المحاضرة الاولى

علم الفايروسات : هو العلم الذي يبحث في ماهية الفايروسات وخصائصها الفيزيائية والكيميائية والبيولوجية والامراض التي تسببها للانسان والحيوان والنبات والكائنات الحية الاخرى.

تعني كلمة فايروس باللاتينية (السم) وكان اول من استعمل هذه الكلمة او التسمية هو العالم الهولندي Beijerink بايرنك حيث اطلقها على مسبب مرض موزائيك التبغ عام 1898 ومنذ ذلك شاع استعمال هذه التسمية.

ان اكتشاف الفيروسات كمسببات مرضية لم يأتي الا في اواخر القرن التاسع عشر الا ان هناك دلائل تشير ان وجود هذه المسببات المرضية على الارض ومصاحبتها للانسان والحيوان والنبات لعدة قرون قبل اكتشافها .

فمثلا من الامراض الفيروسية التي تصيب الانسان هو مرض الجدري, الحصبة, شلل الاطفال وغيرها وكذلك تصيب الحيوانات مسببة امراضاً *مثل الكلب* (RABIES) والجدي والحمى القلاعية والطاعون البقري وتصيب الحشرات مسببة مرض الصفراء في دودة القز .

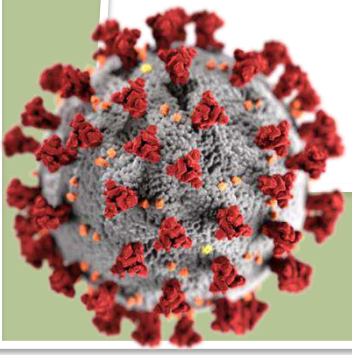
تصيب الفايروسات مجاميع المملكة النباتية المختلفة مثل الطحالب والسرخسيات والنباتات الراقية واقدم الامراض الفايروسية هو *موزائيك ازهار التوليب* الذي يسمى سابقاً مرض تقطع او تكسر اللون في ازهار التيولب *Tulip Colour break disease* وقد وصف 1576 Carlous Clusius شكل ازهار المصابة حمراء مخططة بالاصفر او العكس أما اكتشاف الفايروس كعامل مسبب للامراض النباتية فقد جاء متأخراً .

من اوائل الفايروسات النباتية التي تم دراستها هو فايروس موزائيك التبغ فقد بين 1886 Mayer ان عصارة النباتات المصابة بموزائيك التبغ تحتوي على شيء ما يسبب اعراض الموزائيك اذا ما اعديت به اوراق النباتات السليمة, كما وجد ان قدرة المسبب المرضي على العدوى لم تتأثر بالتسخين على درجة 60 وضعفت بدرجة 60– 70 وفقدت عند التسخين حتى درجة 80 لعدة ساعات .وقد ظن ماير ان المسبب المرضي قد يكون كائن بكتيري فشل في العزل بالوسائل العادية وكان ذلك بعد عامين من اعلان كوخ طريقة الاقماع المصبوبة.

- في عام 1892 اشتغل العالم الروسي Ivanovicky على مرض موزائيك التبغ وأكد نتائج ماير بالنقل من خلال عصير النبات المصاب وتأثير الحرارة وأستبعد الفطريات والمتطفلات الاخرى كمسببات لمرض الموزائيك لكن عارض نتائجه الخاصة الترشيح اذ وجد ان عصير النبات المصاب ظل محتفظاً بقدرته على العدوى ليس فقط بعد ترشيحه خلال ورق الترشيح انما ايضا بعد ترشيحه خلال مرشح شمبر لاند الذي يمنع مرور البكتريا وقد اعتقد ايفانوفسكي ان المسبب المرضي قد يكون سم افرزته البكتريا او ان البكتريا لها القدرة على النفاذ من خلال ثقوب المرشح.

وبعد عدة سنوات قام العالم الهولندي Beijerinck بنفس التجارب وتوصل الى ان مسبب موزائيك التبغ ليس له القدرة على المرور من خلال المرشحات فقط وانما له القدرة ايضاً على الانتشار خلال طبقات من الآكار مما جعله يعتقد يعتقد ان مسبب مرض ليس بكتريا وانما سائل حي معدي contagium vivum fluidium اطلق عليه اسم virus وتعني باللاتينية السم .

- أما دور الحشرات في نقل الفيروس فقد بدأ مبكراً (1894-1895) حيث قام المزارع الياباني Hashimoto بدراسة مرض تقزم الرز *Rice dwarf disease* ووجد ان تغذية نوع معين من حشرات القفاز على نبات الرز يسبب إصابتها بمرض التقزم .وفي عام 1916 أكتشف ان حشرة المن *Aphis gossypii* تتمكن من نقل فايروس *Cucumber mosuie virus* .
- وفي عام 1915 اكتشف Twort بانكلترا و d*Herelle في فرنسا ان بعض الفايروسات تصيب البكتريا سميت Bacteriophage .
- أعلن (Stanley 1935) بانه تمكن من عزل فايروس موزائيك التبغ بشكل بلورات بروتينية نقية من عصير نبات التبغ المصاب وان هذه البلورات لها القدرة على العدوى واحداث المرض وانتهى الى الاعتقاد بان فايروس موزائيك التبغ وهو عبارة عن بروتين له القدرة على التكاثر داخل الخلايا الحية ومنح جائزة نوبل عام 1935 .
- في عام 1936 اكتشف باودن وبيري (Bawden&Pirie) بان بلورات الفايروس التي عزلها ستانلي لم تكن بروتينات فحسب بل كانت تحتوي على حامض نووي اضافة الى البروتين .



- في عام 1939 قام (Kauche et al) كاوشي وزملائه بتصوير الفايروس من خلال المجهر الالكتروني لاول مرة في التاريخ
- واعلن (Gierer & Schramm) في انكلترا و (Conrat & Fraenkal) في امريكا عام 1956 كل على انفراد بان الحامض النووي RNA لفيروس موزائيك التبغ له القدرة على احداث العدوى بدون الغلاف البروتيني , اذ ان عند تلقيح النبات به يسبب المرض يحفز النبات المصاب انتاج الحمض النووي الفايروسي وكذلك البروتين الخاص بالغلاف, ومن هن بدأ الاعتقاد ان دور الغلاف البروتيني للفايروس هو الحفاظ على الحامض النووي من التأثيرات الخارجية وان الحمض النووي للفايروس هو المادة التي تحمل الصفات الوراثية للفايروس

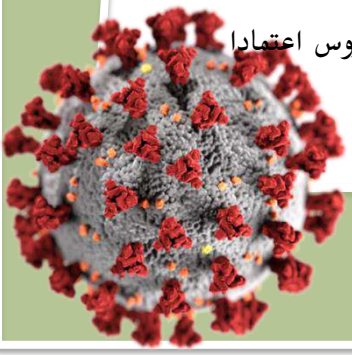
لقد كان كان الاعتقاد بان الحامض النووي في جميع فايروسات النبات هو من نوع RNA الا انه اتضح فيما بعد بان الحامض النووي في بعض الفيروس هو من نوع DNA مثل فايروس موزائيك القرنابيط *Cauliflower mosaic virus*

- أضاف دينر (Diener 1972) نوعاً جديدا من لفيروسات النبات الذي يتميز بكونه يتكون من حامض نووي فقط بدون غلاف بروتيني وهو من نوع RNA واطلق عليه اسم Viroid لتمييزه عن الفايروسات الاعتيادية ومن الامراض التي يسببها مرض الدرنة المغزلية في البطاطا *Potato Spindle Tuber*
- من الظواهر الاخرى التي اكتشفت عن فايروسات النبات هي ظاهرة تعدد جسيمات الفايروس الواحد وهناك فايروسات تتكون من اكثر من جسيمة واحدة, فمثلا فايروس موزائيك البرسيم *Alfalfa Mosaic Virus* يتكون من اربع جسيمات على الاقل ويوزع فيها الحامض النووي بنفس النسبة المئوية وان الغلاف البروتيني فيها متماثل من حيث البناء ولا بد من تواجد الحامض النووي للاربع جسيمات في النبات لاحداث العدوى.

هناك عدة تعاريف للفايروس منها :-

* هو متطفل اجباري داخل الخلية intracellular تحت ميكروسكوبي sumbmicroscopy معدي يتكون من حامض نووي اما DNA او RNA محاط بغلاف بروتيني يستخدم الجهاز الخلوي التمثيلي للعائل ليضاعف نفسه (host metabolic machinery)

لكن التطور السريع لعلم الفايروسات جعل من الصعب تعريفها بكلمات قليلة ولا بد من تعريف الفايروس اعتمادا على اهم الصفات التي تتميز بها الفايروسات عن غيرها



وقد لخص Lwoff and Tournier 1966 اهم الصفات التي يتميز بها الفايروس :

1. يحتوي الفريون (virion) على نوع واحد من الحامض النووي اما DNA او RNA بينما تحوي الكائنات الاخرة على كليهما
2. يعتمد تكاثر الفايروسات على الحامض النووي فقط بينما تعتمد الكائنات الاخرى في تكاثرها على مجموع مكوناتها بصورة متكاملة ومتضامنة .
3. ليس للفايروسات القدرة على النمو والتكاثر بالانشطار
4. لا تحتوي الفايروسات على المعلومات الوراثية اللازمة لتكوين الانظمة الخلوية لانتاج الطاقة مثل نظام ليبمان Lipman system .
5. تستخدم الفايروسات رايبوسومات خلايا العائل في تكاثرها

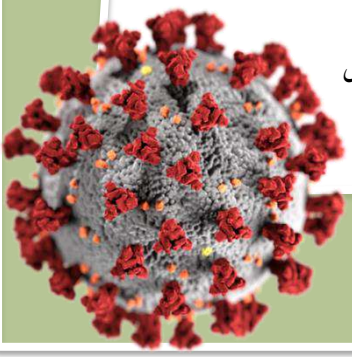
ان مفهوم الفيروس ككائن حي يتحدى الطريقة التي تعرف بها الحياة :-

- الفايروسات لا تتنفس.
- لا تظهر تهيج irritability .
- لا تتحرك
- لا تنمو
- لكنها غالبا تتكاثر reproduce وتتكيف لعوائل جديدة .

لكن حسب العايير المتعلقة بالنباتات والحيوانات فان الفايروسات تعتبر غير حية, لكن من جهة اخرى فان المعيار الحقيقي للحياة في القابلية على التضاعف The ability to replicate اي ان الكائن الحي هو اساس او وحدة النسل المستمر وبتاريخ تطوري مفرد

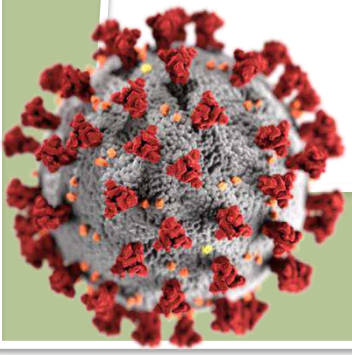
ومن هنا يمكن اعتبار الفايروس كائن حي ...

* انها تتضاعف بلا شك
* تطورها ممكن يستمر بفعالية كاملة
* استقلاليتها من ناحية عدم محدوديتها لكائن حي مفرد كعائل او ليس انواع محددة او اجناس أو شعب (phylum) من العائل



أما التطفل عند الفايروس فهو من طراز آخر فلا هو يفرز يفرز انزيمات تحلل بمكونات العائل ولا هو بقادر على ان يستعمل او يجمع المواد المتحللة لبناء جسمه وتكاثره ولا هو يمتص المواد التي يجهزها العائل لنفسه ولكن التطفل عند الفايروس مقتصر على الاستفادة من وسائل العائل وقدراته على بناء جسمه .

بمعنى اخر فان التطفل الاجباري للفايروس يتم على المستوى الجزيئي أو هو تطفل على المستوى الوراثي علاوة على ذلك فان المتطفلات الاخرى غير الفايروس ذات تنظيم خلوي تحتوي على كروموسومات وريبوسومات ومايتوكوندريا اما ما شابه ذلك مع وجود أنظمة معقدة أو أقل تعقيداً لانطلاق الطاقة وإستخدامها .



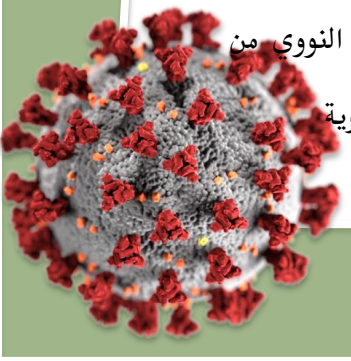
(المحاضرة الثانية)

التركيب الكيمياوي الفايروسات النبات:

ان أول خطوة لمعرفة التركيب الكيمياوي للفايروسات جاءت باكتشاف ستانلي (Stanley, 1935) عام 1935 بأن بلورات فايروس موزانيك التبغ (TMV) التي تمكن من عزلها من نباتات التبغ المصابة كانت تتكون من بروتين ثم تبع ذلك بعد عام واحد اكتشاف باودن وبيري (Bawden and Pirie 1936) بأن فايروس موزاييك التبغ لم يكن بروتين فحسب بل كان يشتمل على حامض نووي (Acid Nucleic) بالاضافة إلى البروتين، وشخصوا الحامض النووي بأنه من نوع الرايبوز (Ribonucleic Acid)، واتضح من ذلك بأن المكونات الأساسية لفايروس موزائيك التبغ هي البروتين والحامض النووي. وقد دلت الدراسات اللاحقة بأن جميع الفايروسات التي امكن عزلها بصورة نقية تتكون من بروتين وحامض نووي, لذا يمكن التعميم بأن جميع الفايروسات المتكاملة تتكون بصورة رئيسية من نوع أو أكثر من البروتينات ومن نوع واحد فقط من الحامض النووي الذي إما أن يكون من نوع (RNA) او (DNA) هذا باستثناء بعض الفايروسات التي تتواجد بشكل حامض نووي عاري اي بدون غلاف بروتيني ، كما هو الحال بالنسبة الفايروس *Potato Spindle Tuber* *درنات البطاطا المغزلية* وفايروس الأكسوكورتس في الحمضيات *Exocortis Virus Of Citrus* وتدعى هذه الفايروسات الاخيرة بالفايرويد (Viroid) لتمييزها عن الفايروسات التي تحتوي على غلاف بروتيني وقد تحتوي بعض الفايروسات – خاصة التي تصيب الحيوان والبكتريا– على بعض المركبات الأخرى كالدهون والكاربوهيدرات بالإضافة إلى البروتين والحامض النووي، وفيها يلي شرح موجز لكل من الحامض النووي والبروتين في الفايروسات التي تصيب النبات :

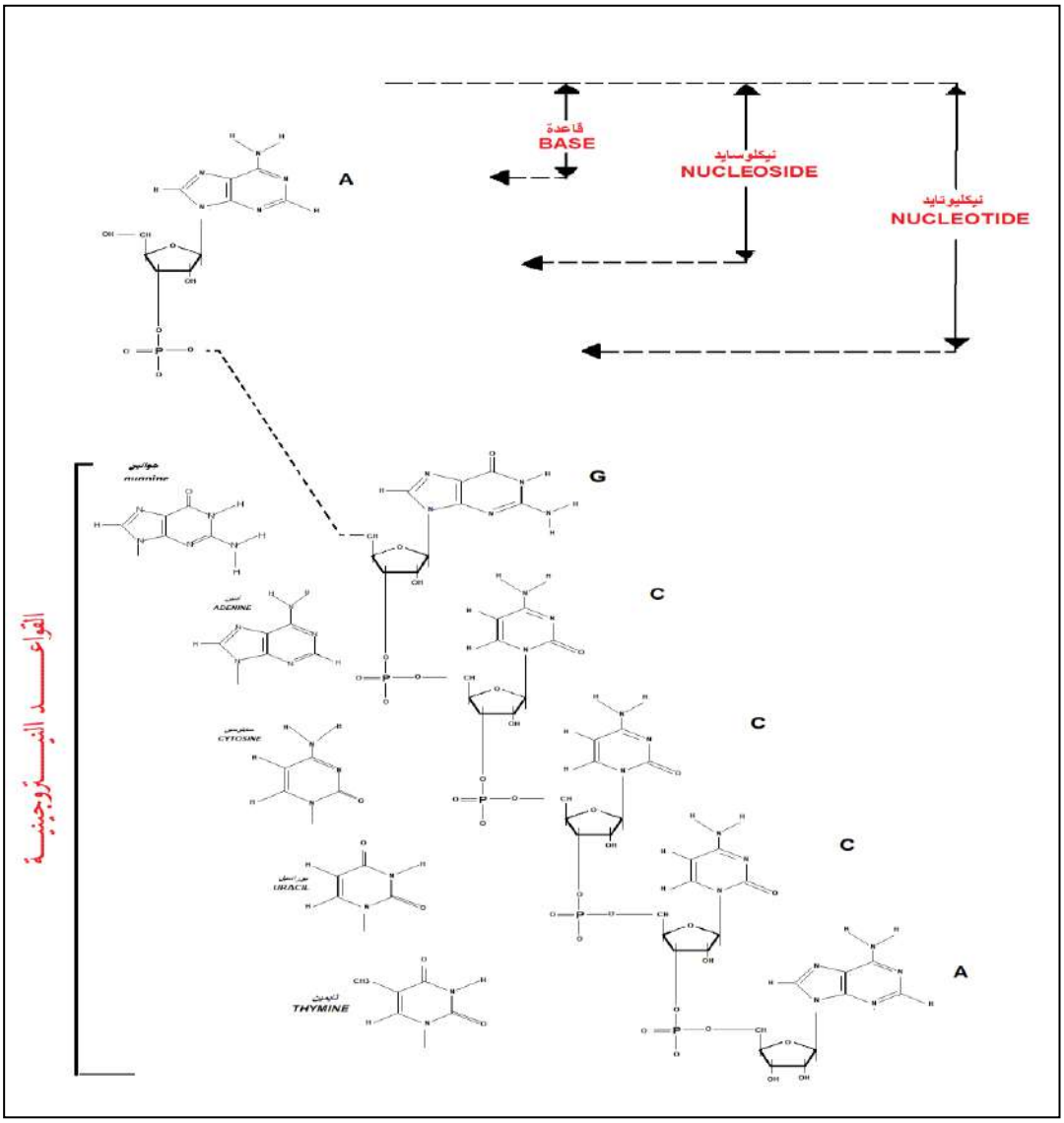
(أ) الحامض النووي (The Nucleic Acid) :-

تشتمل الفايروسات على نوع واحد من الحامض النووي الذي أما أن يكون (Ribonucleic Acid) أو (Deoxyribonucleic Acid) وليس كلاهما في نفس الفايروس. ويكون موقع الحامض النووي في داخل جسيمة الفايروس ومحاطا من جميع جوانبه بالغلاف البروتيني الذي يعتقد بأنه الغطاء الواقي للحامض النووي من تأثير الانزيمات عليه وبصورة خاصة انزيمات النوكلييز (Nuclease) التي تقوم بتحليل الحوامض النووية

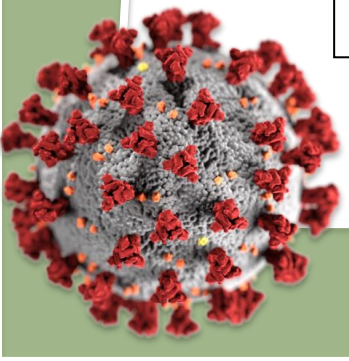


ولأجل أن يكون هذا الغطاء الواقي فعالا يجب ان يكون مقاوما للانزيمات التي تحلل البروتينات والتي تسمى (Proteolytic Enzymes) المتواجدة في خلايا الكائنات الحية ويظهر بأن الغلاف البروتيني فعلا يتميز بمقاومة هذه الأنزيمات بالنسبة لمعظم الفايروسات التي درست بصورة مفصلة ، ويعتقد بأن هذا التركيب للغلاف البروتيني حدث نتيجة للانتخاب الطبيعي اثناء نشوء وتطور الفايروسات في الطبيعة

تتكون الحوامض النووية للفايروسات – كمثيلاتها في الكائنات الاخرى في النيكليوتيدات الطبيعة من سلاسل غير متفرعة من العديد من (Nucleotides) ، ويتكون كل نيكليوتيد من جزيئة سكر ، وقاعدة نيتروجينية ، وجزيئة فوسفات كما هو موضح في الشكل :

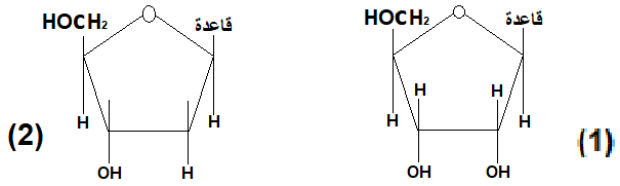


شكل (2) : المكونات الاساسية للحامض النووي



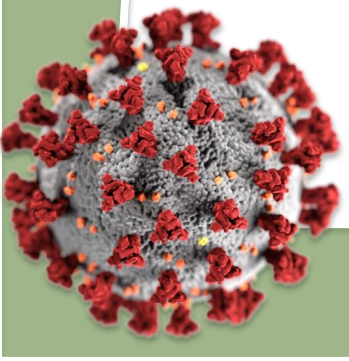
يختلف (RNA) من (DNA) من حيث التركيب في نقطتين هما :

(1) الاختلاف في جزيئة السكر، حيث تكون من نوع (Ribose) في (RNA) بينما تكون من نوع (Deoxyribune) في (DNA)



(ب) يحتوي كلا من RNAوDNA على أربعة قواعد نايتروجينية، منها ثلاثة الأدنين (Adenine) والجوانين (Guanine) من البيورينات والسايتوسين (cytosine) من البيرميدينات (pyramidines) مشتركة بين RNAوDNA, بينما تختلف بالنسبة للقاعدة الرابعة حيث تحتوي RNA على اليوراسيل (uracil) ويحتوي DNA على الثايمين (thymine).

من الحقائق المعروفة اليوم بأن الحامض النووي في الفايروسات هو المادة الوراثية لها حيث تميز بقدرته على التكاثر واحداث العدوى وتصنيع الغلاف البروتيني الخاص بالفايروس وكان أول من اكتشف قدرة الحامض النووي للفايروس على أحداث العدوى هم هيرشي وكيسي في عام 1952 بالنسبة لفايروس بكتريا القولون *Escherichia coli* و جيرر وشرام (Giere & schramm) في عام 1956 و فرانكل – كونراد في نفس العام بالنسبة الفايروس موزائيك التبغ، حيث تمكن هؤلاء الباحثين من فصل الحامض النووي (RNA) لفايروس موزاييك التبغ (TMV) عن الغلاف البروتيني وتلقيح نباتات تبغ سليمة به, وقد أدى ذلك إلى إحداث العدوى وظهور نفس الأعراض المرضية التي تسببها العدوى بالفايروسات الكاملة كما أن الفايروسات الناتجة من العدوى كانت فايروسات كاملة اي انها تشتمل على غلاف بروتيني واستنتجوا من ذلك بان قدرة الفايروس على العدوى يكمن في الحامض النووي وليس في الغلاف البروتيني وقد دفعت هذه النتائج العديد من الباحثين في مجالات فايروسات النبات والحيوان والبكتريا إلى اجراء دراسات مماثلة وكانت النتائج دائما تؤكد بأن الحامض النووي للفايروسات يحمل المعلومات الوراثية الكاملة لاحداث العدوى والتكاثر وتصنيع البروتين عند توفر الأنزيمات الضرورية .



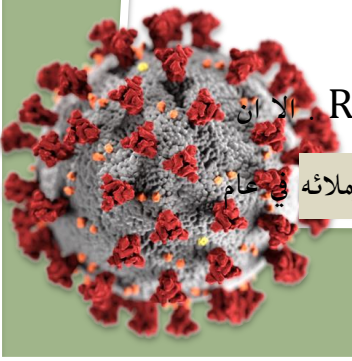
تختلف النسبة المئوية والوزن الجزيئي للحامض النووي في الفايروس الواحد باختلاف الفايروسات والجدول التالي يبين النسبة المئوية للحوامض النووية والبروتينات والوزن الجزيئي للحامض النووي لبعض فابروسات النبات .

جدول (2) يبين نوع الحامض النووي والوزن الجزيئي والنسبة المئوية للحامض النووي والنسبة المئوية للبروتين في بعض فايروسات النبات

الفايروس	نوع الحامض النووي	حامض نووي (%)	الوزن الجزيئي للحامض النووي (مليون دالتون)	بروتين (%)
Cauliflower mosaic	DNA	16	4.7	**84**
Cowpea mosaic	RNA	33	1.7	**67**
Pea enation mosaic	RNA	29	1.7	**71**
Potato X	RNA	6	1.0	**94**
Tobacco mosaic	RNA	5	2.05	**95**
Tobacco necrosis	RNA	20	6.6	**80**
Tobacco ringspot	RNA	40	2.0	**60**
Tomato bushy stunt	RNA	17	1,5	**83**
Wild cucumber mosaic	RNA	35	2.4	**65**
Wound tumour	RNA	23	10.0	**77**

ولما كان الحامض النووي هو المادة الوراثية للفايروسات، فمن البديهي بأنه كلما زادت كتلة الفايروس والنسبة المئوية للحامض النووي فيها كلما كان الفايروس أعقد تركيبا.

قد يكون الحامض النووي للفايروس احادي الخيط (Single-Stranded) كما هو الحال في فايروس موزائيك التبغ، او ثنائي الخيط (Double-Stranded) في بعض الفايروسات مثل *فايروس تقزم الرز (Rice dwarf virus)* و*فايروس عقد الجروح (Wound tumour virus)* . وان الحامض النووي لهذه الفايروسات هو من نوع (RNA) .



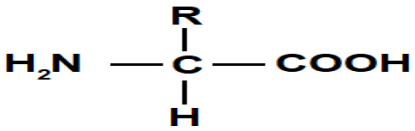
في معظم فايروسات النبات التي درست بصورة جيدة وجد بأن الحامض النووي فيها كان من نوع RNA . الا ان هنالك بعض الفايروسات التي وجد بأن الحامض النووي فيها كان من نوع DNA . فقد اكتشف شبرد وزملائه في عام

1968 بأن *فايروس موزاييك القرنابيط (Cauliflower mosaic virus)* يحتوي على DNA وهو ثنائي الخيط .

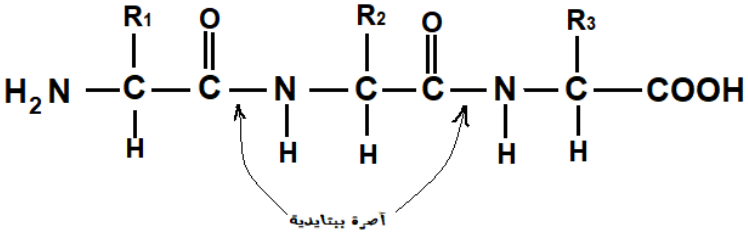
كما أن احد الفايروسات التي اكتشفت على الاشنات الزرقاء – الخضراء (Blue-Green algae virus) تحتوي على DNA وهو ثنائي الخيط ايضاً هذا ويعتقد بان كلا من *فايروس موزائيك الداليا (Dahlia mosaic virus)* و*فايروس التنقر الحلقي في القرنفل (Carnation etched ring virus)* تحتوي على DNA حيث توجد علاقة سيرولوجية بين هذين الفايروسين الاخيرين وفايروس موزائيك القرنابيط وان الفايروسات الثلاثة لها جسيمات كروية يبلغ قطر كل منها 50 نانومتر (Shepherd1976) .

