبير في أنواع الأجسام الضامة بتنوع الفايروسات التي تكونها، وعموما تقسم الأجسام الضامة الفايروسية إلى:

### 1.3.1.5. الأجسام الضامة النووية

توجد الأجسام الضامة النووية Nuclear inclusions في نوى الخلايا أو في منطقة الكاريوبلازم فتسمى Nucleoplasmic inclusions وتأخذ أشكالا عدة فقد تكون حبيبية كما في فايروس تجعد قمة البنجر (BCTV) أو بشكل أجساما ليفية حزمية لتجمعات فايروسية كما في فايروس اصفرار

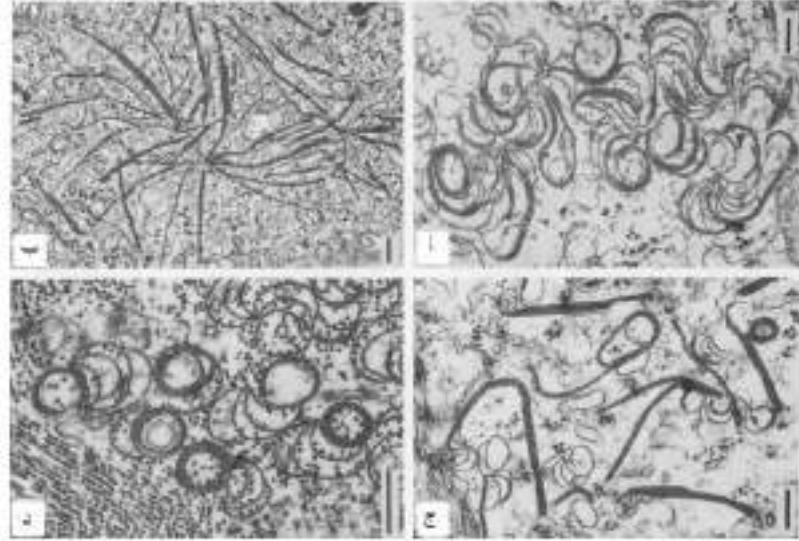
البنجر (BYV) أو بشكل بلورات بروتينية كما في فايروس نقش التبغ (TEV) أو بلورات لتجمعات فايروسية كما في فايروس موزائيك التبغ (TMV)، وقد تظهر الأجسام الضامة النووية بين صفيحتي غلاف النواة بشكل تراكم لجسيمات فايروسية ممتزجة مع مواد بروتينية بلورية أو حويصلية وتسمى بالأجسام الضامة الطرفية النووية Perinuclear inclusions وهي التي تلاحظ مع فايروسات Rhabdoviruses أو قد تظهر في النوية بشكل أجسام متبلورة بروتينية كما في فايروسات عائلة Potyviridae كما أن النوية ذاتها يمكن أن تتحول إلى جسم ضام بسبب تضخمها وتحول محتوياتها إلى أشكال ليفية وعصوية أو بلورية فتسمى "الجسم التابع" Satellite body وهي أجسام كثيفة معتمدة حبيبية بروتينية يتراوح قطرها بين 18-20 نانومتر وقد تحوي كميات ضئيلة من الرنا الفيروسي وهذا يلاحظ مع الإصابات التي يسببها فايروس موزائيك البنجر (BtMV) فايروس الكومفرينا (GoV).

### 2.3.1.5. الاجسام الضامة الساييتوبلازمية

تضم الاجسام الضامة الساييتوبلازمية Cytoplasmic inclusions (1) أجساما مكونة من تجمع لجسيمات فايروسية قد تظهر بشكل حزم ليفية خيطية كما في الإصابات التي تسببها فايروسات الجنس Potexvirus وفايروس موزائيك التبغ والذي قد يكونها أيضا بشكل تجمعات أبرية أو شبه بلورية أو بشكل بلورات سداسية حيث تصطف الجسيمات الفايروسية بشكل متوازي وتكون كل طبقة بسلك جسيمة فايروسية واحدة (2) أجسام ضامة بروتينية تظهر بأنواع عديدة فقد تكون بشكل أجسام حبيبية غير متبلورة كثيفة محاطة بالشبكة الاندوبلازمية كما في حالة الإصابة بفايروس الموزائيك الأصفر للبرسيم (CIYMV) ويعتقد أنها تزود الفايروس بروتينات الكابسيد أو تظهر بشكل أجسام لولبية ليفية تسمى أجسام دولاب الهواء Pinwheels المميزة الشكل فهي ذات اذرع تنبثق من مركز واحد وهي تصاحب كل فايروسات عائلة Potyviridae، وقد تظهر بشكل اهليلجي كما عند الإصابة بفايروس الموزائيك التخطيطي للحنطة (WSMV)، وإن وجود هذه الأجسام قرب البلازموديزماتما يدل على أنها تلعب دورا بتوفير البروتين المتخصص اللازم لنقل الفايروسات عبر الخلايا،

(الشكل 2-5) (3) الأجسام الضامة الصفائحية والتي تكون بشكل طبقات متعددة مكونة من حزم بروتينية صفائحية تتداخل معها الجسيمات الفايروسية أو تخلوا منها وهي التي تلاحظ في النباتات المصابة بفايروس البطاطا اكس (PVX) (4) الأجسام الضامة غير منتظمة الشكل Amorphous bodies التي يكونها فايروس موزائيك القرنابيط (CaMV) وهي أجسام بروتينية معقدة تعرف بالأجسام السينية X-bodies وهي أجسام كبيرة تظهر قرب النواة عادة لذلك يمكن مشاهدتها بالمجهر الضوئي لكبر حجمها وتعد من اعقد أنواع الأجسام الضامة وقد تكون هي الموقع الفعال لتجميع الفايروسات في الخلايا حيث تمتاز بتزكيتها الحويصلية الغشائية واحتوائها على أجسام خيطية قد تكون قطعا من الأحماض النووية. لازالت وظيفة الأجسام الضامة في الإصابات

الفايروسية غير واضحة ولكن يعتقد أنها تلعب دورا في تجميع الفايروسات أي تغليف الحامض النووي الفايروسى بالغطاء البروتينى وربما يكون لها وظائف أخرى.



الشريط يمثل 200 نانومتر

الشكل (2-5): أشكال مختلفة من الأجسام الضامة اللولبية اللفيفة Pinwheels التي تكونها أنواع من فايروسات البوتى Potyviruses (أ) الأجسام اللفيفة لفايروس غير مشخص في أوراق الرغيلة *Chenopodium quinoa* (ب) في أوراق التبغ (ج) أجسام لفيقة وتجمعات صفائحية يكونها فايروس البطاطا واي (PVY) في أوراق التبغ (د) أجسام لفيقة لفايروس موزائيك الشلغم (TuMV) في نبات التبغ. الشريط يساوي 200 نانومتر.

الشكل مقتبس من Hull (2009).

المصدر / فايروسات النبات – د. نبيل عزيز قاسم 2011

## محاضرة رقم (8)

### انواع الاصابات الفايروسية

تصنف الإصابات الفايروسية إلى الأنواع التالية:

#### 1. الإصابات الموضعية

الإصابات الموضعية Local infections هي التي يتموضع فيها الفايروس في جزء صغير من النسيج النباتي ويشمل ذلك عددا محدودا من الخلايا النباتية التي تحيط بمنطقة دخول الفايروس إلى النبات، وبالتالي فإنه لا يتمكن من الانتشار جهازيا في النبات والتقدم باتجاه أنسجة جديدة، لذلك فإن هذه الإصابات تعد نوعا من المقاومة التي يظهرها النبات اتجاه الفايروس وان ظهورها مرتبط بنوع النبات والفايروس والعلاقة الوراثية بينهما. إن الإصابات الموضعية هي قليلة الظهور طبيعيا وليس لها أهمية اقتصادية لأنها قليلة التأثير على النباتات إلا أنها ذات فوائد علمية في دراسة تقدير تركيز الفايروسات في عوائلها وفي عزل السلالات الفايروسية وتشخيص الفايروسات.

#### 2.3.5. الإصابات الجهازية

الإصابات الجهازية Systemic infections هي الأكثر شيوعا وخطورة على النباتات والتي تصاحب معظم الإصابات الفايروسية وتسبب خسائر كبيرة في الإنتاج الزراعي. وتعني الإصابة الجهازية انتشار الفايروس النباتي في الأنسجة الحساسة له وتقدمه في خلايا ذلك النسيج أو الأنسجة سواء عبر الخلايا أو في الأوعية الناقلة وخاصة للحاء لينتشر في معظم أجزاء النبات حسب الأنسجة المتخصصة عليها، وقد تتحدد الإصابة الجهازية التي تسببها بعض الفايروسات في منطقة معينة من النبات ولا تشمل كل أجزائه كما في حالة الإصابة بفايروس موت التبغ (TNV) الذي ينتشر جهازيا في الجذور فقط ولكنه قد يصبح جهازيا شاملا لكل النبات مع عوائل اخرى.

#### 3.3.5. الإصابات الكامنة

الإصابات الكامنة Latent infection هي نوع من الإصابات الجهازية التي تصاحب الإصابة ببعض الفايروسات والتي يطلق عليها "الفايروسات الكامنة أو غير الفعالة" Latent or Non-infective viruses وتمتاز هذه الإصابات بعدم ظهور أية أعراض خارجية على النبات المصاب رغم وجود الفايروس بتركيز عالي في أنسجته وهي حالة تظهر بالتوافق بين نوع الفايروس ونوع العائل حيث لا تظهر أعراض الفايروس الكامن على النوع النباتي المعين طيلة حياته ولكن إذا تغير نوع العائل تصبح تلك الأعراض ظاهرة عليه فان هذه الإصابات تمثل علاقة وراثية معقدة بين الفايروس والنبات وهي لا تتأثر بالظروف البيئية. يحصل أحيانا مع بعض الفايروسات أن تكون الإصابة ظاهرة في بدايتها ثم تتحول إلى كامنة لتبقى هكذا طيلة حياة النبات.

تعد الإصابات الكامنة خطرة اقتصاديا لأنها (1) تسبب خفضا في الإنتاج الزراعي رغم عدم ظهور الأعراض على النباتات المصابة (2) تشكل النباتات المصابة وبسبب عدم ظهور الأعراض بؤرة لانتشار الفايروس الكامن إلى أفراد نباتية جديدة لنفس النوع أو إلى أنواع نباتية أخرى تصبح فيها الإصابة ظاهرة حيث لا تثير إنتباه المزارعين فلا تفلح من الحقل أثناء التفنيس الحقل، وهناك العديد من الفايروسات التي ارتبط اسمها بهذه الإصابات ومنها فايروس القرنفل الكامن (CLV).

#### 4.3.5. الإصابات المخفية

تتشابه الإصابات المخفية Masked infections مع الإصابات الكامنة في كل الصفات باستثناء تأثيرها بالظروف البيئية وتحديدا عاملي الحرارة والضوء حيث تكون الأعراض مخفية تماما على النبات المصاب في ظل ظروف حرارة وضوء معينة ولكن عند تغير درجة الحرارة وشدة الضوء في الحقل تصبح تلك الأعراض ظاهرة على نفس النبات، وقد درس تأثير الضوء على الإصابات الفايروسية فوجد أنه يؤثر على طبيعة الأعراض التي تسببها الفايروسات وكذلك على حساسية النباتات للإصابة إذ تحصل تغيرات موسمية في طبيعة الأعراض مرتبطة بالتباينات الضوئية الناتجة عن طول أو قصر النهار ولم توفر الدراسات تفسيرات واضحة لهذه التأثيرات فوجد أن إيقاف تزويد النبات بغاز ثاني أكسيد الكربون في ظروف الضوء يؤدي إلى زيادة الإصابة الفايروسية فيما يختفي حامض الاسكوريك من أوراق النباتات المصابة المعرضة للظلام، وتحصل تأثيرات الضوء المعقدة إما بتأثير شدة الضوء Light intensity أو مدة التعريض الضوئية Photoperiodic period فمثلا يسبب فايروس الموزائيك التخطيطي للحنطة (WSMV) أعراض موزائيك في النهار الطويل وموزائيك وتورد في النهار القصير.

تتسبب هذه الإصابات عن العديد من أنواع الفايروسات المعروفة بأعراضها الجهازية الظاهرة التي تسببها على النباتات.

### 5.3.5. الإصابات الخليطة

الإصابات الخليطة Mixed infections هي إصابة النبات الفرد بأكثر من نوع فايروسي أو بأكثر من سلالة في وقت واحد وبذلك تتداخل الإصابات التي يسببها كل نوع أو سلالة وتتنوع الأعراض الجهازية التي تظهر على النبات المصاب ويظهر ذلك التداخل بإحدى الحالات التالية (1) حالة الحياد Neutralization والتي تصاحب الإصابة بالأنواع الفايروسية المتباعدة القرابة ولا تظهر في حالة الإصابة الخليطة بسلالات النوع الفايروسي الواحد حيث يعمل كل نوع فايروسي بشكل مستقل عن الآخر في النبات وبذلك فإن كل منهما سيعطي أعراضه الخاصة به على النبات من دون تأثير على الأعراض التي يسببها الفايروس الآخر (2) حالة التضاد Antagonism وهي التي يطلق عليها "المقاومة المتبادلة" Cross protection أو "التداخل" Interference وهي الحالة التي تحصل عند الإصابة الخليطة بسلالات النوع الفايروسي الواحد حيث تعمل السلالة الأولى على تثبيط الإصابة التي تسببها السلالة اللاحقة، وقد تظهر هذه الحالة بين الفايروسات الوثيقة القرابة ولا تظهر عادة بين الفايروسات المتباعدة القرابة، ووظفت هذه الظاهرة في مقاومة فايروسات النبات تطبيقياً (أنظر الفقرة 4.1.12 الفصل الثاني عشر) وذلك بتلقيح النبات المراد حمايته بالسلالة الضعيفة للفايروس فيكتسب النبات مناعة ضد السلالة القوية، لذلك يطلق على هذه الظاهرة أيضاً مصطلح "المقاومة المكتسبة" Acquired resistance أو "المناعة المكتسبة" Acquired immunity (3) حالة التنشيط Synergism وهي الحالة التي ينشئ فيها كل من الفايروسين المشتركين في الإصابة الخليطة للنبات الفرد العائل Co-infecting viruses أحدهما الآخر وبذلك سيكون التأثير المرضي شديداً جداً على النبات لأنهما يتفاعلان معاً لإعطاء أعراض أكثر خطورة من الأعراض التي يسببها كل فايروس منهما على انفراد، تظهر هذه الحالة عادة مع الفايروسات المتباعدة القرابة حيث يساعد أحدهما الآخر إما في التضاعف أو في الانتشار أو في كليهما. إن حالة التنشيط هي نوع من نظم التكامل الطبيعي التي توفر فرصة لفهم كيفية تعاون الفايروسات في الإصابة المختلطة وهي تظهر عادة مع فايروسات عائلة Potyviridae حيث يكون أحد أفراد هذه العائلة هو أحد طرفي الشريك التنشيطي مع الفايروس الآخر الذي ينتمي إلى عائلة فايروسية أخرى سواء كان ذو جينوم من نوع الدنا أو الرنا وتزيد هذه العلاقة التنشيطية من تراكم الفايروس الشريك في العلاقة التداخلية.

وتعد العلاقة بين فايروس البطاطا اكس (PVX) وعدد من فايروسات الجنس *Potyvirus* نموذجا لفهم الأساس الجزيئي للعلاقات التنشيطية للأمراض التي تسببها فايروسات هذا الجنس لفايروسات أخرى ويطلق عليها "الأمراض المنشطة المرتبطة بفايروسات الجنس بوتى"-*Potyvirus-associated synergistic disease* وأكثر العلاقات دراسة هي العلاقة التنشيطية بين فايروسي البطاطا واي (PVY) والبطاطا اكس فعند إصابة النبات بهما تظهر أعراض وضوح العروق الشديدة يعقبها موت النسيج لأول ورقة مصابة جهازيا وتزداد شدة الأعراض الجهازية بمقدار 3-10 أضعاف عند الإصابة بالفايروس الثاني منفردا ولكن لا تحصل زيادة أو نقصان في شدة إصابة الاول، ولوحظ وجود عاملين مؤثرين في استحثاث الاستجابة التنشيطية بين الفايروسين المذكورين وهما (1) توقيت الإصابة بهما فلكي يحصل التنشيط يجب أن يدخل فايروس البطاطا اكس إلى الخلايا المصابة بفايروس البطاطا واي عندما يكون في حالة التضاعف النشط، أما إذا حصلت الإصابة بفايروس البطاطا اكس خارج هذا التوقيت فإنها لن تؤدي إلى تنشيطه ولن يزداد تراكمه في أنسجة النبات (2) الحالة التطورية للنبات العائل حيث تحصل أفضل حالات التنشيط عندما تكون الأنسجة المتأثرة بنفس مستوى النضج.

وجد أن القطع الرايبية المسؤولة عن تشفير البروتين PI/Hc-Pro لفايروس نقش التبغ (TEV) هي التي تنشط تضاعف ثلاثة فايروسات من خارج عائلة *Potyviridae* وهي موزائيك التبغ وموزائيك الخيار والبطاطا اكس في الإصابات الخليطة، وأن آلية هذه القطع الرايبية في تنشيط الفايروس الآخر هي إستهداف وتثبيط النظام الدفاعي النباتي وهو نظام "الإسكات الجيني عقب الأستنساخي" , *Posttranscriptional gene silencing* المسمى اختصارا PTGS الذي يعيق تضاعف الفايروسات من خلال تفكيك الحامض الرايبي الفايروسي حيث تهاجم تعاقبا نيوكليوتايدا معيناً فيه، ويتنشط هذا النظام ويبدأ بالعمل بواسطة القطع الجينومية الثانوية للحامض النووي الفايروسي الطبيعي *Subgenomic particles* أو لأشكال شاذة منه *Aberrant forms* والتي قد تكون جزيئات ثنائية الخيط *dsRNA* تعمل مستحاثات لهذا النظام الدفاعي وبذلك يكون الفايروس ذاته هو المنشيط الفعال *Potent activator* للنظام الدفاعي *PTGS* لذلك فإن الآلية المقترحة لعمل بروتينات *PI/Hc-Pro* هي إيقاف مسار "الإسكات الجيني عقب الأستنساخي" ولإثبات ذلك فقد أجري تهجين بين نباتات معدلة وراثيا تمتلك جين إظهار هذه البروتينات وهو الجين *GUS* مع نباتات لديها جين إظهار الإسكات الجيني فوجد أن الذرية الناتجة منها فقدت قدرة الإسكات الجيني. وبينت الدراسات أن البروتين الأساسي الذي يخدم الإسكات الجيني هو *Hc-Pro* ويساعده البروتين *PI* الذي يعد غير أساسي في هذه الوظيفة وبذلك يبدو أن فايروسات *Potyvirus* طورت تخليق بروتينات *PI/Hc-Pro* كدفاعات مضادة *Counterdefence* لنظام الإسكات الجيني الدفاعي النباتي.

لقد سجلت حالات تنشيط أخرى لفايروسات لا تعود لعائلة *Potyviridae* إذ يحصل تنشيط بين فايروسي موزائيك التبغ والبطاطا اكس في الطماسة مسببا مرض التخطيط المزدوج *Double streak* ويؤدي ذلك إلى زيادة تركيز الفايروس الثاني في النبات، ويفسر سبب حدوث التنشيط إلى إظهار قطع جينومية ثانوية من جينوم الفايروس المحفز للتنشيط وبطريقة مماثلة لعمل التعاقب

النوكليوتايدي الذي يخلق بروتينات PI/Hc-Pro في فايروسات Potyviruses. كذلك لوحظت حالة تنشيط بين فايروس موزائيك التبغ وفايروس أسبرمي الطماعة (TAV) وبين فايروس التبرقش الأصفر للوبيا (CCMV) وفايروس موزائيك الفاصوليا الجنوبي (SBMV) وبين فايروس موزائيك الجت (AMV) وفايروس موزائيك أوكيوبا البطاطا (PAMV).

#### 4.5. الأعراض المشابهة للأعراض الفايروسية

تسبب العديد من أنواع الطفيليات والعوامل غير الحية الممرضة للنبات أعراضا تماثل إلى حد كبير بعض أنواع الأعراض الفايروسية مما يربك تشخيص الإصابات الفايروسية ومنها الفايتوبلازما وكذلك العديد من المسببات غير الحية ومنها أعراض نقص العناصر وخاصة الحديد والمغنيسيوم وكذلك حالات التسمم النباتي الناتجة عن الرش المفرط لمبيدات الأدغال وخاصة الهرمونية، ويطلق على المسببات التي تسبب أعراضا تماثل الأعراض الفايروسية مصطلح "اللافايروسات" Ex-viruses وتشمل (1) الفايتوبلازما Phytoplasma والتي تسبب العديد من أنواعها أعراض اصفرار وتقزم وتشوهات وتجدد أوراق وتورد والأزهار الورقية Phylloidy (2) الراكنتسيا Rickettsia والتي تسبب أعراض تغيرات لون وموزائيك واصفرار وتشوهات كما في مرض "بيرس" Pierce disease على العنب الذي تسببه الراكنتسيا Xylella fastidiosa (3) أنواع من الحشرات والحلم حيث تسبب تغذية بعض أنواع قفازات الأوراق التي تعود لرتبة Homoptera ومنها حشرة القفاز Galligypona pellucida أعراضا تشبه الأعراض الفايروسية حيث تفرز الإناث سموما تحقنها مع اللعاب وتتحرك جهازيا في النبات مسببة تثبيطا للنمو وزيادة التفرعات وذلك أثناء تغذية الحشرة، كذلك تظهر على أوراق الذرة الصفراء نموات شاذة نتيجة تغذية قفاز الأوراق Dalbulus elimatus عليها، ويسبب الحلم الاريوفي المتطفل على البرسيم أعراض موزائيك على الأوراق الفتية علما بأن أفراد هذا الحلم لا ترى بالعين المجردة مما يوحي بأن الإصابة فايروسية (4) التشوهات الجينية Genetic abnormality في النباتات نتيجة حدوث طفرات وراثية تلقائية فجائية تسمى "الكاميرا" Chimaera تسبب ظهور أعراض موزائيك أو تبرقش على بعض أجزاء النبات ويترافق ذلك غالبا مع تشوهات في البلاستيدات (5) نقص العناصر وخاصة عنصر الحديد والفسفور وعدد من العناصر الصغرى والتي تسبب حين عدم ميسوريتهما في التربة أعراض تغيرات لونية تماثل الإصابات الفايروسية وخاصة تحزم العروق والموزائيك (الشكل 3-5) (6) الرش بالمبيدات حيث يسبب الاستعمال الخاطئ للمبيدات خصوصا عند التراكم العالي تشوهات وتغيرات لونية تماثل تلك التي تسببها الفايروسات وخاصة الأدغال الهرمونية ومنها المبيد 2,4-D الذي يسبب تشوهات حادة في الأوراق واختزال للنصل وتشوه عام للنبات حيث يتوقف نمو نسيج الميزوفيل، كما تسبب العديد من أنواع المبيدات الحشرية حالات مماثلة، (الشكل 4-5) (7) الملوثات الجوية Air pollutants والتي تسبب أعراضا تماثل تلك التي تسببها الفايروسات وخاصة أعراض التشوه وتغيرات اللون، فمثلا تسبب الأدخنة المنبعثة من معامل الاسمنت تقزما لبادرات الذرة الصفراء واصفرارها وكذلك النفاق الأوراق وظهور مساحات ميتة عليها.