(ب) البروتين (The Protein) :-

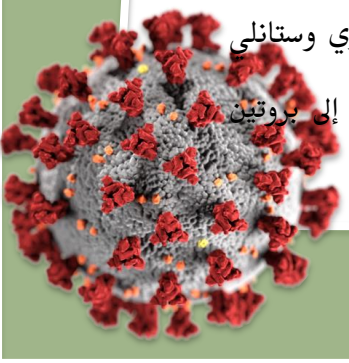
تتكون البروتينات بصورة عامة من سلاسل طويلة وغير متفرعة من البوليببتايدات (Polypeptides) وتتكون هذه الاخيرة من وحدات بنائية أساسية هي الحوامض الامينية (Amine acide) يبلغ عدد الحوامض الامينية المعروفة في الطبيعة عشرون نوعاً, ومنها تكون بروتينات الفايروسات أيضاً لهذه الحوامض الامينية تركيب كيمياوي عام يرمز له بالشكل التالي :



وإن ارتباط الحوامض الامينية مع بعضها البعض لتكوين الببتيدات يكون باتحاد المجموعة الكربوكسيلية (-COOH) من احد الحوامض الامينية مع المجموعة الامينية (-NH_2) (peptide bond) كما هو موضح في الشكل التالي :



وفي السنوات التي تلت اعلان (ستانلي 1935) بأن فايروس موزاييك التبغ يتكون من بروتين ، ثم اعلان باودن و بيري 1936 بأن الفايروس المذكور يتكون من البروتين والحامض النووي RNA ازداد اهتمام الباحثين في تركيب البروتين والحامض النووي للفايروسات من حيث الشكل والهيكل .فقد قام العديد من الباحثين امثال بيري وستانلي وشرام وزملائهم بدراسات وابحاث تهدف إلى امكانية تحليل (Degradation) فايروسات النبات إلى بروتين



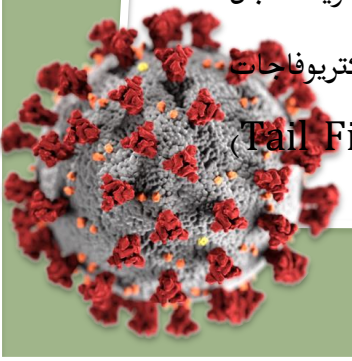
وحامض نووي باستعمال مختلف المواد الكيمياوية كاليوريا والمحاليل القاعدية والمواد المنظفة (Detergent) وحامض الخليك والفينول ... الخ.

وفي نفس الوقت كانت تجري ابحاث ودراسات أخرى على جسيمات بعض الفايروسات بواسطة الأشعة السينية (X-Ray Diffraction) وقد اتضح من نتائج تلك الدراسات والابحاث بان الغلاف البروتيني للفايروسات يتكون من وحدات تركيبية متكررة ذات أوزان جزيئية واطئة نسبيا وقد أكد هاريس و نايت (Harris and Night) عام 1955 هذه النتائج مستندين على التجارب التي أجروها على فايروس موزائيك التبغ، حيث وجدوا بأن الغلاف البروتيني للفايروس المذكور يتكون من مئات الببتيدات المتماثلة في أوزانها الجزيئية التي بلغت حوالي (17000) دالتون لكل منها، وقد أكد وعمم فكرة هذه الوحدات التركيبية فيما بعد كرك و واطسن (Crick and Watson)

ومعروف اليوم بأن الغلاف البروتيني الفايروسات يتكون من وحدات تركيبية تدعى Subunits سواء كان في الفايروس نوع واحد من البروتينات كما هو الحال في بعض فايروسات النبات مثل فايروس موزائيك التبغ، أو أكثر من نوع واحد كما هو الحال في فايروسات أخرى.

يتضح من الجدول (2) بأن البروتين يشكل معظم كتلة الفايروسات لذا ليس من الغرابة ان ترى بأن للبروتين دور كبير في تحديد حجم وشكل الفايروسات كما وأن الهيكل التركيبي (Configuration) لجزيئة البروتين يعتمد على تسلسل (Sequence) الحوامض الأمينية المكونة للبروتين وهذا التسلل بدوره يعتمد على تسلسل النيوكليوتيدات المكونة للحامض النووي للفايروس.

يعتقد بأن الخطوة الأولى في عملية العدوى بالنسبة للعديد من الفايروسات هي التصاق (Attachment) او ادمصاص (Adsorption) جسيمة الفايروس على مستقبلات (Reccptors) خاصة على سطح الخلية الحساسة للأصابة وينطبق ذلك بصورة خاصة على الفايروسات التي تصيب البكتريا والتي تصيب الحيوان ويعتقد بأن البروتينات الخاصة بهذه الفايروسات دور مهم في عملية الادمصاص ففي حالة البكتريوفاجات (Bacteriophages) – الفايروسات التي تصيب البكتريا – التي تحتوي على زوائد (Tail Fibers)



يحدث ادمصاصها على جدار البكتريا بواسطة البروتينات المكونة للزوائد أما بالنسبة للفايروسات الكروية التى لا توجد فيها زوائد فقد وجد بأن لهذه الفايروسات بالإضافة إلى الغلاف البروتيني نوع خاص من البروتين الذي له دور في عملية الادمصاص ويدعى هذا البروتين (A-Protein) ومن السهل التمييز من هذا البروتين وبروتين الوحدات التركيبية للغلاف حيث يبلغ الوزن الجزيئي الأول حوالي (38000) دالتون ، بينها يبلغ الوزن الجزيئي

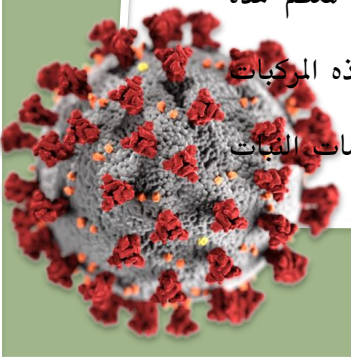
لوحدات الغلاف حوالي (14000) دالتون. كما يحتوي هذا البروتين على خمسة جزيئات من الحامض الاميني Histidine الذي لا وجود له في تركيب الغلاف البروتيني .

تتميز مكونات الكائنات الحية والفايروسات ذات الوزن الجزيئي العالي نسبياً كالبروتينات والحوامض النووية والكربوهيدرات بقدرتها على تحفيز انتاج الأجسام المضادة (Antibodies) لدى حقنها في حيوانات مناسبة . ولهذه الخاصية أهمية في تشخيص الفايروسات باستعمال الطرق السيرولوجية في الوقت الحاضر, مما لا شك فيه بان اهم وظائف الغلاف البروتيني هو الحفاظ على الفايروسات في الطبيعة ووقاية المادة الوراثية (الحامض النووي فيها من المؤثرات الخارجية الضارة كأنزيمات النيوكلييز التي تحتل الحوامض النووية والاشعاعات فوق البنفسجية، وحديثا تشير بعض الدراسات بأنه قد يكون للغلاف البروتيني دور في تخصص الحشرات في نقل فايروس معين وتخصص الفايروسات على بعض النباتات

يستدل من الدراسات التي أجريت على الغلاف البروتيني لفايروس موزائيك النبغ بانه مشتمل على (2130) وحدة تركيبة (Sulunit) وأن كلا من هذه الوحدات يتكون من (158) حامض أميني وقد تمكن فرانكال – كونراد وزملاءه من اكتشاف الترتيب المتعاقب للحوامض الأمينية (Amino acids) في الوحدة التركيبية عام 1960 كما هو مبين في الشكل (3)

(جـ) مكونات اخرى (Other constituents) :-

بالاضافة للبروتين والحامض النووي فقد وجد بأن بعض الفايروسات تحتوي على مكونات أخرى مثل مركبات البولي امين (Polyamines) والدهون (Lipids) والتى أهمها Phospholipids وتتميز معظم هذه الفايروسات باحتوائها على غشاء خارجي يحيط بالغلاف اليروتيني ويدعي Envelop, ان وجود هذه المركبات يكون شائعاً في الفايروسات التي تصيب الحيوان، بينما تجدها مقتصرة على فايروسات قليلة من فايروسات النبات



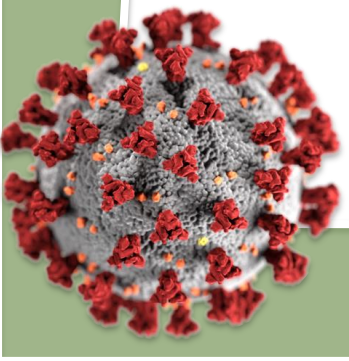
مثل *فايروس التقزم الاصفر للبطاطا* Potato yellow dwarf virus الذي يحتوي على (20%) مركبات دهنية *وفايروس الذبول المبقع في الطماطة* Tomato spotted wilt virus الذي يحتوي على (19%) من المركبات الدهنية .

فايروسات بدون غلاف بروتيني : (Viroids) :

اكتشفت هذه الفايروسات لاول مرة على البطاطا كمسبب *لمرض الدرنة المغزلية* Potato Spindle Tuber وقد كرس دينر (Diener, T,O 1972) سنوات عديدة لدراسة مسبب هذا المرض والذي كان يعتقد بأنه فايروس وتبين من تلك الدراسات بأن المسبب ليس فايروس وانما حامض نووي فقط من نوع (RNA) يتميز بوزن جزيئي لا يزيد عن 130000 دالتون مما سيجعله من اصغر الكائنات المسببة لبعض الامراض المعدية المعروفة. كما وجد بأنه ينقل ميكانيكياً ولا ينقل بواسطة ناقلات حية، وقد اطلق دينر على هذا المسبب اسم فايرويد (Viroid) لتمييزه عن الفايروسات . ومن ثم اكتشفت فايرويدات أخرى تسبب امراضاً في النبات مثل :

- ***Avocado sun -blotch***
- ***Cadang -Cadang of coconute***
- ***Cucumber pale-fruit***
- ***Chrysanthemum stunt***
- ***Citrus exocortis***

كما ويعتقد بأن هنالك فايرويدات تسبب امراض في الانسان والحيوان ايضاً .



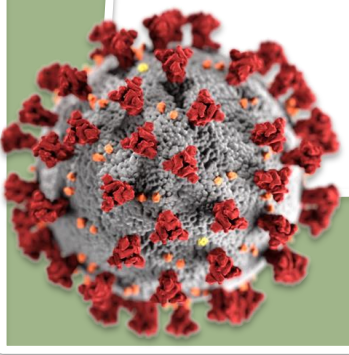
المحاضرة الثالثة

شكل وحجم فايروسات النبات :-

ذكر ماثيوس (Matthews ,1970) بأن ما يتوفر لدينا من معلومات عن شكل وحجم الفايروسات كان حصيلة ثلاثة اتجاهات رئيسية من البحوث هي :

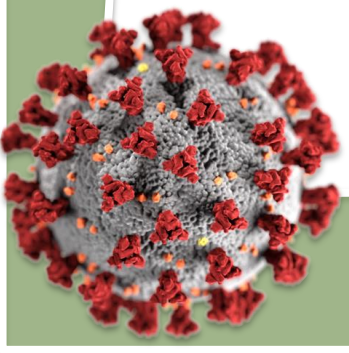
- الدراسات الكيمياوية والفيزياوية التي اجريت على مكونات الفايروسات .
- المجهر الالكتروني الذي زودنا بمعلومات مباشرة عن شكل وحجم جسيمات الفايروسات وبعض المعلومات عن سطحها الخارجي وتركيبها الداخلي .
- الأشعة السينية (X Ray Crystallography) وطرق استخدامها في دراسة بلورات الفايروسات والتي وفرت معلومات وافية عن الأبعاد الثلاثية لجسيمات بعض الفايروسات .

واليوم يستدل من نتائج تلك الدراسات بأن فايروسات النبات تتباين فيما بينها في الشكل والحجم تباينا كبيرا. فمنها المتساوية الابعاد (الكروية) التي تتراوح اقطارها بين (١٧ – ٨٠) نانومتر ، ومنها العصوية المرنة أو الخيطية التي تتراوح اطوالها بين (٤٨٠– ٢٠٠٠) نانومتر ، ومنها ما يكون على شكل عصيات صلدة تتراوح اطوالها بين (١٠٠– ٤٥٠) نانومتر ، ومنها ما يشبه الاطلاقة، كما ان هنالك فايروسات متغيرة الشكل أو لا يعرف لها شكلا ثابتا . يبين الشكل (1) رسوم تخطيطية للاشكال المختلفة لبعض الفايروسات المعروفة ، كما يوضح الشكل (٥) صوراً مأخوذ بالمجهر الالكتروني تمثل بعض اشكال الفايروسات وتسهيلا لعرض المعلومات المتوفرة عن اشكال وحجوم فايروسات النبات يمكن تقسيم الفايروسات الى ثلاثة اقسام عامة يتضمن كل قسم مجموعة من الفايروسات التي تتشابه في اشكالها . يبين الشكل (1) بعض فايروسات هذه الاقسام الثلاثة، وفيما يلي بعض الخصائص التي تميز المجاميع التي تتكون منها الاقسام :



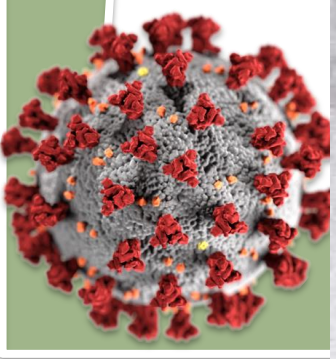
فايروسات شبيهة بالاطلاقة (Bullet - shaped)	متساوية الابعاد (Isometric)
1) Alfalfa mosaic virus	1) Cucumovirus Group

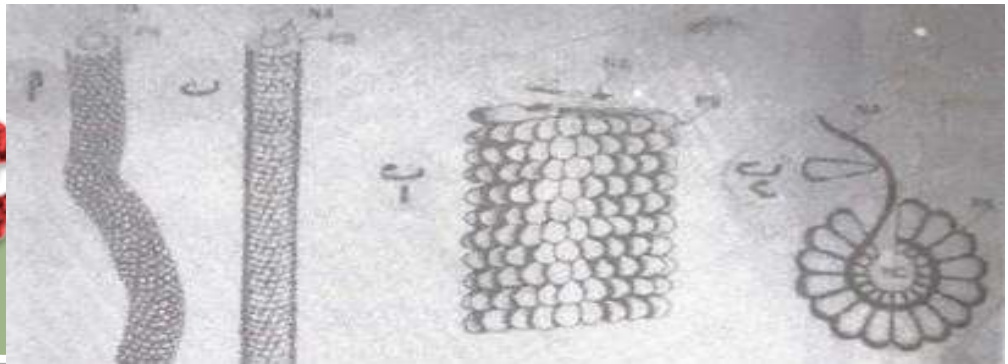
اولا : فايروسات متباينة الأبعاد (Anisometric Viruses) :-



2) Tymovirus Group	2) Cacao swollen shoot Virus	
3) Comovirus Group	3) Rhabdovirus Group (Potato yellow dwarf virus & Lettuce necrotic yellows virus)	
4) Nepovirus Group	متباينة الابعاد (Anisometric)	
5) Tobacco Necrosis Virus		
6) Satellite Virus	عصيات مرنة (Flexous rods)	عصيات صلدة (Rigid rods)
7) Bromovirus Group		
8) Tembusvirus Group	1) Potexvirus Group	1) Tobravirus Group
9) Potato leaf roll & similar viruses	2) Carlavirus Group	2) Soil -borne wheat mosaic virus
10) Pea enation mosaic virus	3) Potyvirus Group	3) Tobamovirus Group
11) Caulimovirus Group	4) Beet yellow s virus & Citrus tristeza virus	
12) Clover wound tumer & similar viruses		
13) Tomato spotted wilt virus		

شكل (1) : تبين بعض فايروسات النبات حسب اشكالها





شكل (2) : رسوم توضيحية لاهم اشكال فايروسات النبات

(أ) عصية مرنة: Protein subunit=PS Nucleic acid = NA

(ب) عصية صلدة تمثل جزء من فايروس موزاييك الشيخ

(1ب) جزء مكبر من العصية الصلدة يوضح ترتيب الوحدات البروتينية والحامض النووي .

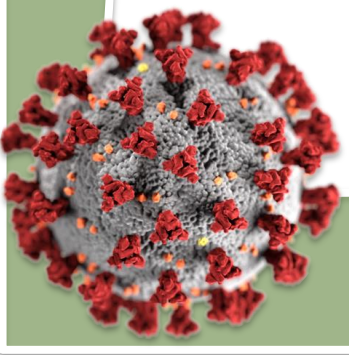
(2ب) رسم توضيحي المقطع في العصية الصلدة ..

(جـ) فايروس شبيه بالاطلاقة .

(1جـ) مقطع عرضي في الفايروس الشبيه بالاطلاقة

(د) فايروس متعدد الأوجه (٢٠ وجه في هذه الصورة) يبين ترتيب الوحدات البروتينية .

(1د) رسم يوضح الأوجه العشرون للفايروس .



يضم هذا القسم مجموعة من الفايروسات التي تكون اطوالها من بضعه مرات إلى أكثر من مائة مرة من قطرها وتنتظم الوحدات البروتينية للغلاف البروتيني فيها على شكل حلزون انبوبي يضم في داخله الحامض النووي .

لقد كان للمجهر الالكتروني دورا رئيسيا في تحديد اشكال وابعاد هذه الفايروسات ، وخاصة بالنسبة للفايروسات الطويلة جدا مثل فايروس الترستيزا في الحمضيات (Citrus tristeza) الذي يبلغ طوله 2000 - 2500 نانومتر و فايروس اصفرار البنجر السكري (Beet yellows virus) الذي يبلغ طوله حوالي 1200 نانومتر ، والتي كان من المتعذر معرفة ابعادها بالطرق الأخرى . بالاضافة الى تشابه هذه الفايروسات في اشكالها فأنها تتشابه في بعض خصائصها الأخرى . تكون نسبة البروتين الى الحامض النووي فيها عالية ، وسهلة النقل بالتلقيح الميكانيكي، ومعظمها تسبب أمراض الموزائيك في النباتات التي تصيبها . وبالنظر للتغاير الموجود بين افراد هذه الفايروسات من حيث اطوالها ومرونة جسيماتها يمكن تقسيمها الى مجموعتين هما :

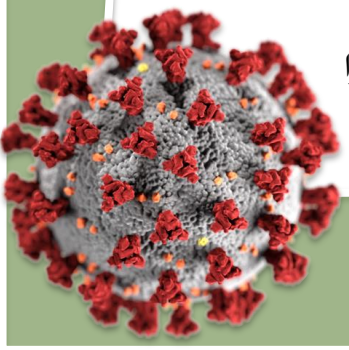
(1) **الفايروسات العصوية الصلدة** (Rigid rods) :

اهم ما تتميز به هذه الفايروسات هو شكلها العضوي المستقيم، وتتغاير اطوالها من بضعة مرات إلى عشرات المرات بقدر أقطارها من اهم الامثلة على هذه الفايروسات :

(أ) **مجموعة فايروس موزاييك التبغ** (Tobamovirus Group) وتضم هذه المجموعة :

Tobacca mosaic virus
Cucumber green mottle mosaic virus
Sunn hemp mosaic virus, Tomato mosaic virus
Ribgrass mosaic virus.

وتتمثل بفايروس موزاييك التبغ الذي يعتبر من أكثر الفايروسات النباتية التي درست من حيث تركيبه الكيمياوي وخصائصه الفيزياوية والبيولوجية . فهو من أكثر الفايروسات ثباتا واستقرارا

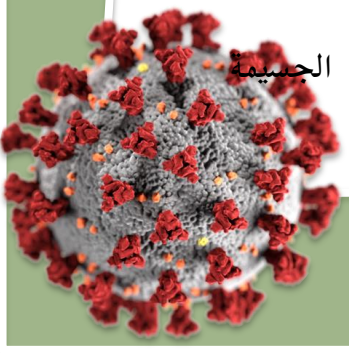


اذ وجد بأنه يحتفظ بقدرته على العدوى في العصير المستخلص من نبات مصاب لمدة (50) عاماً ، كما وجد محتفظا بقدرته على العدوى ايضا في أوراق التبغ المجففة بعد مروز (52) عاماً على تخزينها ، ويعزى هذا الاستقرار الى طبيعة ارتباط الوحدات البروتينية للغلاف مع بعضها البعض وارتباط الغلاف البروتيني ككل مع الحامض النووي الذي يحتويه، يوضح الشكل(5أ) بعض جسيمات هذا الفايروس مصوره بالمجهر الالكتروني . كما يوضح الشكل (4) رسوم تخطيطية تمثل الهيكل التركيبي الجسيمة الفايروس . و يبين الجدول التالي اهم المعلومات الاساسية عن تركيب جسيمة فايروس موزاييك التبغ (TMV) :

الخواص	القياس او العدد
طول جسيمة الفايروس	300 نانومتر
قطر جسيمة الفايروس	15 نانومتر
الوزن الجزيئي لجسيمة الفايروس	40 مليون دالتون
عدد الوحدات البروتينية في جسيمة الفايروس	2130 وحدة
الوزن الجزيئي لكل وحدة بروتينية	27530 دالتون
الوزن الجزيئي للحامض النووي RNA	2 مليون دالتون
عدد النيوكلوتيدات في الحامض النووي RNA	6340 نيوكليوتايد

(ب) مجموعة فايروس خشخشة التبغ (Tobravirus Group) :

تضم هذه المجموعة فايروس Pea early browning virus وتتمثل بفايروس خشخشة التبغ Tobacco rattle virus الذي يتكون من جسيمتين عصويتين مستقيمتين ، أكثر صلادة من جسيمة فايروس موزاييك التبغ ، الجسيمة قصيرة يبلغ طولها (52) نانومتر والطويلة يبلغ طولها (197) نانومتر ويبلغ قطر كلتاهما (25) نانومتر ، ويتوزع الحامض النووي للفايروس في كلتا الجسيمين ان العدوى بهذا الفايروس تتطلب وجود كلنا الجسيمين في خلية النبات، وقد وجد بأن الجسيمة.



الطويلة قادرة على العدوى الا انها لا تنتج فايروسات متكاملة حيث أن المادة الوراثية الخاصة بتصنيع الغلاف البروتيني موجودة في الجسيمة القصيرة .

(٢) الفايروسات العصوية المرنة (Flexible rods) :

وتتميز هذه المجموعة من الفايروسات بكونها اطول من الفايروسات العصوية الصلدة وان جسيماتها مرنة بحيث غالبا ما تظهر في المجهر الالكتروني بشكل عصيات فيها إنحناءات وليس بشكل عصيات مستقيمة ، ومن الأمثلة على هذه الفايروسات :

(أ) مجموعة بوتيكس فايروس (Potexvirus Group):

ويمثل هذه المجموعة فايروس البطاطا اكس Patato virus X . كما تضم (White clover mosaic virus) وبضعة فايروسات اخرى . تتميز هذه المجموعة بأن طول عصياتها يتراوح بين (580-480) نانومتر. وتنقل ميكانيكيا، وتسبب أمراض الموزائيك في النباتات التي تصيبها. ولها مدى عوائلي ضيق . يبين الشكل (ه . ز) بعض جسيمات هذا الفايروس .

(ب) مجموعة بوتي فايروس (Potyvirus Group) :

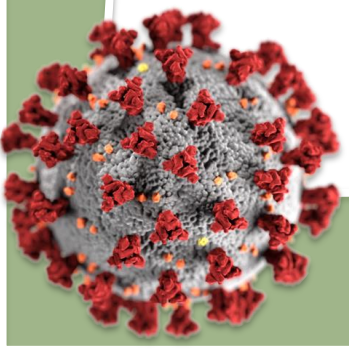
تعتبر هذه المجموعة من أكبر المجاميع من حيث عدد فايروسات النبات التي تضمنها . وتشمل على العديد من الفايروسات المهمة اقتصاديا مثل :

Bean common mosaic virus . Bean yellow mosaic virus

Lettuce Mosaic virus . Cowpea aphid- born mosaic virus

Sugarcane mosaic virus, Plum pox virus

والعديد من الفايروسات الاخرى.



تتميز فايروسات هذه المجموعة بعصيات خيطية مرنة تتراوح أطوالها بين (730-790) نانومتر، تنقل ميكانيكيا في المختبر وتنقل في الطبيعة بواسطة حشرات المن والعلاقة بينها وبين هذه الحشرات علاقة غير باقية (Non–persistenet) .

المدى العوائلي لبعض هذه الفايروسات واسع، بينما بالنسبة للبعض الآخر كالفايروسات التي تنقل بالبذور مثل (فايروس موزاييك الفاصولية الاعتيادي Bean Common mossic virus) (وفايروس موزاييك الخس Lettuce mosaic virus) فان المدى العوائلي ضيق, معظمها تسبب امراض الموزاييك على النباتات التي تصيبها. ويمثل هذه المجموعة فايروس البطاطا واي (Potato virus y) الذي يتميز بعصيات يبلغ طولها حوالي (730) نانومتر وقطرها حوالي 11 نانومتر ينقل ميكانيكيا وبواسطة بضعة انواع من حشرات المن. يصيب حوالي 60 نوعاً من النباتات معظمها في العائلة الباذنجانية واهمها اقتصاديا البطاطا .

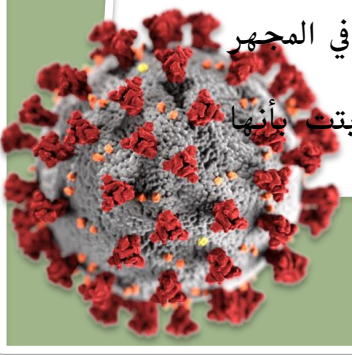
(ج) **فايروس اصفرار البنجر** (Beet yellows virus)

وفايروس ترستيزا الحمضيات (Citrus tristeza virus)

أهم ما تتميز به هذه الفايروسات هو جسيماتها الطويلة جداً نسبيا ، حيث يبلغ طول فايروس اصفرار البنجر حوالي ١٢٠٠ نانومتر كما في شكل (ه ، هـ) ، و فايروس الترستيزا حوالي 2000 نانومتر وتعتبر هذه من اطول الفايروسات المعروفة لحد الآن . تسبب هذه الفايروسات الاصفرار وموت انسجة اللحاء في النباتات التي تصيبها . تنقل ميكانيكيا ولكن بصعوبة ، كما تنقل بواسطة بعض حشرات المن.

ثانياً: فايروسات متساوية الابعاد Isometric viruses :

وتسمى أيضا الفايروسات الكروية أو متعددة الأسطح (Spherical or Polyhedral) ان العديد من هذه الفايروسات وخاصة الصغيرة الحجم منها كانت تظهر لأول وهلة عند فحصها في المجهر الالكتروني وكأنها كروية الشكل . غير أن الدراسات المستمرة والطرق التقنية المتطورة قد أثبتت بأنها



ليست كروية بالمعنى الصحيح بل إنما هي متعددة الأسطح أو الأوجه (Polyhedral) من ثم تبين بأن الكثير من الفايروسات المتعددة الاسطح هي في الحقيقة تحتوي على عشرين سطح وفي هذه الحالة تسمى فايروسات ذات عشرين سطح (Icosahedral Viruses) .