المصدر : فايروسات النبات / د. نبيل عزيز قاسم 2011

## محاضرة رقم (10)

### العلاقات بين حشرات المن وفايروسات النبات

تعد العلاقة بين المن والفايروسات هي أعقد أنواع العلاقات بين الحشرات وفايروسات النبات حيث سجلت أربعة أنواع من العلاقات التخصصية بينهما وهي:

#### ا- العلاقة غير الباقية

تظهر العلاقة غير الباقية Non - persistent relationship في الفايروسات غير الباقية Non-persistent viruses وهي الفايروسات المحمولة خارجيا بالناقل Externally-borne viruses أي الفايروسات المحمولة على الرمح، وتسمى هذه العلاقة أيضا "غير الدوارة" Non-circulative relationship وتعد إحدى أهم العلاقات القائمة بين المن والفايروسات والتي تساهم بشكل كبير في نقل الفايروسات نقلا أفقيا في الحقول، حيث أنه من بين 290 نوعا فايروسيا منقولاً بالمن فإن القسم الأكبر منها منقول بهذه الطريقة وتنتمي الأنواع الفايروسية المنقولة بهذه لطريقة إلى خمسة أجناس هي *Alfamovirus* و *Cucumovirus* و *Fabavirus* و *Macluravirus* و *Potyvirus* والتي تضم مختلف أشكال الفايروسات ففيها العصوي والايوزومتري وكذلك كل أنواع الأحماض النووية الفايروسية مفردة أو مزدوجة الخيط. ولنجاح هذا النقل فإنه لا يتطلب اختراق رمح المن لأكثر من طبقة خلايا بشرة النبات المصاب لاكتساب الفايروس ويحصل ذلك نتيجة سلوك التغذية القصيرة الاستكشافية Expletory probing التي يمارسها المن في بداية وصوله إلى سطح النبات حيث يلتقط الفايروس وترتبط جسيماته بالبطانة الكيوتكلية للجزء الداخلي من القمة الأمامية للرمح Stylet tip وقد اثبت ذلك عمليا حيث أدت معاملة الرمح بالفورمالين أو بالأشعة فوق البنفسجية إلى إبطال هذا النقل نتيجة إتلاف الفايروس مما دل على وجوده في هذه المنطقة. وضعت فرضيتان تفسران آلية اكتساب هذه الفايروسات وكيفية حملها في الرمح وهما (1) آلية كذف الفريونات Egestion من القناة الغذائية للرمح وإرجاعها مع الغذاء إلى مقدمة الرمح بحركة انعكاسية للمضخة الساحبة Sucking pump للحشرة (2) آلية إفراز اللعاب Salivation وحقنه في النبات من قبل الحشرة، وبذلك يتم الاحتفاظ بهذه الفايروسات في مفصل قناتي الغذاء واللعاب أي في الفسحة المشتركة بينهما عند قمة الرمح، (الشكل 6-11) حيث توفرت الكثير من الأدلة التي تدعم ذلك إذ أظهر المجهر الالكتروني وجود جسيمات فايروسي نقش التبغ (TEV) والتبرقش العرقي للتبغ (TVMV) مرتبطة بالكيوتكل الخارجي Epicuticle المبطن لقناة الغذاء فيما كانت هناك أعدادا قليلة من الجسيمات مرتبطة بمنطقتي التجويف الفمي Cibarium ومقدمته Precibarium، وأظهرت تقانات التعليم الشعاعي باستعمال جسيمات فايروسية معلّمة إشعاعيا Radioactively labeled viruses أن هذه الجسيمات ظهرت على الأسطح الداخلية للثلث الطرفي لقناة الغذاء في نهاية الرمح وأنه يتم إطلاقها وحقنها في النبات عند إفراز اللعاب وضجّه في النبات.

يحدث الارتباط بين الفايروس والسطح الداخلي لرمح الحشرة بطريقتين (1) الارتباط المباشر بين الكابسيد والكيوتكل المبطن للرمح حيث يعمل جزء معين من الكابسيد عمل الرابط بين جسيمة الفايروس والكيوتكل وأثبت ذلك مع فايروسي موزائيك الجت (AMV) وموزائيك الخيار (CMV) بإمكانية نقل الفايروسيين عند تغذية المن على المحلول الفايروسي النقي لكل منهما عبر غشاء من دون إضافة أية بروتينات أو مواد أخرى، وتم تأكيد ذلك أيضا عند إعادة تركيب جينوم فايروس موزائيك التبغ (TMV) غير المنقول بالمن مع كابسيد فايروس اسبيرمي الطماطة (TAV) المنقول بالمن حيث أدى ذلك إلى نجاح نقل الفايروس الأول المهجّن. وجد أن لبعض الأحماض الامينية ولمواقعها في الكابسيد دورا في تخصصية الربط ولوحظ ذلك في العلاقة بين حشرة "مَنْ القطن" A. *gossypii* و فايروس موزائيك الخيار إذ وجد أن مواقع الأحماض الامينية 25 و 129 و 168 و 162 و 214 وفق تسلسلها في الكابسيد هي المواقع الحاكمة لنقل الفايروس المذكور بواسطة مَنْ الخوخ الأخضر ويفسر دورها التخصصي بمسئوليتها عن تحديد طبيعة التفاف ببتيدات الغطاء البروتيني أو في ترسيخ الثباتية الفيزيائية للفايروس داخل جسم المن الناقل (2) الارتباط غير المباشر للجسيمة الفايروسية وكيوتكل الرمح عبر وسيط هو البروتين المساعد Helper protien الفايروسي المتخصص بربط كابسيد الفايروس مع رمح المن والذي يشكل جسرا رابطا بينهما وهو المسئول عن النقل التخصصي للفايروسات بالمن ويوجد قريبا من النهاية النتروجينية للكابسيد حيث يضم مجموعة مكونة من ثلاث أحماض أمينية هي الأسبرجين والألانين والكلاليسين ومجموعة رباعية تتكون من الأحماض الامينية السستين والثريونين والأيزوليوسين واللايسين وهما مجموعتان ضروريتان للنقل، ويطلق على هذا البروتين أيضا مصطلح "المكون المساعد" Helper protien أو "العامل المساعد" Helper factor أو يسمى "عامل النقل بحشرات المن" Aphid transmission factor وهو بروتين وظيفي يشقّره الفايروس وتخلّقه الخلية المصابة، (الشكلين 6-12 و 6-13) وقد سجل وجود هذا البروتين في فيروسات "البوتي" Potyviruses والذي يتباين في حجمه ووزنه الجزيئي حسب نوع الفايروس فهو في فايروس التبرقش العرقي للتبغ (TMV) بوزن جزيئي 53 كيلو دالتون (KDa) وفي فايروس البطاطا واي (PVY) بوزن جزيئي 58 كيلو دالتون. إن البروتين المساعد هو أصلا جزء بروتيني ينشطر من البروتين الكبير Polyprotein الذي تشقّره فايروسات Potyviruses والذي يطلق عليه إختصارا HC-Pro هو رمز مشتق من مصطلح "المكوّن المساعد - إنزيم تحليل البروتين" - Helper Component-Protease وهذا يعني أنه يتكون من جزأين الأول هو البروتين المساعد للنقل والثاني هو الأنزيم المحلل للبروتين لذا فهو ذو وظيفتين حيويتين ويرتبط في فايروسات "البوتي" ارتباطا غير تخصصي بالحامض النووي الفايروسي من خلال منطقتي ربط بالحامض، وأظهرت الدراسات أنه يفصل الارتباط مع الرنا أكثر من ميله للارتباط بالدنا الفايروسي، كما وجد أنه يساعد أيضا في نقل أنواعا أخرى من الفايروسات غير المنقولة بالمن عند وجود أحد فايروسات "البوتي" في إصابة خليطة مع فايروسات أخرى لا تنقل بالمن في نفس النبات حيث يكتسب المن ذلك البروتين إما خلال تغذية الاكتساب لفايروس "البوتي" أو قبلها مباشرة ليصبح قادرا على نقل الفايروس الآخر الذي لم يكن أصلا منقولا بالمن، أما إذا اكتسبه المن بعد اكتساب فايروس "البوتي" عندها يفشل نقل

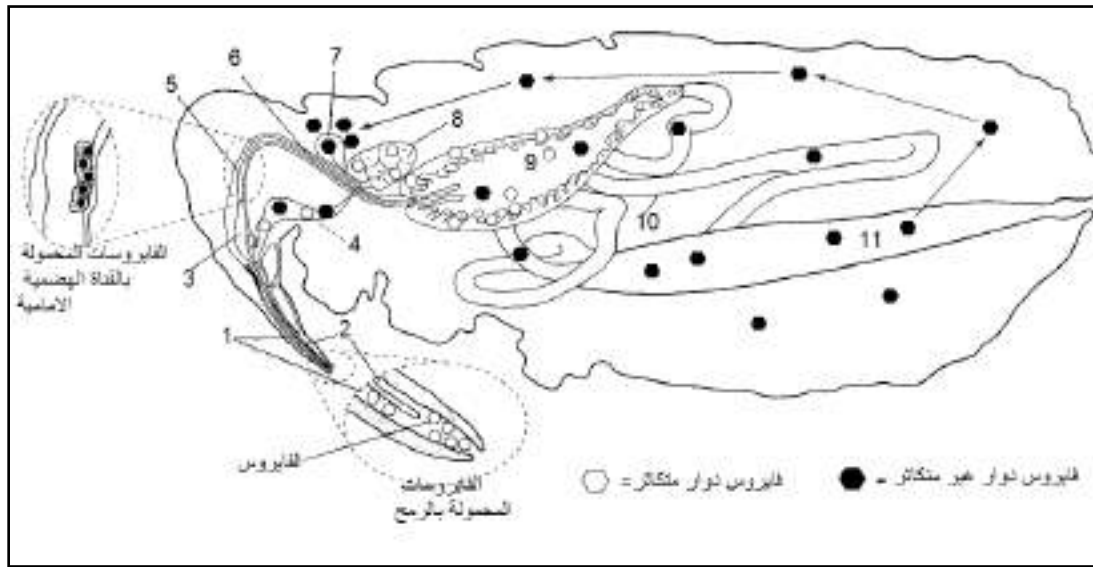
الفايروس الآخر، وهذه الظاهرة هي التي نبهت الباحثين على وجود هذا البروتين، ويسمى فايروس "البوتي" الذي يساعد فايروسا آخر لنقله بحشرات المن "الفايروس المساعد" Helper virus وهي ظاهرة شائعة في هذه الفايروسات إلا أنها متخصصة في دورها النقلي بمعنى أنه ليس كل فايروسات البوتي ستساعد أي فايروس من مجموعة أخرى للنقل بالمن إن وجدا معا في إصابة خليطة، وتوجد العديد من الأمثلة على ذلك ومنها دور فايروس البطاطا واي (PVY) في نقل فايروس موزايك أوكيوبا البطاطا (PAMV). أمكن تنقية وتشخيص البروتينات المساعدة لبعض فايروسات البوتي ومنها فايروسات التبغ الحلقي للبابايا (PRSV) وموزايك الرقي الثاني (WMV-2) و الموزايك الاصفر لقرع الزكيني (ZYMV) وموزايك الشلغم (TuMV).

أما بخصوص آلية إطلاق الفايروسات غير الباقية من الرمح بعد اكتسابها فقد وضعت فرضيتين لتفسير الكيفية التي تتحرر بها هذه الفايروسات من الرمح وهما (1) آلية الابتلاع والحقن Injection-egestion mechanism وهي التي تفترض إطلاق الجسيمات الفايروسية من الرمح نتيجة عمليتي الاسترجاع Regugitation وإفراز اللعاب Salivation التي تقوم بهما الحشرة (2) إطلاق الجسيمات بتأثير قذف اللعاب فقط ويساعد على ذلك أن قناتي اللعاب والغذاء متحدتان قرب قمة الرمح الطرفية. ويلخص الجدول (3-6) مواصفات النقل غير الباقي بحشرات المن.

الجدول (6-3): العلاقات الحيوية بين فايروسات النبات وحشرات المن

موقع إحتفاظ المن بالفايروس	نوع النقل	التركيب الفايروسي المرتبط بالمن	فترة الإكتساب	فترة احتفاظ المن بالفايروس	مرور الفايروس عبر أنسجة المن	وجود الفايروس في الهيمولمف	فترة الحضانة	تضاعف الفايروس في المن	النقل بالبيض
الفايروسات المحمولة خارجيا بالمن	النقل غير الباقي والفايروسات محمول بالمح	الكابسيد والبروتين المساعد	ثواني إلى دقائق	دقائق	لا يحصل	لا يوجد	لا توجد	لا يحصل	لا يحصل
	النقل شبه الباقي	الكابسيد والبروتين المساعد	دقائق إلى ساعات	ساعات	لا يحصل	لا يوجد	لا يوجد	لا يحصل	لا يحصل
Internal ly borne viruses	النقل الباقي والفايروسات محمول في القناة الهضمية الأمامية	لا توجد معلومات	ساعات إلى أيام	أيام إلى أسابيع	يحصل	يوجد	ساعات إلى أيام	لا يحصل	لا يحصل
	النقل الباقي والفايروسات محمول في جسم المن	لا توجد معلومات	ساعات إلى أيام	أيام إلى أسابيع إلى أشهر	يحصل	يوجد	أسابيع	يحصل	غالبا

									ومتضاء ف ف المن
--	--	--	--	--	--	--	--	--	-----------------------

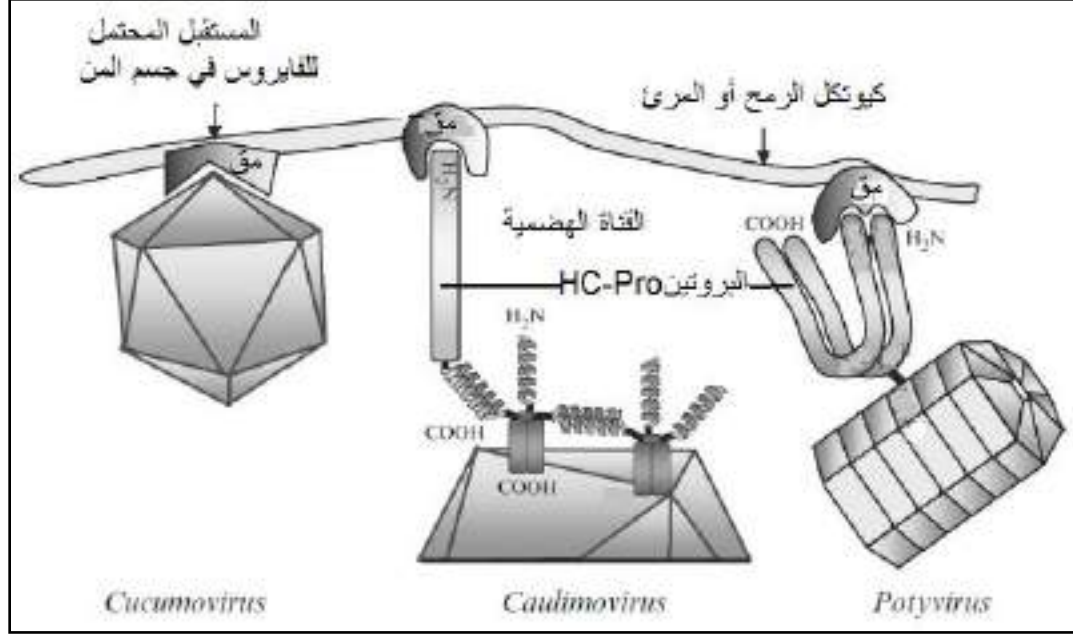


الشكل (6-11): آليات نقل فايروسات النبات بواسطة الحشرات الثاقبة الماصة.

الشكل مقتبس من Hull (2002).

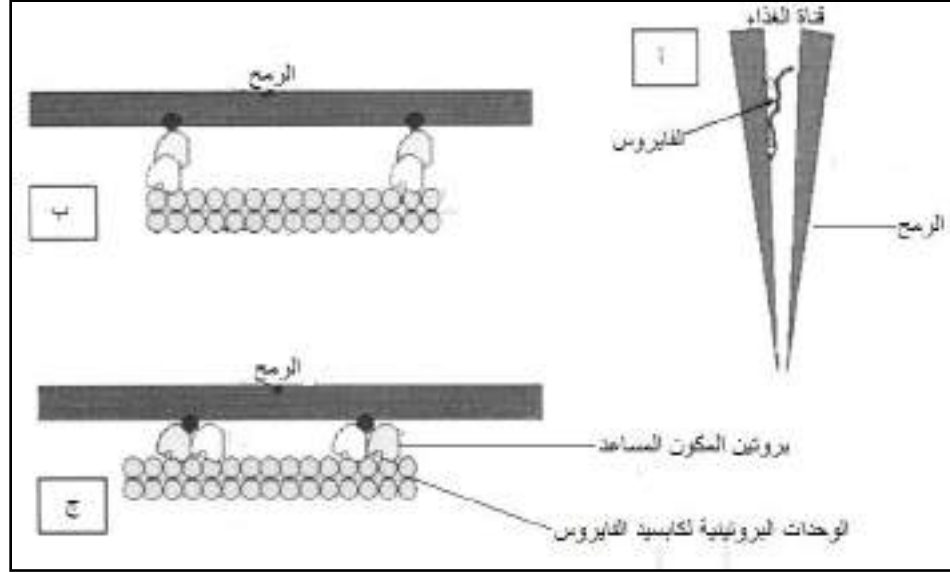
يبين الشكل تشريح القناة الهضمية والجهاز اللعابي والمواقع الأخرى ذات الصلة بنقل الفايروسات. تظهر الصورة المكبرة السفلى توضيحاً للنهاية البعيدة للرمح حيث تنتهي قناتي الغذاء (1) واللعاب (2) في فجوة مشتركة في نهاية الرمح. إن الآلية المقترحة لنقل الفايروسات غير الباقية المحمولة بالرمح هي الاحتفاظ بها في القمة البعيدة للرمح ثم إطلاقها بواسطة اللعاب المفرز عندما تحقنه الحشرة في النبات خلال التغذية. تظهر الصورة المكبرة العليا (إلى اليسار) موقع وجود الفايروسات شبه الباقية المحمولة بالقناة الهضمية الأمامية Foregut-borne viruses حيث ترتبط الجسيمات الفايروسية بالكيوتكل المبطن للقناة منظرة في مادة مائنة تسمى Matrix material مرتبطة بالكيوتكل لا يعرف تركيبها الدقيق، وتوجد في نهاية هذه القناة المضخة الماصة (3) والبلعوم (5) والمرئ (6). أما الفايروسات الدوارة غير المتكاثرة فأنها ستعبر القناة الهضمية الأمامية إلى الجزء الأمامي من القناة الوسطى (9) ثم إلى الجزء الخلفي للقناة الوسطى (10) ثم إلى القناة الهضمية الخلفية (11)، وهي لا تصيب خلايا القناة الهضمية ولكنها تعبر خلال خلايا الجزء الخلفي للقناة

الوسطى والأمامي للقناة الخلفية وتتحرك إلى الدم (الهيموسيل) Hemocoel ثم تصل إلى الغدد اللعابية المساعدة (7) وتنتقل عبر خلاياها ثم تتحرر إلى القناة اللعابية (2). أما الفايروسات المتكاثرة فهي تصيب خلايا القناة الهضمية الوسطى ثم تصيب أنسجة أخرى لاحقة لترتبط بعدها بالغدد اللعابية الأساسية (8) وربما بالغدد اللعابية المساعدة قيل أن تتحرر في القناة اللعابية نتيجة ضخها بواسطة مضخة اللعاب (4) كما هو الحال مع الفايروسات الدوارة غير المتكاثرة.



الشكل (6-12): نموذج افتراضي لآلية ارتباط فايروسات أجناس *Caulimovirus* و *Potyvirus* و *Cucumovirus* غير الباقية وشبه الباقية المنقولة بالمن على كيوكتل الرمح أو المرئ. يلاحظ الاحتفاظ بالفايروسات بواسطة مستقبل واحد أو أكثر موجود على الكيوكتل يسمى "مستقبل المن" Aphid receptor والذي أعطي الرمز "مق" حيث تحتاج فايروسات الجنس *Caulimovirus* و *Potyvirus* إلى البروتين الفايروسي المتخصص بالنقل HC-Pro لكي تدمص على كيوكتل الرمح أو المرئ، أما مع فايروسات الجنس *Cucumovirus* فيكون الارتباط مباشر ومن دون تدخل لأي بروتين فايروسي.

الشكل مقتبس من Foster وآخرون (2008).



الشكل (6-13): الآليات المحتملة لربط بروتين المكون المساعد الذي يشفره الفايروس والمسمى "البروتين HC-Pro" مع كابسيد فايروسات البوتي Potyviruses ومع رشح المن (أ) موقع الجسيمات الفايروسية داخل الجزء الأمامي من الرشح وتحديدًا بداية قناة الغذاء (ب) نموذج يفترض الارتباط بين جزئ البروتين حيث يرتبط الجزء الأول مع مستقبل موجود على الرشح فيما يرتبط الثاني مع وحدة بروتينية من وحدات الكابسيد (ج) نموذج يفترض الحاجة إلى "مثنى" Dimer للربط مع المستقبل الموجود على الرشح إذ يرتبط كلا جزئي HC-Pro مع الوحدات البروتينية للكابسيد.

الشكل مقتبس من Hull (2002).

## 2- العلاقة شبه الباقية

العلاقة شبه الباقية Semi-persistent relationship هي الأقل شيوعًا من بقية العلاقات القائمة مع المن وهي تجمع في صفاتها بين العلاقة غير الباقية والعلاقة الباقية الدوارة وكما مبين في الجدول (6-3) وسجلت هذه العلاقة مع خمسة أجناس فايروسية هي *Caulimovirus* و *Closterovirus* و *Sequivirus* و *Carlavirus* و *Vitivirus* إلا أن أكثرها دراسة هي الأنواع التابعة للجنسين الأول والثاني وخاصة فايروسي اصفرار البنجر (BYV) وترستيزا الحمضيات (CTV) المنتميان للجنس الثاني ويصيان اللحاء، أما الفايروسات التابعة للجنس الأول ومنها فايروس موزائيك القرنابيط (CaMV) فهي موجودة في معظم أنسجة النبات وعند نقلها بهذه الطريقة فأنها تحتاج إلى وجود البروتين المساعد والذي يتدخل في نقل فايروسات الجنس *Sequivirus* إلا أنه لم يتم تشخيصه لحد الآن. لا تظهر الفايروسات المنقولة بهذه الطريقة صفات



نقل متجانسة بينها لذا فمن الصعب وضع مواصفات محددة لهذه العلاقة ولكنها عموما ذات فترة تغذية اكتساب وتلقيح طويلة تستغرق عدة ساعات وكلما ازدادت تزداد كفاءة النقل وذلك لان معظم الفايروسات شبه الباقية توجد في اللحاء مما يتطلب وصول الرمح إليه، ولا توجد فترة حضانة لان مواقع الاحتفاظ بهذه الفايروسات في جسم المن تكون في بداية القناة الهضمية الأمامية، (الشكل 6-11) وهناك أدلة على أن الفايروسات شبه الباقية تحتاج إلى البروتين المساعد لنقلها التخصصي بحشرات المن إلا أن تركيب هذا البروتين يختلف عن تركيب مثيله في الفايروسات غير الباقية فهو أكثر تعقيدا حيث وجد أن البروتين المساعد الذي يحتاجه فايروس موزائيك القرنابيط لنقله بحشرة من الخوخ الأخضر يتكون أصلا من نوعين من بروتين الغطاء الفايروسي الاول بحجم 18 كيلو دالتون وهو ناتج المنطقة الجينومية الثانية ORFII والثاني بحجم 15 كيلو دالتون وهو ناتج المنطقة الجينومية الثالثة ORFIII وهو يجب أن يكتسب من قبل المن قبل أو خلال التغذية كي ينقل الفايروس، ووجد أن لبعض البروتينات الأخرى التي تنتجها فايروسات الجنس *Caulimovirus* قدرة الارتباط التكاملي مع هذا البروتين ومساعدته في مهمة النقل، (الشكل 6-12) ولوحظت في هذه العلاقة أيضا ظاهرة النقل المساعد التي وجدت في الفايروسات غير الباقية حيث أن فايروس الترقط الاصفر للجزر الابيض (PYFV) لا ينقل بالمن ولكن عند وجوده في النبات بإصابة خليطة مع فايروس اصفرار البقدونس الافرنجي (AYV) المنقول بالمن عندها يصبح المن الناقل *Cavariella aegopodii* ناقلا له حيث يعمل الأخير فايروسا مساعدا للأول وهذا يشير إلى تخصصية هذا النقل حيث يمتلك الفايروس الثاني موقع ارتباطي تخصصي في المعى الأمامي للحشرة، وهناك أدلة على أن فايروسات *Carlaviruses* و *Closteroviruses* تحتاج إلى بروتينات مساعدة لنقلها بالمن وسجل ذلك مع فايروس الهرقلية الكامن (HLV) (الهرقلية نوع من الازهار من العائلة الخيمية) وهو عصوي مرن بطول 730 نانومتر حيث يعتمد في نقله على فايروس الهرقلية السادس (HV-6) العصوي بطول 1600 نانومتر وكلاهما ينتميان لجنس *Closterovirus* إذ يرتبطان معا من نهايتيهما طرف لطرف عند نقلهما بالحشرة وهي حالة غريبة من الارتباط لم تسجل مع فايروسات أخرى، ويبدو أن الجزء البروتيني الذي يغطي النهاية 5 لجينوم فايروسات *Closteroviruses* هو المسئول عن نقلها تخصصيا بالمن.

تظهر في هذه العلاقة ظاهرة "النقل المزدوج" *Bimodal transmission* والذي يتم فيه نقل فايروس نباتي معين بالطريقتين غير الباقية وشبه الباقية بنفس نوع المن، ولكن رغم تسجيل هذه الظاهرة مع عدد قليل من الفايروسات إلا أن بعض الباحثين يشكك في وجودها معللين بأنها قد تظهر نتيجة لاختلاف في العوامل المحيطة بعملية النقل وخاصة التفاعل بين المن الناقل والنبات العائل للفايروس.

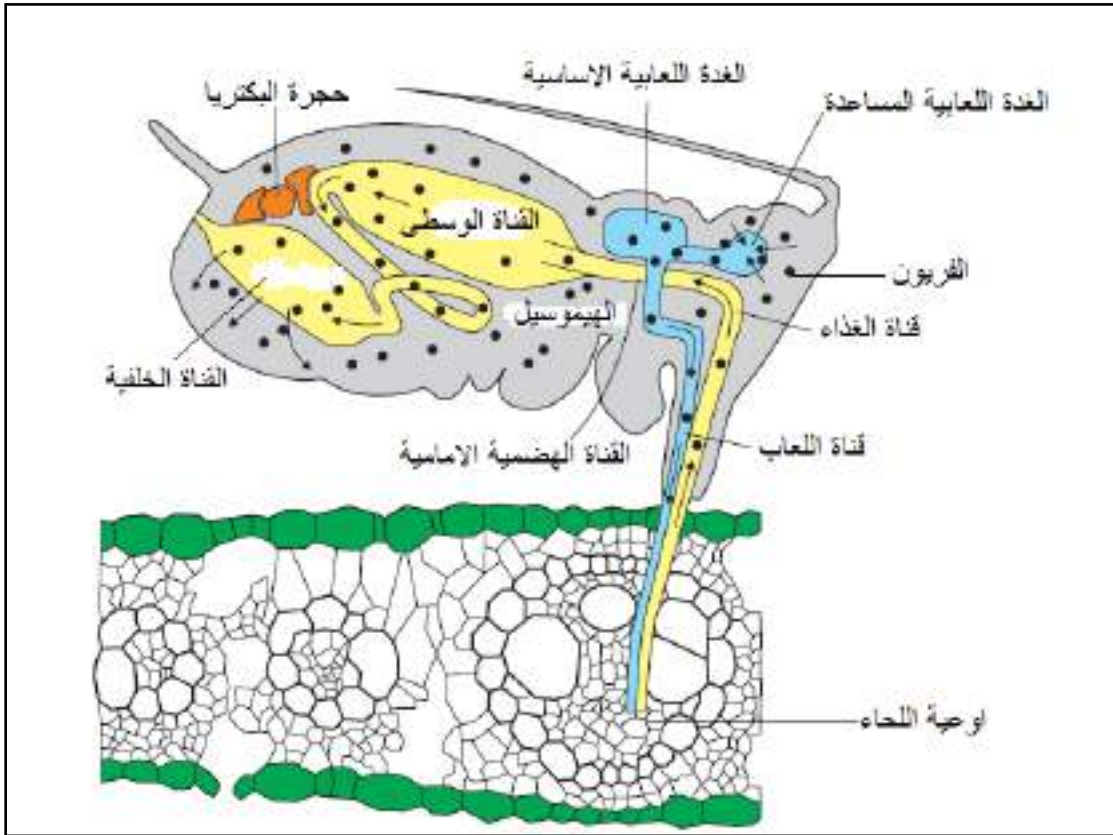
### 3- العلاقة الباقية

العلاقة الباقية *Persistent relationship* والتي تسمى أيضا "العلاقة الدوارة" *Circulative relationship* هي من العلاقات المهمة بين العديد من أنواع الفايروسات وحشرات المن ويطلق

على الفايروسات التي تمتاز بهذه العلاقة "الفايروسات الدوارة الباقية" Persistent circulative viruses وتسمى أيضا "الفايروسات المحمولة داخليا بالناقل" Internally-borne viruses أي داخل القناة الهضمية وتجويف الجسم والدم، (الشكل 6-11) وتنقل بهذه الطريقة الأنواع التابعة لأجناس *Nanovirus*، عائلة *Circoviridae* و *Luteovirus* و *Polerovirus* و *Enamovirus*، عائلة *Luteoviridae*، وتلعب هذه العلاقة دورا مهما في النقل الأفقي لعدد كبير من أنواع الفايروسات الخطرة على الإنتاج الزراعي والتي تسبب أعراض الاصفرار والتفاف الأوراق غالبا لأنها تتطفل على اللحاء كما أنها مسؤولة عن النقل القريب والبعيد للفايروسات، ويلخص الجدول (6-3) المواصفات الرئيسية لهذه العلاقة. يزداد مستوى التخصصية في هذه العلاقة بين الفايروس والمن مقارنة بالعلاقات السابقة حيث لا ينقل النوع الفايروسي الباقي إلا بنوع معين من المن أو ربما بعدة أنواع قليلة مما يشير إلى التخصصية العالية فيها، بينما ينقل الفايروس غير الباقي بعدد كبير من أنواع المن.

يتم في هذه العلاقة ابتلاع الجسيمات الفايروسية من قبل الحشرة عند التغذية الطويلة لتنتقل مع العصير النباتي إلى الأمعاء ثم تعبر إلى الدم (هيمولف الحشرة) وتحديدا من المعى الخلفي للحشرة ثم تصل إلى الغدد اللعابية لتحقن مع اللعاب في النبات الجديد الذي تتغذى عليه الحشرة، لذا فإن دورتها هذه في جسم الحشرة يتطلب أن تعبر حاجزين هما جدار الأمعاء وجدر الغدد اللعابية وفترة حضانه قد تستغرق 12 ساعة- عدة أيام حسب نوع الفايروس، (الشكل 6-14) كما أن المدة المعتادة لاكتساب هذه الفايروسات هي عدة ساعات رغم تسجيل فترة اكتساب مع بعض الفايروسات لا تستغرق أكثر من خمسة دقائق في حدها الأدنى، وتحتاج الحشرة لفترة تغذية لمدة 10-30 دقيقة لتلقيح النبات السليم، وتبقى الحشرة الحاملة للفايروس قادرة على نقله لعدة أيام. ولفهم كيفية عبور هذه الفايروسات للأغشية الداخلية للحشرة فقد درست آلية عبور جسيمات بعض أنواع فايروسات *Luteoviruses* لأغشية أنسجة حشرات المن ومنها فايروس التقزم الاصفر للحبوب (-CYDV RPV) والذي كان يسمى سابقا فايروس التقزم الاصفر للشعير (BYDV- RPV) حيث ترتبط جسيماته بالأغشية الخلوية لخلايا المعى الخلفي للمن *Ropalosiphon padi* ومن المحتمل أن تدخل إليها بواسطة عملية الابتلاع Endocytosis حيث تتجمع الجسيمات الفايروسية أولا داخل نقر أو حويصلات مغلقة Coated pits or vesicles ثم تتراكم في حويصلات أنبوبية وفي اللايسوسومات Lysosomes لتطلق إلى الهيموسيل عن طريق اتحاد الحويصلات الأنبوبية مع الغشاء البلازمي القاعدي Basal plasmalemma، ودرست آلية عبور فايروسي اصفرار البنجر الغربي (BWYV) والتفاف أوراق البطاطا (PLRV) من الدم إلى الأغشية اللعابية لحشرة من الخوخ الأخضر ووجدت جسيماتهما في فجوات الغشاء البلازمي Plasmalemma invaginations لخلايا الغدد اللعابية المساعدة وكذلك في الحويصلات الأنبوبية في سايتوبلازم الخلايا المجاورة للغدد اللعابية وفي النقر المغطاة المرتبطة بالغشاء المسمى بالغشاء القناتي Canal membrane حيث يتم عبور هذه الأغشية بواسطة مستقبل بروتيني "بآلية الابتلاع الميسرة بالمستقبل" Receptor mediated endocytosis، وتوفرت أدلة على وجود البروتين Read

through protein وهو جزء من كابسيد هذين الفايروسين والذي يعد ضروريا لنقلهما بالمن حيث أن الفايروسات التي لا تمتلكه يمكنها أن تصل إلى الهيموسيل بعد عبورها لجدار الأمعاء ولكنها تفشل في عبور جدر الغدد اللعابية، كما اكتشفت أنواع أخرى من البروتينات التي تلعب دورا في ربط الجسيمات الفايروسية بأغشية الحشرات فقد عزلت بروتينات من حشرات المن بوزن جزيئي 31 و85 كيلو دالتون حاملة لبعض أنواع فايروسات Luteoviruses، كذلك سجل وجود بروتين السمبيونين Symbionin ذو الوزن الجزيئي 60 كيلو دالتون والذي له قدرة الارتباط بأغشية المن وهو يعمل مع أنواع فايروسية عديدة منها الأنواع التي تعود للجنس *Luteovirus* وهو ينتج من قبل البكتريا المتعايشة داخليا في أمعاء المن والتي تعود للجنس *Buchnera* حيث وجد في هيمولف المن وهو يتبع مجموعة بروتينات الكايرون Chaperone المسؤولة عن تثبيت هيكلية البروتينات حيث يرتبط مع الجسيمة الفايروسية في منطقة Read through domain الموجودة في الكابسيد، ووجد أنه عند معاملة من الخوخ الأخضر بالمضادات الحيوية أدى ذلك إلى خفض مستويات هذا البروتين في الحشرة وثبط نقلها للفايروس وفقدان تماسك الكابسيد، كما أن لهذا البروتين دورا في ثباتية الجسيمات الفايروسية داخل هيمولف الحشرة.



الشكل (6-14): نموذج للنقل الدوار للفايروسات بواسطة حشرات المن.

تكتسب الحشرة الفريونات من أوعية اللحاء في النبات المصاب وتتجه الفريونات عبر الرمح خلال قناة الغذاء إلى القناة الهضمية الامامية ثم تنقل بالنقل النشط عبر خلايا جدار القناة الخلفية إلى

الهيموسيل ثم تنتشر عبر الهيمولف إلى الغدة اللعابية المساعدة ثم تنقل بالنقل النشط إلى قناة الغدة وتقذف من هناك مع اللعاب إلى اوعية اللحاء في النبات الجديد.

الشكل مقتبس من Domier (2008).

من الظواهر المهمة المرافقة للعلاقة الباقية بين المن والفيروسات هي ظاهرة "النقل الإتكالي" *Dependent transmission* حيث تحتاج بعض هذه الفيروسات إلى فايروس مساعد أو منشط *Helper or Activator virus* موجود مسبقا في النبات كي تنقل بالمن ولوحظت هذه الظاهرة مع فايروس التقزم الاصفر للحبوب (CYDV-RPV) المنتمي للجنس *Luteovirus* والذي ينقل بكفاءة بواسطة نوع المن *R. padi* ولكنه لا ينقل بالمن *Sitoboin avenae*، أما فايروس اصفرار وتقزم الشعير (BYDV-MAV) فينقل بكفاءة بالأخير ولا ينقل بالأول ولكنها ينقلان بنفس الكفاءة وبكلا نوعي المن عند وجودهما معا في النبات بإصابة خليطة اذ وجد أن كلا الفايروسين يستطيعان الدخول إلى هيمولف الناقل غير الكفاء ولكنهما يفشلان في عبور غدده اللعابية ليصلا إلى النبات، ويفسر التأثير المنشط للإصابة الخليطة في نقلهما إلى وجود ما يعرف بالخلط الشكلي *Phenotypic mixing* وذلك عند تضاعف الفايروسين معا في النبات حيث يتم تغليف بعض جينومات فايروس اصفرار وتقزم الشعير (BYDV-MAV) بالغطاء البروتيني لفايروس التقزم الاصفر للحبوب (CYDV-RPV) وبذلك يسهل نقله بالمن غير الكفاء. لوحظت هذه الظاهرة أيضا مع فايروسات *Umbraviruses* التي لا تمتلك قدرة تشفير غطاؤها البروتيني لذلك ترتبط بفايروس مساعد من فايروسات الجنس *Luteovirus* ليمنحها الكابسيد الذي يربطها بالمن، ولوحظت أيضا مع فايروسات *Nanoviruses* التي تحتاج إلى فايروس الإصفرار التماوتي للبقلاء (FBNYV) لنقلها بالمن، كذلك فان فايرويد الدرنه المغزلية للبطاطا (PSTVd) ينقل بالمن عندما تكون نباتات البطاطا مصابة بفايروس التفاف أوراق البطاطا (PLRV) رغم وجود شك بإمكانية تعبئة الفايرويد في كابسيد الفايروس المذكور. تمتاز العلاقة الاتكالية بالمزايا التالية (1) أن كلا الفايروسين ينقلان بالطريقة الباقية غير المتضاعفة (2) ينقل الفايروس الاتكالي ميكانيكيا بينما لا ينقل الفايروس المساعد بهذه الطريقة (3) لا ينقل الفايروس الاتكالي بالمن إلا إذا كان النبات مصاب بكلا الفايروسين إصابة مشتركة حيث يتم تعبئة الفايروس الاتكالي في كابسيد الفايروس المساعد، يبين الجدول (4-6) سبعة أنواع من الفايروسات الاتكالية وفايروساتها المساعدة.

الجدول (4-6): الفايروسات الإتكالية التابعة لجنس *Umbravirus* والفايروسات المساعدة لنقلها بالمن والتابعة للجنس *Luteovirus*

أنواع الفايروسات الجنس <i>Umbravirus</i>	أنواع الفايروسات المساعدة <i>Luteovirus</i>	أنواع المن الناقل
فايروس تحزم العروق الأصفر للفاصوليا (BYV BV)	فايروس التفاف أوراق الفاصوليا (BLRV)	<i>Acyrtosiphon pisum</i>
فايروس تبرقش الجزر (CMoV)	فايروس الورقة الحمراء للجزر (CtRLV)	<i>Cavariella aegopodi</i>
الفايروس المحاكي لتبرقش الجزر (CMoMV)	فايروس الورقة الحمراء للجزر (CtRLV)	<i>Cavariella aegopodi</i>
فايروس تورق فستق الحقل (GRV)	الفايروس المرافق لتورق فستق الحقل (GRAV)	<i>Aphis craccivora</i>
فايروس التبرقش الرقطي للخص (LSMV)	فايروس الإصفرار الغربي للبنجر (BWYV)	<i>Myzus persicae</i>
فايروس موزائيك وزوائد البزاليا الثاني (PEMV-2)	فايروس موزائيك وزوائد البزاليا الأول (PEMV-1)	<i>Acyrtosiphon pisum</i>
فايروس تبرقش التبغ (TMoV)	فايروس تشوه عروق التبغ (TVDMV)	<i>Myzus persicae</i>



#### 4- العلاقة الباقية الدوارة المتضاعفة

العلاقة الباقية الدوارة المتضاعفة Propagative relationship هي العلاقة الأكثر تخصصا بين المن والفايروسات المنقولة بهذه الطريقة والتي تسمى الفايروسات الدوارة المتضاعفة Propagative viruses وهي الفايروسات التي تتضاعف داخل ناقلاتها الحشرية لذلك فإن هذه العلاقة تحقق النقل الافقي للفايروسات فضلا عن النقل العمودي لها أيضا عبر أجيال الحشرة، وتمتاز هذه العلاقة بذات المواصفات التي تميز العلاقة الباقية الدوارة والفرق الوحيد بينهما أن الفايروسات في هذه العلاقة تتكاثر في أنسجة ناقلاتها وتحديدا في الدم بينما لا يحصل ذلك في العلاقة الباقية الدوارة، كما تمثل هذه العلاقة حالة نادرة من التطفل المزدوج للفايروس على عائل نباتي وآخر حيواني معا برغم التباين بين الأنسجة الحيوانية والنباتية وهي حالة لم تسجل مع أي من الطفيليات الأخرى. سجلت العديد من الفايروسات المنقولة بهذه الطريقة التابعة لجنسي *Cytorhabdovirus* و *Nucleorhabdovirus* التابعين لعائلة *Rhabdoviridae* حيث شوهدت جسيمات فايروسي العرق الاصفر للكسُوب (SYVV) والاصفرار التماوتي للخس (LNYV) المنقولين بالمن *Hyperomyzus lactucae* في نوى وسائتوبلازم خلايا دماغ الحشرة وفي خلايا الغدة المريئية تحت

Subesophageal ganglion وفي خلايا الغدد اللعابية والمبايض والجسم الدهني والعضلات وحجرة الكائنات الدقيقة Mycetome ويبدو أن جسيماتهما تتجمع في نوى الخلايا، وهما ينقلان بواسطة بيض المن المذكور (يستعمل مصطلح Transoviral transmission للإشارة لنقل الفايروسات ببيض الحشرات الحاملة للفايروس) وذلك بعد فترة حضانة طويلة تعتمد على درجات الحرارة، ووجد أن 1% فقط من الحوريات الناتجة من البيض كانت حاملة للفايروس الأول وقدرة على نقله كما تسببت إصابة حشرات المن بالفايروس زيادة في نسب موتها وأمكن نقل الفايروس تسلسليا من حشرة لأخرى بحقن المحلول الفايروسي في الهيمولف. إن هذه العلاقة هي أقل شيوعا مقارنة بالعلاقات الأخرى ورغم ذلك فهي من العلاقات التي تسبب انتشار ونقل العديد من الفايروسات الخطرة ومنها فايروس التفاف أوراق البطاطا (PLRV) الذي ينقل بالمن بهذه الطريقة حيث وجد أنه عند حقن الحشرات بالمحلول النقي للفايروس المذكور ولمرة واحدة فإن 50% من الحشرات المحقونة أصبحت قادرة على نقله طيلة حياتها بعد فترة حضانة 20 ساعة.

يبدو مما تقدم أن العلاقات الأربعة مع المن تعتمد على عاملين هما (1) مواقع الاحتفاظ بالفايروس في جسم الحشرة Site of retention (2) مسار الفايروس داخل جسم الحشرة Route of transport. كما تمر دورة نقل الفايروسات بالمن وبغض النظر عن نوع العلاقة بأربع مراحل هي (1) مرحلة الاكتساب Acquisition phase وهي المرحلة التي يكتسب فيها المن ما يكفي من الجسيمات الفايروسية ليكون قادرا على نقلها بعد تغذيته على النبات المصاب بما يسمى "بتغذية الاكتساب" Acquisition feed وتسمى المدة اللازمة لانجازها "مدة تغذية الاكتساب" Acquisition feeding period وهي المدة التي تحتاجها الحشرة لاكتساب الفايروس من أنسجة

النبات المصاب (2) فترة الحضانة

Incubation period أو تسمى فترة الكمون Latent period وهي الفترة الزمنية التي يبقى فيها الفيروس في جسم الحشرة الناقلة لتصبح بعدها قادرة على نقله إلى النباتات السليمة وتتباين هذه الفترة حسب نوع العلاقة القائمة بين الفيروس والمن فهي تستغرق مع الفيروسات المحمولة داخليا بين عدة ساعات إلى عدة أيام أما مع الفيروسات المحمولة خارجيا فهي لا تستغرق إلا عدة ثواني (3) فترة الاحتفاظ بالفيروس Retention period وتسمى أيضا فترة النقل Transmission period وهي الفترة التي يبقى فيها الفيروس فعالا في جسم حشرة المن وتكون فيها ناقلة له إلى النباتات السليمة (4) مرحلة تلقيح النبات السليم Inoculation period وهي المرحلة التي تكون فيها الحشرة لناقلة قادرة على تلقيح النبات بالفيروس الذي تحمله ويشار إلى المدة التي تحتاجها الحشرة لتلقيح النبات السليم بأنها "مدة تغذية التلقيح" Inoculation feeding period أما التغذية فتسمى "تغذية النقل أو التلقيح" Transmission or Inoculation period.

إن التسميات المستعملة لوصف هذه العلاقات وضعت من قبل Watson و Roberts سنة 1939 فهما أول من استعمل مصطلح الفيروس الباقي Persistent virus والفايروس غير الباقي Non-persistent virus لوصف الفيروسات حسب المدة التي تبقى فيها في المن القادر على نقلها بعد اكتسابها لها.

#### 5- نقل الفيروسات ميكانيكيا بحشرات المن

هي علاقة قليلة الأهمية جدا في نقل الفيروسات وليست تخصصية حيث يتم هذا النقل عن طريق جرح الخلايا النباتية ميكانيكيا بسبب حركة المن على سطح النبات ومع أنواع معينة من الفيروسات الثابتة وهي فايروسات موزائيك التبغ (TMV) والموزائيك الاصفر للشلغم (TYMV) وموزائيك الفاصوليا الجنوبي (SBMV) وهو نقل لم يلاحظ طبيعيا في البيئة ولكنه سجل تجريبيا مع الفيروسات المذكورة الموجودة بتركيز عالية في النباتات والتي تمتاز بثباتيتها العالية علما بأن هذه الفيروسات لا تنتقل بالمن طبيعيا، وتمخضت التجارب التي أجريت في هذا المجال على فايروس موزائيك التبغ عن النتائج التالية (1) لا يمكن لحشرات المن أن تنقل هذا الفيروس برماحها (2) أمكن نقل الفايروس تجريبيا بعمل جروح دقيقة حصلت نتيجة زحف المن على أسطح الأوراق (3) تمكنت حشرات المن من ابتلاع جسيمات الفايروس من النباتات المصابة مباشرة وكذلك من خلال الأغشية النفاذة الصناعية ثم طرحها مع فضلاتها وهي فعالة قادرة على الإصابة (4) لا يثبط لعاب المن الإصابة بالفايروس عند خلطهما معا ثم تلقيح النباتات الكاشفة ميكانيكيا بالخليط (5) أصبحت حشرات المن قادرة على اكتساب الفايروس من خلال الأغشية وذلك عند خلط المحلول الفايروسي النقي مع مركب الأورثينون المتعدد Poly orthinone وكلوريد البوتاسيوم وفسر ذلك بأن هذا المركب جعل من الخلايا المخترقة بالرمح حساسة للإصابة أو أنه سهل احتفاظ رمح المن بالفايروس.





## محاضرة رقم (11)

### الإصابة الفايروسية، التضاعف الفايروسي وحركة الفايروس في النبات

#### 1.7. مراحل الإصابة الفايروسية

إن الفايروس الناجح هو الذي يتمكن من التضاعف في خلايا النبات المصاب بعد دخوله فيها ثم الحركة من الخلايا المصابة إلى بقية أنسجة النبات لذا فإن نجاح الإصابة الفايروسية الجهازية يتطلب تضاعف الفايروس أولاً داخل الخلايا المصابة ثم حركته من الخلية المصابة إلى الخلايا المجاورة السليمة وتكرار الإصابة والحركة وصولاً إلى الأوعية الناقلة، عليه تمر الإصابة الفايروسية بالمراحل المتتالية التالية في النبات العائل.

#### 1.1.7. مرحلة وصول ودخول الفايروس إلى النبات

تصل الفايروسات إلى النباتات بوسائل النقل المختلفة التي فصلت في الفصل السادس وتلعب الناقلات بأنواعها الدور الأهم في نقل عدد كبير من أنواع الفايروسات وإيصالها إلى النباتات السليمة ثم تلقيحها بالفايروس وإدخاله إلى خلاياها حيث تخترق السطح النباتي المكون من الشمع والكيوتكل والجدر الخلوية التي لا تستطيع الفايروسات اختراقها، لذا ولتحقيق الإصابة فإنه يجب أن تدخل الفايروسات إلى النباتات ميكانيكياً عبر خلايا البشرة المجروحة بجروح غير مميتة Sub lethal wounds أي المزال عنها جدارها الخلوي (الفقرة 2.6 الفصل السادس) ويتحقق ذلك حينما تصل الجسيمات الفايروسية محمولة بعصير النبات المصاب وتدخل في الخلايا المجروحة أو تدخل مباشرة بواسطة الناقلات بأنواعها والتي تخرق الطبقات النباتية أعلاه وتنقل الفايروسات أثناء تغذيتها، ولم يسجل دخول أي فايروس نباتي عن طريق الفتحات الطبيعية في النبات وهي الثغور والعديسات والثغور المائية والغدد الرحيقية.