وأن كل من هذه الاسطح يتركب من مجموعة من الوحدات البروتينية (Protein subunits) وان مجموع الوحدات البروتينية التي تشكل الغلاف البروتيني تنتظم مع بعضها البعض لتعطي للفايروس شكله النهائي . يبين الشكل (4) صورة تخطيطية توضح شكل وترتيب الاسطح لفايروس ذوعشرين وجه (أ) وترتيب الوحدات البروتينية وتوزيعها على السطح الكلي للفايروس نفسه (د)

لقد وزع جيبز وهاريسون (Gibbs and Harrison 1976) الفايروسات المتساوية الابعاد في ثلاثة عشر مجموعة فايروسية (Groups) على اساس الخصائص المتشابهة بين فايروسات المجموعة الواحدة، وهي نفس الاسس التي اعتمدت قبل هاريسون وزملاءه (Harrison et al 1971). وفيما يلي وصفا مختصراً لبعض من هذه المجاميع :

(أ) **مجموعة فايروس موزاييك الخيار** Cucumovirus Group :

وتضم ثلاثة فايروسات هي : Tomato aspermy Virus

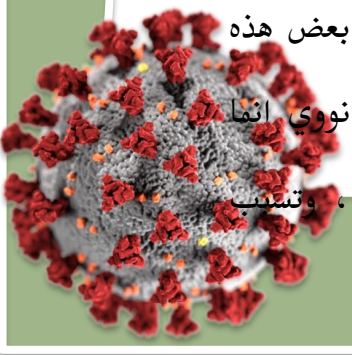
Peanut stunt Virus & Cucumber Mosaic Virus.

(ب) **مجموعة فايروس موزائيك اللفت المصفر** (Tymovirus Group)

وتضم هذه حوالي عشرة انواع من الفايروسات منها :

Wild cucumber mosaic virus . Cacao yellow mosaic virus
Onion yellow mosaic virus . Eggplant Mosaic virus

بالاضافة الى Turnip yellow mosaic virus الذي يمثل المجموعة . تتميز المجموعة بجسيمات متساوية الأبعاد ومستديرة الحافات يتراوح قطرها بين (25-30) نانومتر، تتكون بعض هذه الفايروسات من أكثر من جميعة واحدة ، وبعض هذه الجسيمات لا تحتوي على حامض نووي انما تتكون من بروتين فقط . لا تسبب عدوى لوحدها . المدى العوائلي لهذه الفايروسات ضيق ، وتسبب



موزاييك في النباتات التي تصيبها . جميعها ينقل ميكانيكيا وبواسطة بعض الخنافس (Beetles) القارضة للاوراق . يبين الشكل (2,0) صوره لجسيمات فايروس موزاييك اللفت .

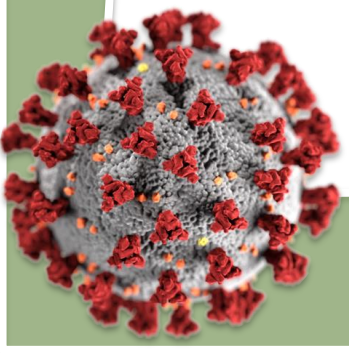
(ت) **مجموعة فايروس موزاييك اللوبيا** (Comovirus Group) :

وتضم حوالي اثني عشرة نوعاً من الفايروسات منها :

Squash mosaic virus . Bean pod mottle virus .
Radish mosaic virus . Broad bean stain virus .
Red clover mosaic Virus,

ويمثل المجموعة فايروس موزاييك اللوبيا . Cowpea mosaic virus جسيمات هذه الفايروسات متساوية الأبعاد ذات زوايا ، يتراوح قطرها بين (25–30) نانومتر. تتكون معظم هذه الفايروسات من ثلاثة جسيمات بنفس القطر المذكور . بعض هذه الجسيمات تحتوي على حوالي (28) والبعض الآخر حوالي (34) حامض نووي، بينما لا تحتوي الجسيمات الأخرى على حامض نووي . أي أن الحامض النووي لكل فايروس موزع على جسيمتين ، والجسيمة الثالثة لا تحتوي على حامض نووي . وبهذا يكون وجود الجسيمتين اللتين تحتويان على الحامض النووي ضروري لأحداث العدوى في النبات . معظم هذه الفايروسات لها مدى عوائلي ضيق . وانها تسبب امراض الموزاييك او موت الانسجة في النباتات التي تصيبها . جميعها تنقل ميكانيكيا وبعضها ينقل بواسطة الخنافس القارضة للاوراق .

(ث) مجموعة فايروس موزاييك القرنابيط (Caulimovirus Group) تضم هذه المجموعة ثلاثة فايروسات وهي Carnation etched ring virus, Dahlia mosaic virus والثالث هو فايروس موزاييك القرنابيط الممثل للمجموعة يكون الحامض النووي في هذه الفايروسات من نوع (DNA) . وتكون جسيماتها متساوية الابعاد ، يبلغ قطرها حوالي (٥٠) نانومتر . تنقل



ميكانيكيا وبواسطة عدة انواع من حشرات المن، ولا تبقى هذه الفايروسات في الحشرات الناقلة اكثر من بضعة ساعات . لها مدى عوائلي ضيق ، وتسبب امراض الموزاييك والتبرقش في النباتات التي تصيبها .

ثالثا : الفايروسات الشبيهة بالأطلاقة (Bullet – shped Viruses)

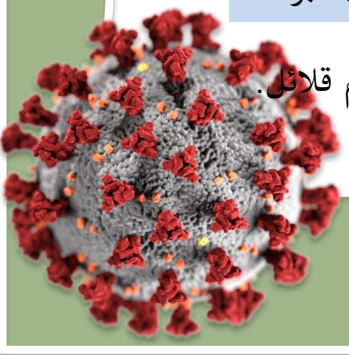
تتميز هذه الفايروسات بتركيب جسيماتها المعقد والشبه الموجود بينها وبين بعض فايروسات الحيوان يكون طول جسيمات هذه الفايروسات مرتين أو ثلاثة مرات بقدر قطرها وتكون أشبه بالاطلاقة لاتوفر معلومات دقيقة وكافية عن تراكيبها بسبب صعوبة فصلها من النباتات المصابة بصورة نقية، هنالك أربعة فايروسات معروفة من هذا النوع وهي :

(1) **فايروس موزاييك الجت** (Alfalfa mosaic virus)

. يتكون هذا الفايروس من أربعة جسيمات على الأقل تختلف عن بعضها البعض في طولها ، حيث تبلغ اطوالها (58) و (18) و (36) و (48) نانومتر كما يبلغ قطر كل منها (18) نانومتر, تحتوي ثلاثة من تلك الجسيمات على حامض سوري من نوع (RNA) واحادي الخيط لذا وجودها معاً ضروري الأحداث العدوى في الثبات نسب أمراض الموزائيك والتبرقش والبقع الحلقية، لها مدى عوائلي واسع, تنقل ميكانيكيا وبواسطة حشرات المن التي يبقى فيها الفايروس اقل من ساعتين فقط .يبين الشكل (5,و) صوره لجسيمات هذا الفايروس .

(٢) **فايروس الساق المنتفخة في الكاكاو** (Cacao swallen shoot virus)

يتكون هذا الفايروس من جسيمة شبيهة بالاطلاقة، يبلغ قطرها حوالي (28) نانومتر ويختلف طولها من (100–150) نانومتر .ينقل ميكانيكيا ولكن صعوبة ، كما ينقل بصورة رئيسية بواسطة حشرات البق الدقيقي (Melly - bug) في الطبيعة. حيث يبقى فيها الفايروس لمدة أيام قلائل.



يصيب الفايروس نباتات قليلة ويسبب فيها امراض الموزائيك وانتفاخ الساق، ينتشر في افريقيا وتربناداد بشكل وبائي ويسبب خسائر كبيرة في محصول الكاكاو . يبين الشكل (5, ج) صوره لبعض جسيمات هذا الفايروس .

(3) (Lettuce necrotic yellows virus) :

التي يبلغ طول جسيمته حوالي (227) نانومتر و قطره (66) نانومتر ، يكون الحامض النووي فيه من نوع (RNA). يغطي جسيمة الفايروس غلاف خارجي يحتوي على زوائد على سطحه طول كل منها حوالي (6) نانومتر والبعد كل منها عن الأخرى (6) نانومتر

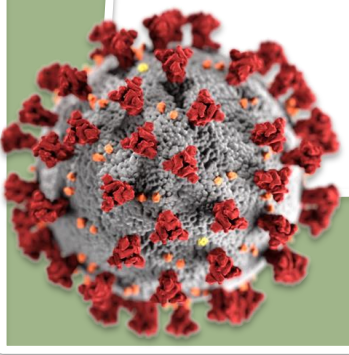
ينقل ميكانيكيا من نباتات الخس المصابة الى نباتات أخرى عدا الخس كما ينقل من الخس إلى الخس والى نباتات أخرى بواسطة بعض حشرات المن, المدى العوائلي للفايروس ضيق. هنالك بعض الدلائل تشير إلى احتواء الفايروس على بعض المركبات الدهنية.

(4) **فايروس تقزم البطاطا المصفر** Potato yellow dwarf virus

يبلغ طول جسيمة الفايروس حوالي (380) نانومتر و قطره حوالي (75) نانومتر، وتكون نهايته مستديرة. يحيط بجسيمة الفايروس غشاء (Envelop) خارجي يتكون من ثلاثة طبقات سمك كل منها حوالي (305) نانومتر والمسافة بين طبقة واخرى حوالي (5) نانومتر, يحتوي الفايروس على (30%) مركبات دهنية ينقل الفايروس بواسطة حشرات القفاز وله مدى عوائلي محدود .

من الجدير بالذكر بأن الفايروسين الأخيرين لهما شبه ببعض فايروسات الحيوان التي تنتمي إلى مجموعة (Rhabdovirus Group) والتي تضم Vesicular stomatitis virus و Rabies virus التي هي الأخرى تتميز بشكلها الذي –يشبه الاطلاقة، وتتراوح اطوالها بين (200– 300) نانومتر وقطرها (50- 100) نانومتر. كما يحيط بجسيماتها ايضا غشاء خارجي يحتوي على مركبات دهنية وبروتين .

رابعا : فايروسات بدون غلاف بروتيني (Viroid) :



وقد اطلق عليها داينر اسم (Viroid) لتمييزها عن الفايروسات الاعتيادية التي لها. غلاف بروتيني ، وتضم ثلاثة فايرويدات هي :

فايرويد درنة البطاطا المغزلية (Potato spindle tuber Viroid)

وفايرويد تقزم الداودي (Chrysanthemum stunt Viroid)

وفايرويد الاكسوكورتس في الحمضيات (Citrus exocortis Viroid)

تتكون هذه المسببات المرضية من حامض نووي (RNA) احادي الخيط فقط وليس لها غلاف بروتيني . يتراوح وزنها الجزيئي بين (125.000-50.000) دالتون تنقل ميكانيكيا ولها مدى عوائلي محدود .

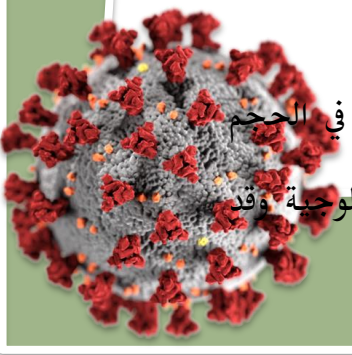
خامساً :

بالاضافة إلى ما سبق ذكره عن اشكال وحجوم الفايروسات ، هنالك مجموعة من الفايروسات التي لها اهمية اقتصادية والتي تصيب العديد من اشجار الفاكهة في المناطق المعتدلة والتي تتكون جسيماتها من جسيمتين او اكثر غير انها غير مستقرة في العصير المستخلص من النبات المصاب مالم يضاف اليه مادة مختزلة أو مادة رابطة لايونات العناصر، تحتوي جيماتها على (15–25%) حامض نووي من نوع (RNA)، وتكون حافاتها غير منتظمة. العديد من هذه الفايروسات تنقل عن طريق حبوب اللقاح أو البذور، ولم تعرف ناقلات لهذه الفايروسات لحد الآن وقد دلت دراسات حديثة بان هنالك بعض التشابه بين هذه الفايروسات. ومنها

Black raspberry latent virus

Tobacco streak virus

Elm mottle virus



التي يتكون كلا منها من ثلاثة أنواع من الجسيمات، لها نفس الكثافة ولكنها تختلف في الحجم بالاضافة إلى هذه وجد بأن هنالك فايروسات أخرى تربطها مع بعضها البعض روابط سيرولوجية وقد

جمعت جميع هذه الفايروسات ضمن مجموعة واحدة سميت (llarvirus) ومعناها (Viruses with isometric labile particles causing ringspot symptoms) أي الفايروسات المتساوية الأبعاد. التي لها جسيمات غير ثابتة الشكل، وتسبب اعراض البقع الخلقية

من هذه الفايروسات أيضا :. . Rose Mosaic Virus . Apple Mosaic virus

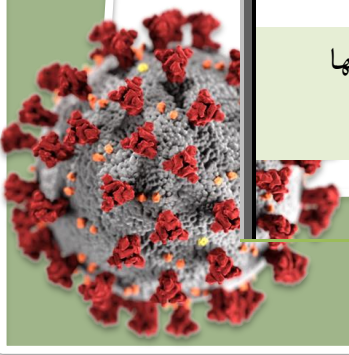
Prunns Necrotic ringspot virus . Prune dwarf virnes

لا تتوفر معلومات وافية عن هذه الفايروسات لتقييمها اكثر .

وظائف البروتين التركيبي الفايروسي :-

يؤدي البروتين التركيبي الوظائف التالية (1) حماية الجينوم الفايروسي من المؤثرات المتلفة له وهي الإنزيمات المحللة والأشعة فوق البنفسجية والأشعة المؤينة والأكسدة والحرارة (2) هو المسئول عن تحديد الشكل الخارجي للفايروس لأنه يشكل الكتلة الأكبر للفايروس إذ يشكل 95٪ من كتلة الفايروس العصوي و 75٪ من كتلة الفايروس البلوري (3) يلعب دورا في الإصابة الفايروسية حيث يرتبط مع بروتين الحركة في بعض أنواع الفايروسات وبالتالي يسهل نقلها عبر الخلايا عن طريق البلازموديزماتا (4) له دورا هاما في تخصصية نقل الفايروسات بالناقلات. يلخص الجدول (2-3) وظائف بروتين الغطاء (الكابسيد) في الفايروسات ذات الحامض الرايبي RNA viruses بسيطة التركيب .

الوظيفة	الآلية
التجميع Assembly	تتجمع الوحدات البروتينية لتكوين غطاء حامي للحامض النووي الفايروسي.
التعبئة package	تعمل الوحدات البروتينية وبتخصصية عالية على تعبئة الحامض النووي الفايروسي .
الارتباط بالمستقبلات Binding to receptors	قد يساهم الكابسيد بفعالية في عملية اصابة في عملية الاصابة التي يحثها الفايروس في النبات العائل
النقل transport	نقل الفريونات داخل النبات العائل



تضاعف الرنا الفايروسي RNA replication	تعمل بعض البروتينات المتخصصة في الكابسيد بمثابة بوادئ PRIMERS لتحفيز البدء بتضاعف الرنا الفايروسي

ملخص المحاضرة:-

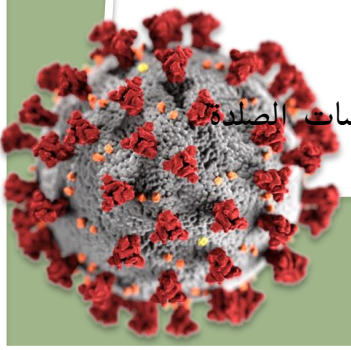
تختلف الفايروسات النباتية من حيث الشكل والحجم ويمكن ان تقسم على المجاميع التالية :-

1. **الفايروسات المتباينة الابعاد** Anisometric Viruses **او الفايروسات العصوية** Rod-shaped V. وتكون أطوالها ضعف أو ثلاث أضعاف عرضها مثلاً فايروس TMV يبلغ طولة 200 نانومتر و عرضه 15 نانومتر. وتنتظم الوحدات البروتينية للغلاف البروتيني على شكل حلزون انبوبي يضم في داخله الحامض النووي .

وصف المجموعة تتباين في أطوالها ومرونه جسيماتها لذا تقسم الى :

أ- الفايروسات العضوية الصلدة . Rigid rods V تتميز بشكلها العصوي المستقيم وتتراوح أطوالها من بعض مرات الى عشرات المرات بقدر أقطارها . ومن الامثلة عليه مجموعة Tobamovimes Group مثل TMV , Tomato mosaic. v

ب- الفايروسات العصوية المرنة flexible rods v. تتميز بكونها أطول من الفايروسات الصلدة ومرنة وبشكل عصيات منحنيه من الإمثلة عليها مجموعة :



(Potato virus x--- Potexvirus group)
(Potato virus Y ----. Potyvirus group)

2. **الفايروسات متساوية الابعاد** Isometric Viruses وتسمى الفايروسات الكروية أو متعددة الاوجه Polyhedral وقد تبين ان الكثير من الفايروسات المتعددة الاوجه تحتوي على عشرين سطح وتسمى فايروسات ذات عشرين وجه Icosahedral وان كل وجه يتكون من مجموعة من

الوحدات البروتينية وهي التي تشكل الغلاف البروتيني قد وزع جبز وهاريسون Gibbs & 1976Harison هذه الفايروسات في (13) مجموعة فايروسيه Groups ومنها مجموعة :

موزاييك الخيار (CMV)Cucumovirus Group

موزاييك اللوبيا(Cowpea mosaic V) Comovirus Group.

3. **الفايروسات الشبيهة بالاطلاقة** Bullet-shaped Viruses تتميز بتركيب جسيماتها المعقد ، وطول جسمها (2–3) مرات بقدر عرضها او قطرها وتكون شبيهة بالاطلاقة و من الامثلة : Alfalfa mosaic virus فايروس موزائيك الجت.

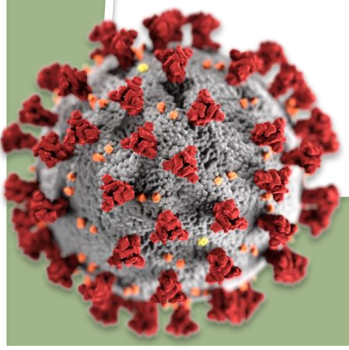
4. **فايروسات بدون غلاف بروتيني** : Viroids و قد اطلق عليها Diner فايرويد لتمييزها عن . الفايروسات الاعتيادية ومنها Potato spindle tuber virus و في الحمضيات Citrus exocortis viroid

5. **الفايروسات المتساوية الابعاد التي لها جسيمات غير ثابتة الشكل** وتسبب اعراض البقع الحلقية (Ilavirus) منها

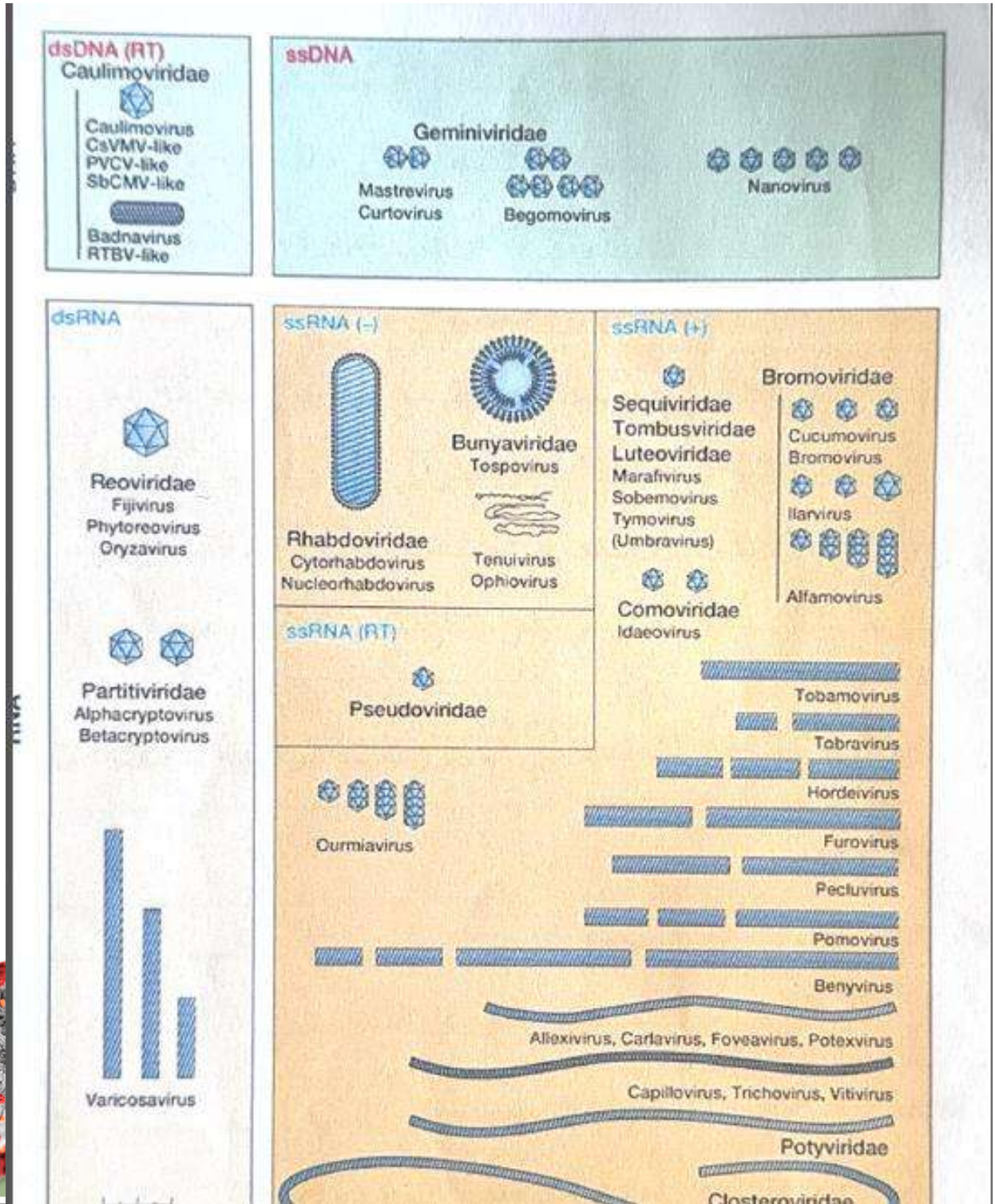
(apple mosaic virus)

Rose mosaic virus

لاتتوفر معلومات كافيه عنها .



.


dsDNA (RT)
Caulimoviridae
Caulimovirus
CsVMV-like
PVCV-like
SbCMV-like
Badnavirus
RTBV-like
ssDNA
Geminiviridae
Mastrevirus
Curtovirus
Begomovirus
Nanovirus
dsRNA
Reoviridae
Fijivirus
Phytoreovirus
Oryzavirus
Partitiviridae
Alphacryptovirus
Betacryptovirus
Varicosavirus
ssRNA (–)
Bunyaviridae
Tospovirus
Rhabdoviridae
Cytorhabdovirus
Nucleorhabdovirus
Tenuivirus
Ophiovirus
ssRNA (+)
Sequiviridae
Tombusviridae
Luteoviridae
Marafivirus
Sobemovirus
Tymovirus
(Umbravirus)
Comoviridae
Idaeovirus
Bromoviridae
Cucumovirus
Bromovirus
Ilarvirus
Alfamovirus
ssRNA (RT)
Pseudoviridae
Ourmiavirus
Tobamovirus
Tobravirus
Hordeivirus
Furovirus
Pecluvirus
Pomovirus
Benyvirus
Allexivirus, Carlavirus, Foveavirus, Potexvirus
Capillovirus, Trichovirus, Vitivirus
Potyviridae
Closteroviridae

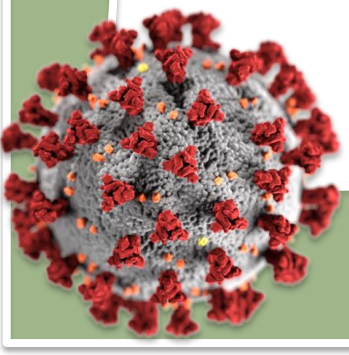
المحاضرة الرابعة

استجابة النباتات 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 فأن 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 متصلة الأعراض Syndrome أي تطور الأعراض مع الزمن.

أنواع أعراض الأمراض الفايروسية :

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



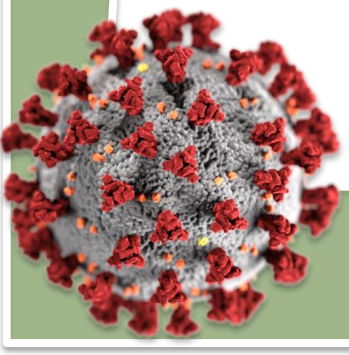
1) **الأعراض الخارجية** :-

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

أ- 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 اغلب الإصابات الفايروسية لأن ظهورها يعني مقاومة النباتات للفايروسات ومنعها من الحركة إلى الخلايا السليمة المجاورة لمنطقة الدخول، أو يفسر ظهورها بأن الأنسجة المصابة قد تكون أنسجة في المرحلة التطورية أو الأيضية النشطة غير المتمايزة حيث تكون الخلايا في حالة من النشاط الأيضي 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

عادة ما يتحدد الفايروس الذي يسبب البقع الموضعية الميتة بمنطقة البقعة ولا ينتشر جهازيا أما مع البقع الموضعية المصفرة فان الفايروس قد يستمر بالانتشار خارج البقعة إلى الخلايا المجاورة ليصبح لاحقا جهازي الانتشار. إن عدد البقع الموضعية التي تظهر على الأوراق الملقحة هو مؤشر التركيز 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 وان كان هو الأكثر شيوعا بل يمكن أن تظهر بدرجة اقل على الجذور والبذور مصاحبة لبعض الإصابات الفايروسية.



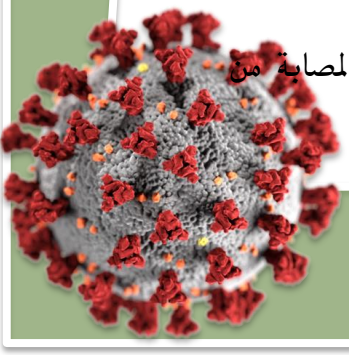
كذلك فإن ظهور البقع الموضعية هو تعبير عن آليات الدفاع النباتية في النباتات المقاومة وخاصة حالة الحساسية المفرطة Hypersensitive reaction حيث يسبب الفايروس بعد دخوله للنبات استحثاثا للاستجابة الخلوية تؤدي إلى تحلل نوى الخلايا ثم موت مجموعة الخلايا المصابة المكونة للبقعة مما يمنع تقدم الفايروس جهازيا في النبات.

ب- 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 أو Acute or sever symptoms ثم تتحول إلى أعراض حادة Primary symptoms تسمى "الصدمة" Shock بعدها تتحول إلى أعراض مزمنة Chronic symptoms وأحيانا يموت النبات دون إظهار الأعراض المزمنة، تظهر الأعراض الجهازية بانواع عديدة ومتنوعة وهي:

a. **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 المساحات 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 تكتل وتحلل كلوروبلاستات الخلايا المصابة ويعتقد أن الإصابة بالموزائيك تحصل في وقت مبكر من نشوء الورقة حيث يصيب الفايروس الخلايا المنشأة للورقة وقبل تطور وانبساط الفصل، عليه فالخلايا الأولية المصابة ستغطى المناطق المصابة بعد البساط النصل فيما ستعطي الخلايا الأولية السليمة المناطق غير المصابة من النصل .



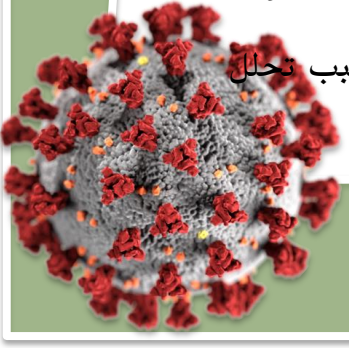
قد يسبق ظهور الموزائيك أنواع أخرى من أعراض تغيرات اللون وهي أعراض شفافية العروق Vein clearing أو تسمى اصفرار العروق Vein chlorosis والتي تتطور لاحقا إلى موزائيك كما تصاحب أعراض الموزائيك الشديد عادة أعراض التنفط Blistering وهي بروز المناطق الخضراء الداكنة للنصل وتقببها بشكل "فقاعات" Blisters وانخفاض مستوى المناطق المصفرة المصابة وذلك بسبب توقف نموها واستمراره في المناطق السليمة من النصل.

من أعراض تغيرات اللون المهمة هي التبرقش Mottle , Mottling 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.

اما 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 رفيعة الأوراق ذات التعريق المتوازي الطولي أو العرضي، أعراض التخطط Streak وهي خطوط مصفرة تمتد طوليا أو عرضيا حسب نوع التعريق وبشكل متقطع بموازاة عروق الورقة، وإذا كانت الخطوط مستمرة يطلق على التخطط مصطلح Stripe أو Striate وتعد أعراض الاصفرار Yellowing or Chlorosis إحدى أهم أعراض تغيرات اللون حيث تسبب الإصابة الفابروسية اختفاء لون الأوراق الأخضر تماما أو جزئا كبيرا منه بسبب تحلل الكلوروفيل.

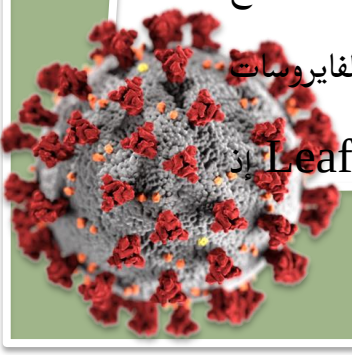


توجد أنواع من أعراض تغيرات اللون هي اقل ظهورا مع الإصابات الفايروسية مقارنة مع الأعراض التي ذكرت أنها ومنها أعراض الابيضاض Blanching وهي تلون النسيج المصاب باللون الأبيض وكأنه لم يتعرض إلى أشعة الشمس، وكذلك أعراض الاحمرار Reddening أو التلون الوردي Purpling والتي تتسبب عن تشجيع الإصابة الفايروسية لتكوين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

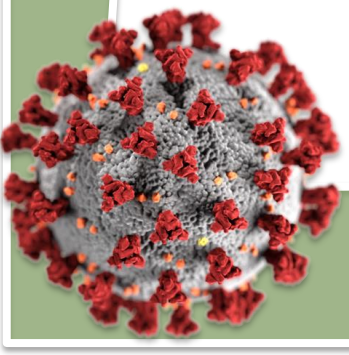
إن أعراض تغيرات اللون هي واسعة الانتشار وتصاحب الإصابة بعدد كبير من أنواع الفايروسات لعوائلها النباتية كما ارتبطت أسماء الكثير من الفايروسات بأسماء تلك الأعراض. تظهر أعراض تغيرات اللون أيضا على الأعضاء الأخرى من النبات وأن كانت أكثر شيوعا على الأوراق حيث تظهر على الأزهار والثمار والأفرع و الجذور، ومنها أعراض التلون الزهري المعروفة بأعراض الإنفصال اللوني Color breaking على أزهار التيوليب والمتسببة عن الإصابة بفايروس الإنفصال اللوني للتيولب (TBV) ويسبب فايروس الموزائيك الشديد للسوسن أعراض موزائيك على بتلات السوسن والاوركيد واكلاديولس مما يؤثر على قيمتها التسويقية (ISM) و فايروس موزائيك الخيار (CMV) . كذلك تظهر أعراض تغيرات اللون على ثمار العديد من أنواع النباتات ومنها تلون ثمار الطماطة عند الإصابة بفايروسي موزائيك الطماطة (ToMV) والذبول المبقع للطماطة (TSWV)

b. **أعراض التشوهات** :-

تسبب العديد من الفايروسات حالات متنوعة من أعراض التشوه Malformation التي تظهر على أي جزء 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 يسببه ومن أعراض التشوه (1) تجعد الأوراق Curling , Leaf cupping إذ



يتجعد النصل بسبب خلل في النظام الوعائي وخاصة اللحاء ويعاق نقل المواد الغذائية في الأوراق وتتجمع فيها فيتجعد النصل (2) التفاف الأوراق Leal rolling حيث يتحول النصل إلى شكل أنبوبي بالتفافه إلى الأعلى وذلك بسبب تراكم النشأ نتيجة إعاقة حركة المواد الغذائية في اللحاء (3) اختزال النصل أو تسمى أعراض القيطان وهي شائعة مع العديد من الفايروسات Shoe-string or strap-leaf symptoms " 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 (4) Fern leaf (Rugosity) التجعد الشديد للأوراق Rugosity هو نشوه وتجعد 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 والتنفط (5) البروزات الورقية Enations هي نموات ورقية زائدة تنبثق من عروق السطح السفلي للأوراق المصابة وتكون إما بشكل نموات خلوية غير منتظمة تسمى Histoid أو نموات خلوية منتظمة تشبه خلايا الورقة الطبيعية تسمى (6) Organoid الأورام والعقد Tumors and Galls هي أورام صلبة القوام تظهر على أجزاء النبات المصابة وخاصة السيقان أو الجذور أو الثمار بسبب النمو غير الطبيعي للأنسجة المصابة والتي تحصل فيها ظاهرتي الانقسام غير المنضبط للخلايا Hyperplasia أو تضخم الخلايا (7) Hypertrophy 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.



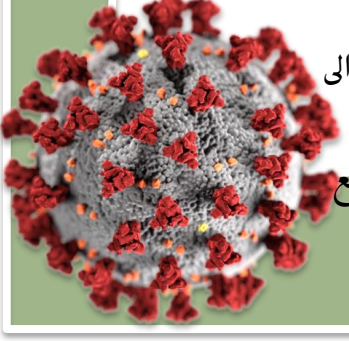
(9) التورد Rosetting وهي من أعراض التشوه الشائعة التي تصاحب الكثير من الفايروسات حيث يتقزم النبات وتتقارب نمواته الخضرية فيأخذ المجموع الخضري للنبات شكل الزهرة وذلك بسبب تقزم سلاميات الأفرع نتيجة الخلل الهرموني الذي تسببه الإصابة الفايروسية وعندما تظهر هذه الحالة التشوهية على الأشجار تسمى الأعراض حينئذ 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 التشطؤ Proliferation وهي زيادة نشوء النموات الجديدة لافرع النباتات النجيلية (الاشطاء) Sprouts .

c. **أعراض التقزم** :-

ينتج التقزم Stunting - Dwarfing عن تباطؤ نمو البنات المصاب فيصبح بأكمله أو بعض أجزاءه 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 تظهر على بعض أجزاء النبات كالأوراق أو الثمار مع احتفاظ بقية النبات بحجمه الطبيعي . أن أعراض التقزم إن لم تصاحبها أعراض تغيرات اللون أو التشوهات فانه ليس بالسهولة الكشف عنها أن 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 .

d. **أعراض الذبول** :-

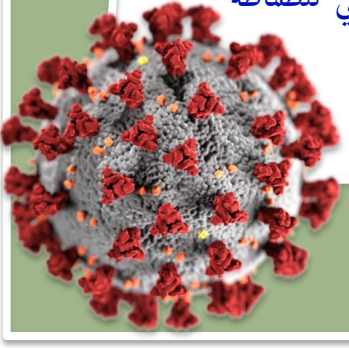
تسبب قلة من الفايروسات أعراض ذبول Wilt نتيجة إصابتها لأوعية الخشب أو اللحاء ومن أشهر حالات الذبول هي التي يسببها فايروس ترستيزا الحمضيات (CTV) الذي يسبب ذبولا سريعاً الأشجار الحمضيات حيث يهاجم منطقة التركيب في الساق الرئيسي ويقتل أوعية الحاء فيها مما يؤدي الى عدم وصول الغذاء في الجذور وموتها ثم موت الشجرة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



وهناك فايروسات ارتبط اسمها بالذبول ومنها فايروسي ذبول الباقلاء الأول والثاني (BBWV-2 BBWV-1) وفيروس الأصفرار التماوتي الباقلاء (FBNYV) قد تسبب بعض الفايروسات أعراض ذبول موضعية تسبب جفاف موضعيا لبشرة الأوراق وتسمى هذه الأعراض النقش او التنقر Etching الملحق 3 .

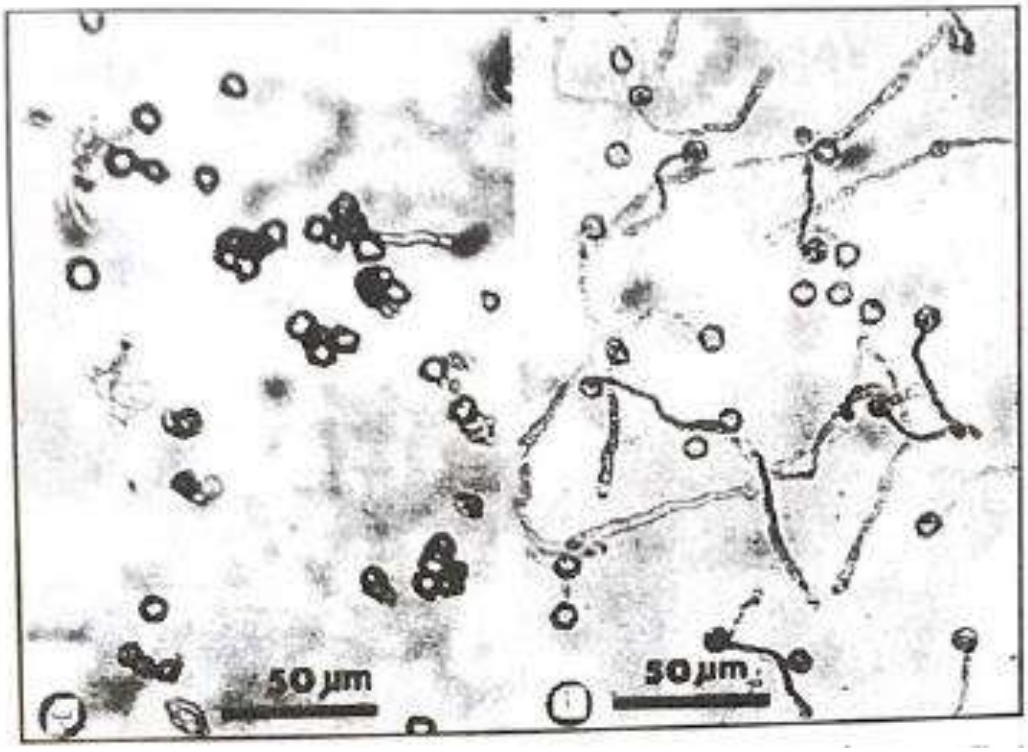
e. **أعراض موت النسيج (النكروزز)** :-

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 اصابة البطاطا بفايروس البطاطا واي (PVY) وخاصة السطح السفلي للاوراق والتي تمتد الى الأفرع أيضاء كذلك بسبب فايروس تكتل قمة البطاطا (PMTV) خطوط متماوتة في الدرنة ويلاحظ أن هناك علاقة طردية بين عمق موقع الخط البني في الدرنة وتركيز الفايروس في النبات, تسبب بعض الفيروسات حالات من موت الأنسجة في الجذور كما في إصابة البطاطا الحلوة بفايروس التبرقش الريشي للبطاطا الحلوه (SPFMV) حيث تظهر خطوط فلينية داخلية وتشققات خمرية اللون Russet cracks في الجذور، ومن اعراض موت النسيج الجذري المعروفة هي أعراض اسوداد الجذر Blackening الذي يسببه فيروس 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 الشهي Red delicious عند تركيبه على بعض الأصول حيث تصل حالة عدم توافق تركيبي Gran incompatibility تضعف منطقة التركيب سنة بعد أخرى لحين موت الشجرة ويطلق على المرض الخط البني Brown line disease أو تدهور التفاح الذي يسببه فايروس التبقع الحلقي للطماطة (ToRSV). الملحق 3

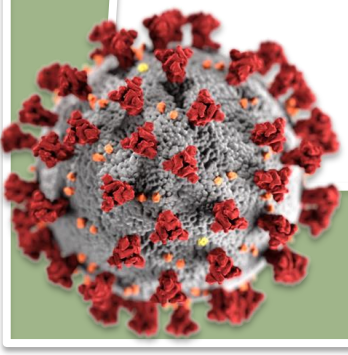


f. **أعراض متنوعة** :-

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 الموزايك التخططي للحنطة (WSMV) ارباك ورائي في النبات بسبب إصابته لحبوب اللقاح يؤدي إلى شذوذ وراثي بعد اخصاب الأزهار في الجيل الناتج فتظهر حالة "تأثير توزيع الشذوذ" Aberrant Ration effect وتسمى اختصارا ER Effect بسبب تثبيط انبات حبوب اللقاح (الشكل 1-5)، كما تسبب بعض الفايروسات موتا سريعا للنباتات وتعرف الحالة بالصدمة Shock



الشكل (1) تأثير الإصابة بفايروس التبقع الخلفي للتبغ (TRSV) على انبات حبوب لقاح نبات فول الصويا بعد 24 ساعة من وضعها في محلول السكروز تركيز 30% (1) التفاح السليمة (ب) اللقاح المصابة الفاقدة لأنابيب الإنبات



2) الأعراض الداخلية :-

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

أ- الأعراض على المستوى الخلوي :-

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

a. **تشوه أو تحلل عضيوات الخلية** :-

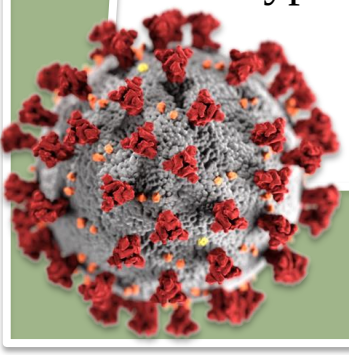
يقصد بعضيات الخلية Organelles المايتوكوندريا والبلاستيدات حيث تحصل تشوهات في المايتوكوندريا أو تتجمع وتتكتل كما هو الحال عند الإصابة بفيروس خشخشة التبغ (TRV)، كما تسبب العديد من الفايروسات تغيرات وتشوهات أو تحلل البلاستيدات وخصوصا مع الفايروسات المسببة لأعراض الموزائيك .

b. **تغيرات في الجدر الخلوية** :-

تمثل هذه التغيرات بزيادة في سمكها بسبب ترسيب الكالوس أو ظهور نتوءات داخلية على البطانة الداخلية للجدر ناشئة من البلازموديزماتا 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 بفايروس موزاتك التبغ (TMV) في منطقة البقع الموضعية .

3) 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 الـ Hyperplasia وحالات تضخم الخلايا Hypertrophy التي تؤدي الى تكون أورام و شفافية العروق .

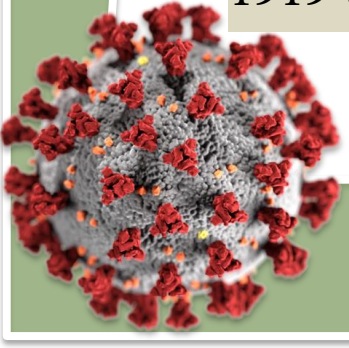


من الأعراض المهمة على المستوى النسيجي هي أعراض تأخر النمو او اعاقة التمر Hypoplasia والتي تلاحظ في الأنسجة المصابة بالموزائيك حيث تكون خلايا نسيج القشرة المصابة اقل تخصصا ويقل سمك النسيج المصاب عن السليم في المناطق الخضراء الداكنة في نفس الورقة، تعمل بعض الفايروسات على أعاقة نمو انابيب حبوب اللقاح المصابة كما يلاحظ أيضا حصول تغيرات نسيجية في انسجة الخشب مع بعض الإصابات الفايروسية حيث تظهر أشرطة خشبية مشبعة باللكنين تسمى Endocellular cardoons كما في إصابة العنب بفايروس الورقة المروحية للعنب (GFLV)، كما يسبب فايروس التقزم الأصفر الشعير (BYDV) وبعض فايروسات الاصفرار تكوين التايلوسات Tylosis في أوعية الخشب وكذلك موت خلايا اللحاء وتحللها وتراكم الكالوس على الصفائح الغربالية لأنسجة اللحاء .

وجد أن الأورام التي يسببها فيروس التورم الجرحي (WTV) سببها النشاط المرستيمي المفرط للحاء الخلايا البارنكيمية أما الأورام التي يسببها فايروس تورم أفرع الكاكاو (CSSV) فهي متسببة عن الإفراط في تكوين انسجة الخشب .

الأجسام الضامة الفايروسية :

يعد ظهور الأجسام المضادة inclusion bodies من الظواهر المهمة التي تصاحب معظم الأصابات 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 اصابة النبات بالفايروس لأنها لا تظهر مع بعض أنواع الفايروسات، عرفت هذه الأجسام لأول مرة من قبل إيفانوفسكي سنة 1903 عند دراسته لفايروس موزائيك التبغ (TMV) في خلايا نبات التبغ، ودرسها أيضا ماتز (Matz) سنة 1919 وكنكل (Kunkel) سنة 1921 .

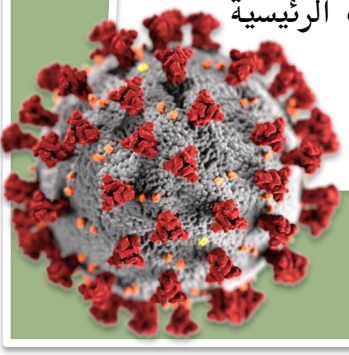


و اعتقدوا أنها بروتوزوا أو تراكيب ناتجة عن المثال العمليات الفسلجية في الخلايا المصابة .

تختلف الأجسام الضامة عما يحيطها من سايتوبلازم و عضيوات 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 يكون فايروس موزائيك 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.

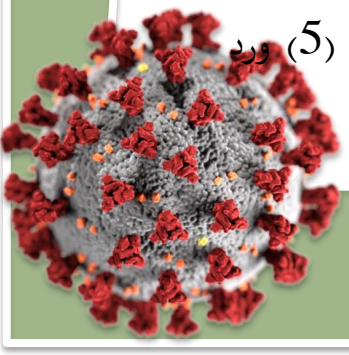
ان الأجسام الضامة هي ليست مجرد نواتج عرضية By - products للإصابات الفايروسية بل قد تشارك في تخليق الفايروس أو منتجاته، ولقد ساهمت دراسة هذه الأجسام سواء من ناحية شكلها وتركيبها وطريقة تطورها في خلايا العائل في فهم آلية الإصابة فضلا عن أهميتها في تشخيص الفايروسات وخاصة في الإصابات الخليطة للنباتات بأكثر 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 *Polerovirus , Begomovirus* في الخلايا البارانكيمية 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 اساسية لتصنيف 31 مجموعة فايروسية عند بداية عمل اللجنة ثم اعمتدت في التقرير التصنيفي الذي تشر سنة 1992 كاحد 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 الأصابة لحين وصولها لمرحلة النضج، كما توفر 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 خفيفة فيما تجد 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 بالمجهز الضوئي خصوصا عند صبغها وأن أفضل قوة تكبيرية لفحصها ومعرفة خصائصها في 1000 مرة واستعملت العديد من الصبغات النسيجية الخلوية لمشاهدة الأجسام الضامة وفحصها بالمجهر الضوئي ومنها صبغة الأزور AZURE 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 فإن استعمال أنواع مختلفة من الصبغات في الوسيلة الأصل 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 ان تؤخذ الصفات الآتية بنظر الاعتبار (1) شكل الجسم الضام (2) تركيبة هل هو بروتيني ام نيوكليوبروتيني (3) موقعة داخل الخلوي هل هو في السايتوبلازم أم في النواة (4) موقعه النسيجي في اللحاء أم في البارانكيما (5) ورد فعله اللوني Color reaction اتجاه الصبغات المستعملة .



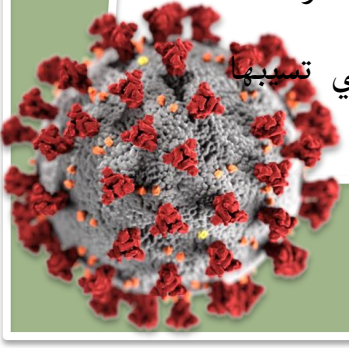
وضعت العديد من التصانيف للأجسام الضامة وذلك بسبب التنوع الكبير في أنواع الأجسام الضامة بتنوع الفايروسات التي تكونها، وعموماً تقسم الأجسام الضامة الفايروسية الى :

a. **الأجسام الضامة النووية** :

توجد الأجسام الضامة النووية Nuclear inclusions في نوى الخلايا أو في منطقة الكاريوبلازم فتسمى Nucleoplasmic inclusions وتأخذ اشكالا عدة قد 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 الأجسام الضامة الطرفية النووية Perinuclear inclusionوهي التي تلاحظ مع فايروسات Rhabdoviruses او 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 او عصوية أو بلورية فتسمى الجسم التابع Satellite body وهي أجسام كثيفة معتمة حبيبية بروتينية يتراوح قطرها بين 18–20 نانومتر وقد تحوي كميات ضئيلة من الرنا الفايروسي وهذا يلاحظ مع الإصابات التي يسببها فايروس موزائيك البنجر (BtMV) فايروس الكومفرينا GOV

b. الاجسام العامة السايتوبلازمية

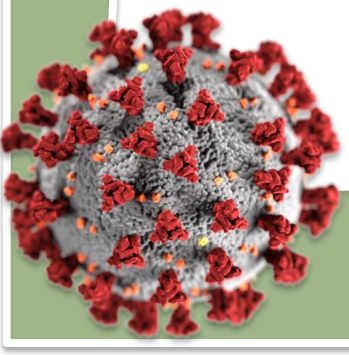
تضم الاجسام الضامة السايتوبلازمية (Cytoplasmic inclusions)1 اجساما مكونة من تجمع لجسيمات فايروسية قد تظهر بشكل حزم ليفية خيطية كما في الإصابات التي تسببها

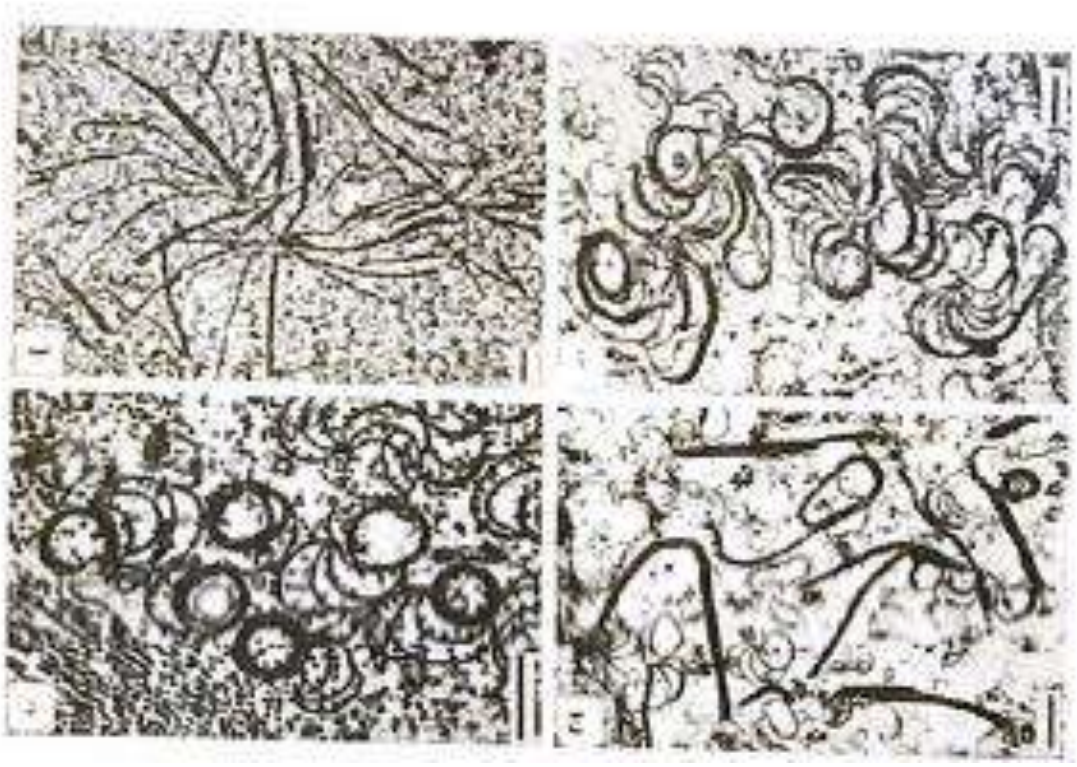


فيروسات الجنس Potyexvirus فايروس موزائيك التبغ والذي قد يكونها أيضا بشكل تجمعات أبرية أو شبه بلورية أو بشكل بلورات سداسية

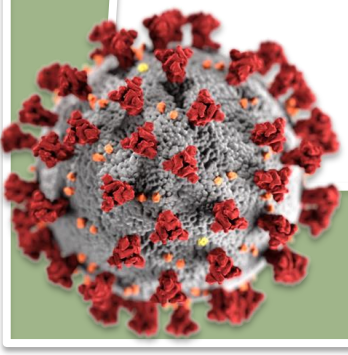
حيث تصطف الجسيمات الفايروسية بشكل متوازي وتكون كل طبقة بسمك جسيمة فايروسية واحدة (2) أجسام ضامة بروتينية تظهر بانواع عديدة فقد تكون بشكل أجسام حبيبية غير متبلروة كثيفة محاطة بالشبكة الأندوبلازمية كما في حالة الأصابة بفايروس الموزائيك الأصفر للبرسيم (CIYMV) و يعتقد لها تزود الفايروس ببروتينات الكابسيد أو تظهر بشكل أجسام لولبية لفيفة تسمي أجسام دولاب الهواء Pinwheels المميزة الشكل فهي ذات اذرع تنبثق من مركز واحد وهي تصاحب كل فايروسات عائلة Potyviridae، وقد تظهر بشكل اهليجي كما عند الإصابة بفايروس الموزائيك التخططي للحنطة (WSMV)، وأن وجود هذه الأجسام قرب البلازموديزماتا يدل على أنها تلعب دورا بتوفير البروتين المتخصص اللازم لنقل الفايروسات عبر الخلايا .

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 بفيروس 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 انواع الأجسام الضامة وقد تكون في الموقع الفعال لتجميع الفايروسات في الخلايا حيث تمتاز بتركيبتها الحويصلية الغشائية واحتوائها على أجسام خيطية قد تكون قطعا من الأحماض النووية لازالت وظيفة الأجسام الضامة في الإصابات الفيروسية غير واضحة ولكن يعتقد أنها تلعب دورا في تجميع الفايروسات اي تغليف الحامض النووي الفيروسي بالغطاء البروتيني وربما يكون لها وظائف أخرى.





الشكل (2) اشكال مختلفة للأجسام الضامة اللولبية اللفيفة Pinwheels التي تكونها انواع من فايروسات البوتي Potyviruses(أ) الأجسام اللفيفة لفايروس غيرمشخص في أوراق الرغيلة Chenopodium quinoa (ب) في أوراق التبغ (ج) اجسام لفيفة وتجمعات صفائحية يكونها فايروس البطاطا واي (PVY) في أوراق التبغ (د) أجسام لفيفة لفايروس موزائيك الشلغم (TUMV) في نبات التبغ الشريط يساوي 200 نانومتر.