#### 2.1.7. تضاعف فايروسات النبات

تأخر فهم آلية تضاعف الفايروسات النباتية في عوائلها مقارنة بالمعلومات المتوفرة عن تضاعف الفايروسات البكتيرية أو البشرية أو غيرها من الفايروسات وذلك بسبب تأخر تطوير تقانات زراعة الأنسجة النباتية في أوساط زرعية صناعية لغاية سبعينات القرن العشرين وهي التقانات التي تتيح دراسة تضاعف الفايروسات وتصرفها في الخلايا في أنسجة معزولة خارج جسم النبات مما يسهل العمل وسرعة الحصول على النتائج حيث طوّرت تقانات تخليق البروتين في خلايا مفصولة حرة خارج النسيج النباتي الحي وزراعة البروتوبلاست وزراعة خلايا الناقلات الحشرية للفايروسات في بيئات زرعية خاصة وكذلك تقانات تضاعف الفايروسات خارج النبات الحي باستعمال رايبوسومات أجنة الحنطة Wheatgram system أو في بكتريا القولون *Escherichia coli* أو في خلايا دم الأرانب Rabbit reticulocyte lysate أو تسمى Rabbit anaemic blood cells. إن الزراعة النسيجية للبروتوبلاستات Protoplasts وهي خلايا نباتية تم فصلها عن النسيج النباتي

وإزالة جدارها الخلوي الصلب بإنزيمات السليليز والبكتينيز ثم زراعتها في أوساط زرعية خاصة قد سهل كثيرا دراسة تضاعف الفيروسات وذلك لأن هذه التقانة ألغت مشكلة عقبة الجدار الخلوي الذي يستحيل اختراقه من قبل الفيروسات حيث اعتمدت التجارب التي كان يجريها الباحثون قبل ابتكار هذه التقانة على تلقيح خلايا النبات ميكانيكيا بالفيروس بالطريقة التقليدية وهي التي تتطلب نظريا جرح 10000 خلية نباتية لكي تصاب خلية واحدة يتحقق فيها شرط الجرح غير المميت، كذلك فإن كل خلية ملقحة تتطلب 100 ألف جسيمة فيروسية لتحقيق الإصابة ولكن عند استعمال زراعة البروتوبلاست فإن 50% من البروتوبلاست الملقحة ستصاب بالفيروس ولا يحتاج كل برتوبلاست لأكثر من 10-100 جسيمة لكي يصاب كما أن تركيز الفيروسات يكون عاليا فيه إذ وصل تركيز فيروس موزائيك التبغ (TMV) إلى ما يقرب من  $10^6$  جسيمة/بروتوبلاست بعد التحضين لمدة 24 ساعة عند 25م.

يعتمد تضاعف الفيروسات على جينوماتها التي تتباين في أنواعها حسب نوع الفيروس، ويبين الجدول (1-7) أنواع جينومات فيروسات النبات حسب نوع الجينوم وعدد قطعه مع الأجناس الفيروسية الممثلة لكل نوع حيث تتباين آليات تضاعف الفيروسات حسب أنواع جينوماتها، إلا أنها تشترك بآليات عامة فهي جميعا تبدأ بالتضاعف مباشرة بعد دخولها إلى سايتوبلازم خلايا النبات العائل، وفيما يأتي خطوات تضاعف الفيروس النباتي.

#### 1.2.1.7. مرحلة نزع الغطاء البروتيني (إزالة الكابسيد)

تتشترك كل الفيروسات وبغض النظر عن نوع جينومها في خطوة نزع الغطاء البروتيني Uncoating or Decapsidation حيث تدخل كل أنواع الفيروسات إلى النباتات بشكل فيروس كامل (الفيون) Virion أو يسمى Intact virus أي الجسيمة الفيروسية بكل مكوناتها. يبدأ تفكيك الغطاء البروتيني إلى وحداته البنائية البروتينية الأساسية Protein subunits لتحرير الجينوم كي يتمكن من إظهار (ترجمة) معلوماته الوراثية أي تفعيل جيناته ويحصل ذلك خلال ساعات من دخول الفيروس إلى الخلية ويرجح تفكيك أغشية الفيروسات بسيطة التركيب المكونة من الحامض النووي والكابسيد خلال الفترة النشطة بايوكيميائيا من دورة حياة الفيروس، فيما تتفكك أغلفة الفيروسات المعقدة ومنها فايروسي الاصفار التماوتي للخص (LNYV) والتورم الجرحي (WTV) جزئيا خلال هذه الفترة ولكنها تبقى محتفظة بجزء قليل من البروتين المكون لجوهر الجسيمة (اللب) Core.

#### الجدول (1-7): أنواع جينومات فيروسات النبات

نوع الجينوم	عدد قطع الجينوم	جنس الفيروس	الفايروس الممثل
-------------	-----------------	-------------	-----------------

فايروس موزائيك التبغ (TMV)	<i>Tobamovirus</i>	قطعة واحدة	جينوم مفرد الخيط موجب التوجه (+) ssRNA
فايروس خشخشة التبغ (TRV)	<i>Tobravirus</i>	قطعتين	جينوم مفرد الخيط موجب التوجه (+) ssRNA
فايروس موزائيك نجيل البروم (BMV)	<i>Bromovirus</i>	ثلاث قطع	جينوم مفرد الخيط موجب التوجه (+) ssRNA
فايروس الأصفرار التماوتي للخص (LNYV)	<i>Rhabdovirus</i>	قطعة واحدة	جينوم رايبى مفرد الخيط سالب التوجه (-) ssRNA
فايروس التورم الجرحى (WTV)	<i>Phytoreovirus</i>	12 قطعة	جينوم رايبى مزدوج الخيط dsRNA
فايروس موزائيك القرنابيط (CaMV)	<i>Caulimovirus</i>	قطعة واحدة	جينوم رايبى منقوص الاكسجين مزدوج الخيط dsDNA
فايروس تخطط الذرة (MSV)	<i>Geminivirus</i>	قطعة واحدة	جينوم رايبى منقوص الاكسجين مفرد الخيط ssDNA

توجد علاقة بين نزع الغطاء والمدى العائلي للفايروسات إذ وجد عند تغليف جينوم فايروس موزائيك نجيل البروم (BMV) بالغطاء البروتيني لفايروس موزائيك التبغ فانه يصبح غير معدي لنباتات الشعير وهو العائل الأساسي لذلك الفايروس، كذلك تتأثر عملية نزع الغطاء بأي استبدال لحامض أميني بأخر يدخل في بناء الغطاء. من الأدلة المهمة التجريبية على نزع الغطاء البروتيني

للفايروسات مباشرة بعد دخولها خلايا العائل هي أن تلقيح نباتات التبغ بالجينومات العارية لفايروس موزائيك التبغ أدى إلى ظهور الإصابة بوقت أسرع مقارنة بتلقيحها بالجسيمات الكاملة كذلك حصول ظاهرة التنشيط الضوئي لجينومات الفايروسات Photoreactivation بعد تعريضها للأشعة السينية أو الأشعة فوق البنفسجية وهذا دليل على عدم وجود الغطاء البروتيني لأن وجوده يمنع حدوثها ووجد أيضا أن 25% من كمية البروتين في فايروس موزائيك التبغ قد ترسبت بعد ثمانية دقائق فقط من تلقيح نباتات التبغ به. تتباين آليات تفكيك الأغشية البروتينية لفايروسات النبات حسب تركيب الفايروسات وكما يلي:

#### أ- تفكيك الفايروسات العسوية

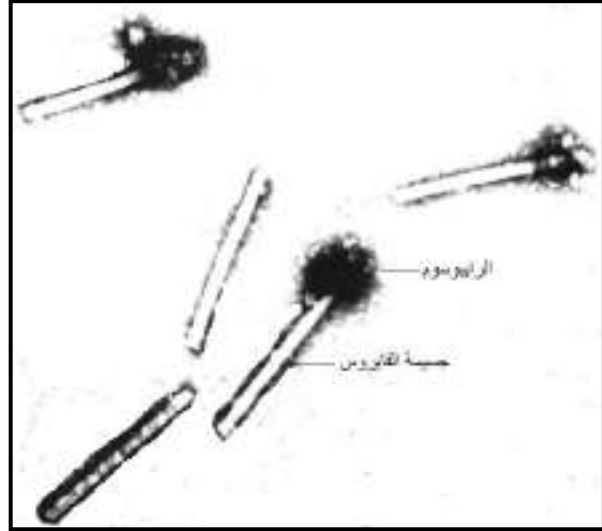
تبدأ الإصابة الفايروسية بإزالة الكابسيد عن الجينوم بما يكفي لترجمة أول هيكل تشفيرى مفتوح Open Read Frame , ORF ووجد أن أيون الكالسيوم  $Ca^{++}$  يبطئ أو يعيق تفكيك وحدات الكابسيد عند الأس الهيدروجيني 9 ويدل ذلك أن مواقع ارتباط أيون الكالسيوم في الخلية  $Ca^{++}$  binding sites تعمل مفتاح سيطرة لعملية التفكيك وأن إزالة أيون الكالسيوم يحدث تغييرا في بنية الوحدات البروتينية مما يؤدي إلى تفككها، ويعتقد أن الفايروسات بسيطة التركيب ومنها فايروس موزائيك التبغ تتفكك أعطيتها عند الغشاء الخلوي لخلية العائل أو في داخله حيث يكون تركيز أيون الكالسيوم مرتفعا وهو  $10^{-3}$  مولر في الوقت الذي يكون تركيزه داخل الخلية  $10^{-7}$  مولر وبالتالي يوفر هذا التركيز الأيوني في الأغشية طاقة تكفي لتفكيك الأواصر البينية للوحدات البروتينية ولكن لا زالت هذه الفرضية مثار جدل.

ولقد أجرى الباحثون العديد من التجارب المختبرية خارج النسيج الحي وباستعمال تقانات متعددة لدراسة آليات تفكيك الغطاء البروتيني وأجريت أغلب هذه الدراسات على فايروس موزائيك التبغ باستعمال جسيماته المعلمة شعاعيا Radioactively labeled particles سواء بتعليم الغطاء أو الجينوم حيث تم تفكيك البروتينات باستعمال القلويات Alkaloids أو المنظفات Detergents ومنها مركب "كبريتات دوديسيل الصوديوم" تركيز 1% SDS , Sodium dodecyl sulphate , الشائع الاستعمال في هذا المجال حيث تقوم هذه المركبات بنزع الوحدات البروتينية لجينوم فايروس موزائيك التبغ وتبدأ عملية التفكيك من النهاية 5 للجينوم وهي النهاية المقعرة Concaved end للجسيمة الفايروسية ويؤدي هذا التفكيك إلى إنتاج سلسلة من الجسيمات الفايروسية دون الحجم الحقيقي للفايروس Subviral rods وبأطوال متباينة، وأدى وضع جسيمات فايروس موزائيك التبغ لفترة قصيرة في وسط محلول الرنا المراسل باستعمال معلق الخلايا الدموية للأرانب ذو الأس هيدروجيني بقيمة 8 إلى إنتاج أنواع من عديد الببتيد الفايروسي ويفسر ذلك ان الوسط القاعدي يؤدي إلى إزالة ثباتية الكابسيد Destabilize عند النهاية 5 للجينوم بما يكفي لرايبوسومات الخلية للارتباط مع التعاقب الجينومي الريادي leader sequence 5 ثم تتحرك نزولا على طول الجينوم مستبدلة الوحدات البروتينية للغطاء وهذا يعني أن الرايبوسومات الخلوية هي المسئولة عن عملية تفكيك الغطاء البروتيني الفايروسي بواسطة آلية معقدة تسمى "التفكيك الترجمي المرافق" Co-

transitional disassembly وأطلق مصطلح "الستربتوسومات" Sriptosomes على الرايبوسومات التي تقوم بالتفكيك، وأطلق على حالة إرتباط الرايبوسومات مع الكابسيد مصطلح "المعقد الرايبوسومي المزيل الجزئي للغطاء" Ribosome partially stripped rod complex، (الشكل 7-1) وأجريت تجارب مماثلة باستعمال أجنة القمح وعند الأس الهيدروجيني 8 فأنتجت الجسيمات الفايروسية كمية من عديد الببتيد تزيد بثلاثة أضعاف عن كميته المنتجة من قبل الجينوم الموجود في خلايا النبات المصاب وهذا يشير إلى قدرة فايروس موزائيك التبغ ومن خلال هذه الآلية على حماية حامضه النووي داخل العصية من الإنزيمات المحللة للأحماض النووية خلال مرحلة نزع الغطاء الحرجة بسبب ما ينتجه من عديد الببتيد الذي يعيد تغليف الجينوم، وتوفرت أدلة أخرى دعمت هذه الآلية من تجارب تخليق البروتينات خارج النسيج الحي باستعمال بكتريا القولون وعند أس هيدروجيني 8 حيث أعطى الجينوم المخلوق في البكتريا كمية كبيرة من البروتين ذو الحجم 126 كيلودالتون فيما أعطى الجينوم العادي المخلوق في خلايا النبات المصاب بروتينا بحجم 50 كيلودالتون أو أقل مع كميات من بروتين الغطاء، ووجد أنه عند معاملة جسيمات فايروس موزائيك التبغ بمادة SDS لمدة 15 ثانية فقد أدى ذلك إلى تعرية تعاقبا نيوكليوتايدا من الطرف 5 وإلى ما وراء الكودون AUG ولكن لم يتم تجاوز حدود هذا التعاقب كما لم يتم تعرية التعاقبات التالية خلال الخمسة عشرة دقيقة التالية من التعريض لتلك المادة، ووجد أنه عند تحضين الجسيمات الفايروسية مع خلاصة أجنة القمح أو خلايا دم الأرانب أدى ذلك إلى إرتباط رايبوسوما واحدا أو اثنين مع حوالي 20% من الجسيمات الفايروسية.

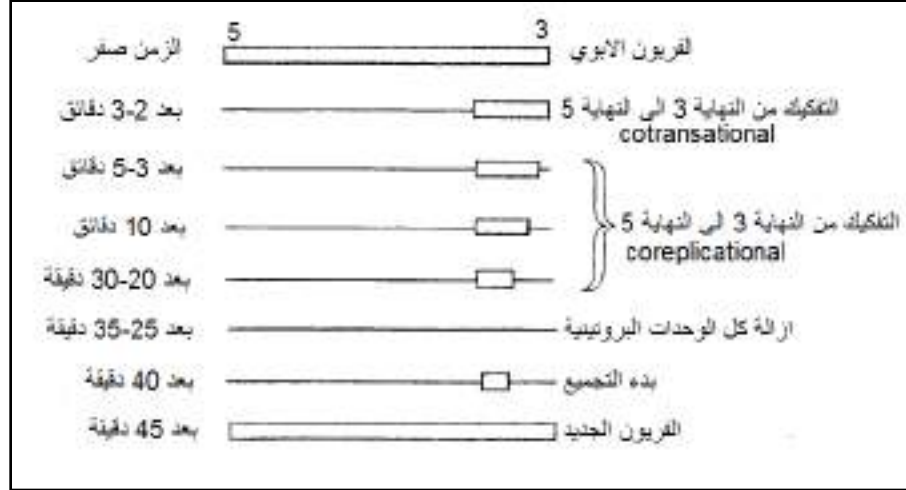
واستعمل البروتوبلاست في دراسة تجارب نزع الغطاء باستعمال القلويات الضعيفة ومادة SDS حيث لقحت برتوبلاستات بشرة نبات التبغ المصاب بفايروس موزائيك التبغ وأضيفت جزيئات الرايبوسوم 80S التي تحركت على طول الجينوم من النهاية 5 حيث أمكن عزل معقدات بروتينية مماثلة لخواص الستربتوسومات وذلك بعد فترة من تلقح البرتوبلاستات، ووجد أن الرايبوسوم يرتبط بالجينوم بعد إرخاء الفريون مما يؤدي إلى كشف جزء من النهاية 5 فيصبح الجينوم في متناول الرايبوسوم حيث أن التعاقب الريادي الذي بحجم 68 نيوكليوتايدة والذي تنقصه قاعدة الكوانين يرتبط بشكل ضعيف جدا مع وحدات الغطاء البروتيني مقارنة ببقية مناطق الجينوم وكانه مهيا أصلا للتفكك ويفسر ذلك بان الوحدات البروتينية لهذا الفايروس ترتبط مع بعضها بأواصر كاربوكسيلية حيث تتكون أصرتين كاربوكسيليتين بين كل وحدتين متجاورتين مع وجود أصرة كاربوكسيلية أخرى بين كل وحدة بروتينية والجينوم وتصبح هذه الأواصر في الوسط الضعيف قاعدية موجبة الشحنة بروتونية مما يؤدي لحدوث تنافر كهربائي مستقر Electrostatic repulsion وبذلك تتفكك أغشية الفايروسات قبل أن يعمل عليها الرايبوسوم لتبدأ عملية التفكيك الترجمي المرافق بارتباط الرايبوسوم بالجينوم وبيدأ بترجمة الهيكل التشفيري المفتوح الأول لفايروس موزائيك التبغ وهو 5-ORF1 فيخلق أنزيم الربلكيز بحجم 128/126 كيلودالتون مستبدلا الوحدات البروتينية للغطاء، وعندما يصل الرايبوسوم إلى " الكودون الموقوف" Stop codon وهو الهيكل التشفيري المفتوح 126/ 128 ORF فان الرايبوسوم ينفصل عن الجينوم، وأثيرت

التساؤلات حول كيفية تفكيك الربع الأخير من الجسيمة الفايروسية وتحديدًا في النهاية 3 إذ لا يصل الرايبوسوم إلى هذا الجزء بل يبدأ عمله من النهاية 5 لذلك يعتقد أن إنزيم الربلكيز هو الذي ينجز المهمة بدلا عن الرايبوسومات بتحركه على الجينوم بالاتجاه 3-5 وتخليقه للخيط التضاعفي الوسيط السالب Strand replication intermediate (-) خلال عملية التضاعف ويعني ذلك أن تفكيك الغطاء البروتيني لفايروس موزانيك التبغ يحصل بطريقة ثنائية الاتجاه وفق آلية "التفكيك التضاعفي المرافق" لذلك يطلق عليه "التفكيك ثنائي الإتجاه" Bi-directional disassembly وهو مصطلح مرادف لمصطلح "التفكيك الترجمي المرافق" وهي الآلية التي تعمل على الجينوم بالاتجاه 3-5 لإنتاج إنزيم الربلكيز الذي يكمل عملية التفكيك لما تبقى من الجسيمة بالاتجاه 3-5، (الشكل 7-2) وهذا دليل على أن عمليتي التضاعف والتفكيك هما عمليتين متزامنتين مترافقتين Coupled processes وهي عملية سريعة تفكك الغطاء البروتيني خلال 20 دقيقة، كما وجد أن كل جسيمة فايروسية تعمل عليها أربعة رايبوسومات في وقت واحد لتفكيكها.



الشكل (7-1): صورة بالمجهر الإلكتروني لمعقدات الرايبوسومات - الفايروسات والمسماة "الستربتوسومات" Striptosome complexes التي تلعب دورا محتملا في عملية التفكيك الترجمي المرافق Co-translational disassembly process والتي تكونت من خلال تفاعلات الترجمة لفايروس موزانيك التبغ (TMV) خارج النسيج الحي، ويلاحظ ارتباط إحدى نهايات بعض الجسيمات بتراكيب يعتقد أنها رايبوسومات.

الشكل مقتبس من Hull (2002).



الشكل (7-2): التفكيك ثنائي الاتجاه Bidirectional disassembly لفايروس موزائيك التبغ (TMV) داخل بروتوبلاست خلية العائل حيث تزال الوحدات البروتينية للغطاء بالاتجاه 3-5 اولا من حوالي 75% منه وذلك في أول 2-3 دقائق بعد تلقیح البروتوبلاست بالفايروس، أما إزالة الغطاء من النهاية 3 فتبدأ بعد وقت قصير من بدايتها من النهاية 5، لتكتمل إزالة الوحدات البروتينية بالاتجاه 3 – 5 بعد حوالي 25-35 دقيقة، ثم يبتدئ إنشاء الغطاء البروتيني أي تجميع Assembly الخيط الرايبي الجديد بعد حوالي 30-40 دقيقة من الإصابة ويكتمل عند الدقيقة 45.

الشكل مقتبس من Hull (2002).

#### ب- تفكيك الفايروسات البلورية

أجريت أغلب هذه الدراسات على فايروسات Bromoviruses وخاصة فايروسي موزائيك نجيل البروم (BMV) وفايروس التبرقش الأصفر للوبيا (CCMV) وباستعمال أجنة الحنطة كوسط للتضاعف والتي أظهرت حصول إنتفاخ لجسيمات الفايروس الأول في وسط يزيد فيه الأس الهيدروجيني عن 7 ويسمح هذا الانتفاخ بحصول آلية التفكيك الترجمي المرافق كما في الفايروسات العسوية وبذلك يعد الانتفاخ ضروريا كمرحلة تسبق مباشرة تفكيك أغشية هذه الفايروسات، ووجد أن لأيون الكالسيوم دورا فيها ولكن أظهر الفايروس الثاني أدلة تشكك في هذه الآلية حيث لم تنتفخ جسيماته تحت الظروف القلوية لذا اقترحت آلية بديلة وهي حصول تحول تركيب في الأغشية بتأثير الأس الهيدروجيني يؤدي إلى تفككها وبذلك يصبح الجينوم في متناول النظام الترجمي وهذه الآلية مماثلة لتلك الملاحظة مع الفايروسات الحشرية والفقارية وتفترض بأن النهاية النروجينية المكونة من خمس وحدات بروتينية والموجودة في الكابسومير الخماسي للكابسيد تخضع لتحول تركيب كبير يبتدئ من داخل الفريون إلى خارجه مما يسمح بتكوين قناة يعبر من خلالها الجينوم ليصبح في متناول النظام الترجمي إلا أن هذا يتطلب تحرير النهاية 5 أيضا وهذا يعني أنها مرتبطة مع الكابسومير الخماسي.



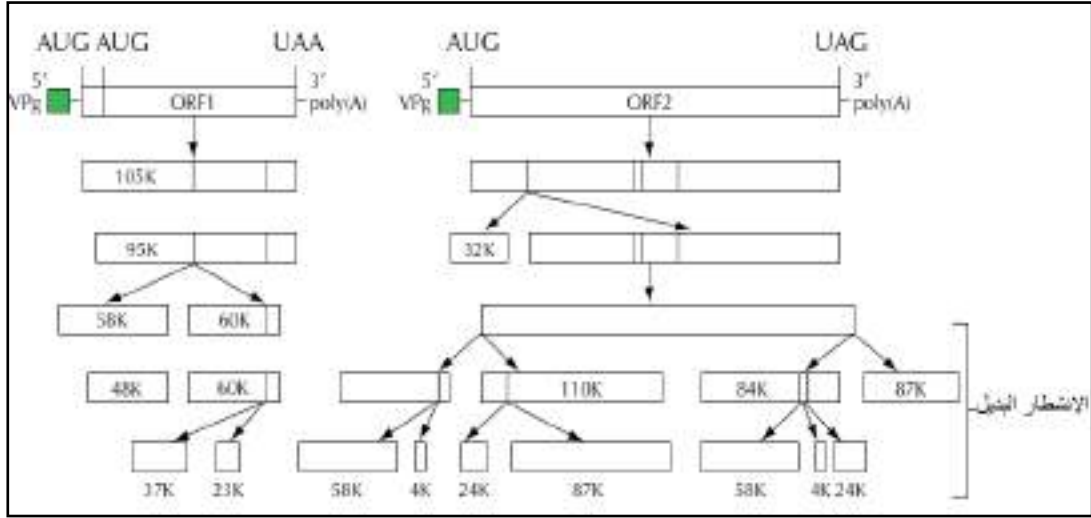
### 2.2.1.7. مرحلة تضاعف الحامض النووي الفايروسي

يبدأ الحامض النووي الفايروسي (الجينوم) بالتضاعف فور انتهاء عملية تفكيك الغطاء البروتيني ولكن تتباين آليات التضاعف حسب نوع الحامض النووي الفايروسي وفردية أو ازدواج خيطيه وهل هو سالب أو موجب التوجه، وتتماثل آليات تضاعف جينومات فايروسات النبات عموماً مع آليات تضاعف واستنساخ الأحماض النووية الخلوية وفهمت آليات تضاعف العديد من أنواع فايروسات النبات باقتباس آليات تضاعف الفايروسات الحيوانية والبكتيرية كما ساعد تطور علم الحياة الجزيئي Molecular Biology في ذلك خصوصاً أن بعض الفايروسات أصبحت أداة هامة لنقل الجينات في تقانات الهندسة الوراثية.