محاضرة رقم (5)

اشكال وهيكلية الفايروسات النباتية

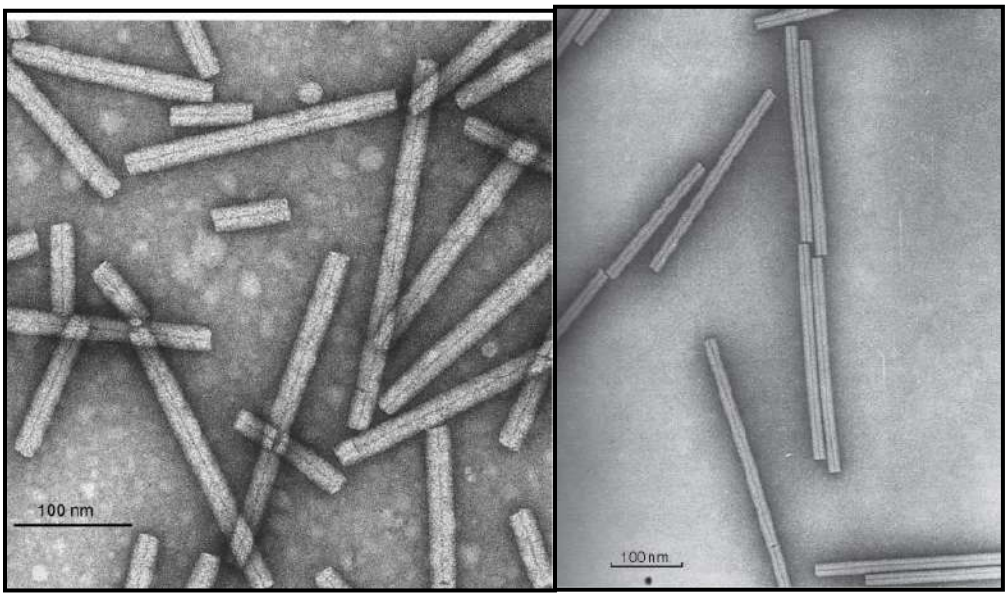
أشكال وهيكلية فايروسات النبات

. أشكال الفايروسات

تمتلك فايروسات النبات الأشكال الظاهرية Formsالتالية 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).



(أ) (ب)

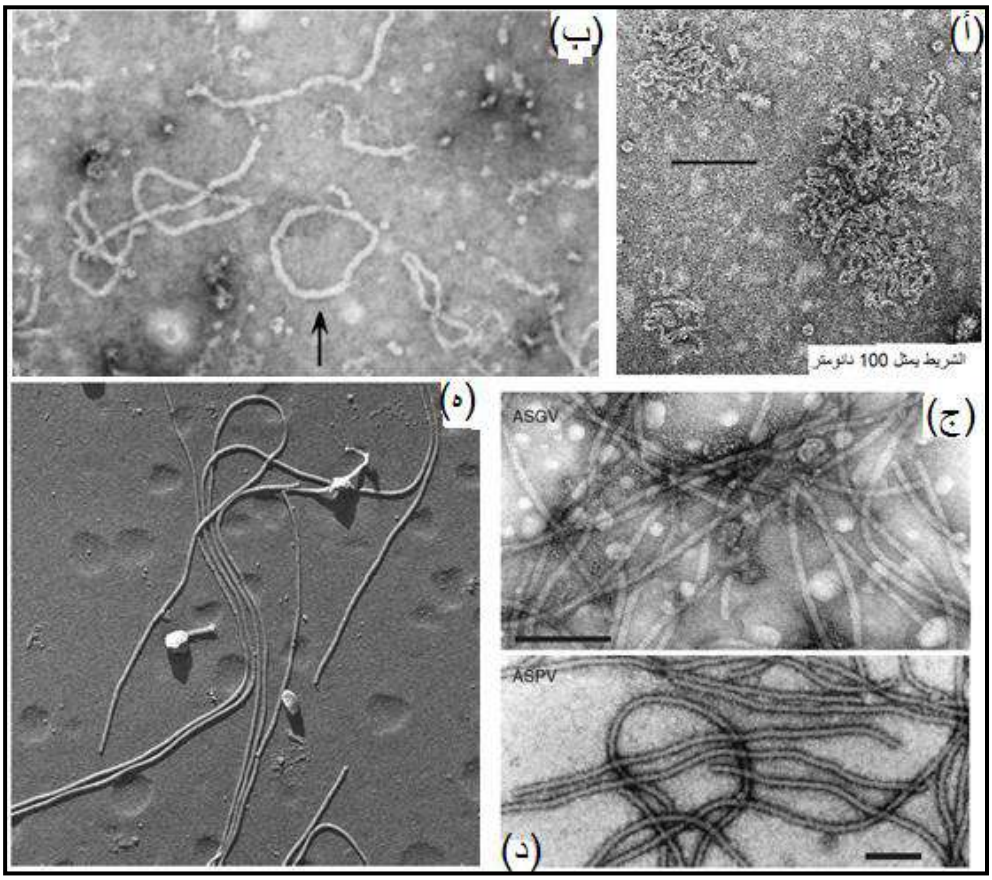
الشكل (4-1): الجسيمات الفايروسية العصوية الصلدة الأنبوبية المشاهدة بالمجهر الإلكتروني والمصبوغة بطريقة الصبغ السالب (أ) لفايروس موزائيك التبغ (TMV) (ب) لفايروس الإصفرار التماوتي لعروق البنجر(BNYVV).

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 أطوالهما إلى 2000 و 1200 نانومتر على التوالي، تتراوح أطوال هذه الفايروسات بين 650-750 وقطر 13 نانومتر، (الشكل 4-2).

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.

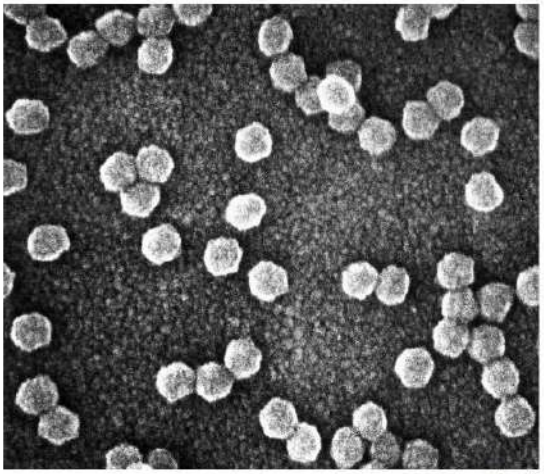


الشكل(4-2): الجسيمات العصوية المرنة المصورة بالمجهر الالكتروني لخمسة أنواع من الفايروسات هي (أ) اجسام خيطية غريبة لفايروس غير مشخص يعود للجنس Ophiovirus معزول من نباتات خس (ب) فايروس الورقة البيضاء للرز(RHBV) (ج) فايروس تشقق ساق التفاح (ASGV) (د) فايروس تنقّر ساق التفاح (ASPV) (ه) جسيمات فايروس البطاطا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

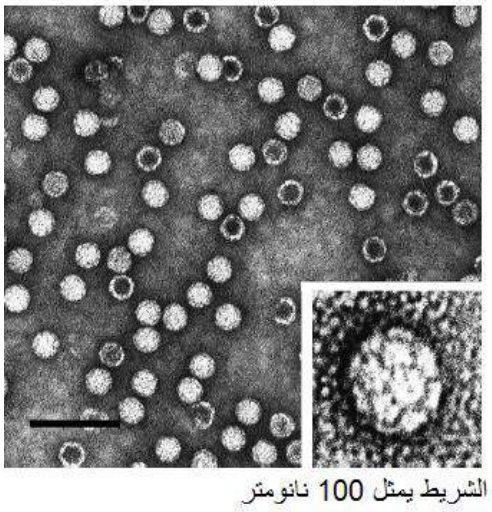
الشكل مقتبس من Mahy وVan Regenmortel (2008).

3.1.4. الفايروسات الآيزومترية

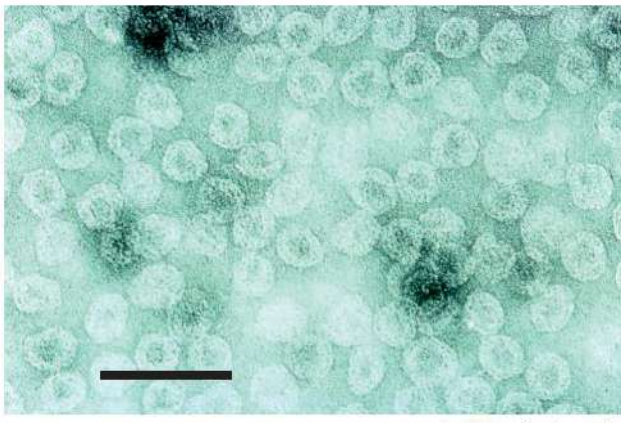
تمتاز الفايروسات الآيزومترية Isometrical viruses والمسماة أيضا الفايروسات الكروية Spherical viruses أو الفايروسات البلوريةPolyhedral viruses أو الفايروسات العشرينية الأوجه Icosahedral viruses بشكلها البلوري المنتظم المغلق، وتتباين أقطارها بين 25-50 نانومتر وهي تشكل نسبة كبيرة أيضا من أنواع فايروسات النبات،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



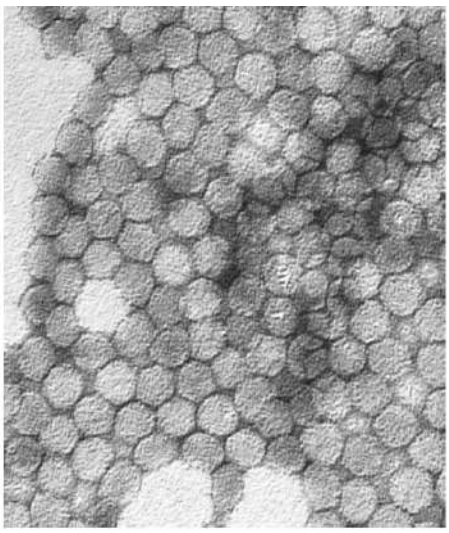
(أ)



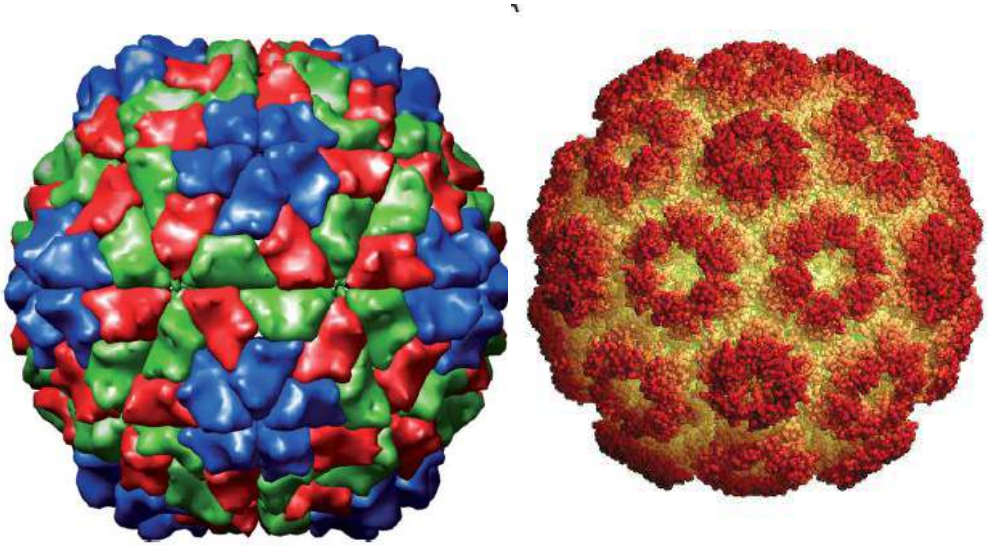
(ب)



(ج)



(د)



(ه) (و)

الشكل(4-3): أنواع من الفايروسات الآيزومترية (أ) الجسيمات البلورية لفايروس التقزم الاصفر للشعير(BYDV) (ب) فايروس تبرقش البيلادونا (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) (ه) 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.

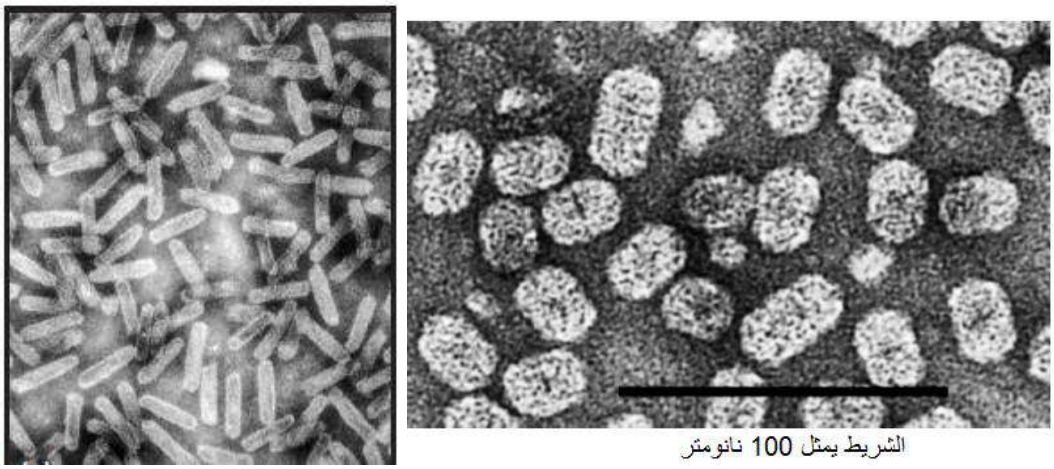
الشكل مقتبس من Mahy وVan Regenmortel (2008).

4.1.4. الفايروسات الباسيلية

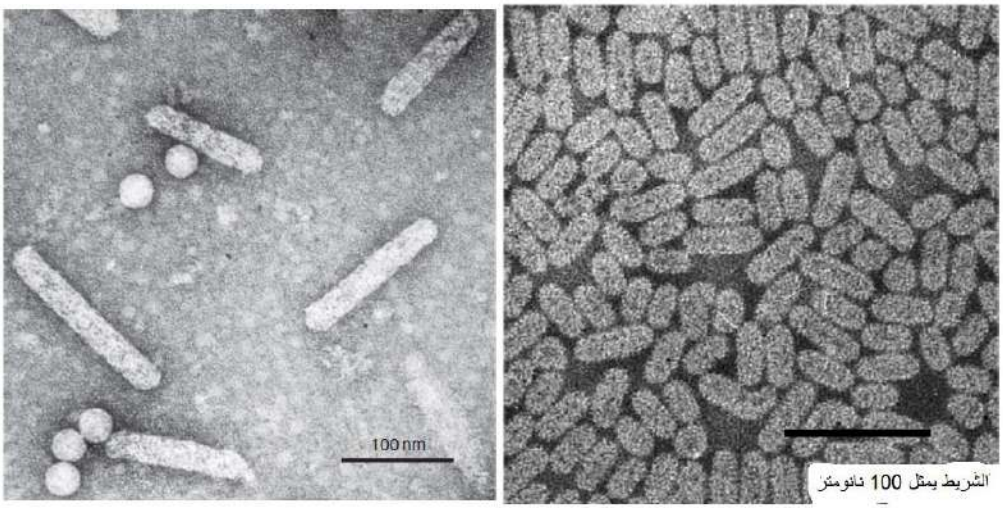
تمتاز الفايروسات الباسيلية Bacillus viruses بشكلها الأنبوبي العصوي القصير مع نهايات مكوَّرة بشكل نصف دائري، وتتباين في أطوالها وأقطارها حسب نوع الفايروس ومن أمثلتها فايروس موزائيك الجت(AMV) وأفراد الجنس *Badnavirus* بأبعاد 130 ×30 نانومتر، (الشكل 4–4).

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).



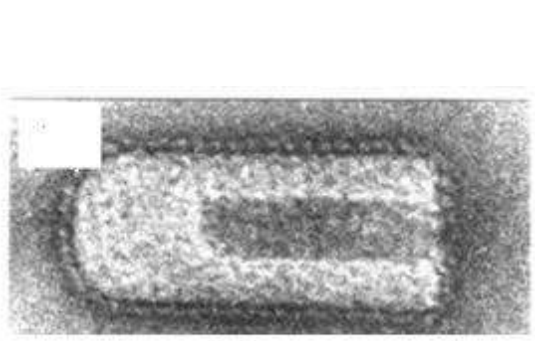
(أ) (ب)

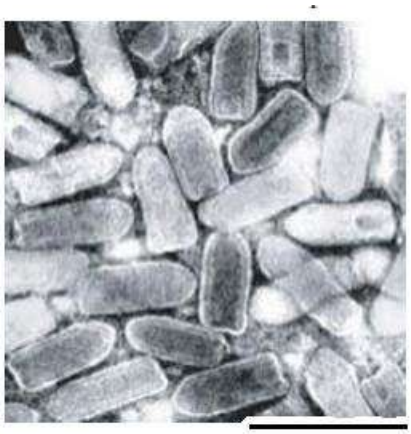


(ج) (د)

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 وVan Regenmortel (2008) و Carter و Saunders (2007).





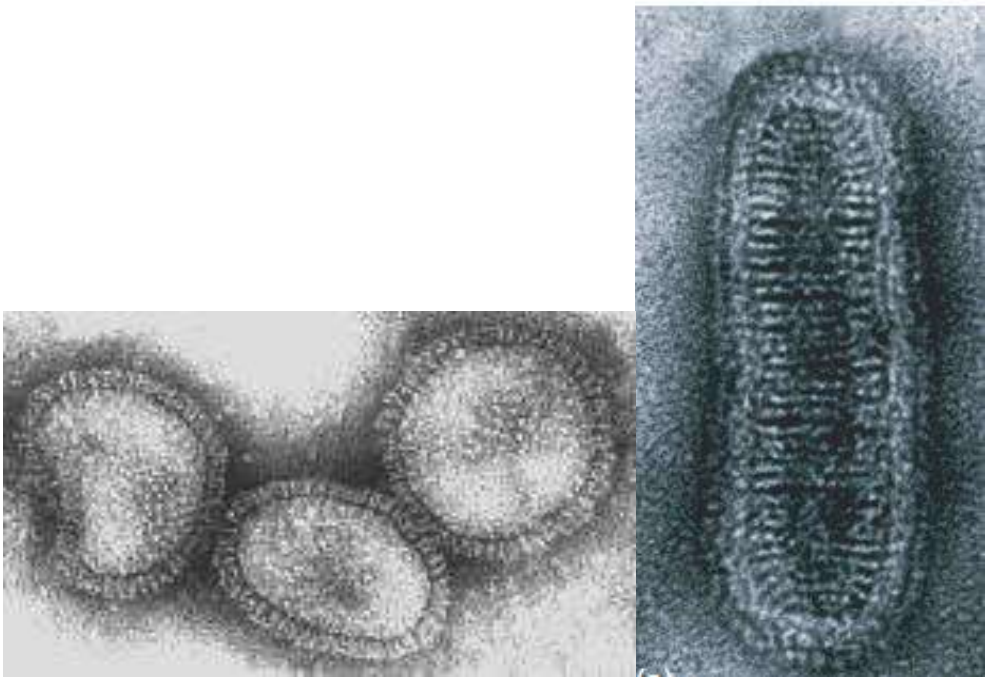
(أ) (ب)

الشكل (4–5): الجسيمات الشبيه بالاطلاقة المكورة من جهة والمستقيمة من الجهة الأخرى (أ) لفايروس الاصفرار التماوتي للخس (LNYV) (ب) لفايروس التبقع الأحمر لأوراق الليليا (LRLV)، (الشريط يمثل 100 نانومتر).

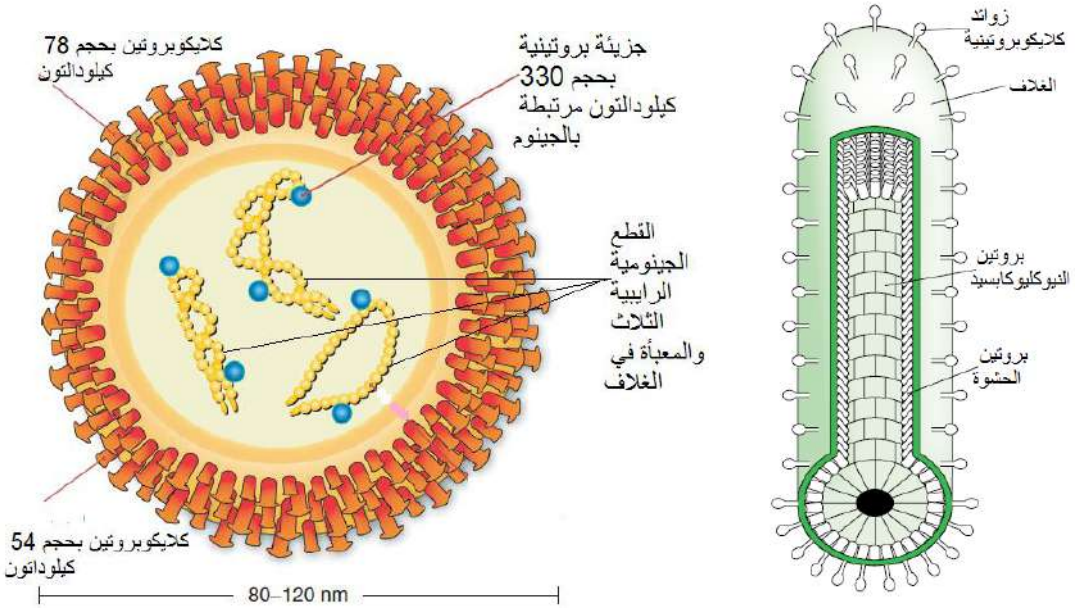
الشكل مقتبس من Carter و Saunders(2007) وMahy وVan Regenmortel (2008).

6.1.4. الفايروسات المغلَّفة

الفايروسات المغلَّفة Enveloped viruses هي فايروسات معقدة التركيب تمتلك غلافا إضافيا Envelope ليبوبروتيني يحيط بالكابسيد البروتيني الذي قد يأخذ شكلا مغايرا أحيانا للغلاف الخارجي، ومن أهم أمثلتها الأنواع التابعة لعائلة Rhabdoviridae التي تمتلك جسيماتها غلافا باسيليا 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 الأشكالPleomorphic ذات أشواك كلايكوبروتينية خارجية منطمرة في غلاف ليبيدي مزدوج، (الشكل4-6). ونظرا لتماثل أغلفة هذه الفايروسات تركيبيا مع الأغشية الخلوية الليبيدية المزدوجة المغلفة للعضيوات الخلوية لذا إقترح الباحثون أن الفايروسات المغلَّفة تكتسب أغلفتها من الأغشية الخلوية الليبيدية المزدوجة وذلك خلال عبورها لها أثناء حركتها في الخلية بآلية التبرعم، الشكل (4-7).



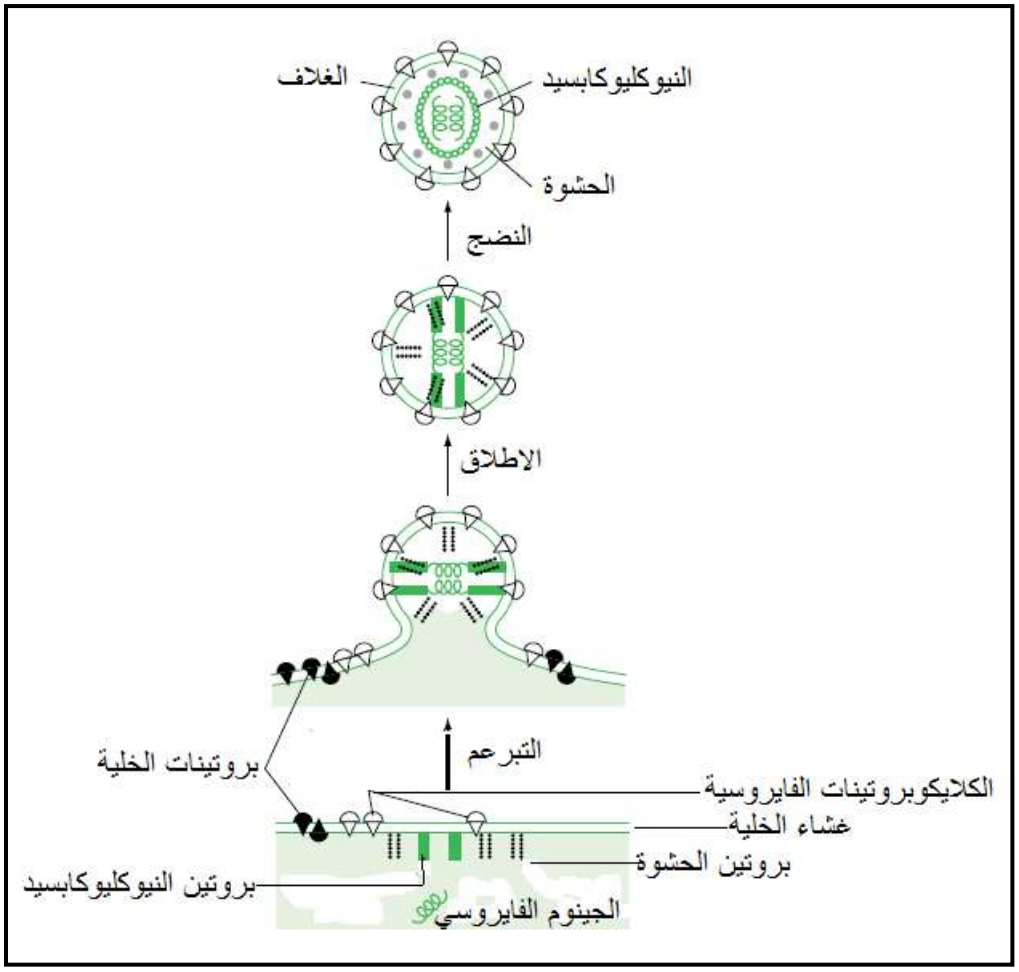
(أ) (ب)



(ج) (د)

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 وVan Regenmortel (2008) و Cann (2005).



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

الشكل مقتبس من Cann (2005).

(المحاضرة السادسة)

العدوى بالفايروسات وحركة الفايروسات داخل النبات :-

العدوى هي دخول الفايروس الى خلية النبات العائل والتكاثر فيها لانتاج جيل من الفايروسات التي قد تبقى في الخلية أو تنقل الى الخلايا الأخرى، وان مجرد دخول الفايروس الى الخلية لا يعني العدوى الكاملة .

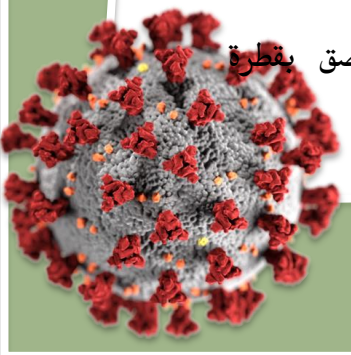
تختلف طبيعة الفايروسات في تكاثرها عن بقية الكائنات الخلوية التي تتضاعف بانقسام الخلية الناتجة في حين تختلف الحالة في الفايروسات حيث أنها بعد دخولها الى خلية العائل تتجزأ كلياً أو جزئياً الى مكوناتها الاساسية وهي الحامض النووي و البروتين. ثم تترجم العوامل الوراثية للفايروس بواسطة جهاز الترجمة الخاص بخلية العائل الى بروتينات جديدة بضمنها الانزيمات الضرورية لتكاثر الفايروس ثم يتم تصنيع الحامض النووي الخاص بالفايروس ويتحد البروتين الخاص بغلاف الفايروس مع الحامض النووي مكوناً فايروسات جديدة .