يبدأ الجينوم الفايروسي بالتضاعف وبغض النظر عن نوعه مباشرة بعد نزع الغطاء البروتيني وتحرير الجينوم فإذا كان الجينوم من النوع الرايبي مفرد الخيط موجب التوجه Sense ssRNA (+) فإن الجينوم بكامله يسلك سلوك الرنا المراسل mRNA، أما الأنواع الأخرى من الفايروسات فإنها لا تسلك سلوك الرنا المراسل ولكنها تخلق عدة نسخ من الرنا المراسل الفايروسي Viral mRNA والتي تقوم بتشغيل نواتج جينية بروتينية أهمها إنزيم الربليز الفايروسي Viral replicase فضلاً عن بروتينات أخرى تشارك في التضاعف لإنتاج أنواع من الجينومات الرايبيية الثانوية Subgenomic RNAs وكذلك لتخليق جينومات فايروسية جديدة، ويتم لاحقاً إنتاج بروتينات الغطاء وبروتين الحركة المسئول عن نقل الجسيمات الفايروسية من خلية لأخرى وأيضاً بروتين النقل بالناقل إن كان الفايروس منقول بناقل وتنتج هذه البروتينات في مرحلة متأخرة من دورة التضاعف الفايروسي، وتشير عدد من الفايروسات ومنها الأنواع التابعة للجنس Comomvirus بروتينا بحجم كبير يسمى Polyprotein or Long polyprotein، (الشكل 7-3) والجدول (7-2). إن المعلومات الوراثية اللازمة لتشفير الغطاء البروتيني لا تأخذ إلا جزءاً بسيطاً من حجم الجينوم، ولغرض إنتاج غطاء بروتيني بحجم 200 حامض أميني فإن الفايروس يحتاج إلى جينوم ذو وزن جزيئي 200 كيلودالتون أي قطعة جينومية بوزن كيلودالتون واحد لكل حامض أميني وهذا لا يشكل أكثر من 10% من حجم جينوم رايبي بوزن  $10 \times 2^6$  دالتون أما المتبقي من حجم الجينوم فهو لتشفير إنزيم التضاعف والبروتينات الأخرى ومنها بروتين الحركة والنقل بالناقل. يتم تجميع الجينومات الفايروسية مع الوحدات البروتينية للغطاء لتكوين الفيونات في سايتوبلازم خلايا العائل عادة ثم تتحرك إلى الخلايا المجاورة لإحداث الإصابة الجهازية.

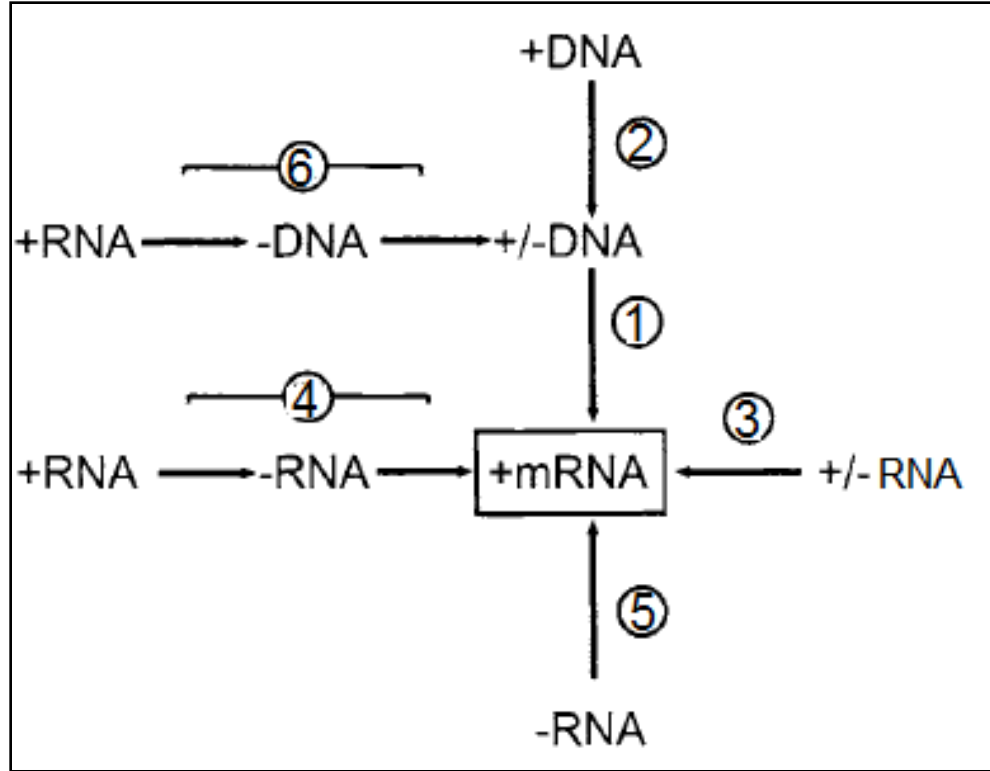
تتلخص آليات التضاعف التي ذكرت أعلاه باستنساخ الجينومات الفايروسية من الرنا المراسلة الرايبيية الفايروسية mRNAs والمتمثلة بجينومات الفايروسات من النوع الرايبي مفرد الخيط موجب التوجه Sense ssRNA (+) أو المتمثلة بمسئنسخات Transcripts جينومات الفايروسات سالبة التوجه Sense ssRNA (-) وجينومات الفايروسات من النوع dsRNA أو dsDNA، يبين الشكل (7-4) مسارات استنساخ الجينومات الفايروسية باختلاف أنواعها. يتم تضاعف الجينوم الفايروسي من الجينوم الأبوي في أنواع الفايروسات مزدوجة الخيط سواء كانت dsRNA أو dsDNA بطريقة

"التضاعف شبه المحافظ" Semi-conservative replication حيث تنتج هذه الطريقة جينوما مماثلا للجينوم الأبوي إذ يفصل الخيطين الأصليين للجينوم الأبوي عن بعضهما أولا ثم يكوّن كل منهما خيطه التكاملي وكما مبين في الشكل (7-5) ومن المعروف أن الدنا المزدوج في الكائنات الحية يتضاعف بثلاث طرق وهي (1) طريقة "التضاعف المحافظ" Conservative replication حيث يعود الخيطين الأصليين للجينوم بعد انفصالهما وتخليق الخيطين الجديدين إلى الارتباط ثانية فيما يرتبط الخيطين الجديدين معا (2) طريقة "التضاعف شبه المحافظ" Semi-conservative replication (3) طريقة "التضاعف المشتت" Dispersive replication حيث تتوزع قطع الجينوم الأبوي عشوائيا في خيطي الجينوم الوليد.



الشكل (7-3): البروتينات الكبيرة Polyprotein , Long polyprotein التي تشفرها فايروسات Comoviruses والناجمة من الهيكلين التشفيرين المفتوحين الأول والثاني ORF1 , ORF2 والتي يتم شطرها لاحقا إلى بروتينات وظيفية صغيرة بواسطة إنزيم تحليل البروتين عالي الفعالية والذي تشفره هذه الفايروسات. تشير الأرقام إلى حجم البروتينات بالكيلودالتون (K).

الشكل مقتبس من Cann (2005).



الشكل (4-7): مسارات إظهار الجينوم الفيروسي عن طريق الرنا المراسل mRNA.

المصدر : فايروسات النبات ، د. نبيل عزيز قاسم 2011

## محاضرة رقم (12)

### حركة الفايروسات في النباتات

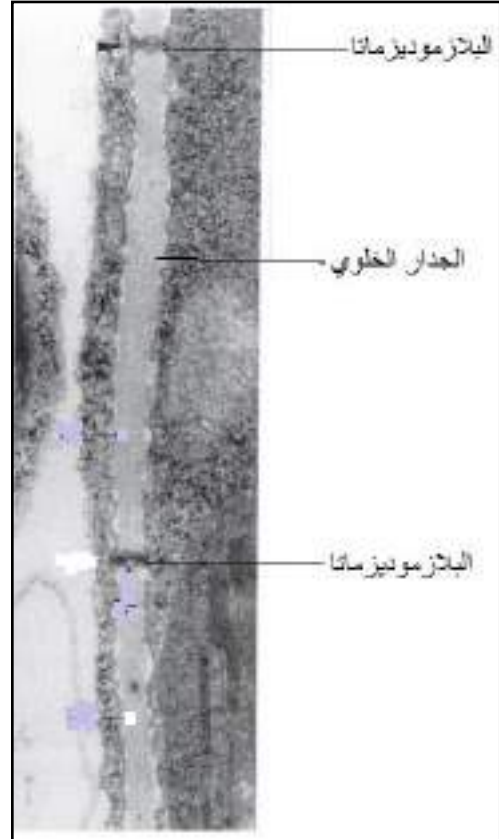
هي المرحلة الثالثة من مراحل الإصابة والتي تعقب مرحلة التضاعف الفيروسي وهي تعد مرحلة أساسية لاكتمال الإصابة الفيروسية فمن دونها لا تكتمل الإصابة حتى لو نجح الفيروس بالتضاعف داخل الخلايا، أظهرت الدراسات المبكرة التي أجريت على حركة الفايروسات في النبات أنها تتحرك جهازيا في أنسجة اللحاء وثبت ذلك تجريبيا بتجارب التركيب حيث ظهرت الأعراض في الطعوم السليمة المطعمة على أصول مصابة وبينت الدراسات التي اعتمدت طريقة قطع وإتلاف اللحاء بطريقة التحليق الحراري Heat girdling طبيعة اتجاه وسرعة تحرك الفايروسات من الخلايا المصابة باتجاه الأنسجة السليمة حيث تتحرك الفايروسات التي تصيب النباتات جهازيا أولا ببطء عبر الخلايا النباتية ثم إلى نسيج اللحاء محمولة مع الغذاء فيما تتحرك القلة من الفايروسات عن طريق أوعية الخشب ويكون اتجاه حركتها أولا نحو الجذور ثم إلى الأوراق الحديثة في قمة النبات لتتحرك بعدها نزولا إلى بقية أجزاء النبات وقد أيدت الدراسات التي أجريت باستعمال المجهر الالكتروني وجود الحركتين البطيئة عبر البلازموديماتا والسريعة خلال اللحاء بمشاهدة الجسيمات الفيروسية فيهما وذلك عند دراسة أنماط الحركة في نوعين من الأعراض وهما الموزايك والاصفرار حيث تحددت مناطق الإصابة في الأعراض الأولى بنوع التعريق في الأوراق

Leaf vasculature مما يدل على نقل الفيروس عبر الخلايا ثم بالأنسجة الوعائية فيما دلت أعراض الاصفرار على انتشار الفيروس حتما بالأنسجة الوعائية حيث أن فايروسات الاصفرار تصيب اللحاء وتتحرك فيها، وهكذا ولكي تكتمل الإصابة الجهازية يتوجب على الفايروس النباتي أن يتحرك أولا حركة بطيئة عبر الخلايا ثم تعقبها حركة سريعة وطويلة عبر الأنسجة الناقلة وخاصة اللحاء ثم يعود ثانية إلى الحركة البطيئة لإصابة خلايا جديدة وإنشاء مواقع إصابة جديدة في النبات.

#### 1.1.3.7. الحركة البطيئة (الحركة بين الخلايا)

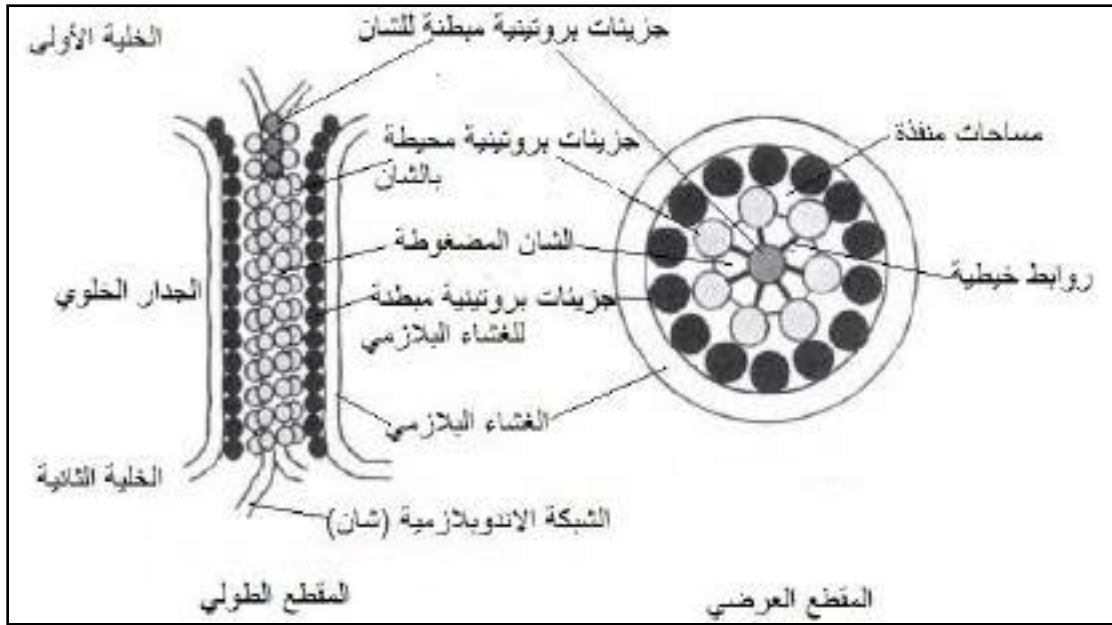
تحصل الحركة البطيئة (الحركة بين الخلايا) Slow or Cell-to-cell movement بتحرك الفايروسات الكاملة أو جينوماتها داخل الخلية المصابة في السايئوبلازم وكذلك عبر الأغشية الخلوية بالنسبة للفايروسات المتضاعفة فيه أو من النواة إلى السايئوبلازم بالنسبة للفايروسات المتضاعفة في النواة ويعتقد أن هذه الحركة تتم بظاهرة الضغط الانتشاري وحركة السايئوبلازم الدورانية وبعد اكتمال تضاعف الفايروس داخل الخلية وامتلائها بالأفراد الجديدة ثم تبدأ هذه الأفراد بالحركة من خلية لأخرى عبر الروابط السايئوبلازمية الرابطة بين سايئوبلازم كل خليتين متجاورتين والمسماة "البلازموديماتا" Plasmodesmata وهي قنوات سايئوبلازمية مبطنة بالأغشية البلازمية تمتد عبر جدران خلايا النباتات، (الشكلين 7-12 و 7-13) لتسهل الانتشار بين الخلوي للجزيئات الحيوية الخلوية وخاصة

البروتينات والأيونات. يبلغ معدل أقطار البلازموديزماتا في النباتات بحدود 3 نانومتر وهو قطر لا يكفي لعبور الجسيمات الفايروسية التي تتراوح معدلات أقطارها بين 10-100 نانومتر، (الشكل 7-14) لذلك لا بد من حدوث تحويل لها كي تتوسع لتسمح للجسيمات الفايروسية من العبور خلالها حيث تلعب بروتينات الحركة Movement proteins , MP التي تشفرها الفايروسات دورا في تحويل البلازموديزماتا والارتباط بالجسيمات الفايروسية لتمريرها عبر هذه القنوات. وقد أثبتت الدراسات التي أجريت على فايروس موزائيك الداليا (DMV) والذي يبلغ قطر جسيماته 50 نانومتر ذلك حيث أظهرت صور المجهر الالكتروني وجود عدد من البلازموديزماتا المحورة التي أصبحت بشكل شبه أنبوبي وهي ممثلة بصف مفرد من جسيمات الفايروس، ولقد فسرت عدة آليات لتفسير الكيفية التي تحور بها البلازموديزماتا لتصبح مهيأة لعبور الفايروسات وبالإستعانة ببروتينات الحركة مع العديد من أنواع الفايروسات والتي يوضحها الشكل (7-15)، ويبين الجدول (7-3) أنواع من بروتينات الحركة بين الخلايا والخاصة بعدد من أنواع الفايروسات.



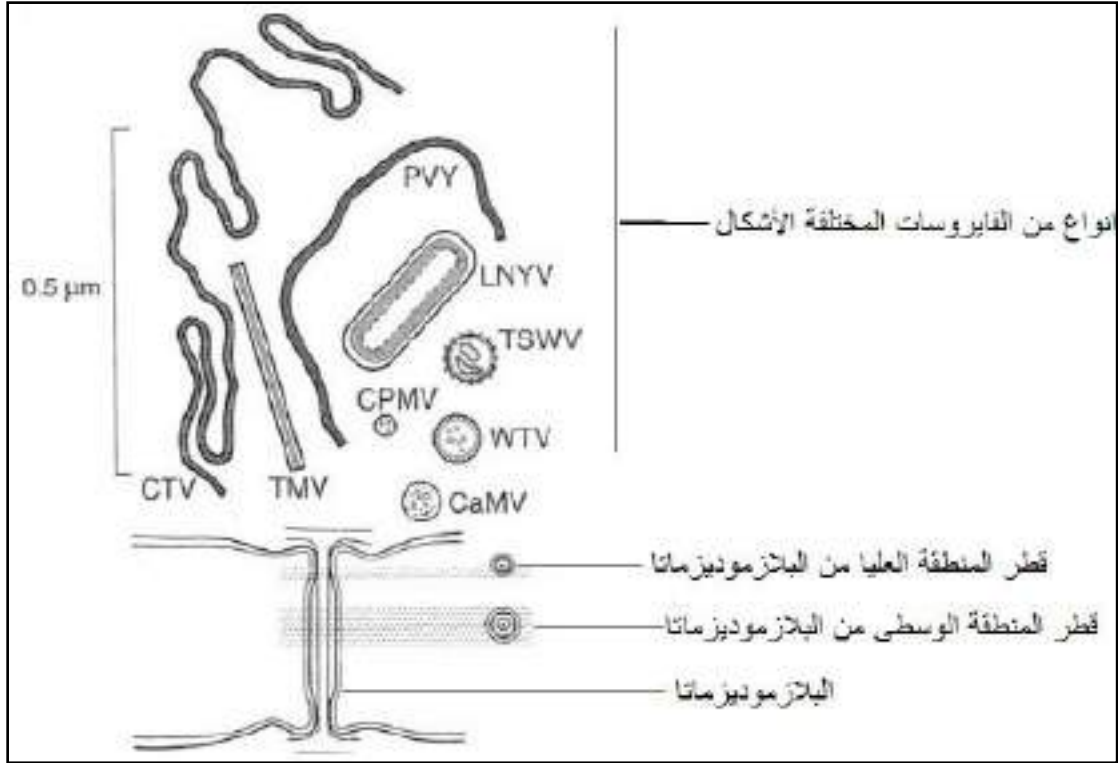
الشكل (7-12): صورة بالمجهر الالكتروني يبين مواقع البلازموديزماتا في الجدار الخلوي الفاصل بين خليتين.

الشكل مقتبس من Hull (2009).



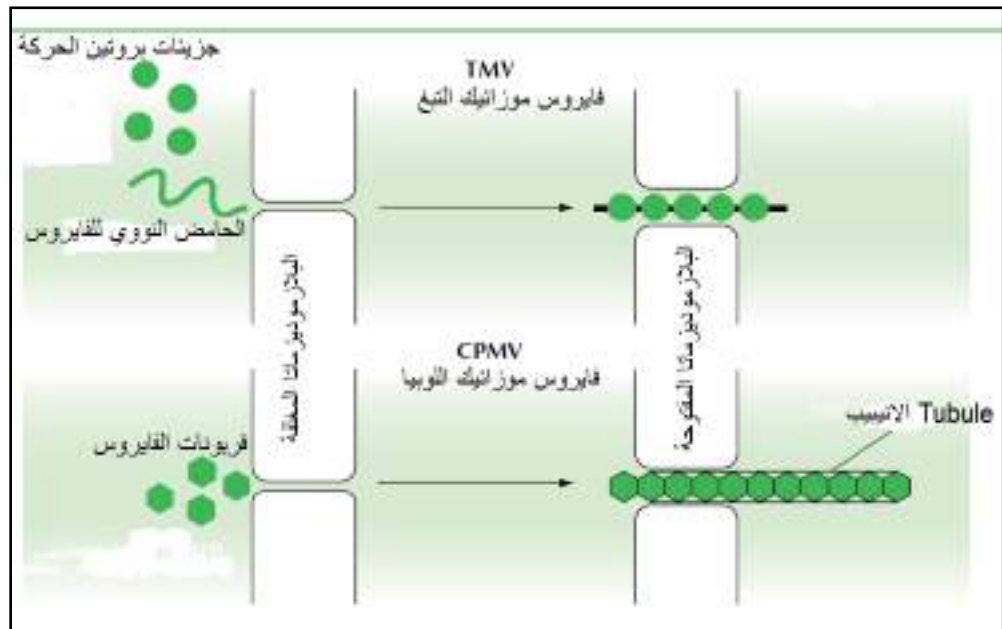
الشكل (7-13): التركيب التشريحي للبلازموديزماتا بالمقطعين الطولي والعرضي، (الرمز "شان" يعني الشبكة الاندوبلازمية).

الشكل مقتبس من Hull (2009).

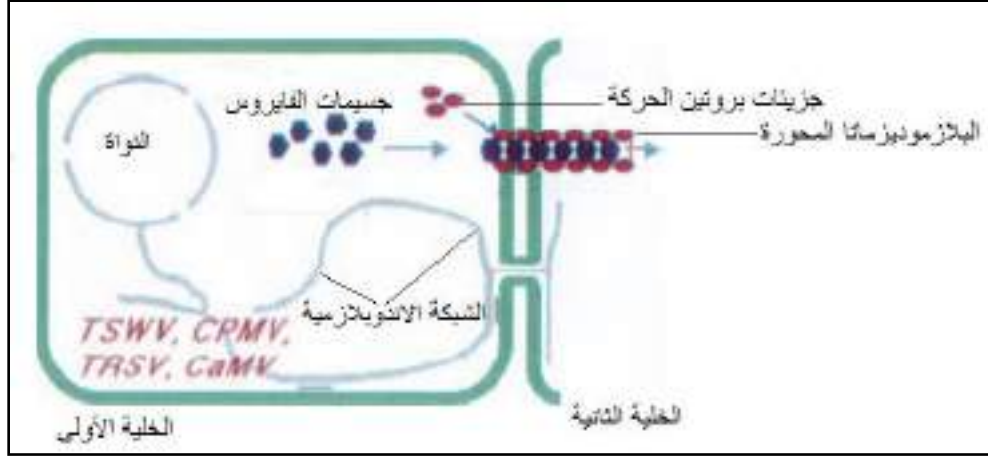


الشكل (7-14): مخطط يبين صغر حجم قطر البلازموديماتا الطبيعية والذي لا يزيد عن 3 نانومتر، مقارنة بحجم عدد من أنواع الفيروسات المختلفة الأشكال.

الشكل مقتبس من Hull (2009).



(أ)



(ب)

الشكل (7-15): (أ) نموذج مقترح لآلية عمل بروتينات الحركة لتسهيل عبور الفايروسات العسوية والايرومترية عبر البلازموديزماتا بعد توسعتها بتلك البروتينات، حيث يظهر الشكل العلوي أن جزيئات بروتين الحركة ترتبط بالحامض النووي لفايروس موزائيك التبغ الممثل للفايروسات العسوية وليس بالفايروس الكامل وتممره عبر البلازموديزماتا، أما الآلية الثانية فهي اصطفاف جزيئات بروتين الحركة بشكل أنيبيب Tubule في فجوة البلازموديزماتا وتوسعتها لتتمر منها الجسيمات الفايروسية الأيزومترية الكاملة كما موضح مع فايروس موزائيك اللوبيا. (ب) نموذج لحركة أربعة أنواع من الفايروسات الأيزومترية عبر البلازموديزماتا حيث يتم إقحام تركيب أنبوبي قصير مكون من بروتين الحركة في تجويف البلازموديزماتا لغرض توسعته للسماح للجسيمات الفايروسية بالعبور خلالها وهناك أدلة على دور الشبكة الأندوبلازمية في هذه الحركة، (مختصرات أسماء الفايروسات مبينة داخل الشكل).

الشكل مقتبس من Cann (2005) و Hull (2009).

وتمت دراسة دور بروتين الحركة في نقل الفايروسات عبر الخلايا بإتباع الطرق المناعية الخلوية Immunocytological methods التي تعتمد استعمال أضداد بروتينات الحركة والكشف عن وجودها مصليا باستعمال طريقة البصمة الغربية Western blot method حيث تم الكشف عن وجود هذه البروتينات في البلازموديزماتا المحورة، كما تحدث تحويلات تركيبية في البلازموديزماتا لغرض توسعة تجويفها عن طريق تكوين الأنبيبات البلازموديزماتية Plasmodesmata tubules والتي لوحظت في العديد من أنواع النباتات المصابة بفايروسات Comoviruses و Nepoviruses و Badnaviruses، و Tospoviruses، ويشفر فايروس موزائيك اللوبيا (CpMV) بروتينين بحجم 48 و 58 كيلودالتون المسؤولين عن تكوين الأنبيبات التي تعمل على توسعة الشكل الأنبوبي للبلازموديزماتا وبالتالي تعمل هذه الأنبيبات تحويل التجويف البلازموديزماتي أي زيادة "حجم حدود السعة البلازموديزماتية"



Plasmodesmal size exclusion limit , SEL وبالتالي تسمح بعبور جزيئات أكبر بكثير من تلك التي تقوم بتمريرها في الحالة الطبيعية.

وهناك إشارات إلى حدوث آلية معقدة لعبور عدد من أنواع الفايروسات بشكل حامض نووي عاري غير فريوني مرتبط مع بروتين الحركة مباشرة حيث يتكون "المعقد النيوكليوبروتيني غير الفريوني" Non-virion nucleoprotein complex وليس كما هو مقترح في الآلية السابقة بارتباط بروتين الحركة مع بروتين الكابسيد وقد لوحظ ذلك مع فايروس موزائيك وتقرم الفاصوليا (BDMV) ذو جينوم من النوع ssDNA والذي يتضاعف في النواة وعليه فان الفايروس يحتاج إلى نوعين من بروتينات الحركة وهما البروتين BV1 الذي ينقل الجينوم من النواة إلى الساييتوبلازم والبروتين BC1 الذي ينقله عبر البلازموديماتا إلى الخلايا المجاورة.

تسبب الحركة البطيئة انتشارا موضعيا للفايروس في النبات إذ لا يتحرك بواسطتها عبر الخلايا لأكثر من 0,2 ملم يوميا كمعدل عام لكل الفايروسات ويعني ذلك أن الفايروس يحتاج إلى عدة أيام للانتشار في الورقة النباتية الواحدة ويتحكم في سرعة هذه الحركة مقدار تضاعف الفايروس داخل الخلية وبتناسب طردي فكلما زاد مقدار التضاعف زادت سرعة هذه الحركة.

## أ- الجينات الفايروسية المسؤولة عن الحركة البطيئة للفايروسات

ساعدت تقانة الاستنساخ الجزيئي Molecular cloning في الكشف عن الجينات المسؤولة عن تشفير بروتينات الحركة في الفايروسات فقد عرف الجين المشفر لبروتين الحركة في فايروسات Tobamoviruses وهو بحجم 30 كيلوداتون وذلك بدراسة طفرات من فايروس موزائيك التبغ (TMV) حساسة حراريا وخاصة الطفرة Ls1 التي تفقد قدرتها على الحركة بين الخلايا عند تعرضها إلى درجات حرارية عالية نسبيا، ووجد أن الفرق الوحيد بين السلالة البرية للفايروس والطفرة Ls1 هو حامض أميني واحد استبدل في تعاقب بروتين الحركة، كذلك سجل وجود الجين 3a الذي يشفر بروتين الحركة المسمى 3a protein في القطعة الجينومية الثالثة RNA3 وهي ثنائية التشفير Dicistronic في فايروسات Bromoviruses المكون جينومها من ثلاث قطع هي RNA1 و RNA2 و RNA3، ووجد أن بروتين غطاء هذه الفايروسات ضروري للنقل البعيد عبر اللحاء والنقل البطيء عبر الخلايا. وتشفر جينومات فايروسات Potyviruses بروتينا كبيرا Polyprotein والذي يسمى HC-Pro وهو يلعب دورا في نقل هذه الفايروسات عبر الخلايا وفي النقل البعيد لها داخل النباتات. وتمتلك فايروسات Potexviruses و Carlaviruses و Hordeiviruses وبعض أنواع فايروسات Furoviruses مجموعة من ثلاثة جينات متداخلة Overlapping genes ويطلق على القطعة الجينومية التي تحمل هذه الجينات مصطلح "القطعة الجينومية ثلاثية الجين" TGB , Triple gene block وهي تشفر بروتينات الحركة البطيئة والسريعة لهذه الفايروسات. أما الفايروسات النوأمية Geminiviruses ذات الجينوم منقوص الأكسجين المفرد ssDNA فان بعض أنواعها هي أحادية الجينوم Monopartite genome وهي تمتلك الجين CP وهو المسئول عن تشفير بروتين الغطاء وهو ذات البروتين المسئول عن حركة هذه الفايروسات في النباتات، أما أنواعها الأخرى ثنائية الجينوم Bipartite genome فهي تتكون من قطعتين جينوميتين متماثلتي الحجم وهما DNA-A و DNA-B والقطعة الأخيرة هي التي تحمل جينات تشفير بروتينات الحركة حيث تحمل الجينين BC1 و BV1 المسئولين عن ذلك.

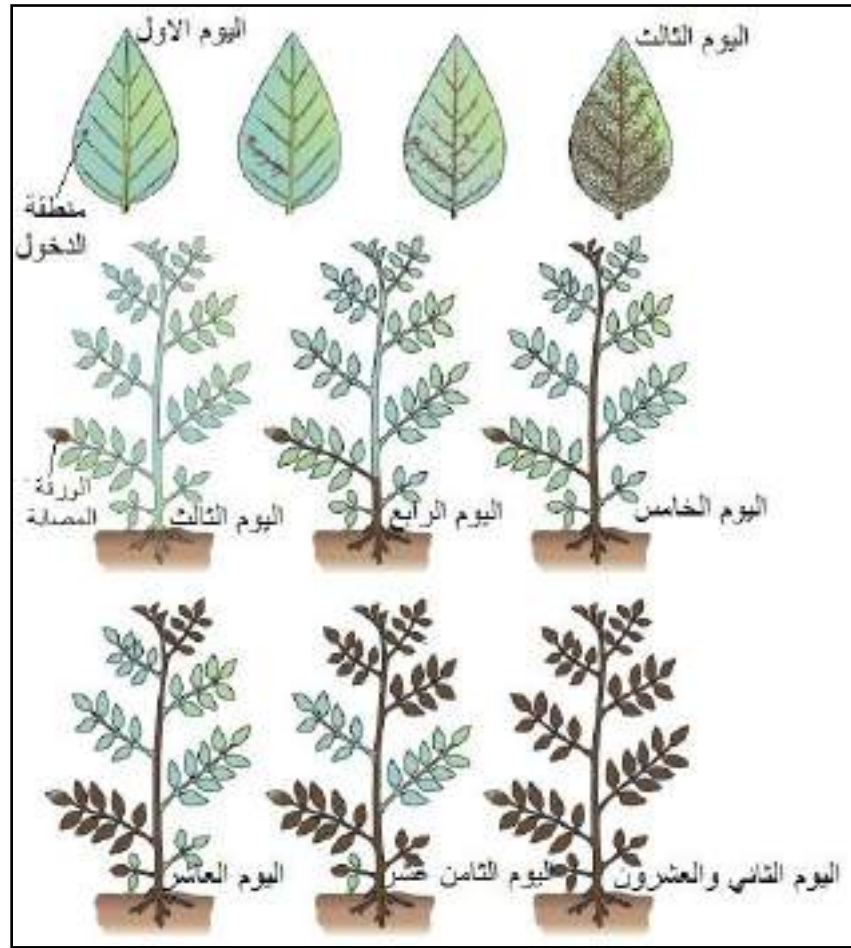
### 2.1.3.7. الحركة السريعة (حركة المسافات الطويلة)

الحركة السريعة أو حركة المسافات الطويلة Quick or long-distance movement هي حركة الفايروسات إلى الأنسجة والخلايا البعيدة عن منطقة دخول الفايروس في النبات، وهي الحركة المسؤولة عن نجاح الإصابات الفايروسية الجهازية وتبدأ هذه الحركة بعد نجاح الفايروس في اجتياز عدة خلايا بواسطة الحركة البطيئة ليصل إلى أوعية اللحاء في الورقة ثم ينتشر بسرعة في عروقها ويكتمل انتشاره فيها خلال ثلاثة أيام تقريبا وحسب نوع الفايروس والنبات، ثم يبدأ الفايروس بالحركة باتجاه الجذور محمولا مع الغذاء المنقول باللحاء مستغلا آلية نقل الغذاء ثم يتجه بعد ذلك إلى المناطق العليا من النبات لتكتمل الإصابة الجهازية بعد أسبوعين - ثلاثة أسابيع في معظم النباتات العشبية، (الشكل 7-16) ولقد شوهدت جسيمات العديد من فايروسات النبات بواسطة المجهر الإلكتروني في الأنابيب الغربالية وفي ثقب صفائحها وتصل سرعة نقل الفايروس في هذه الحركة إلى عدة سنتمترات في الساعة وحسب نوع الفايروس والنبات فمثلا تصل سرعة نقل فايروس موزايك التبغ في الأنسجة المصابة إلى 8 سم/ساعة، كما لوحظت بعض أنواع الفايروسات تتحرك في اللحاء بعكس حركة الغذاء، وجد أيضا أن هناك قلة من أنواع الفايروسات تتحرك في أوعية الخشب. ولكي تكون الحركة السريعة كفاءة فأن ذلك يتطلب امتلاك الفايروس لقدرة الدخول إلى اللحاء أو الخشب ثم الخروج من هذه الأنسجة بذات كفاءة الدخول. درست حركة الفايروسات في الأوعية الناقلة باعتماد تقانات عديدة واعتمدت الدراسات المبكرة على أخذ عينات من أنسجة النبات الملقح بالفايروس عند فترات زمنية معينة بعد التلقيح ثم يكشف عن الفايروس باستعمال النباتات الكاشفة لمعرفة مواقع وصول الفايروس في أنسجة النبات المصاب كما حصل عند متابعة حركة فايروس موزايك القرنابيط (CaMV) في نبات الشلغم حيث وجد أن هذا الفايروس لا يستطيع الوصول إلى الأنسجة الزهرية في مرحلة إزهار النباتات وتسمى هذه الظاهرة "المقاومة التطورية أو النشئية" Developmental resistance وهي المقاومة المرتبطة بتطور النبات من مرحلة النمو الخضري إلى النمو الزهري ولوحظت الظاهرة ذاتها مع فايروس موزايك وتقزم الفاصوليا (BDMV) عند إصابته لنبات الفاصوليا حيث يتوقف خروجه من اللحاء خلال المراحل المبكرة للإزهار ولكن ليس خلال النمو الخضري أو بعد انتهاء الإزهار، كما استعملت طريقة تحليق النبات Girdling لدراسة هذه الحركة وإثبات أن الفايروسات تتحرك باتجاه حركة الغذاء في أوعية اللحاء محمولة في الغذاء لذلك يطلق على ذلك مصطلح "النقل بالأبيض الضوئي Photo assimilate transmission أي إتباع الفايروسات لنمط حركة الغذاء من مصدر إنتاجه وصولا إلى الأنسجة المستقبلة له

Source –to- Sink pattern، أما التقانات الحديثة التي استعملت لدراسة الحركة فهي الدراسات الجينية باستعمال جينات معلّمة إشعاعيا يطلق عليها الجينات المؤخرة Reporter gene إذ يتم إدخال جين معلّم في نسيلة فايروسية وبذلك تسهل متابعة ذلك الفايروس عند حركته في النبات، واستعملت هذه التقانة لمتابعة حركة فايروس نقش التبغ (TEV) في النبات باستعمال الجينين المعلمين GUS و GFP حيث لوحظ بقاء الفايروس في خلايا

البشرة لمدة 12 ساعة بعد الإصابة لإتمام نزع الغطاء البروتيني و التضاعف ثم بدأ بالتحرك ليجتاز خلية واحدة كل ساعتين أعقبها بدء الحركة الطويلة حيث كانت أول الخلايا التي أظهرت نشاطا للجين GUS والبعيدة عن منطقة الإصابة الأولية هي الخلايا القريبة من الأنابيب الغربالية للحاء ثم أعقبها خروج الفايروس منها إلى الخلايا المرافقة وبارانكيما للحاء.

لكي يتم الفايروس حركته السريعة في النبات المصاب فانه يحتاج (1) إظهار (تشفير) بروتينات الحركة اللازمة لتسهيل الحركة البطيئة (2) تضاعف الفايروس ووصول تركيز جسيماته في منطقة الإنتاج إلى التركيز الحرج Critical titer اللازم لضخ الفايروس بشكل كاف إلى اللحاء (3) الوقت اللازم للجسيمات الفايروسية للحركة من خلايا البشرة ثم عبر خلايا الميزوفيل وإلى الأوعية الناقلة.



الشكل (7-16): المسار المعتاد للفايروسات التي تصيب النباتات العشبية جهازيا من نقطة الدخول في الورقة العليا اليسرى لحين اكتمال الإصابة في النبات الأدنى اليمين، يلاحظ أن الفايروس يتجه أولا إلى الجذور في اليوم الرابع من الإصابة حيث يوضح اللون البني مسار الفايروس في النبات ثم

يتحرك صعودا إلى بقية اجزاء النبات، والتوقيتات المثبتة تقريبا تتباين حسب نوع النبات والفايروس وظروف الإصابة.

الشكل مقتبس من Agrios (2005).

## المصادر

عوض، محمد أحمد (2005) أمراض النبات الفيروسية ومسبباتها. الدار العربية للطباعة والنشر، القاهرة.

قاسم، نبيل عزيز (2011). فايروسات النبات. جامعة الموصل دار ابن الاثير للطباعة، الموصل العراق

## محاضرة رقم (13)

### التشخيص المصلي (السيرولوجي) لفايروسات النبات

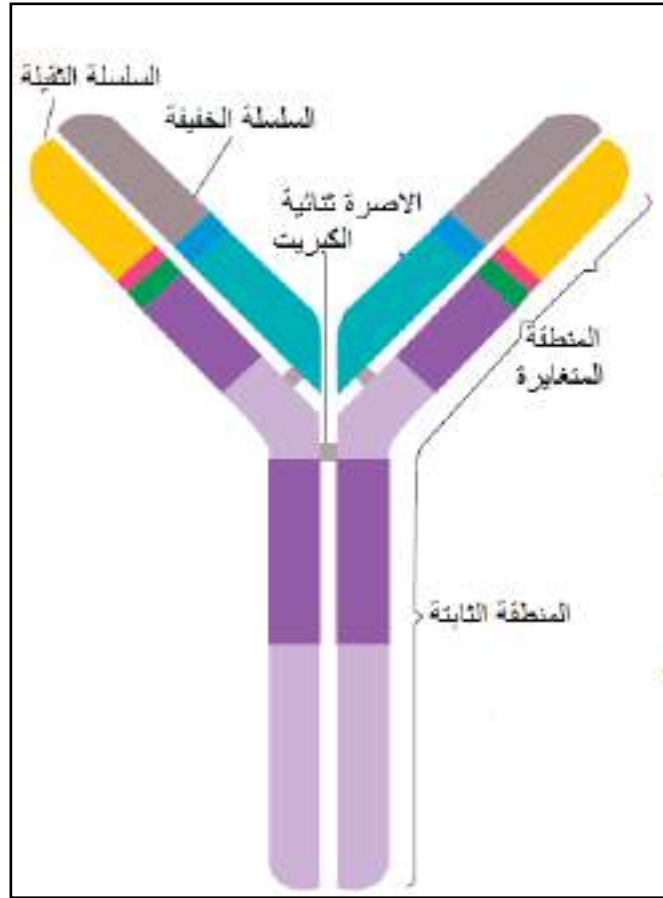
هي إحدى أهم طرق تشخيص الفايروسات المعتمدة الآن عالميا والتي سهلت عملية التشخيص بشكل كبير حيث تمتاز بسرعتها ودقتها العالية وتتلخص مميزاتها بما يأتي:

(1) الكشف عن الفايروسات مباشرة وهي في العصير النباتي الخام بوجود الشوائب النباتية (2) الحصول على نتائج التشخيص خلال 3-24 ساعة حسب نوع التقانة المصلية المستعملة مقارنة بمدة أيام - أسابيع عند اللجوء إلى طريقة التشخيص بالنباتات الكاشفة (3) تمتاز عدد من التقانات المصلية الحديثة ومنها الأليزا واختبار البصمة المناعية بحساسيتها العالية مما يمنحها إمكانية الكشف عن الفايروس في النبات حتى وإن كان بتركيز منخفض جدا فيه (4) سهولة تشخيص الفايروسات التي لا تنقل ميكانيكيا والتي لم يكن بالإمكان تشخيصها بالنباتات الكاشفة (5) وفرت إمكانية التشخيص المسحي السريع لعدد كبير من العينات في وقت واحد مما ساعد في إجراء الدراسات الوبائية الفايروسية وكذلك الفحص السريع للشحنات الزراعية في المحاجر الزراعية (6) سهولة شحن المصول و تخزينها لفترات زمنية طويلة قد تصل لمدة سنة أو أكثر تحت التبريد مما سهل كثيرا من تداولها (7) تتيح إجراء الدراسات التصنيفية للفايروسات من خلال تحديد العلاقة المصلية بين الفايروسات المختلفة ودراسة تركيب الفايروس ونشاطاته الحيوية داخل خلايا العائل.

#### 1.1.9. الأضداد

الأضداد Antibodies هي بروتينات مناعية جلوبولينية Igs , Immunoglobulins يكونها الجهاز المناعي في الحيوانات اللبونة وهي على خمسة أنواع (1) "الجلوبيولين المناعي - جي" IgG (2) "الجلوبيولين المناعي - إم" IgM (3) "الجلوبيولين المناعي - إي" IgE (4) "الجلوبيولين المناعي - أي" IgA (5) "الجلوبيولين المناعي - دي" IgD، ويعد الضد IgG هو الأهم والوحيد الفعال في الاختبارات المصلية بسبب خصوصية ارتباطه بالبروتينات الفايروسية ويتكون من سلسلتي عديد ببتيد ثقيلتان Heavy chains بشكل حرف Y وأخريتان خفيفتان Light chains ويبلغ الوزن الجزيئي للثقيلة خمسة كيلودالتون وللخفيفة اثنان كيلودالتون وترتبط هذه السلاسل مع بعضها بأواصر ثنائية الكبريت S-S-bonds والتي توجد أيضا داخل السلاسل لتدعم بنائها وتعطيها الثباتية المطلوبة.

يتكون الطرف الأميني لكل من السلسلتين الثقيلة والخفيفة من تعاقبات أمينية متغايرة Heterogeneous sequence لذا يطلق عليها مصطلح "المنطقة المتغايرة" (V) Variable region وترتبط هاتين المنطقتين في السلسلتين الثقيلة والخفيفة لتكوين "منطقة ربط المستضد" Antigen-binding site وأن التغير المستمر في تركيب هذه المنطقة هو الذي يوفر مرونة تركيبية لظهور أشكال ارتباطية متعددة قادرة على الارتباط مع جسيمات المستضد (الفايروس) أما الطرف الآخر للسلسلتين فيسمى "الجزء الثابت" (FC) Constant fragment، (الشكل 9-1)، تنتج هذه الأضداد في أجسام الحيوانات اللبونة ذات الجهاز المناعي المتطور من قبل خلايا مناعية لمفوية متخصصة تسمى الخلايا البائية B-lymphocytes.



الشكل (9-1): مخطط للضد IgG يبين السلسلتين الثقيلة والخفيفة و المنطقتين المتغايرة والثابتة.

الشكل مقتبس من Mahy و Van Regenmortel (2008).

2.1.9. المستضدات (الأنتجينات)

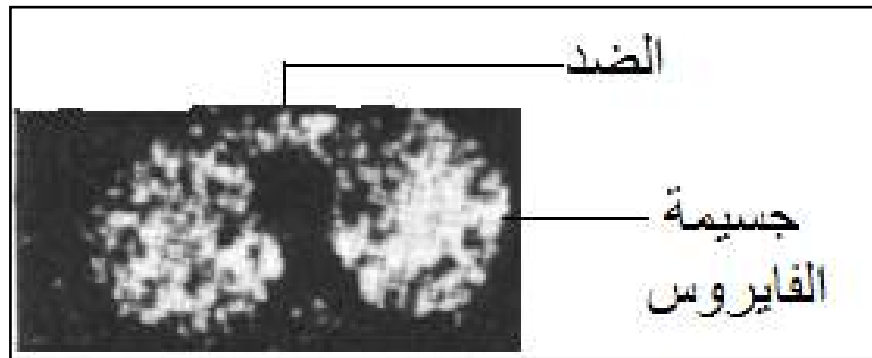


المستضدات Antigens وتسمى أيضا "العوامل الممّعة Immunizing agents هي أية جسيمات بروتينية أو سكرية معقدة يزيد وزنها الجزيئي عن 10 كيلودالتون تحفز الجهاز المناعي في الحيوانات الفقارية واللبونة، وتعد المستضدات البروتينية هي الأكثر كفاءة في استحثاث الجهاز المناعي لإنتاج الأضداد التي ستفاعل تخصصيا معها وتسمى هذه الخاصية "القدرة الإمناعية للمستضد" Immunogenicity كما تمتلك المستضدات قدرة الارتباط مع الأضداد المتخصصة عليها ويطلق على ذلك مصطلح "القدرة الإستضادّية" Antigenicity، وحيث أن فايروسات النبات هي جسيمات عالية الوزن الجزيئي نسبيا وتحتوي نسبة عالية من البروتين تتراوح بين 75-95 % من كتلتها لذا فهي مستضدات فعالة في تحفيز الجهاز المناعي وإنتاج الأضداد والكابسيد هو المستضد الفعال إلا أن الوحدات البنائية البروتينية المكونة له تستحث أيضا الجهاز المناعي ولكنها أقل قدرة إمناعية منه بسبب صغر حجمها. يرتبط الفايروس مع الضد في منطقة ارتباط موجودة على سطح المستضد يطلق عليها "المحدد المستضدي" Antigenic determinant أو تسمى Epitope والمكونة من تعاقب معين للأحماض الأمينية في الفايروسات البسيطة وقد تكون منطقة الارتباط في الفايروسات المعقدة مكونة من بروتين وكاربوهيدرات. يعتمد التفاعل المصلي بين الفايروسات وأضدادها على الصفات التركيبية لبروتين الغطاء ووحداته البروتينية ولكن أمكن عمليا إنتاج أضداد فايروسية باستعمال البروتينات الوظيفية الفايروسية، توجد المحددات المستضدية بعدة أنواع في فايروسات النبات وهي (1) "المحددات المستضدية الخيطية المستمرة" Continuous epitopes وتكون بشكل سلسلة من الأحماض الأمينية غير المتفرعة المنقبضة Linear stretch، وهي الأكثر شيوعا (2) "المحددات المستضدية الخيطية المتفرقة" Discontinuous epitopes أو تسمى "المحددات المستضدية المُحدثة" Neotopes والتي تتكون من عدد من سلاسل الأحماض الأمينية المتباعدة مكانيا ولكنها تتقارب بسبب الالتفاف الذي يحصل في تلك السلاسل (3) "المحددات المستضدية المخفية" Cryptotopes وهي التي لا تظهر إلا حين تفكك (دنتر) المستضد (4) "المحددات المستضدية المتحولة" Metatopes وهي التي تظهر عندما يتبلمر أو يتفكك المستضد، إن تباين وتنوع المحددات المستضدية على سطح الفايروس هو الذي يعطي للأضداد متعددة النسيلة قدرة الارتباط المتنوعة أي قدرتها على التفاعل مصليا مع أنواع عدة من الفايروسات المتقاربة تصنيفيا، ووجد أن مساحة سطح البروتين الفايروسي الذي تتحسسه جزيئة الضد هي التي تحدد نوع المحدد المستضدي الذي تتعامل معه فإذا كانت مساحة سطح البروتين بحدود  $2,5 \times 2$  نانومتر فان نوع المحدد المستضدي الذي تتعامل معه هو من النوع المتفرق.