أولا: دخول الفايروس إلى الخلية :-

تدخل الفايروسات الى الخلية من خلال الجروح الدقيقة التي تحدث أما بواسطة الكائنات الناقلة للفايروسات مثل الحشرات والعناكب و النيماتودا – الفطريات او عن طريق النقل الميكانيكي بالاحتكاك

أن العدوى لا تحدث الا من خلال الجروح تنفذ من خلالها الفايروسات الى الخلية أما العدوى الميكانيكية تحدث نتيجة الجروح التي تحدث في خلايا البشرة أو الشعيرات على سطح الورقة.

فقد لوحظ ايضاً انه جرح شعيرة من الشعيرات الموجودة على سطح الورقة بطريقة ما تفرز فيها قطرة صغيرة جداً من البروتوبلازم التي لا تلبث أن تنسحب مرة أخرى الى ..خلية الشعيرة دون أن يودي ذلك الى موت الخلية فاذا كانت جسيمات الفايروس موجودة في منطقة الجرح فانها ستلتصق بقطرة البروتوبلازم وتدخل معها الى الخلية .



تشير بعض البحوث الى دور Ectodesmata وهي خيوط بلازمية plasmodesmata التي تمتد في الجدار الخارجي لخلايا بشرة اوراق النبات لها دور في دخول الفايروس الى خلايا النبات اثناء عملية التلقيح الميكانيكي للورقة.

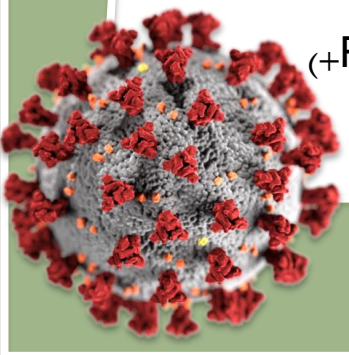
تعتبر عمليه pinocytosis من الطرق الهامة لدخول الفايروسات الحيوانية الى خلايا عوائلها، ولكن لم تلق هذه الطريقة أهتماماً يذكر بالنسبة الفايروسات النباتية لكن وجد cocking 1970 عند دراسته عدوى بروتوبلاست خلايا ثمار الطماطة بفايروس موزايئك التبغ فان الفايروس يرتبط بسطح الاكتوبلاست في تجاويف صغيرة به ثم لا تلبث ان تظهر الجزيئات الفايروسية أخيراً فيما يشبه الفجوات البينوسيتوزية في السايتوبلازم يعقبها تضاعف الفايروس في الخلايا.

ثانياً : تكاثر الفايروس داخل النبات العائل :-

1. نزع الغلاف البروتيني عن الحامض النووي للفايروس: هي أول الخطوات بعد دخول الفايروس الى الخلية وتتم هذه العملية بصورة تدريجية بازالة الوحدات البروتينية من الغلاف ويتم ذلك بمساعدة خلية النبات العائل لعدم وجود اي انزيمات في جسيمة الفايروس النباتي.
2. تضاعف الحامض النووي الفايروسي: نظراً لكون الحامض النووي لمعظم فايروسات النبات هي من نوع RNA الاحادي الخيط لذا سنبين **الخطوات الاتية لتضاعف هذا الحامض النووي RNA في خلايا العائل:**

أ- ترجمة العوامل الوراثية على جزء من الحامض النووي لتصنيع الأنزيمات الخاصة بتضاعف الحامض النووي معها (RNA replicase) ..

ب- استنساخ خيط سالب يسمى الخيط الشقيق السالب Minus complementary strand على خيط الحامض النووي الكامل للفايروس والذي يسمى عادة بالخيط الموجب (+RNA)



وبمساعدة الانزيم Replicase و انزيمات أخرى، ونتيجة لذلك يتكون RNA ثنائي الخيط أحدهما الحامض النووي الاصلي للفايروس(RNA+) والثاني هو الخيط الشقيق (RNA–) ويطلق على هذين الخيطين معاً الشكل التناسخي (RF) Replicative form

ت- ينفصل الخيط التناسخي RF عن بعضها ويعمل الخيط السالب (RNA–) كقالب Template لانتاج العديد من الخيوط الموجبة عليه بمساعدة أنزيمات عديدة .

* ان موقع تضاعف الحامض النووي وخصوصاً لفايروس TMV لكثرة التجارب عليه هو النواة وخصوصاً النوية Necleolus وبعد تكوين الخيوط الموجبة تنفصل تاركا النوية والنواة الى السايتوبلازم حيث يتم تمثيل البروتين الفايروسي .

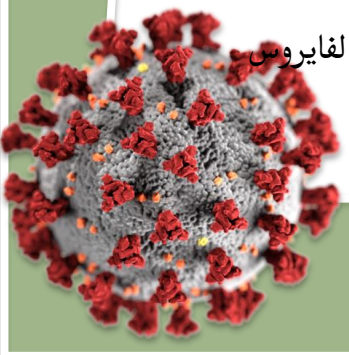
3. تصنيع البروتينات الخاصة بالفايروس :

يصنع البروتين الفايروسي في السايتوبلازم بواسطة RNA الفايروسي (+) الذي يقوم بدور mRNA وباستخدام الاحماض الامينية والرايبوسومات و tRNA فانه يتم تكوين تحت الوحدات البروتينية التي تستخدم في تكوين الغطاء البروتيني.

وبعد ان يتم تصنيع الحامض النوري الفايروسي الجديد ، وكذلك تحت الوحدات البروتينية الفايروسية الجديدة فان تحت الوحدات البروتينية تنتظم حول الحامض النووي ويكونان معاً الجزئ الفايروسي الكامل المسمى Virion وهناك آراء مختلفة حول آلية تجميع واتحاد اجزاء الفايروس داخل الخلية وكذلك مكان التجميع لا تزال طور البحث .

حركة الفايروسات داخل النبات المصاب :-

هناك ارتباط بين تحرك الفايروس داخل النبات وبين أصابة هذا النبات, لكي تحدث الإصابة فانه يلزم أن يتحرك الفايروس وينتشر داخل النبات بين الخلايا وبعضها وبعد ان يتم تضاعف الفايروس داخل خلية العائل فانه عادة ما تتواجد الجزيئات الفايروسية متجمعة في أجسام أمورفية



أو بلورية أو تتواجد متفرقة في السايتوبلازم والنواة . وتقسم حركة الفايروسات داخل النبات المصاب الى ثلاث أنواع :

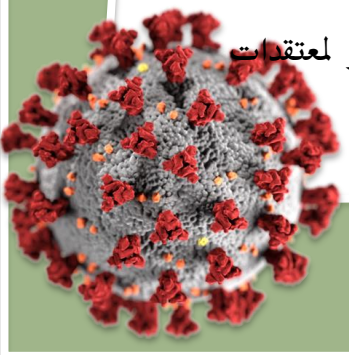
1. **الحركة داخل الخلية الواحدة** :-

تتحرك الفايروسات أو مكوناتها المصنعة داخل الخلية مع حركة السايتوبلازم الى اماكن تمثيل وتجميع الحامض النوري والبروتين الفايروسي وقد تنتقل بعض الفايروسات وبشكل خاص الكروية من السايتوبلازم إلى النواة من خلال فتحات الغشاء النووي وبتأثير الاختلاف في الضغط الانتشاري (Diffusion pressure).

2. **الحركة من خلية إلى أخرى** :-

أن الفايروسات تحمل بواسطه السايتوبلازم من خلية الى اخرى عبر القنوات البلازمية Plasmodesmata و تختلف هذه الخيوط باختلاف النباتات وعموماً تتراوح أقطارها nm(200 20–) وهذا يسمح بمرور معظم الفايروسات ولكون الفايروسات لا تمتلك القدرة على الحركة فلهذا تعتمد على حركة السيتوبلازم مدعوماً بعملية الانتشار Diffusion .. تفصل بين كل خليه والخلايا الأخرى جدران خلوية، أقطارها او ابعادها dimentions اكثر بكثير من حجم معدل الفريونات مثلا (TMV–300nm) هذا يعني أن خلايا النبات منيعة بشكل فعال ضد الفايروسات وحتى لاكلات البكتريا phages.

خلايا النبات الحية تتصل داخليا من طريق planadesmate وهي تراكيب معقدة من الاغشية المرتبطة مع الشبكة الإندوبلازمية Endoplasmic reticulum الداخلية وهذه القنوات الداخل خلوية (بوابات gates)، التي تحدد مرور الجزيئات بين الخلايا وهناك بروتينات خاصة بالفايروس تتداخل مع plasmodesmata لكي تزيد حجم الفتحات لتسمح بمرور لمعتقدات nucleoprotein الفايروسي من المرور .



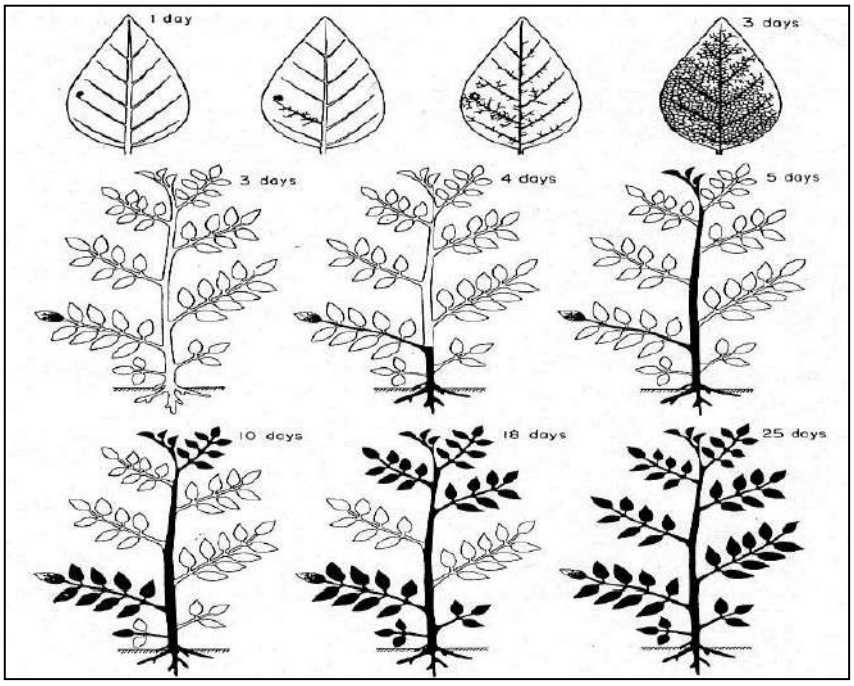
كل الفايروسات التي تصيب النبات تمتلك واحد او اكثر من جينات بروتين الحركة

movement – related protein gene (MP)

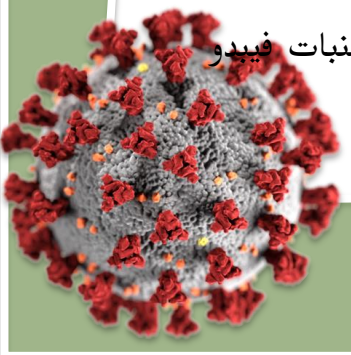
3. **حركة الفايروسات في الأوعية الناقلة** : Long-distance Movement

قام Samuel 1934 ببعض التجارب لدراسة تحرك TMV خلال نبات الطماطة وذلك عن طريق تلقيح وريقة طرفية لبنات طماطة وتتبع مسار الفايروس في الاجزاء المختلفة للنبات على فترات مختلفة وقد اتضح ان الفايروس يتحرك ببطء في الورقة المعداة تم يتحرك في أتجاه الجذور عن طريق اللحاء ثم يتجه بعد ذلك الى الاوراق الحديثة النمو في القمة النامية. بعدها ينتقل الى جميع أجزاء النبات.

في حالة النباتات الصغيرة جداً فان جميع الأوراق تصبح مصابة بعد وقت قصير من التلقيح للاوراق الفتية، أما النباتات الكبيرة فان الاوراق المتقدمة في العمر لا تظهر فيها الاصابة حتى بعد مرور مدة من الزمن .



ان تواجد الفايروس في نسيج اللحاء يؤدي الى انتشاره جهازياً خلال النبات وينتقل الى الخلايا البرنكيمية المجاورة لخلايا اللحاء وان معظم الفايروسات تتحرك في أوعية اللحاء بالاضافة الى أن هناك قسم من الفايروسات تتحرك داخل أوعية الخشب xylem مثل فايروس موزائيك الفاصوليا الجنوبي Southern bean mosaic virus اما طبيعة الجزيئات التي تتحرك داخل الاوعية الناقلة للنبات فيبدو ان الفايروسات تتحرك في شكل جيسمات متكاملة.



محاضرة رقم (7)

استجابة النباتات العائلة للاصابة 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 المضيّفي)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 فأن 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 اغلب 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 المتمايزة 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 فان الفايروس قد يستمر بالانتشار خارج البقعة إلى الخلايا المجاورة ليصبح لاحقا جهازي 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 وان كان هو الأكثر شيوعا بل يمكن أن تظهر بدرجة اقل على الجذور والبذور مصاحبة لبعض الإصابات الفايروسية، كذلك فان 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 اللونDiscoloration 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 تكتل وتحلل كلوروبلاستات الخلايا المصابة ويعتقد أن الإصابة بالموزائيك تحصل في وقت مبكر من نشوء الورقة حيث يصيب الفايروس الخلايا المنشأة للورقة وقبل تطور وانبساط النصل، عليه فالخلايا الأولية المصابة ستعطي المناطق المصابة بعد انبساط 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 تتطور لاحقا الى موزائيك كما تصاحب أعراض الموزائيك الشديد عادة أعراض "التَنَفُّط"Blistering وهي بروز المناطق الخضراء الداكنة للنصل وتقببها بشكل "فقاعات" Blisters وانخفاض مستوى المناطق المصفرة المصابة وذلك بسبب توقف نموها واستمراره في المناطق السليمة من النصل.

من أعراض تغيرات اللون المهمة هي "التبرقش"Mottle , Mottling 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 رفيعة الأوراق ذات التعريق المتوازي الطولي أو العرضي، أعراض "التخطط"Streak وهي خطوط مصفرة تمتد طوليا أو عرضيا حسب نوع التعريق وبشكل متقطع بموازاة عروق الورقة، وإذا كانت الخطوط مستمرة يطلق على التخطط مصطلحStripe أو Striate.

وتعد أعراض الاصفرارYellowing 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 اقل 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 التيوليب والمتسببة عن الإصابة بفايروس الإنفصال اللوني للتيولب (TBV) ويسبب فايروس الموزائيك الشديد للسوسن(ISMV) و فايروس موزائيك الخيار(CMV) أعراض موزائيك على بتلات أزهار السوسن والأوركيد والكلاديولس مما يؤثر على قيمتها التسويقية. كذلك تظهر أعراض تغيرات اللون على ثمار العديد من أنواع النباتات ومنها تلون ثمار الطماطة عند الإصابة بفايروسي موزائيك الطماطة (ToMV) والذبول المبقع 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) "تجعد الأوراق" Leaf curling , Cupping إذ يتجعد النصل بسبب خلل في النظام الوعائي وخاصة اللحاء ويعاق نقل المواد الغذائية في الأوراق وتتجمع فيها فيتجعد 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) "التجعد الشديد للأوراق Rugosity هو تشوه وتجعد 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 والتنفط (5) "البروزات الورقية" Enations هي نموات ورقية زائدة تنبثق من عروق السطح السفلي للاوراق المصابة وتكون إما بشكل نموات خلوية غير منتظمة تسمىHistoid 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 الأزهارAbortion 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 "التشطؤ" 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 أجزاؤه اقل 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

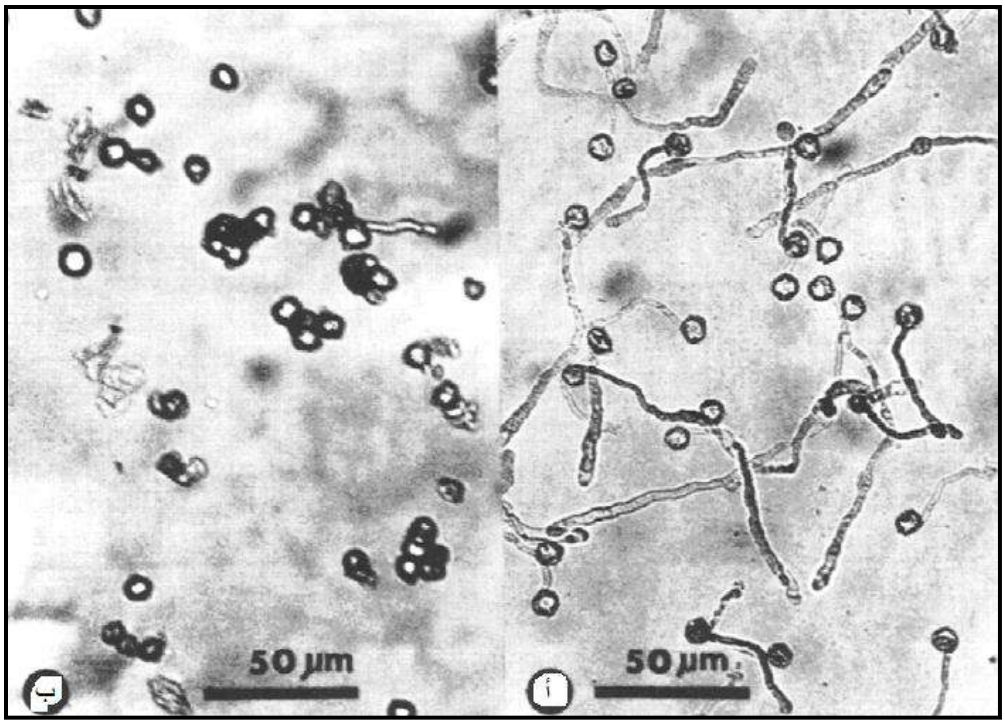
"التدهور السريع" وهناك فايروسات ارتبط اسمها بالذبول ومنها فايروسي ذبول الباقلاء الاول والثاني (BBWV-2 , BBWV-1) وفايروس الأصفرار التماوتي للباقلاء (FBNYV) كما تسبب بعض الفايروسات أعراض ذبول موضعية تسبب جفافا موضعيا لبشرة الأوراق وتسمى هذه الأعراض "النقش أو التنقُّر" Etching، (الملحق 3).

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 متماوتة 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 خمرية 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 الشهي" Red delicious عند تركيبه على بعض الأصول حيث تحصل حالة عدم توافق تركيبي 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 التبقع 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 التخططي للحنطة (WSMV) إرباك وراثي في النبات بسبب إصابته لحبوب اللقاح يؤدي إلى شذوذ وراثي بعد إخصاب الأزهار في الجيل الناتج فتظهر حالة "تأثير توزيع الشذوذ"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 التبقع 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 عضيوات الخلية

يقصد بعضيوات الخلية Organelles المايتوكوندريا والبلاستيدات حيث تحصل تشوهات في المايتوكوندريا 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 البلازموديزماتا 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 بفايروس موزائيك 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 بالموزائيك 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 أعاقة نمو أنابيب حبوب اللقاح المصابة كما يلاحظ أيضا حصول تغيرات نسيجية في أنسجة الخشب مع بعض الإصابات الفايروسية حيث تظهر أشرطة خشبية مشبعة باللكنين تسمى Endocellular cardoons كما في إصابة العنب بفايروس الورقة المروحية للعنب (GFLV)، كما يسبب فايروس التقزم الأصفر للشعير (BYDV) وبعض فايروسات الاصفرار 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 البارانكيمية أما الأورام التي يسببها فايروس تورم أفرع الكاكاو (CSSV) فهي متسببة عن الإفراط في تكوين انسجة الخشب.

3.1.5. الأجسام الضامة الفايروسية

يعد ظهور الأجسام الضامةInclusion 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 1921واعتقدوا أنها بروتوزوا أو تراكيب ناتجة عن اختلال العمليات الفسلجية في الخلايا المصابة.

تختلف الأجسام الضامة عما يحيطها من سايتوبلازم وعضيوات 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 (ClYMV) 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 لان 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 البارانكيمية 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 "الآزور" 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 السايتوبلازم أم في النواة (4) موقعه النسيجي في اللحاء أم في البارانكيما (5) رد فعله اللوني Color reaction اتجاه الصبغات المستعملة.

وضعت العديد من التصانيف 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

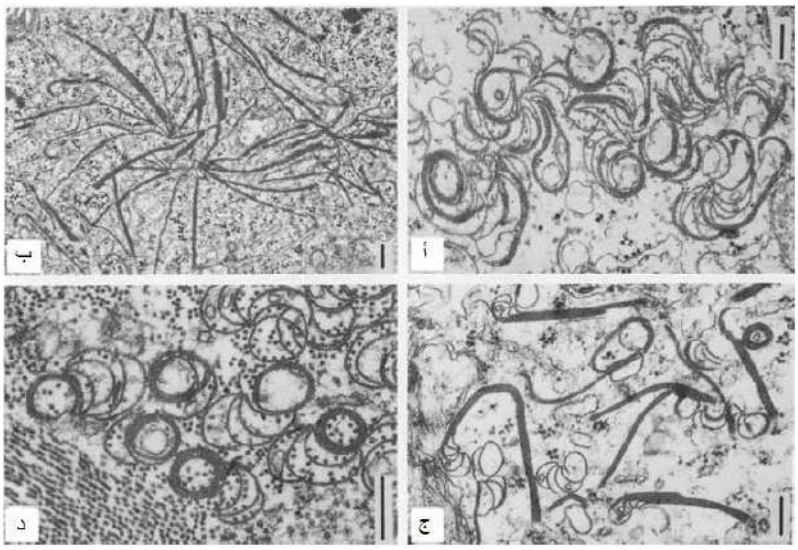
توجد الأجسام الضامة النووية Nuclear inclusions في نوى الخلايا أو في منطقة الكاريوبلازم فتسمىNucleoplasmic inclusions وتأخذ أشكالا عدة فقد تكون حبيبية كما في فايروس تجعد قمة البنجر (BCTV) أو بشكل أجساما ليفية حزمية لتجمعات فايروسية كما في فايروس اصفرار

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 عائلةPotyviridae 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 معتمة حبيبية بروتينية يتراوح قطرها بين 18-20 نانومتر وقد تحوي كميات ضئيلة من الرنا الفايروسي وهذا يلاحظ مع الإصابات التي يسببها فايروس موزائيك البنجر(BtMV) فايروس الكومفرينا (GoV).

2.3.1.5. الاجسام الضامة السايتوبلازمية

تضم الاجسام الضامة السايتوبلازمية 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 بسمك 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 (ClYMV) ويعتقد أنها تزود الفايروس ببروتينات الكابسيد أو تظهر بشكل أجسام لولبية لفيفة 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 التخططي للحنطة (WSMV)، وإن وجود هذه الأجسام قرب البلازموديزماتا يدل على أنها تلعب دورا بتوفير البروتين المتخصص اللازم لنقل الفايروسات عبر الخلايا،
(الشكل 5-2) (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 بتركيبتها 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 الفايروسي بالغطاء البروتيني وربما يكون لها وظائف أخرى.



الشريط يمثل 200 نانومتر

الشكل (5-2): أشكال مختلفة من الأجسام الضامة اللولبية اللفيفة Pinwheels التي تكونها أنواع من فايروسات البوتي Potyviruses (أ) الأجسام اللفيفة لفايروس غير مشخص في أوراق الرغيلة *Chenopodium quinoa* (ب) في أوراق التبغ (ج) أجسام لفيفة وتجمعات صفائحية يكونها فايروس البطاطا واي (PVY) في أوراق التبغ (د) أجسام لفيفة 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 (6)

هيكلية فايروسات النبات

هيكلية فايروسات النبات

هيكلية فايروسات النبات Architecture of plant virusesهو 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 فانه 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 إرتباطهما الفيزيائي "النيوكليوكابسيد" Nucleocapsid وهو المكون المعقد المتكون من إرتباط الكابسيد بالحامض النووي والذي يمثل كيميائيا "النيوكليوبروتين" Nucleoprotein وهذان المصطلحان يعبّران كيماويا عن الفايروسات النباتية البسيطة، أما في الفايروسات المغلَّفة فيطلق على النيوكليوكابسيد مصطلح "اللب" Core والذي يغلّف بغلاف ليبوبروتيني إضافي. إن أول من استعمل مصطلح الكابسيد هو "لوف" (Lowff) في نهاية خمسينات القرن العشرين، وعرَّفه Casper وآخرون (1962) بأنه الغطاء البروتيني المتناظر الذي يضم الحامض النووي الفايروسي مكونا 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 بسب محدودية أعداد الجينات الفايروسية مما لا يسمح بتنويع الوحدات البنائية حيث أن تنويع وتعقيد هذه الوحدات يتطلب المزيد من المعلومات الوراثية (الجينات) كذلك فان 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 تعانيها 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 الحجوم.

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

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

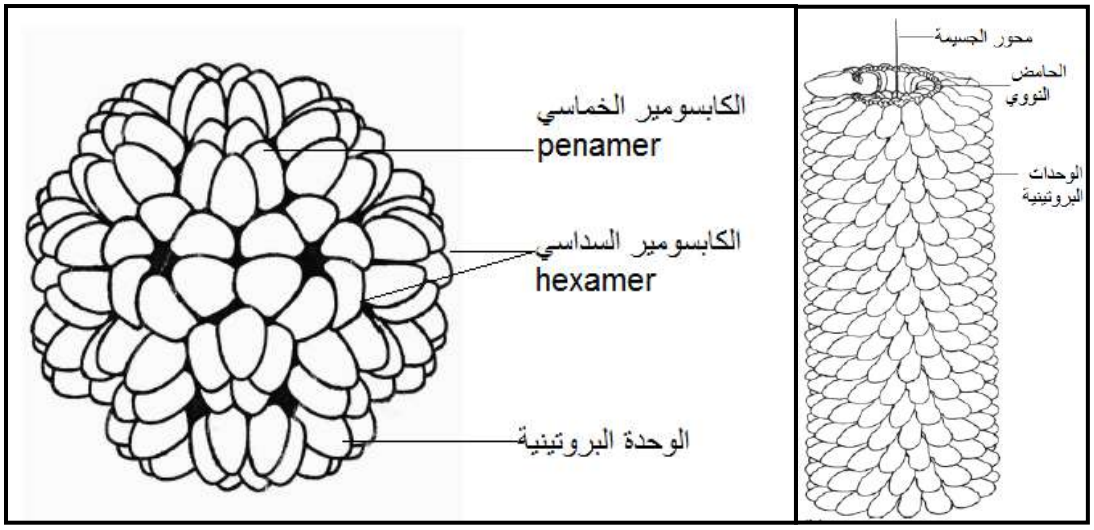
يتكوّن الكابسيد في الفايروسات من المكونات الأساسية التالية:

1.1.2.4 الوحدات البنائية التركيبية الأساسية

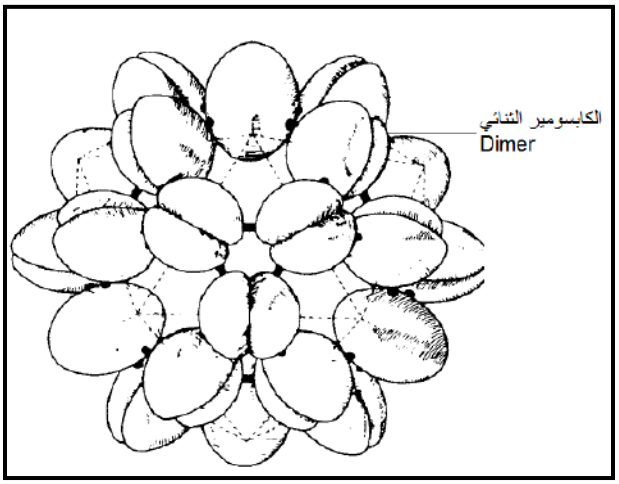
هي الوحدات الأساسية للكابسيد والتي يصطلح عليها Structural units أو تسمى "الوحدة الشكلية" Morphological units وهي عبارة عن سلسلة ببتيد أحادية الالتفاف Single folded peptide أي تمثل التركيب الثالثي للبروتين، وإذا ما تكونت من نوع واحد من الببتيد عندها تسمى "الوحدة الكيميائية" Chemical unit أو "الوحدة التحتية 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 Multiplyredundants 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 المثلثي للفايروسات الآيزومترية 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)

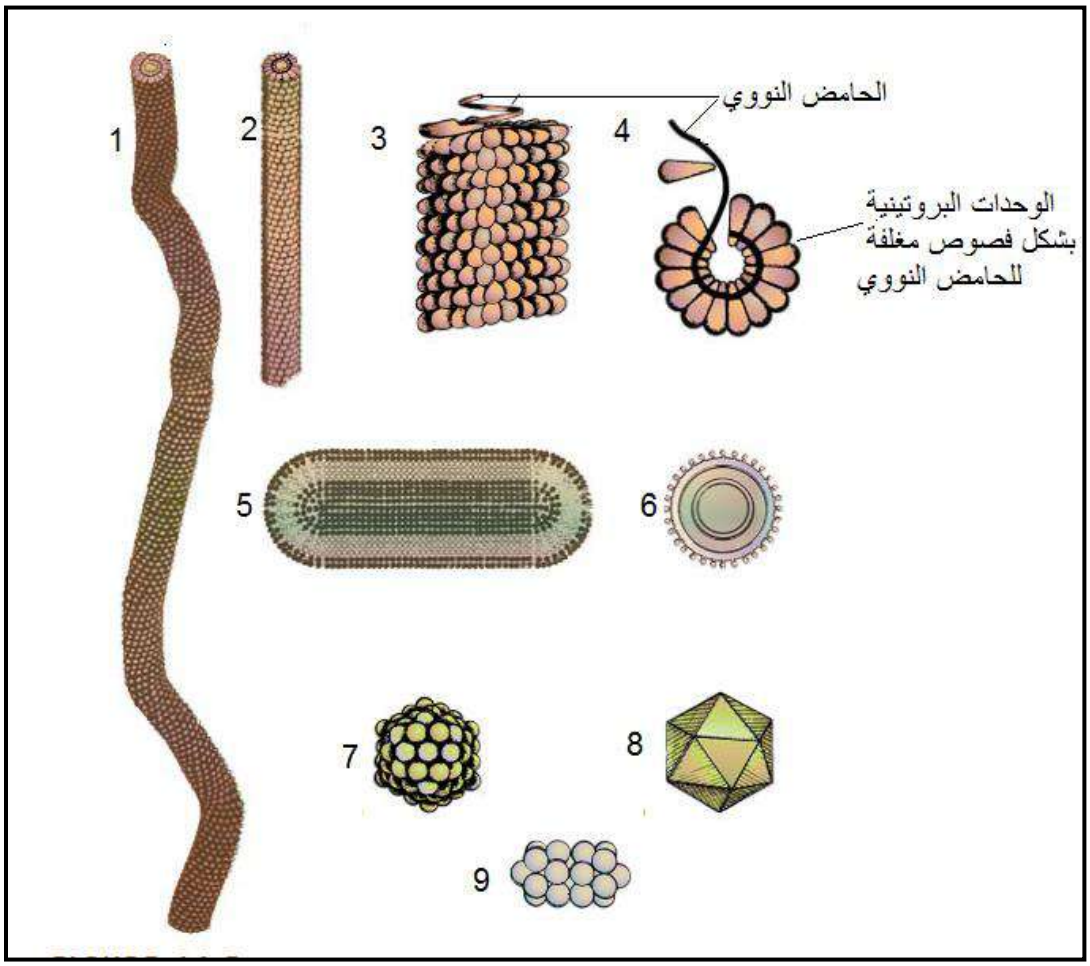


(ج)

الشكل (4-8): هيكلية الفايروسات العصوية المرنة والصلدة والايزومترية وترتيب الوحدات البروتينية الحامية للحامض النووي (أ) مخطط يبين ارتباط الحامض النووي مع الوحدات البنائية البروتينية (الفصوص) في الفايروسات العصوية المرنة والصلدة وان خيط الحامض الحلزوني الواضح أعلى الشكل هو للتوضيح أما في الواقع فانه منطمر تماما في الوحدة البنائية البروتينية الأخيرة ولا يظهر منه شئ، فيما يشير محور الجسيمة إلى محور التناظر، لا يوجد كابسومير في هذا الجسم بل إن الفص هو الذي يمثله (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 "المَثْنَى" 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 فوقي 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 الجسيمتين الثنائيتين Geminate المكونة لفريون فايروسات.Geminiviruses

الشكل مقتبس من Agrios (2005).

2.2.4. أنواع التناظر في فايروسات النبات

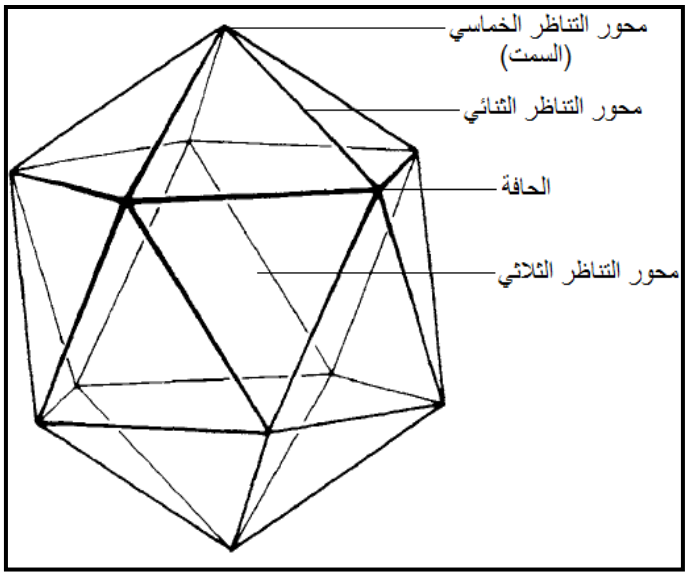
يوجد نوعين رئيسيين من التناظر لفايروسات النبات وهما:

1.2.2.4. التناظر الحلزوني

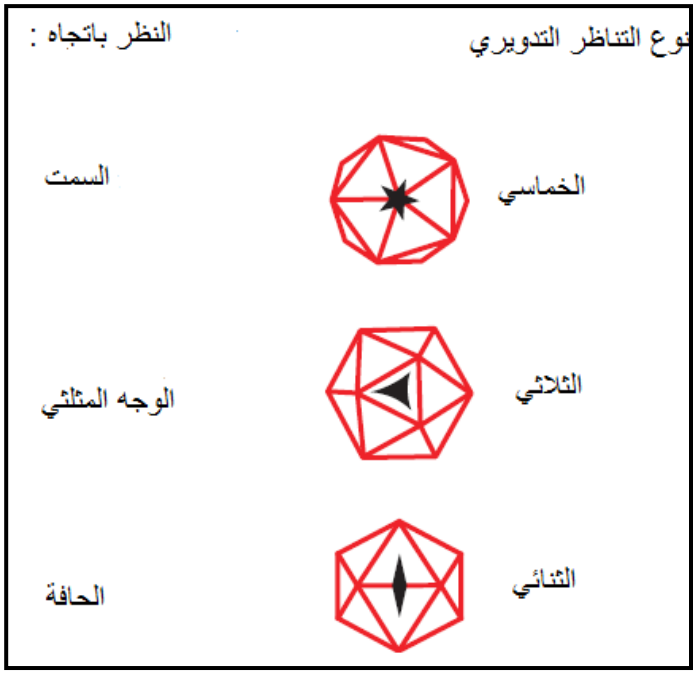
التناظر الحلزونيHelical symmetry هو التناظر الثنائي الذي يميز الفايروسات الأنبوبية بنوعيها الصلد والمرن وكذلك الفايروسات الباسيلية وشبيهة الاطلاقة. والتناظر الثنائي لأي جسم يعني إنتصاف ذلك الجسم إلى نصفين متماثلين تماما عند مرور خط وهمي في محوره الطولي، (الشكل 4–8 أ).

2.2.2.4. التناظر المكعبي

التناظر المكعبي symmetry Cubic أو التناظر البلوري وهو الذي تمتاز به كل أنواع الفايروسات البلورية أو الكروية أو الايزومترية أو العشرينية الوجه وهو تناظر ثلاثي حيث تمتلك البلورة الفايروسية ثلاثة محاور تدويرية Rotational symmetry وذلك حسب مسقط النظر عند تدوير الجسيمة البلورية وهي (1) التناظر الثنائي 2-fold symmetry وهو الذي ينصِّف البلورة إلى نصفين متماثلين وذلك عند مرور خط وهمي من منتصف الحافة Edge التي تفصل كل مثلثين متجاورين لاثنين من المخمَّسات Pentagons المكونة للبلورة حيث أن كل مُخمَّس مكون من خمسة مثلثات متساوية الأضلاع تلتقي في نقطة مدببة هي "السمت" Vertix وبذلك يمتلك الجسم البلوري الفايروسي 15 محورا ثنائي التناظر وعند النظر على كل منها عموديا سترى البلورة بجزئيها المتماثلين (2) التناظر الثلاثي 3-fold symmetryهو التناظر الذي يقسم البلورة الفايروسية إلى ثلاثة أجزاء متماثلة عند مرور خط وهمي في مركز كل وجه مثلثي حيث تضم البلورة الفايروسية العشرينية 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 باشكال مختلفة تتباين في درجة تعقيد بلوراتها وكما مبين في الشكلين (4–3 و4-9) الذي يظهر مخططات للبلورات الفايروسية العشرينية المكونة من كابسوميرات ثنائية وخماسية وسداسية.



(أ)



(ب)

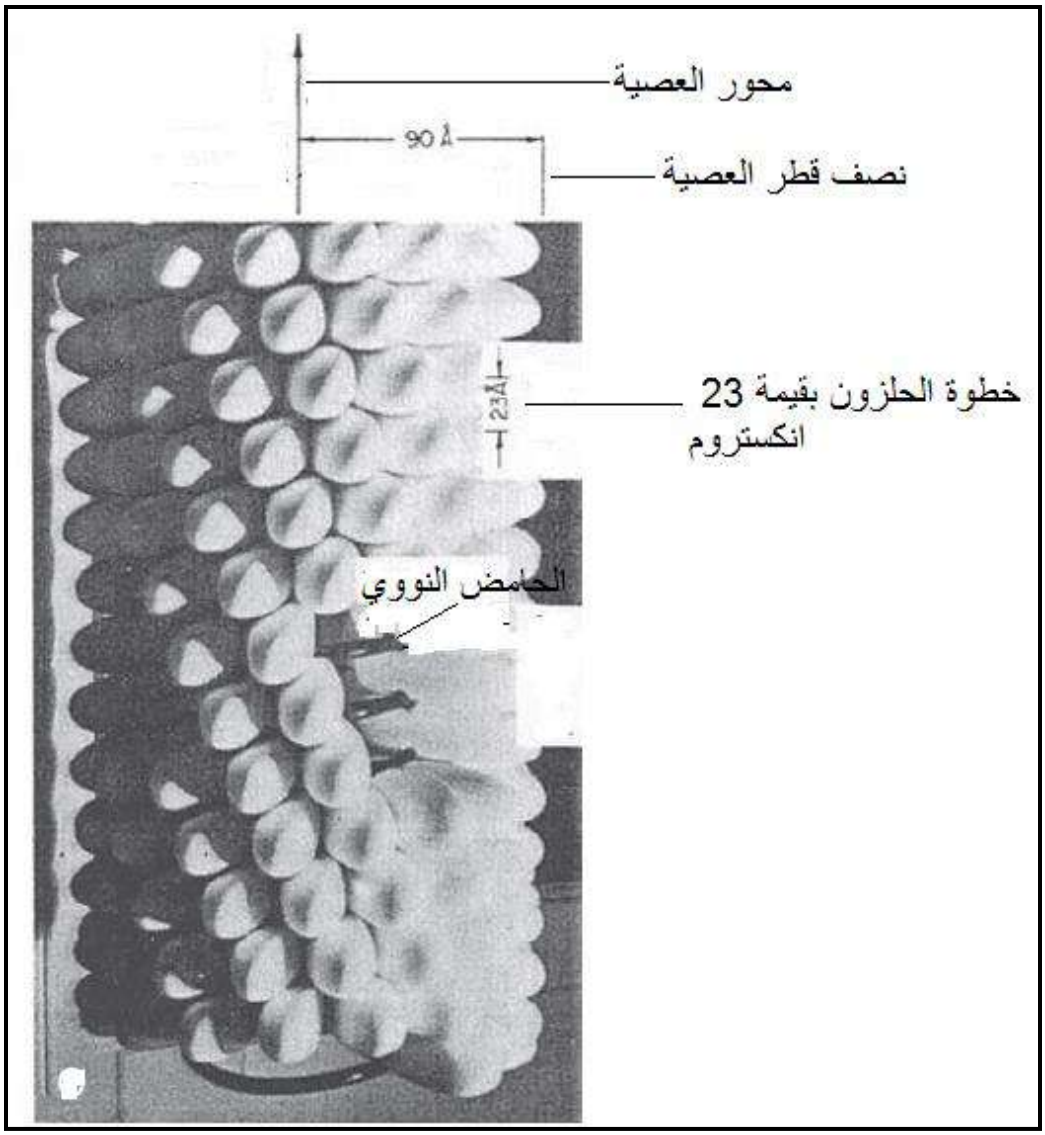
الشكل(4-10): أنواع التناظر في الفايروسات البلورية (أ) االشكل الهندسي لبلورة نموذجية لفايروس عشريني الأوجه Icosahedron وفيها 12 سمت و 20 وجه مثلثي متماثل يبين محاور التناظر الثلاثة وهي: التناظر الثنائي، والتناظر الثلاثي، والتناظر الخماسي (ب) مخطط توضيحي لمحاور التناظر الثلاثة.

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 عصية حلزونية صلدة بطول وقطر300×18 نانومتر على التوالي ويشكل البروتين 95% من كتلتها والمتبقي هو الحامض النووي، يتكون الكابسيد من 2130 وحدة بروتينية مرتبة حلزونيا 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 صلد. 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 العصية، (الشكل4-11) تبتعد مجاميع الفوسفات بحدود 4 نانومتر عن محور العصية ويكون اتجاه دوران الحلزون هو الاتجاه اليميني Right-handed أي من اليسار إلى اليمين، وتكون إحدى نهايتي العصية مقعّرة Concave ترتبط بها النهاية 5 للحامض النووي أما النهاية الأخرى فهي محدّبة Convex وترتبط بها النهاية 3، ويبلغ قطر القناة المركزية المجوفة للعصية 4 نانومتر.

تنتظم سلسلة الحامض النووي بأحكام في الحلزون متداخلة مع كل الوحدات البروتينية وتبقى منطمرة في الوحدتين النهائيتين 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 من50% من الأحماض الامينية الداخلة في بناء الوحدة البروتينية أربعة تراكيب حلزونية من النوع "ألفا" α - helix، و 10% من النوع "بيتا" β - helix فيما تشكل بقية الأحماض الامينية الدورات العكسية Reverse turns، (الشكل4-12) وتكون النهايتين الكاربوكسيلية 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 منHull (2009).

محاضرة رقم (٩)

الحوامض النووية والبروتين الفايروسي

الحامض النووي الرايبي الفايروسي (الرنا الفايروسي)

يماثل الحامض النووي الرايبي الفايروسي Viral ribonucleic acid , RNA الأحماض النووية الخلوية الرايبية وهو الأقرب إلى الحامض النووي المراسل mRNA تركيبيا ووظيفيا وهو يمثل الجينوم الفايروسي للفايروسات ذات الحامض النووي الرايبي. 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 جزئا من الشفرة الوراثية الكاملة للفايروس وفي فايروس موزائيك اللوبيا(CpMV) حيث يتوزع بين جسيمتين مستقلتين.

يوجد الحامض النووي الرايبي في أنواع من فايروسات النبات بشكل حلزوني مزدوج الخيط Double strand RNA , dsRNA شبيه بازدواج الدنا الخلوي وهذا ما يلاحظ في فايروسات عائلة Reovirideae حيث ينشطر إلى 10 -12 قطعة مزدوجة منفصلة معبأة في جسيمة فايروسية واحدة ولكن قد يحصل في بعض الفايروسات ذات الحامض الرايبي 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 الرايبي على مبدأ ارتباط قاعدة الأدنين مع اليوراسيل بآصرة هيدروجينية مزدوجة، وارتباط الكوانين مع السايتوسين بثلاثة أواصر هيدروجينية.

6.1.2.3. الحامض النووي الرايبي الفايروسي منقوص الأكسجين(الدنا الفايروسي)

لا يختلف الحامض النووي الرايبي الفايروسي منقوص الأكسجين (الدنا الفايروسي) Viral Deoxyribonucleic acid , DNA عن مثيله في الخلايا الحية من ناحية التركيب العام والصفات الفيزيائية والكيماوية باستثناء امتلاك بعض الفايروسات للحامض منقوص الأكسجين مفرد الخيط ssDNA والذي لا يوجد في كل الكائنات الحية، أما بقية الفايروسات 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 الأدنين مع عدد وحدات الثايمين وكذلك عدد وحدات السايتوسين لعدد وحدات الكوانين، ويعني ذلك إن مجموع وحدات البيورينات مساو دائما لمجموع وحدات البيريميدنات، 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 والمايتوكوندريات، ويرتبط الدنا في الخلايا حقيقية النواة ببروتينات تسمى "الهستونات "Histones ويطلق عليه "الكروموسوم"، أما الدنا في البلاستيدات والمايتوكندريات و في الخلايا بدائية النواة Prokaryotes و الفايروسات 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 الالكتروني 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 حلقية اروماتية كبيرة مسطحة.

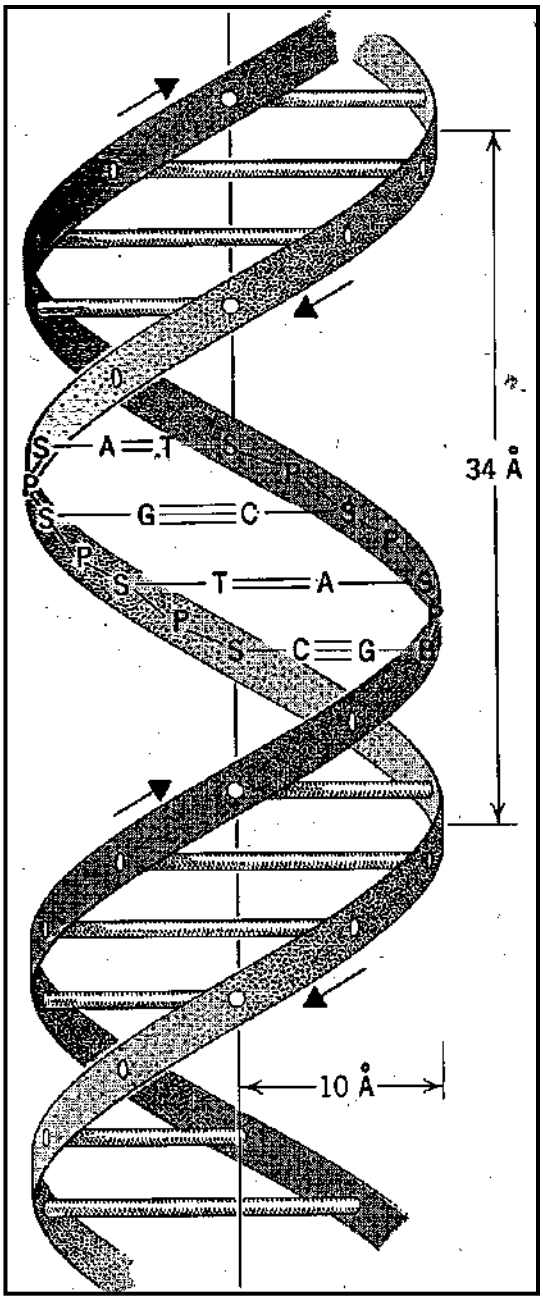
يعبّر عن تعاقب النيوكليوتايدات في جزيئة الدنا بالمخطط الرمزي الذي يسمى "العمود الفقري المكوَّن من السكر- الفوسفات" Sugar phosphate backbone ، (الشكل 3 -5) والذي يمكن استعماله أيضا مع الرنا الفايروسي.

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 (3-1) المحتوى التقريبي للدنا في الفايروسات و الكائنات الأخرى.

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

الكائن	وزن الدنا مقاسا بالبيكوغرام* / خلية	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 Picogram = 10^{-12}غم.

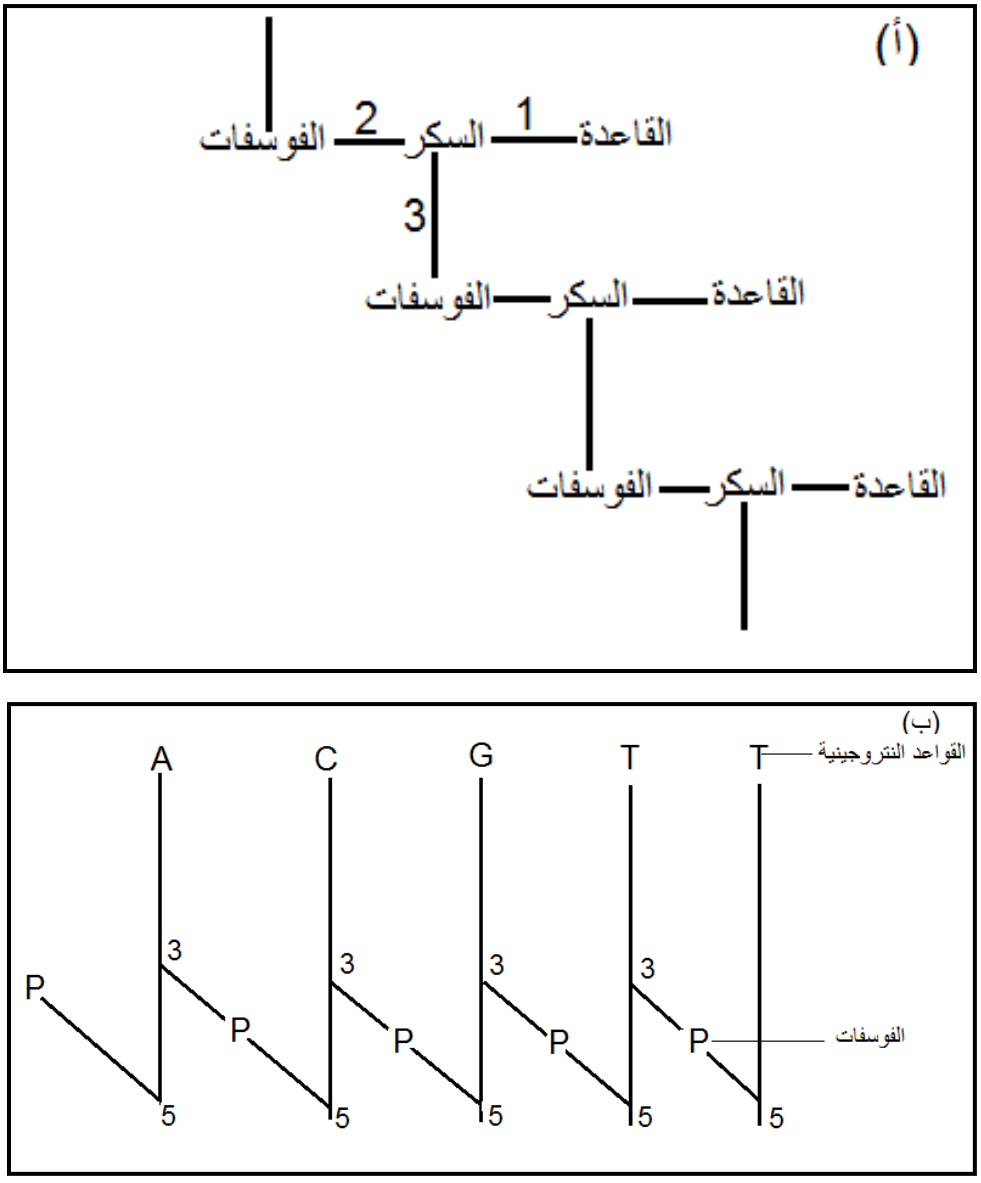


الشكل (3–4): التركيب الحلزوني المزدوج Double helix للدنا المزدوج الخيط.

ترتبط قاعدتي الأدنين (A) والثايمين(T) بآصرتين هيدرروجينيتين، وترتبط قاعدتي الكوانين(G) والسايتوسين(C) بثلاثة أواصر هيدروجينية، أما الشريطين فيتكون كل منهما من الفوسفات(P) المرتبط بآصرة إسترية مع سكر الرايبوز منقوص الأكسجين، وأن طول دورة الحلزون ونصف قطره هو 34 و10 أنكستروم على التوالي.

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

الشكل مقتبس منConn و Stumpf (1972).



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

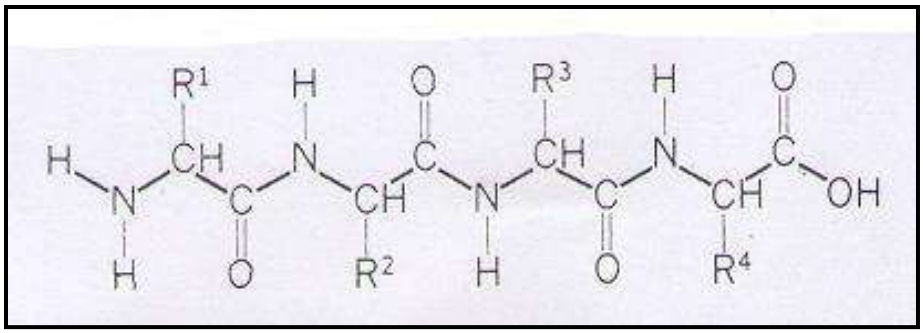
(ب) المخطط الرمزي للعمود الفقري للدنا والذي يقرأ من اليسار إلى اليمينPAPCPGPTPT.