### 3.1.9. الارتباط التخصصي بين الفايروسات والضد IgG

يرتبط الضد IgG ارتباطا تخصصيا ثنائيا Divalent من منطقتة المتغيرة مع الجسيمة الفايروسية المتخصصة عليها أي أن كل جزيئة ضد لها قدرة ارتباط مع جسيمتين فايروسييتين فقط، بينما تكون الجسيمة الفايروسية متعددة الارتباط Multivalent أي لها قدرة الارتباط مع عدد كبير من الأضداد بسبب امتلاكها لعدة مناطق ارتباط وهي المحددات مستضدية الموجودة على سطحها،

(الشكل 9-2) وهو ارتباط تخصصي تحكمه الأشكال المكانية ثلاثية الأبعاد للأحماض الأمينية في كل من الضد والفايروس والتي تربط بأواصر غير تساهمية وهي (1) الأصرة الهيدروجينية Hydrogen bond (2) الأصرة الكهربائية المستقرة Electrostatic bond (3) الأصرة الكاره للماء Hydrophobic bond (4) أصرة فاندارفالس Vander Waals bond، ومثال ذلك فان كابسيد فايروس موزائيك التبغ (TMV) يتكون من 2100 وحدة بروتينية وبذلك يمكن نظريا اعتبار كل منها محدد مستضدي مستقل عليه يمكن أن يرتبط بالجسيمة الفايروسية 2100 جزيئة ضد إلا أنه من الناحية العملية فان العدد الحقيقي الذي يرتبط بالفايروس هو أقل بكثير من العدد المذكور وذلك بسبب تزامم جزيئات الأضداد على المحددات المستضدية. يعبر عن طبيعة الارتباط بين الضد والمستضد بحالتين هما (1) حالة الألفة Affinity وهي مقياس لقوة الارتباط بين محدد مستضدي واحد وجزيئة ضد واحدة وهذا الارتباط هو ارتباط رجعي يمكن أن ينفك وأن الأضداد عالية الألفة هي ذات الأداء الأفضل مصليا (2) حالة الشراهة Avidity وهي مقياس لمجموع حالات الارتباط بين كل المحددات المستضدية الموجودة على سطح الفايروس مع الأضداد المرتبطة بها وبذلك فان الشراهة هي مقياس للثباتية الكلية لمعقد الضد - المستضد وهي تتأثر بحالة الألفة القائمة بينهما وأيضا بالترتيب الهندسي للأسطح المترابطة بين الضد والمستضد، وهكذا فان الألفة هي جزء من الشراهة. عندما ترتبط الجسيمات الفايروسية مع الأضداد المتخصصة عليها فإنها تكون راسبا شبكيا Lattice precipitate حيث تعمل الأضداد بمثابة جسور رابطة بين الجسيمات الفايروسية المنتشرة في المحلول وتترسب بسبب ظهور المجاميع الكاره للماء واختفاء المجاميع المحبة للماء على الأسطح البروتينية للجسيمات الفايروسية بعد ارتباطها بالأضداد وهذا هو الأساس الذي تقوم عليه تفاعلات الترسيب المصلية، إن الكابسيد هو المسئول عن تحفيز الجهاز المناعي للحيوانات اللبونة وتكوين الأضداد وليس الحامض النووي لذا فانه لا يمكن التمييز مصليا بين الفريون والكابسيد الفارغ ولكن وجد أن الفريون هو ذو قدرة إمناعية أعلى من الكابسيد الفارغ مما يدل على دور الحامض النووي في زيادة ثباتية الفايروس وبالتالي زيادة قدرته الإمناعية.



الشكل (9-2): ارتباط جسيمتين بلوريتين للفايروس التابع لفايروس موت التبغ (STNV) مع جزيئات الضد IgG مصورة بالمجهر الالكتروني لتكوين "معقد الفايروس-الضد".

الشكل مقتبس من Hull (2002).

#### 4.1.9. أنواع المصل المضادة

يوجد نوعين من المصل المضادة المستعملة في تشخيص فايروسات النبات وذلك حسب نوع الأضداد التي تحتويها وهما:

(1) المصل ذو الأضداد متعددة النسيلة Polyclonal antibodies , PAB والذي يحوي أضدادا خليطة تتفاعل مع أكثر من سلالة فايروسية لنفس النوع الفايروسي أو مع أكثر من نوع فايروسي من الأنواع المتقاربة مصليا وذلك لأن تنوعها الخليط سمح لها بالتفاعل مصليا مع كل المحددات المستضدية الموجودة على سطح الجسيمات الفايروسية المتخصصة عليها.

(2) المصل ذو الأضداد وحيدة النسيلة Monoclonal antibodies , MAB والذي يحوي أضدادا نقية تتفاعل مع سلالة فايروسية واحدة أو مع نوع فايروسي واحد وذلك بسبب تخصصيتها على محدد مستضدي واحد موجود على سطح الجسيمات الفايروسية المتخصصة عليها.

تقاس كفاءة المصل المضاد سواء كان متعدد أو وحيد النسيلة في تشخيص الفايروس بمعرفة "تركيز المصل المضاد" Titer وهو عبارة عن درجة التخفيف النهائية للمصل المضاد أي أعلى درجة تخفيف ممكنة للمصل مع احتفاظه بقدرته على التفاعل المصلي مع الفايروس المتخصص عليه وهو أيضا مقياس نسبي لتركيز الضد IgG في المصل المضاد.

تعتمد أفضلية كل من المصل المضاد متعدد أو وحيد النسيلة في التشخيص على الهدف التشخيصي المراد تحقيقه فالمصل أحادي النسيلة هو الأفضل لتشخيص السلالات الفايروسية لأنه أكثر تخصصا من الأول الذي لا يميز بين سلالات النوع الفايروسي ولكن وجد أن بعض أنواع المصل أحادية النسيلة مثل تلك المنتجة ضد فايروسات Potyviruses تتفاعل مع كل أنواع هذه الفايروسات وذلك لاشتراكها بنفس المحددات المستضدية كذلك تفشل المصل أحادية النسيلة في الكشف عن السلالة الفايروسية التي لا تحتوي على المحدد المستضدي الموجود في السلالة المتخصصة عليها.

#### 5.1.9. طريقة إنتاج المصل المضاد متعدد النسيلة

يحضر بحقن حيوان لبون بالمحلول الفايروسي النقي الحاوي على جسيمات الفايروس النقية المذابة في المحلول الملحي الفسيولوجي (0,85% كلوريد الصوديوم) وغير المختلطة مع أية شوائب نباتية والخالي من أيونات الفوسفات أو البوريت لأنها مؤذية للحيوان وأكثر الحيوانات استعمالا في التمنيع هي الأرانب وخاصة الأرنب الأوربي *Oryctolagus cuniculus* لسهولة تربيته، وأن أفضل عمر لتلقيحه بين 3-6 أشهر إلا أن

الأضداد التي ينتجها هي سريعة الترسب في الاختبارات المصلية وتستعمل أيضا الجرذان البيضاء وخنزير غينيا والماعز في إنتاج المصل المضادة كما تستعمل الخيول لإنتاج المصل المضادة لفايروسات البطاطا ولكنها صعبة الترسب في الاختبارات المصلية.

يتم إنتاج المصل بحقن الأرنب بجرعة مقدارها ملتر واحد من المحلول الفيروسي إما بالحقن العضلي Intramuscular injection في عضلة الفخذ أو بالحقن الوريدي Intravenously injection في وريد الأذن أو تحت الجلد Hypodermic injection وأحيانا في العقد اللمفية ونادرا في خف القدم، ويفضل عند إجراء الحقن العضلي للأرنب أن يخلط المحلول الفيروسي بكمية مساوية له حجما من مادة "فرند المساعدة الكاملة" Complete Freund's adjuvant المكونة من البارافين المعدني Mineral paraffin بنسبة 85% مع 15% من مركب "المانيد أحادي الأوليت" Mannide monooleate مع 0,05% من معلق بكتريا Mycobacterium المقتولة والمجففة، ويمكن استعمال مادة "فرند المساعدة الناقصة" Incomplete Freund's adjuvant والتي تنقصها البكتريا حيث تعمل هذه المادة سواء كانت كاملة أو ناقصة على تحسين القدرة الإمناعية للحيوان بسبب إعاقتها لتقدم الفيروس في الدم مما يعطي الفرصة للجهاز المناعي للتعرف الأفضل على الفيروس وبالتالي إنتاج أضداد أكثر تخصصا. يفضل عند تمنيع الحيوان أن يعطى أولا حقنة وريدية تعقبها حقنة عضلية بعد أسبوع ثم حقنة عضلية ثانية بعد ثلاثة أسابيع من الثانية حيث تسبب الحقنة الأولى "الاستجابة الأولية" Primary response وتظهر أولا في الدم الأضداد من النوع IgM والتي ليس لها دور في التفاعلات المصلية مع الفايروسات وذلك بعد حوالي أسبوع من الحقن ثم ينخفض تركيزها فيه تدريجيا ويحل محلها في الدم الأضداد المطلوبة وهي من النوع IgG والتي يزداد تركيزها فيه بعد الحقنة العضلية الأولى ثم يرتفع التركيز كثيرا بعد الحقنة العضلية الثانية التي تعرف بالحقنة التعزيزية Booster injection والتي تسبب ظهور "الاستجابة المناعية الثانوية" في الحيوان Secondary or Hyperimmune response. تؤثر طريقة الحقن على تركيز الأضداد في الدم حيث تصل إلى تركيزها الأعلى بعد أسبوعين تقريبا في الحقن الوريدي وبعد 4-8 أسابيع في الحقن العضلي أو تحت الجلد. إن أفضل الأضداد تخصصية هي المستحصلة من الدم بعد الحقنة التعزيزية بمدة أسبوعين تقريبا أما إذا أعطي الحيوان حقنات أخرى لاحقة فقد يسبب ذلك إنتاج أضداد أقل تخصصية. طورت تقانة لإنتاج المصل المضادة من دون الحاجة لحقن الحيوان بالفايروس الكامل ولكن ببروتين الغطاء الفيروسي فقط والمحضر في خلايا بكتيرية معدلة وراثيا لإنتاج هذا البروتين والذي ينقى ويمنع به الحيوان وتتوفر الآن تجاريا مستحضرات للعديد من بروتينات الأغشية الفيروسية المعدة لإنتاج المصل المضادة لفايروسات ومنها فايروس الاصفار التماوتي للباقلاء (FBNYV).

## محاضرة رقم (14)

### التشخيص الجزيئي لفايروسات النبات

#### التشخيص بتقانة تفاعل تسلسل البوليميريز PCR

تمت تهيئة أرضية ابتكار هذا الاختبار الهام سنة 1955 عندما أكتشف " كورنبرج" Kornberg الإنزيم الخلوي DNA polymerase وهو الإنزيم المسئول عن تضاعف وإصلاح حامض الدنا وحاز على جائزة نوبل جراء هذا الاكتشاف، وجاءت سنة 1983 لتشهد ابتكار تقانة تفاعل تسلسل البوليميريز PCR , Polymerase Chain Reaction من قبل " مولس" Mullis ونال أيضا جائزة نوبل في الكيمياء على هذا الابتكار الذي خلق ثورة في الكشف عن الفايروسات وتشخيصها فضلا عن استعمالاته في العديد من الجوانب العلمية الأخرى، وجاء تعريف هذه التقانة في براءة الاختراع الأمريكية التي رخصته كالاتي "هي العملية المتضمنة إنتاج خيوط تكاملية منفصلة للحامض النووي المستهدف بواسطة فائض مولاري من بادئين قصيري النيوكليوتايدات ثم إطالة البادئين لإنتاج نواتج مستنسخة تعمل قالباً لتخليق التعاقب النيوكليوتايدي الكامل للحامض النووي المطلوب وبذلك أصبح هذا الاختبار من أهم التقانات المستعملة في تشخيص أمراض النبات بالكشف عن جينوم الممرض بواسطة الاستنساخ (الكلونة) عالي الكفاءة للتعاقبات النيوكليوتايدية لقطعة صغيرة منه لإنتاج ملايين النسخ الكاملة الجديدة عن طريق آلية "الدورات الحرارية المؤتمتة" Automated thermal cycler حيث يتم تضخيم تلك القطعة الصغيرة والتي قد لا يزيد حجمها عن 50 نيوكليوتايدة لتصل بواسطة الدورات التضاعفية إلى مليون ضعف Million fold خلال 3-4 ساعات، وهذا الاختبار هو عالي الحساسية والنخصص بقدرته على تمييز التعاقبات النيوكليوتايدية المختلفة عن بعضها في نيوكليوتايدة واحدة وبالتالي لديه قدرة الكشف عن أي طفرة حصلت في الجينوم، وقد استعمل لأول مرة في تشخيص فايروسات النبات سنة 1990، حيث شمل استعماله أنواع من الفايروسات تعود للأنواع الأربعة من الجينومات الفايروسية : ssRNA , dsDNA , dsRNA حيث شخّصت به أنواع تعود لأجناس

#### Alfamovirus

*Foveavirus* و *Fijivirus* و *Cucumovirus* و *Caulimovirus* و *Capillovirus* و *Furovirus* و *Idaeovirus* و *Ilarvirus* و *Nanovirus* و *Nepovirus* و *Potexvirus* و *Sobemovirus* و *Tobamovirus* و *Tobravirus* و *Tombusvirus* و *Tospovirus* و *Trichovirus* و *Umbravirus* و *Vitivirus* وأيضا لأنواع من الفايروسات تعود لعوائل *Closteroviridae* و *Geminiviridae* و *Luteoviridae* وهذا يعني تم تصميم بوادئ Primers لكل هذه الأنواع وأنها أصبحت متوفرة تجاريا لأغراض التشخيص.

إن اختبار PCR الأساسي مصمم للتعامل مع الدنا فقط وهذا يعني عدم قدرته على تشخيص الفايروسات ذات الجينوم الرايبي ولغرض جعله صالحا لهذه الفايروسات وكذلك للفايرويدات فقد

تمت إضافة خطوة تطويرية له ليظهر الاختبار المسمى " تفاعل تسلسل البوليميريز بالاستنساخ العكسي" Reverse Transcription-PCR ويعرف اختصارا RT-PCR والذي أصبح لديه قدرة تحويل الرنا الفايروسي إلى الدنا أولا ثم إجراء عملية التضخيم بواسطة اختبار PCR التقليدي.

استعمل اختبار PCR بنوعيه وبنجاح كبير لتضخيم كامل جينومات العديد من أنواع الفايروسات أو جزء من جينوماتها وكذلك لكامل جينومات الفايرويدات ومع العديد من أنواع النباتات العائلة من ذوات الفلقة والفلقتين والصنوبريات كما استعمل أيضا للكشف عن الفايروسات في ناقلاتها حيث استعمل مع المن والبق الدقيقي والذباب الأبيض والثrips وقفازات الأوراق والنيماتودا، واستعمل أيضا في الكشف عن الفايروسات في الحشرات السابطة ودراسة تغايرية الفايروسات ولمسح النباتات المعدلة وراثيا ودراسة الاستنساخ الجزيئي Molecular cloning للجينومات الفايروسية وتعاقب نيوكليوتايداتها والكشف عن الفايروسات في المياه والتربة.

### 1.8.9. آلية تقانة تفاعل تسلسل البوليميريز

يتم التفاعل بعملية تهجين وإطالة Annealing قطعة الحامض النووي المستهدفة بتوسيعها إنزيميا Enzymatic extension باستعمال اثنين من "البوادئ قصيرة النيوكليوتايدات" Oligonucleotide primers كل منها بحجم 16-30 نيوكليوتيدة والتي ترتبط مع المنطقة المستهدفة في خيط الدنا ليزدوج معه مكونا "مزدوج الدنا" المسمى Duplex DNA بواسطة إنزيم خاص بهذا الإختبار هو "إنزيم بلمرة الدنا الثابت حراريا" Thermoresistant DNA polymerase القادر على الاحتفاظ بفاعليته عند درجات الحرارة العالية. يلخص الشكل (9-27) آلية التفاعل المكونة من ثلاث دورات حيث تضم الدورة الأولى الخطوات الآتية (1) دنتره الدنا المزدوج بتسخينه إلى 94-98م° فينفصل خيطاه ويصبحان مهيتين للارتباط بالبوادئ (2) تبريد المتفاعلين إلى 72م° عندها سيرتبط كل بادئ مع الجزء المناسب له من خيط الدنا ويتكامل معه وبذلك يتحول إلى "بذاء مهجن متطاول" Annealed primer (3) يحضن المزيج عند 65-37م° للسماح لإنزيم بلمرة الدنا بإطالة البذاء ليكون خيط دنا جديد متكامل مع خيط الدنا الأصلي. تبدأ الدورة الثانية مباشرة بعد انتهاء الأولى حيث تعاد دورة التسخين والتبريد وبذلك ينفصل خيطي الدنا وتبدأ بوادئ جديدة بالعمل عليها لتضخيمها (تضاعفها) وكما موضح في الخطوتين 4 و5 من الشكل (9-27) أما الدورة الثالثة للتفاعل فتعيد تكرار الدورتين السابقتين وبذلك يتضاعف الحامض النووي ملايين المرات وهو الذي بدأ في الدورة الأولى بقطعة من الحامض والتي يطلق عليها "الإشارة الجزيئية Molecular signal" وذلك في دورات تسخين وتبريد تمتد من 30 ثانية إلى عدة دقائق. يتم الحصول على نتائج الإختبار بالكشف عن حزم الدنا المضخم بعد نقلها إلى صحيفة الهلام وفصلها بطريقة الترحيل الكهربائي ومقارنتها مع دنا معلوم الوزن الجزيئي كما مبين في الشكل (9-28) حيث استعمل الإختبار لتشخيص سلالتين من فايروس موزائيك الزكيني (ZYMV) وهما السلالة المعتدلة (ZYMV-MD) والسلالة الشديدة (ZYMV-SV)، ينفذ هذا الإختبار بكامل دوراته الثلاثة في "جهاز PCR machine" والمبين في

الشكل

(9 - 29). وجرى تطوير على الاختبار الأساسي لتفاعل تسلسل البوليميريز ليكون ملائماً للتمييز بين سلالات الفايروسات حيث طورت طريقة "التعدد الشكلي المقيد لطول الشظية" Restriction RFLP , fragment length polymorphism والتي أثبتت كفاءة عالية في التمييز بين سلالات النوع الواحد، وطورت طريقة " تفاعل تسلسل البوليميريز المضاعف" – Multiplex PCR والتي سمحت بإجراء تضخيم متواقت لعدة أنواع من الفايروسات أو الفايرويدات باستعمال مزيج من أزواج البوادي المتخصصة وبالتالي قلصت هذه الطريقة من كلف التشخيص بتقليصها لعدد الاختبارات المطلوب انجازها.

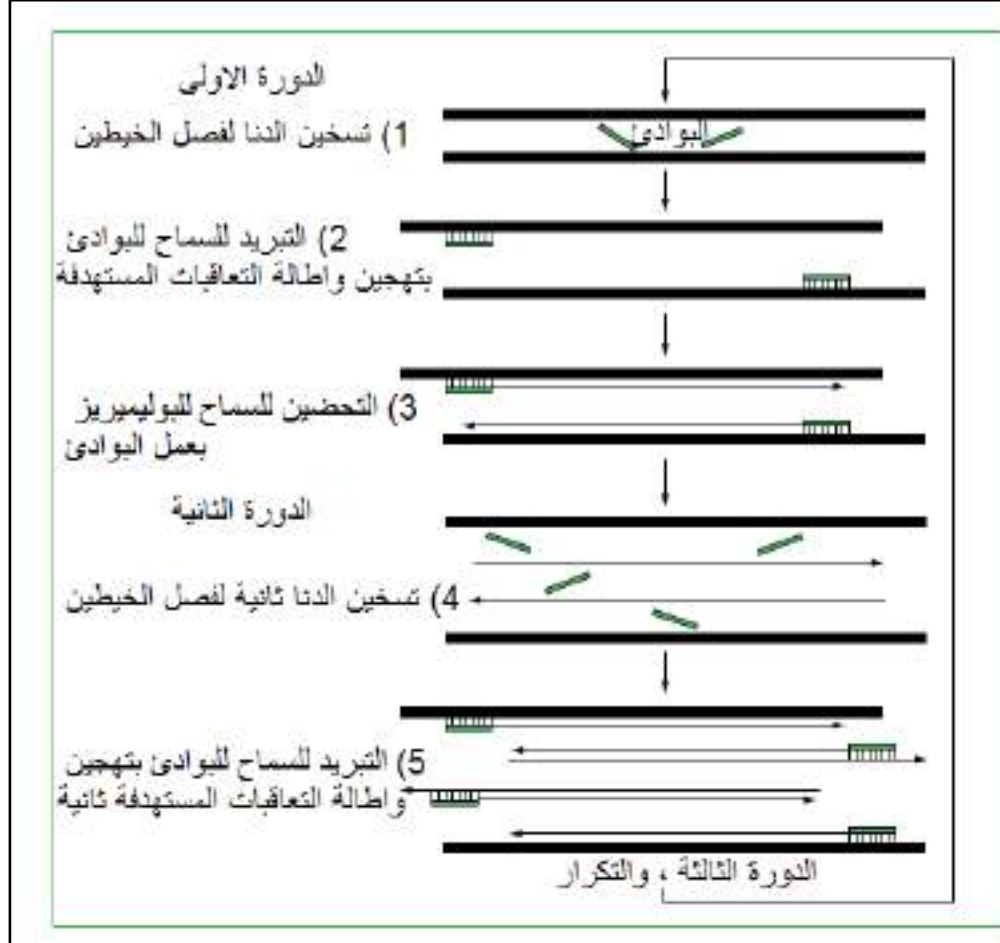
### 2.8.9. إعداد العينة النباتية للفحص بتقانة PCR

يعد إعداد العينات النباتية للفحص أصعب من إعداد العينات البشرية والحيوانية حيث يتطلب سحقها مما يؤدي إلى إطلاق مواد تتداخل سلبياً مع نتائج الاختبار وهي السكريات المعقدة والفينولات وخاصة في النباتات الخشبية لذا يضطر الباحث لسحق العينة في محلول منظم أو الماء المقطر وتخفيف العصير لغرض التخلص من تأثير هذه المواد مما يسبب تقليل حساسة الاختبار لذا فإن البديل هو (1) استخلاص الأحماض النووية بواسطة الفينول أو الكلوروفورم لإزالة البروتينات النباتية ثم استرجاع الأحماض النووية من المستخلص بترسيبها بواسطة الايثانول أو الأيزوبروبانول ويعاد إذابتها في الماء وتستعمل في الاختبار (2) استعمال النتروجين المسال لغرض التجميد السريع للعينة النباتية فتتحول إلى مسحوق مباشرة دون السماح لها بالذوبان (3) استعمال "طريقة الجذب المناعي" Immunoaffinity method أو تسمى "تفاعل تسلسل البوليميريز بالاصطياد المناعي" Immuno-Capture-PCR وذلك لاصطياد الجسيمات الفيروسية نقيه من العصير النباتي وهي طريقة طورت أصلاً للتعامل مع الفايروسات الحيوانية وتسمى "تفاعل تسلسل البوليميريز باصطياد المستضد" Antigen-Capture-PCR، (4) استعمال طريقة "تفاعل تسلسل البوليميريز بالاصطياد البصري" Print-Capture-PCR والتي يطلق عليه إختصاراً PC-PCR هي طريقة تعطي إمكانية الكشف عن الفايروس دون الحاجة لسحق العينة بل اصطياد الفايروس على أغشية النايتروسيليلوز أو النايلون كما يمكن اصطياد الأحماض النووية على جزيئات السليكا (5) استعمال طريقة "الراتنج المحرر للجين" Gene Relaser<sup>™</sup> Matrix ويتوفر هذا الراتنج تجارياً ويستعمل مع العصير النباتي الخام لقدرته على إزالة الملوثات من عصير أنواع مختلفة من النباتات منها التبغ والعنب والتفاح والخوخ والشمش.

### 3.8.9. الإنزيمات المستعملة في تقانة PCR

تتوفر حالياً أنواع من إنزيم "بلمرة الدنا الثابت حرارياً" وأكثرها استعمالاً هو الإنزيم المعروف باسم Taq polymerase المعزول من بكتريا الينابيع الحارة المقاومة للحرارة واسمها العلمي

*Thermus aquaticus* ومنها اشتق اسم الإنزيم والذي يستعمل مع الدنا أما مع الفايروسات ذات الجينوم الرايبي RNA والفايرويدات فيستعمل معها عادة نوعين من إنزيمات الاستنساخ العكسي RTase وهما الإنزيم AMV-RT المعزول من فايروس الطيور Avian myeloblastosis virus والإنزيم MMLV-RT المعزول من فايروس اللوكيميا Moloney murine leukemia virus.



الشكل (9-27): آلية تفاعل تسلسل البوليميريز (PCR).

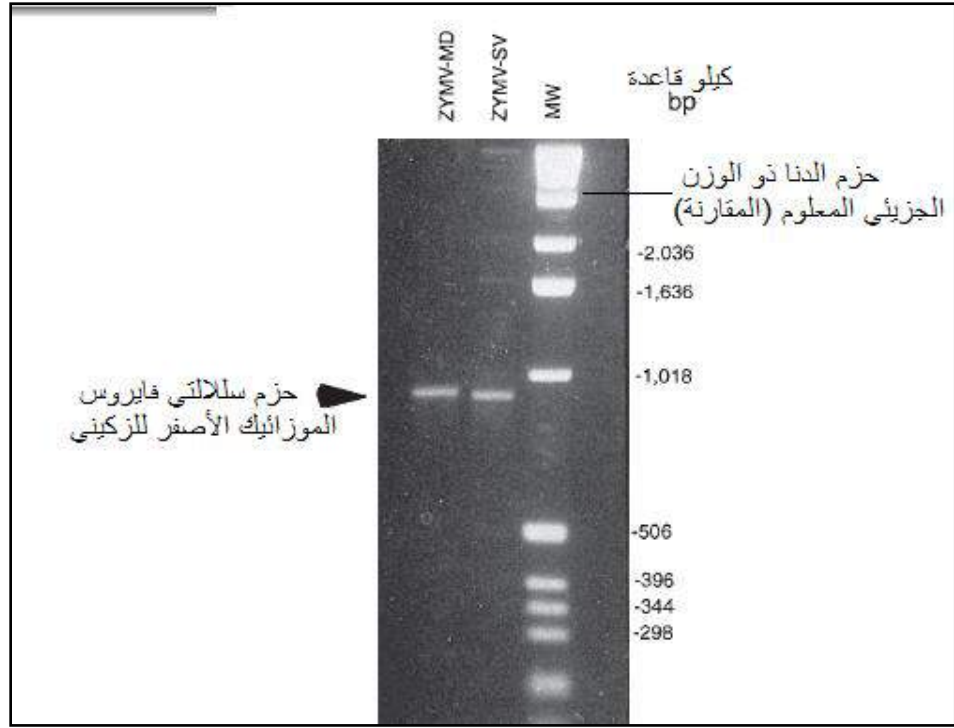
الدورة الأولى (1) تسخين الدنا لفصل الخيطين (2) التبريد للسماح للبادئين بالتهجين والإطالة Annealing مع التعاقبات الهدف (3) التحضير للسماح لإنزيم البلمرة لاستطالة البوادئ.

الدورة الثانية (4) تسخين الدنا لفصل الخيطين ثانية (5) التبريد للسماح للبادئين بالتهجين والإطالة مع التعاقبات الهدف (تكرار للخطوة 2).

الدورة الثالثة : تكرار الدورتين الأولى والثانية مرة أخرى.



الشكل مقتبس من Cann (2005).



الشكل (9-28): تشخيص سلالتي فايروس الموزائيك الأصفر للزكيني (ZYMV) وهما السلالة المعتدلة (ZYMV-MD) والسلالة الشديدة (ZYMV-SV) حيث ظهرت حزمهما في الهلام مقارنة مع النا المعلوم الوزن الجزيئي.

الشكل مقتبس من Agrios (2005).



الشكل (9-29): جهاز PCR نوع ABI 7700 quantitative PCR machine

الشكل مقتبس من Strange (2003).

#### 4.8.9. البوادي

استعملت العديد من أنواع بوادي التضخيم المتخصصة Primers إزاء عدة عوائل فايروسية وهي Geminiviridae و Luteoviridae و Potyviridae و Tombusviridae حيث تستهدف هذه البوادي المناطق المحفوظة في الجينوم Conserved regions والتي تتماثل في العديد من الفايروسات، ولكن قد يتم اختيار بوادي متخصصة جدا قادرة على التمييز بين سلالات النوع الفايروسي الواحد وبذلك طورت بوادي على مستوى السلالة واستعملت لتمييز سلالات فايروس جدري الأجاج (PPV) وكذلك لتشخيص سلالة الكرز التابعة لفايروس التبغ الحلقي التماوتي للأجاج (PNRSV).

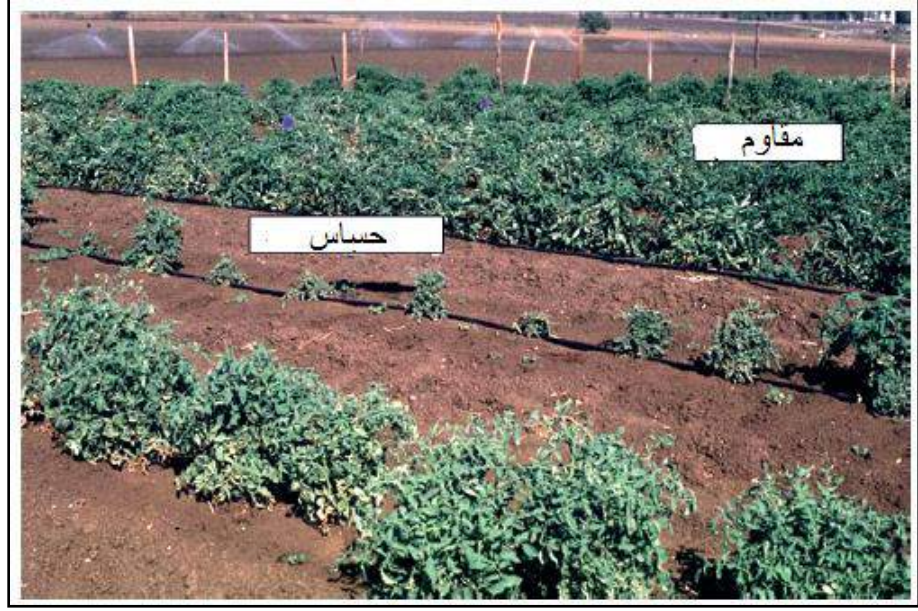
## محاضرة رقم (15)

### المقاومة الوراثية للفايروسات

تعمل هذه الطريقة على مكافحة الفايروسات من خلال استحثاث المقاومة الوراثية للفايروسات في النباتات وتشمل الإجراءات التالية:

#### 1.7.1.12. إنتاج أصناف مقاومة للفايروسات

تظهر النباتات ثلاثة أنواع من المقاومة الوراثية ضد فايروسات النبات وهي (1) المناعة Immunity والتي تشمل كل أفراد مجتمع النوع النباتي المنيع الذي لا يصاب بالفايروس المعين (2) مقاومة الهجين Cultivar resistance حيث يظهر هجين أو أكثر ضمن النوع النباتي الواحد يمتلك صفة مقاومة طبيعية ضد الفايروس المعني ويطلق على هذا النوع من المقاومة بالمقاومة الأفقية Horizontal resistance فيما تكون بقية الهجن حساسة له (3) المقاومة المكتسبة أو المستحثة Induced or acquired resistance وهي المقاومة التي يتم استحثاثها صناعيا في النباتات الحساسة بتعريضها المتعمد لضغط الفايروس ثم انتخاب الأفراد التي أظهرت صفة المقاومة وإكثارها وبالتالي فان هذه النباتات ستمتلك المقاومة العمودية Vertical resistance والتي يسيطر عليها جين واحد سائد، " (الشكل 12-2). ولقد تم تحديد وعزل العديد من جينات المقاومة وذلك بعد معرفة الخارطة الجينية للنباتات وأن أول جين مقاومة تم عزله هو جين مقاومة فايروس موزائيك اللوبيا (CpMV) الذي عزل من صنف اللوبيا "أرلنجتون" Arlington وناتج هذا الجين هي إنزيمات محللة للبروتينات تثبط تخليق بروتين الفايروس المذكور، وقد أستمروا اكتشاف وعزل جينات المقاومة من مختلف أنواع النباتات وضد العديد من الفايروسات إذ بلغ عددها الكلي المكتشف بحدود 179 جينا تضم 139 جين مقاومة مفرد Monogene و40 مجموعة جينات مقاومة متعددة Oligogene or polygene، ويبين الجدول (12-2) أمثلة لهذه الجينات.



الشكل (2-12): حقل مزروع بصنفيين من الطماطة الأول مقاوم لفايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطة (TYLCV) والثاني حساس له وتبدوا الفروقات واضحة في نمو الصنفيين.

الشكل مقتبس من Mahy و Van Regenmortel (2008).

الجدول (12-2): أنواع من جينات المقاومة النباتية المكتشفة ضد عدد من فيروسات النبات

الجين	النبات المعزول منه	الفايروس الذي يعمل ضده
جينات كاملة السيادة		
N	<i>Nicotiana glutinosa</i>	فايروس موزائيك التبغ (TMV)
N <sup>-</sup>	<i>N. sylvestris</i>	فايروس موزائيك التبغ (TMV)
Zym <sup>a</sup>	<i>Cucurbita moschata</i>	موزائيك قرع الزكيني الأصفر (ZYMV)
Tm-2	<i>Lycopersicon esculentum</i>	فايروس موزائيك الطماطة (ToMV)
Tm-2 <sup>2</sup>	<i>L. esculentum</i>	فايروس موزائيك الطماطة (ToMV)
Nx , Nb	<i>Solanum tuberosum</i>	فايروس البطاطا أكس (PVX)
By , By-2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	فايروس الموزائيك الأصفر للفاصوليا (BYMV)
RSV <sub>1</sub> , RSV <sub>2</sub>	<i>Glycine max</i>	فايروس موزائيك فول الصويا (SMV)
جينات ناقصة السيادة		

الفايروس الذي يعمل ضده	النبات المعزول منه	الجين
فايروس موزائيك الطماطة (ToMV)	<i>L. esculentum</i>	Tm-1
فايروس موزائيك التبغ (TMV)	<i>Capsicum spp.</i>	L1 , L , L3
فايروس الموزائيك التخططي للشعير (BSMV)	<i>Hordeum vulgare</i>	جينين غير مسميين
فايروس موزائيك اللوبيا الجنوبي (SCPMV)	<i>Vigna sinensis</i>	مجموعة جينات
جينات متنحية		
فايروس الموزائيك الأصفر للفاصوليا (BYMV)	<i>P. vulgaris</i>	By <sup>3</sup>
فايروس الذبول المبقع للطماطة (TSWV)	<i>L. esculentum</i>	SW <sub>2</sub> , SW <sub>3</sub> , SW <sub>4</sub>

إن العلاقة الوراثية بين الفايروسات وعوائلها النباتية تفسرها ظاهرة "الجين مقابل الجين" أي وجود جين التقبلية في العائل الحساس وجين الأمراض في جينوم الفايروس الممرض وأن التفاعل الجيني بينهما هو الذي يسبب حصول المرض في النبات وأن وجود جين مقاومة واحد أو أكثر في النبات سيعيق تأثير جين الأمراض الفايروسي ويعمل بالضد منه مما يعني أن النبات الذي يمتلكه سيكون مقاوماً أو متحملاً للفايروس، وتعتبر جينات المقاومة عن فعلها الجيني بآليات مختلفة حيث تعمل

نواتج جين المقاومة في الطمطة Tm-1 على منع تضاعف فايروس موزائيك الطمطة (ToMV) فيما تعمل نواتج الجين Tm-2 على إعاقة حركة الفايروس بين الخلايا فيما يعمل جيني المقاومة N<sup>-</sup> , N<sup>-</sup> في التبغ على مقاومة فايروس موزائيك التبغ بألية "الحساسية المفرطة" Hypersensitive reaction والتي كان يعتقد سابقا أن الناتج الجيني لجين المقاومة N وهو البروتين 126/183 KDa هو المسئول عن حدوثها ولكن تبين أن جزءا منه فقط هو المسئول عن ذلك وهي القطعة المحصورة بين الحامضين الأمينيين رقم 692 و1116، فيما يستحث الجين N<sup>-</sup> بواسطة بروتين الغطاء الذي يعمل كمستحث Elicitor لإحداث الحساسية المفرطة وكما مبين في الشكل (12-3)، ويظهر تأثير الحساسية المفرطة حول منطقة دخول الفايروس في النبات ويمتد لمسافة 1-2 ملم منها حيث يحصل نشاط كبير لإنزيمات التنفس وإنزيمات Shunt dehydrogenase وكذلك لإنزيمات البيروكسيداز Peroxidase و Hexose monophosphatase في المنطقة المحيطة بالبقعة المرضية المتكونة مع تراكم السكريات وخاصة البننوز وزيادة في نشاط الفينولات والكينونات التي يبدأ تكوينها بعد حوالي سبع ساعات من الإصابة والتي تمنع انتشار الفايروس من منطقة البقعة.

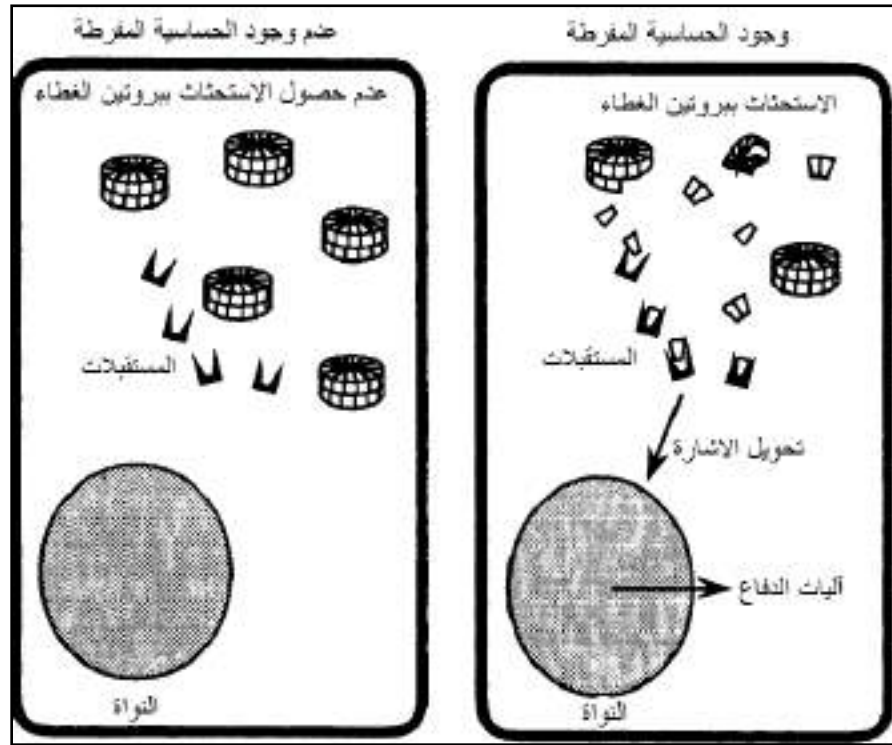
وجد أن أغلب جينات المقاومة تظهر فعلها بمنع الفايروسات من تكوين بروتينات حركتها عبر الخلايا أو إحداث تغيير في تركيب هذه البروتينات مما يسبب إعاقة حركة الفايروسات وبالتالي تجمعها في الخلايا التي دخلت فيها فقط فتحدث نتيجة ذلك ظاهرة "الحساسية المفرطة" وتظهر الإصابة المرضية بلا إصابة جهازية، كما تنتج النباتات المقاومة مركبات دفاعية تظهر بعد الإصابة بالفايروس والتي تسمى "العوامل المضادة للفايروسات" AVF , Antiviral factors وهي كلايكوبروتينات غير متخصصة تشبه في عملها الإنترفيرون Interferon الذي تنتجه الخلايا الحيوانية المصابة بالفايروس حيث تعمل هذه المركبات على إعاقة حركة الفايروس في النبات ووجد أن لها قدرة الانتقال من نبات لآخر بواسطة التطعيم لأنها تتحرك في الأوعية الناقلة للنبات وهي عامة التأثير حيث تؤثر على الفايروسات الوثيقة القرابة من الفايروس الذي تكونت ضده، واكتشفت هذه المركبات المناعية سنة 1960 عندما عزلت من نباتات التبغ الصنف Samsun NN الملقحة بفايروس موزائيك التبغ (TMV)، وأكثر هذه المركبات دراسة هو المعزول من أوراق التبغ البري *Nicotiana glutinosa* المصابة بالفايروس أعلاه وهو كلايكوبروتين مفسفر وزنه الجزيئي 22 ألف دالتون ويسيطر على تخليقه الجين N وهو مقاوم لتأثير الإنزيمين الهاضمين Pronase و Trypsin lipase وذو تأثير تثبيطي عالي للفايروس ولكنه رجعي التأثير حيث يزال تأثيره ويعود الفايروس المثبط إلى نشاطه عند فصله عن الفايروس بالانتباد، وعزل مركب مماثل من أوراق الداتورة المصابة بفايروس موزائيك التبغ.

أنتجت العديد من أصناف النباتات الاقتصادية المقاومة للفايروسات بعد الكشف عن جينات المقاومة ومعرفة مصادرها ونقلها إليها لذلك فهي تحمل صفة المقاومة العمودية ومن أمثلة ذلك إنتاج أصناف بنجر مقاومة لمرض الرايزومانيا الفايروسي، وأصناف شعير مقاومة لفايروس الموزائيك الأصفر للشعير (BaYMV) وأصناف تبغ مقاومة لفايروس موزائيك التبغ وأصناف بطاطا مقاومة لفايروس الدرنة المغزلية (PSTVd) إلا المعضلة التي واجهت استعمال هذه الأصناف هي "درجة تحملتها

الوراثية" Durability أي طول المدة التي تبقى فيها هذه الأصناف مقاومة للفايروس قبل أن يتمكن من كسرها في النبات وإرجاعها لحالة الحساسية حيث أن قدرة الفايروسات على التغيرات تسبب حدوث تغير جينومي وتحطيم لحالة المقاومة في النبات وهذا يتطلب حصول تطور تطفيري في تعاقبات الجينات الفايروسية أو في العناصر الحاكمة Controlling elements الموجودة في الجينوم وهي تعاقبات غير جينية وهذا ما لوحظ عند دراسة التعاقب النيوكليوتايدي لسلالة لفايروس موزائيك الطمطة

(ToMV) حطمت مقاومة النباتات التي تحمل الجين Tm-1 بحصول استبدالات في قاعدتين أدت إلى تغيرات في تعاقب الأحماض الأمينية للبروتينين الفايروسيين 130 و180 كيلودالتون.

ترتبط المقاومة الوراثية للفايروسات أحيانا بمقاومة النبات لطيفل آخر غير فايروسي فقد وجد أن استجابة التبغ للإصابة بفايروس البطاطا واي (PVY) بشكل موت نسيج تمثل نوعا من المقاومة المرتبطة بمقاومة النبات ضد نيماتودا تعقد الجذور وأن جين مقاومة هذه النيماتودا الموجود في الطمطة وهو GPa2 والذي يمثل معقد جيني مكون من أكثر من جين، هو مشابه للجين Rx1 الموجود في البطاطا والذي يمنحها صفة المقاومة ضد فايروس البطاطا واي.



الشكل (12-3): نموذج يوضح تأثيرات الغطاء البروتيني لفايروس موزائيك التبغ (TMV) المستحث للحساسية المفرطة بتأثير الجين  $N^-$  حيث يحدث الاستحاثات في الخلية اليمنى بعد تفكك أقراص الغطاء إلى الموحودات Monomers التي تقوم بوظيفة بروتين مستحث، أما في الخلية اليسرى فلم تظهر الحساسية المفرطة بسبب عدم قدرة تكامل الأقراص الكاملة مع المستقبلات التي لا ترتبط إلا مع الموحودات.



الشكل مقتبس من Hull (2002).

أ- مصادر جينات المقاومة

تتنوع مصادر جينات المقاومة المطلوبة لبناء صنف مقاوم وهذه المصادر هي:

1- النباتات البرية *Wild types*: تمثل الأصول البرية للنباتات الاقتصادية المنزرعة فقد تم الحصول على جينات مقاومة ضد فيروسات البطاطا أي (PVA) والبطاطا أكس (PVX) والبطاطا واي (PVY) من نوع البطاطا البري *Solanum brevidens* حيث تعمل هذه الجينات على إعاقة حركة هذه الفيروسات في نباتات البطاطا، وعزل الجين Ryadg المقاوم لفايروس البطاطا أي والبطاطا واي من صنف البطاطا البري *S. tuberosum var. anigena* وهو موجود في الكروموسوم XI ضمن منطقة جينومية تضم ثلاث جينات أخرى معروفة بدورها في مقاومة الفايروسات التي تصيب الباذنجانيات، وتم عزل جين مقاومة ضد فايروس موزائيك الخيار (CMV) من نباتات الفلفل البري *Capsicum beccatum* لبناء صنف فلفل مقاوم له.

2- جينات المقاومة : وهي الجينات المستحثة التي تظهر في الجينوم نتيجة تأثير مواد مطفرة (الفقرة 1.2.13 من الفصل 13).

3- النباتات الفردية للمحصول: وهي النباتات التي تظهر صفة مقاومة أو تحمليّة طبيعية للفايروس المعني وهذا يتطلب إجراء فحص حقلّي دقة ملاحظة من قبل المختصين للعثور على مثل هذه النباتات.

4- زراعة الخلايا المفردة المزالة الجدار (البروتوبلاست): زراعة البروتوبلاست هي إحدى تقانات الزراعة النسيجية حيث أنه عند تنمية البروتوبلاستات ستتولد نباتات جديدة من الخلايا المتكاثرية التي ستحصل فيها تغيرات وراثية جسمية *Somaclonal variations* قد تؤدي لظهور صفة المقاومة، ويمكن زيادة تكرارية هذا التغير الوراثي بإضافة مواد مطوّرة إلى الوسط الزراعي الذي تنمو فيه الخلايا، فوجد أن هجن الطمطة المنتجة من أقراص أخذت من أوراق مصابة أظهرت حالة مقاومة ضد فايروس موزائيك الطمطة (ToMV)، كذلك استعملت طريقة دمج الروتوبلاستات *Protoplast fusion* لنباتات متباعدة القرابة لإعطاء فرصة أكبر لإدخال جينات المقاومة إلى الصنف الجديد وعادة ما يتم تشجيع الخلايا الواهبة للجينات قبل الاندماج لغرض شطر الكروموسومات للحصول على جينات المقاومة المطلوبة، وقد نجحت هذه الطريقة في إنتاج صنف شعير مقاومة لنقل فايروس الموزائيك التخططي للشعير (BSMV) بحبوب الشعير وتم الحصول على جين المقاومة من صنف الشعير الإثيوبي المسمى *Madjo*.

المصدر: فايروسات النبات ، د. نبيل عزيز قاسم (2011)