2.2.3. البروتين الفايروسي

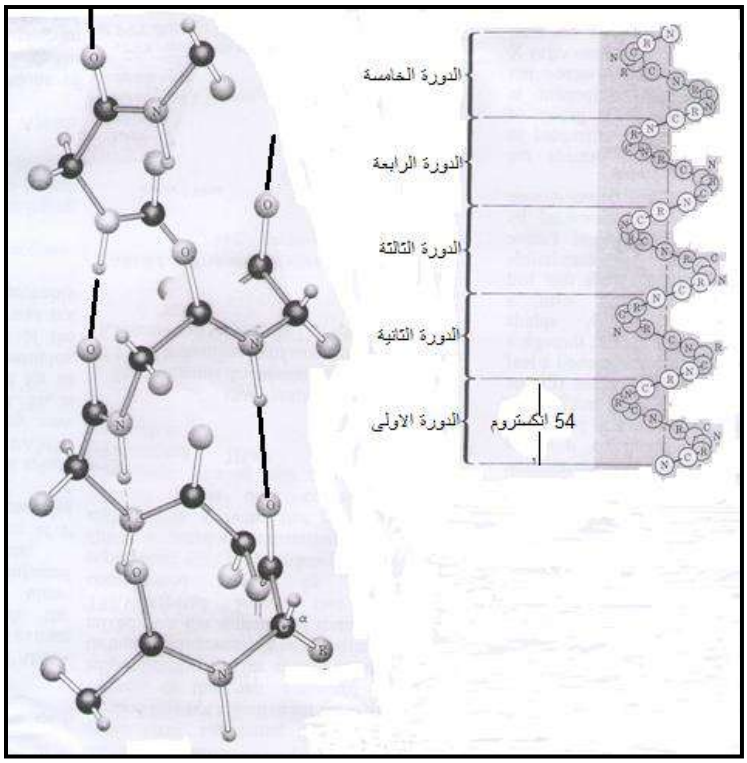
يماثل البروتين الفايروسي تركيبيا أي بروتين خلوي فهو مكوثر (بولمر) لوحدات بنائية وظيفية هي الأحماض الامينية Amino acids ، ويرتبط كل حامض أميني بالذي يليه في سلسلة الببتيد بآصرة ببتيدية Peptide bondوالتي تسمى أيضا آصرة الأميد Amide bond، ويصنف البروتين الفايروسي من نوع الغلوبيولين Globulin ويسمى أيضا A-protien تمييزا له عن بروتينات الكائنات الأخرى. يتم بناء البروتين الفايروسي التركيبي بأربع مستويات هي (1) التركيب الأولي Primary structure حيث تتكون سلسلة ببتيد مفردة تتعاقب فيها الأحماض الامينية في تركيب خيطي غير متفرع وترتبط ببعضها بالآصرة الببتيدية، (الشكل 3-6) (2) التركيب الثانيSecondary structure حيث يأخذ خيط الببتيد الشكل الحلزوني يميني الاتجاه Right handed alpha helical structure ويثبت هذا التركيب بواسطة الأواصر الهيدروجينية القائمة بين مجموعتي الكاربونيل والاميد، (الشكل 3-7) (3) التركيب الثالثي Tertiary structure حيث يحصل المزيد من الالتفاف والالتواء Coiling and Folding للتركيب الثاني لإعطاء شكلا معقدا ثلاثي الأبعاد وصلدا للتركيب، (الشكل 3-8) ويثبِّت هذا التركيب عدة أنواع من الأواصر المبينة في الشكل (3-9) (4) التركيب الرابعي Quaternary structure هو التركيب الذي يجمع قطعتي تركيب ثالثي متماثلتين أو أكثر لتكوين البروتين وإعطائه وظيفته المطلوبة سواء كانت تركيبية أم وظيفية فقد ترتبط وحدتين من التركيب الثالثي بشكل "مَثْنَى" Dimer ، (الشكل3-8).

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

تكوِّن معظم فايروسات 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 الفايروسات المغلفة بروتينا يرتبط مع الليبيد ليكوّن الليبوبروتين Lipoprotein، ويرتبط هذا البروتين في بعض الفايروسات مع الكربوهيدرات ليكوّن الكلايكوبروتينGlycoprotein. يحتاج تخليق بروتين فايروسي 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 بالآصرة البتيدية التساهمية Peptide bond الرابطة بين ذرتي الكربون والنتروجين.(C—N)



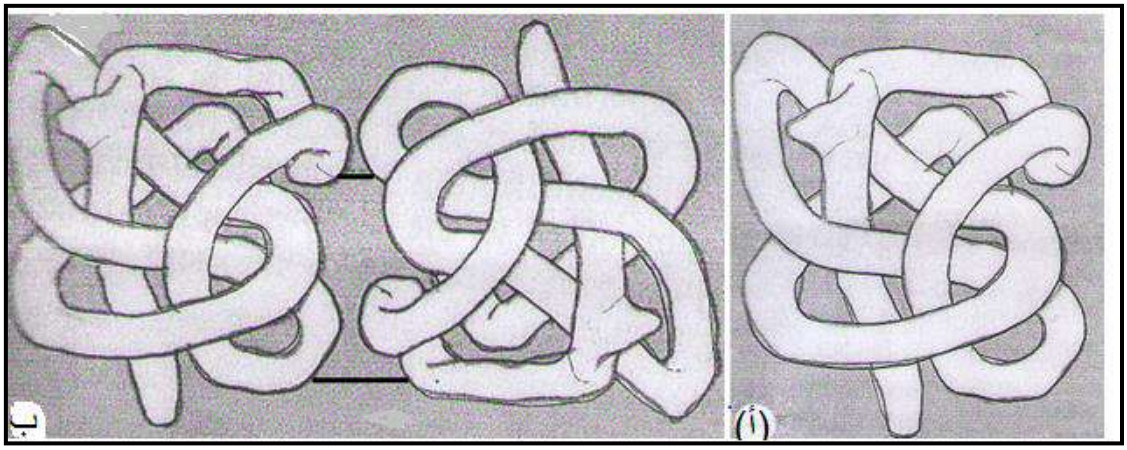
(أ) (ب)

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

(أ) مخطط للتركيب الثاني يبين خمس دورات منه حيث تشير الدوائر المظللة 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 مجسّم للتركيب الحلزوني للببتيد من النوع "الحلزون ألفا" يميني الاتجاه Right handed Alpha – Helix structure حيث تشير الخطوط الغامقة إلى الآصرة الهيدروجينية التي تثبت التركيب الحلزوني.

الشكل مقتبس منConn و Stumpf (1972).

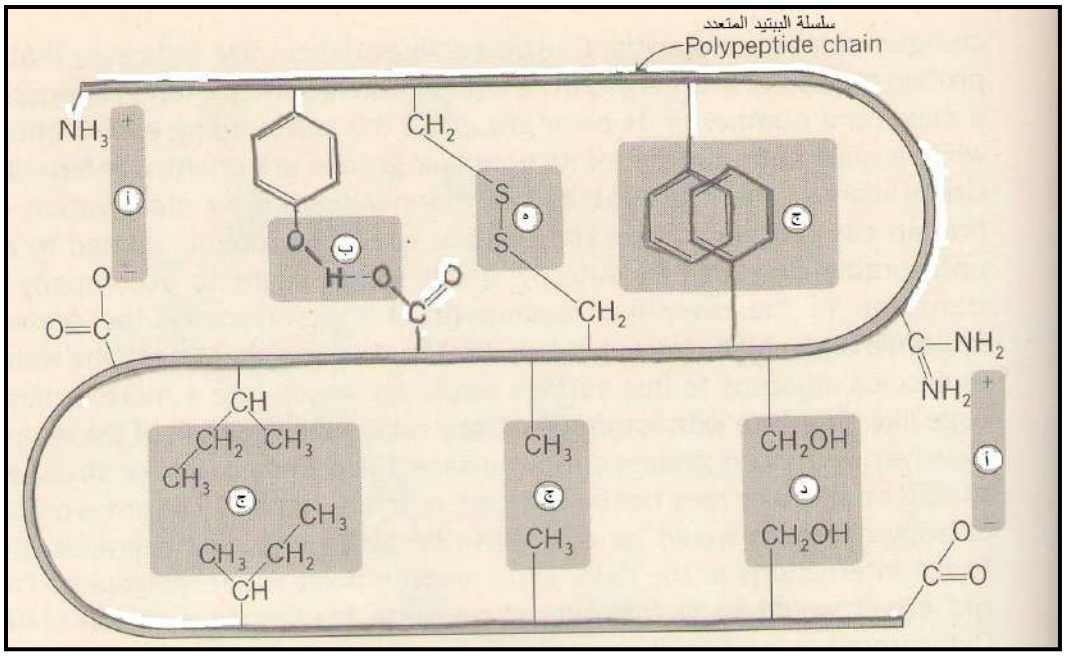


الشكل (3-8): التركيبين الثالثي والرابعي للبروتين الفايروسي.

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

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

الشكل مقتبس منConn و Stumpf (1972).



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

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

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 منقولا بالمن فأن 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 والايزومتري وكذلك كل أنواع الأحماض النووية الفايروسية مفردة أو مزدوجة الخيط. ولنجاح هذا النقل فأنه لا يتطلب اختراق رمح المن لأكثر من طبقة خلايا بشرة النبات المصاب لاكتساب الفايروس ويحصل ذلك نتيجة سلوك التغذية القصيرة الاستكشافية Expletory probing feed 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 قذف 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 المبطِّن لقناة الغذاء فيما كانت هناك أعدادا قليلة من الجسيمات مرتبطة بمنطقتي التجويف الفمّي Cibarium ومقدمته Precibarium، وأظهرت تقانات التعليم الشعاعي باستعمال جسيمات فايروسية معلَّمة 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 وضخِّه 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 الفايروسين 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 الاول المهجَّن. وجد أن لبعض الأحماض الامينية ولمواقعها في الكابسيد دورا في تخصصية الربط ولوحظ ذلك في العلاقة بين حشرة "مَنْ القطن" *A. gossypii* وفايروس موزائيك الخيار إذ وجد أن مواقع الأحماض الامينية 25 و 129و168 و 162 و214 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 والكلايسين ومجموعة رباعية تتكون من الأحماض الامينية السستين والثريونين والآيزوليوسين 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 يشفِّره الفايروس وتخلِّقه 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 (TVMV) 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 تشفِّره 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 يفضّل الارتباط مع الرنا أكثر من ميله للأرتباط 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

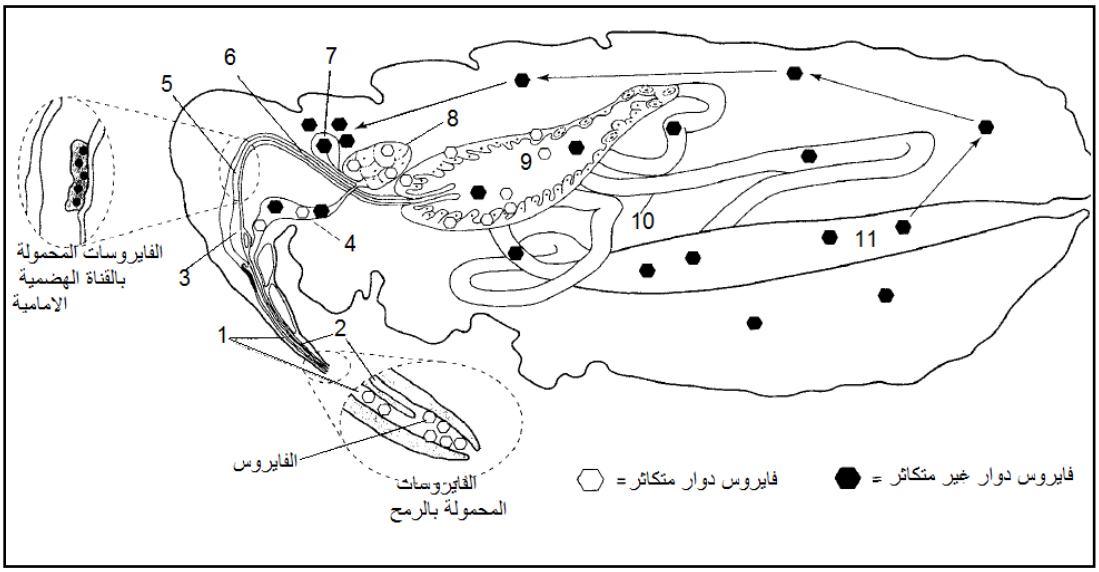
الفايروس الآخر، وهذه الظاهرة هي التي نبهت الباحثين على وجود هذا البروتين، ويسمى فايروس "البوتي" الذي يساعد فايروسا آخر لنقله بحشرات المن "الفايروس المساعد" Helper virus وهي ظاهرة شائعة في هذه الفايروسات إلا أنها متخصصة في دورها النقلي بمعنى أنه ليس كل فايروسات البوتي ستساعد أي فايروس من مجموعة أخرى للنقل بالمن إن وجدا معا في إصابة خليطة، وتوجد العديد من الأمثلة على ذلك ومنها دور فايروس البطاطا واي (PVY) في نقل فايروس موزائيك أوكيوبا البطاطا (PAMV). أمكن تنقية وتشخيص البروتينات المساعدة لبعض فايروسات البوتي ومنها فايروسات التبقع الحلقي للبابايا (PRSV) وموزائيك الرقي الثاني (WMV-2) و الموزائيك الاصفر لقرع الزكيني(ZYMV) وموزائيك 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 Injestion-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 (6-3) 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 External ly borne viruses	النقل غير الباقي والفايروس محمول بالمح	الكابسيد والبروتين المساعد	ثواني إلى دقائق	دقائق	لا يحصل	لا يوجد	لا توجد	لا يحصل	لا يحصل
	النقل شبه الباقي والفايروس محمول في القناة الهضمية الأمامية	الكابسيد والبروتين المساعد	دقائق إلى ساعات	ساعات	لا يحصل	لا يوجد	لا يوجد	لا يحصل	لا يحصل
الفايروسات المحمولة داخليا بالمن Internal ly borne viruses	النقل الباقي والفايروس دوار في جسم المن	لا توجد معلومات	ساعات إلى أيام	أيام إلى أسابيع	يحصل	يوجد	ساعات إلى أيام	لا يحصل	لا يحصل
	النقل الباقي والفايروس دوار	لا توجد معلومات	ساعات إلى أيام	أسابيع إلى أشهر	يحصل	يوجد	أسابيع	يحصل	غالبا

	ومتضاعف في المن								

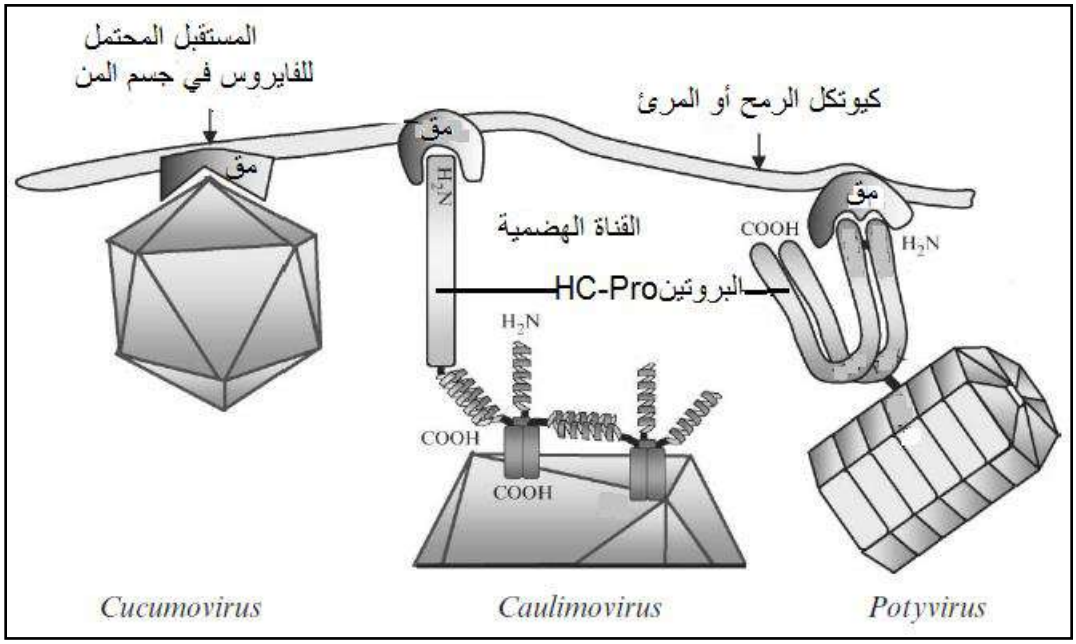


الشكل (6-11): آليات نقل فايروسات النبات بواسطة الحشرات الثاقبة الماصة.

الشكل مقتبس من Hull (2002).

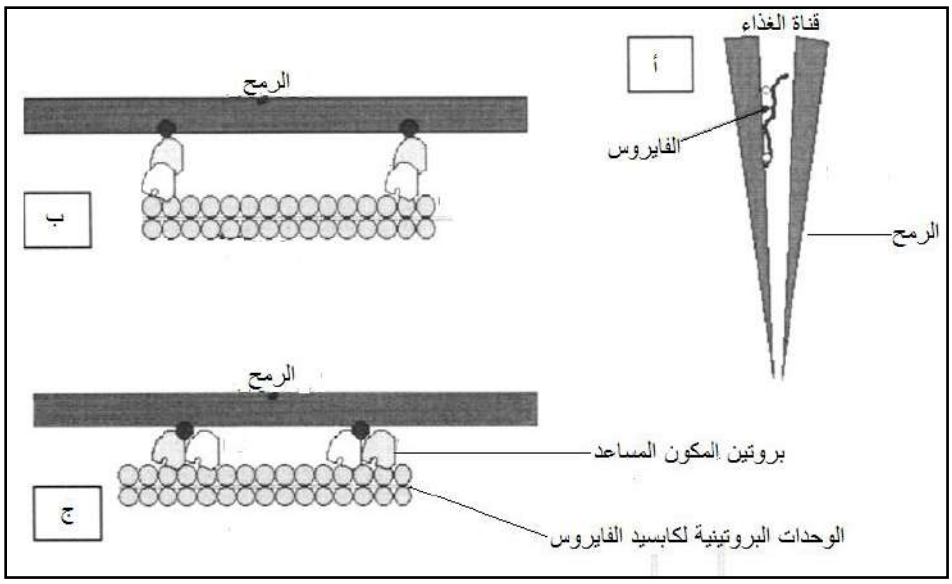
يبين الشكل تشريح القناة الهضمية والجهاز اللعابي والمواقع الاخرى ذات الصلة بنقل الفايروسات. تظهر الصورة المكبرة السفلى توضيحا للنهاية البعيدة للرمح حيث تنتهي قناتي الغذاء (1) واللعاب (2) في فجوة مشتركة في نهاية الرمح. إن الآلية المقترحة لنقل الفايروسات غير الباقية المحمولة بالرمح هي الاحتفاظ بها في القمة البعيدة للرمح ثم يتم 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 منطمرة في مادة مالئة 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 وتتحرر 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 قبل 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 *Potyvirus* و *Caulimovirus* و *Cucumovirus* غير الباقية وشبه الباقية المنقولة بالمن على كيوتكل الرمح أو المرئ. يلاحظ الاحتفاظ بالفايروسات بواسطة مستقبل واحد أو أكثر موجود على الكيوتكل يسمى "مستقبل المن" Aphid receptor والذي أعطي الرمز "مق" حيث تحتاج فايروسات الجنسين *Caulimovirus* و *Potyvirus* إلى البروتين الفايروسي المتخصص بالنقل HC-Pro لكي تدمص على كيوتكل 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 رمح المن (أ) موقع الجسيمات الفايروسية داخل الجزء الأمامي من الرمح وتحديدا بداية قناة الغذاء (ب) نموذج يفترض الارتباط بين جزئ البروتين حيث يرتبط الجزء الأول مع مستقبل موجود على الرمح فيما يرتبط الثاني مع وحدة بروتينية من وحدات الكابسيد (ج) نموذج يفترض الحاجة إلى "مثنى" Dimer للربط مع المستقبل الموجود على الرمح إذ يرتبط كلا جزئي HC-Pro مع الوحدات البروتينية للكابسيد.

الشكل مقتبس منHull (2002).

2- العلاقة شبه الباقية

العلاقة شبه الباقية Semi-persistent relationship هي الأقل شيوعا 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 ويصيبان 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 مَنْ 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 الاخرى 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 وClosteroviruses تحتاج إلى بروتينات مساعدة لنقلها بالمن وسجل ذلك مع فايروس الهرقلّية الكامن HLV (الهرقلية نوع من الازهار من العائلة الخيمية) وهو عصوي مرن بطول 730 نانومتر حيث يعتمد في نقله على فايروس الهرقليَّة 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 الإرتباط 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.

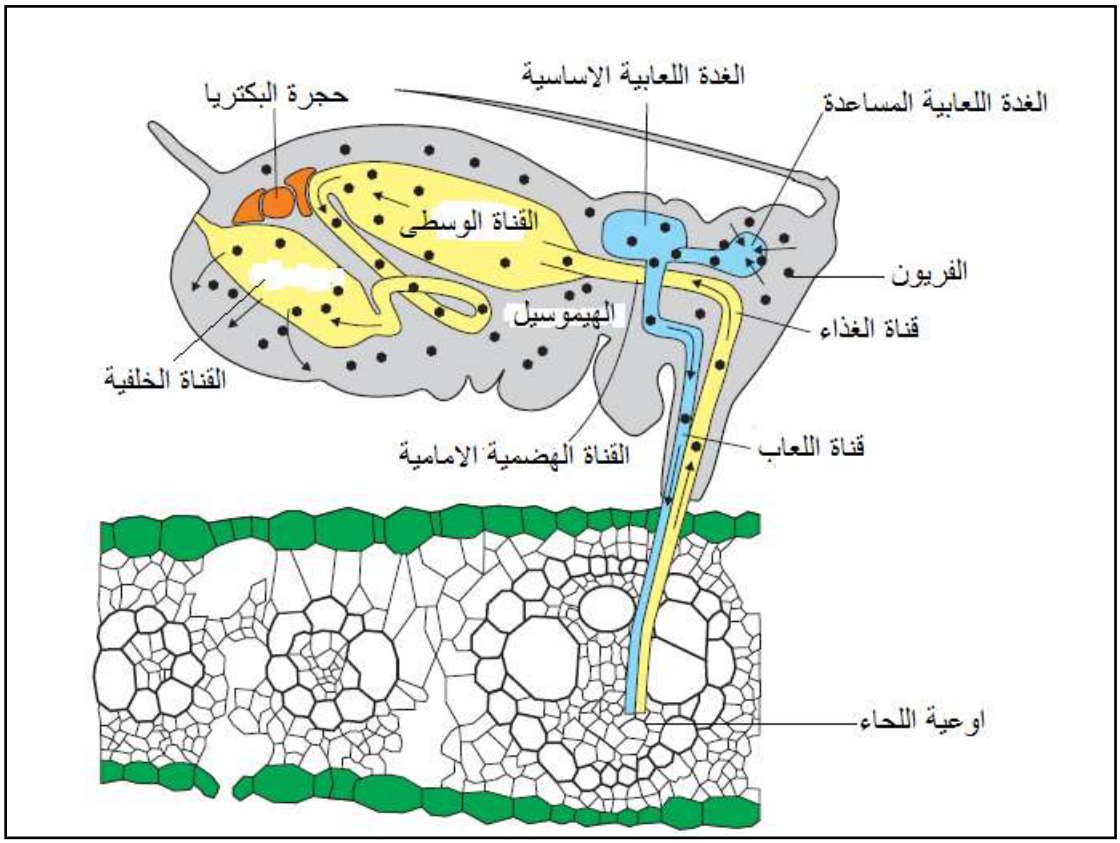
3- العلاقة الباقية

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 Circovridae 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 مسئولة 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 لتنقل مع العصير النباتي إلى الأمعاء ثم تعبر إلى الدم (هيمولمف 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 يتتطلب أن تعبر حاجزين هما جدار الأمعاء وجدر الغدد اللعابية وفترة حضانة 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 المعي الخلفي للمن *Ropalosiphon padi* ومن المحتمل أن تدخل إليها بواسطة عملية الابتلاع Endocytosis حيث تتجمع الجسيمات الفايروسية أولا داخل نقر أو حويصلات مغلفة 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 مَنْ 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 الميَّسرة 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 *Buchneria* حيث وجد في هيمولمف المن وهو يتبع مجموعة بروتينات الكابيرون Chaperone المسئولة 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 هيمولمف 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 الهيمولمف 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 الفايروسات إلى فايروس مساعد أو منشِّط 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 ولكنهما ينقلان بنفس الكفاءة وبكلا نوعي المن عند وجودهما معا في النبات بإصابة خليطة اذ وجد أن كلا الفايروسين يستطيعان الدخول إلى هيمولمف الناقل غير الكفء ولكنهما يفشلان في عبور غدده اللعابية ليصلا إلى النبات، ويفسر التأثير المنشِّط للاصابة 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 الكفء. 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 للباقلاء (FBNYV) لنقلها بالمن، كذلك فان فايرويد الدرنة 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 (6-4) سبعة أنواع من الفايروسات الاتكالية وفايروساتها المساعدة.

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

أنواع فايروسات الجنس *Umbravirus*	أنواع فايروسات *Luteovirus* المساعدة	أنواع المن الناقل
فايروس تحزم العروق الأصفر للفاصوليا (BYVBV)	فايروس التفاف أوراق الفاصوليا (BLRV)	*Acyrthosiphon pisum*
فايروس تبرقش الجزر (CMoV)	فايروس الورقة الحمراء للجزر (CtRLV)	*Cavariella aegopodi*
الفايروس المحاكي لتبرقش الجزر (CMoMV)	فايروس الورقة الحمراء للجزر (CtRLV)	*Cavariella aegopodi*
فايروس تورد فستق الحقل (GRV)	الفايروس المرافق لتورد فستق الحقل (GRAV)	*Aphis craccivora*
فايروس التبرقش الرقطي للخس (LSMV)	فايروس الإصفرار الغربي للبنجر (BWYV)	*Myzus persicae*
فايروس موزائيك وزوائد البزاليا الثاني (PEMV-2)	فايروس موزائيك وزوائد البزاليا الأول (PEMV-1)	*Acyrthosiphon pisum*
فايروس تبرقش التبغ (TMoV)	فايروس تشوه عروق التبغ (TVDMV)	*Myzus persicae*

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 فأن 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 للكَسُّوب (SYVV) والاصفرار التماوتي للخس(LNYV) المنقولين بالمن *Hyperomyzus lactucae* في نوى وسايتوبلازم خلايا دماغ الحشرة وفي خلايا الغدة تحت المريئية 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 للأشارة 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 وقادرة على نقله كما تسببت إصابة حشرات المن بالفايروس زيادة في نسب موتها وأمكن نقل الفايروس تسلسليا من حشرة لأخرى بحقن المحلول الفايروسي في الهيمولمف. إن هذه العلاقة هي أقل شيوعا مقارنة بالعلاقات الاخرى 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 فأن 50% من الحشرات المحقونة أصبحت قادرة على نقله طيلة حياتها بعد فترة حضانة 20 ساعة.

يبدوا 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 الاكتسابAcquisition 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 الفايروس في جسم الحشرة الناقلة لتصبح بعدها قادرة على نقله إلى النباتات السليمة وتتباين هذه الفترة حسب نوع العلاقة القائمة بين الفايروس والمن فهي تستغرق مع الفايروسات المحمولة داخليا بين عدة ساعات إلى عدة أيام أما مع الفايروسات المحمولة خارجيا فهي لا تستغرق إلا عدة ثواني (3) فترة الاحتفاظ بالفايروس Retention period وتسمى أيضا فترة النقل Transmission period وهي الفترة التي يبقى فيها الفايروس 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 بالفايروس 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 الفايروس الباقيPersistent virus والفايروس غير الباقي Non-persistent virus لوصف الفايروسات حسب المدة التي تبقى فيها في المن القادر على نقلها بعد اكتسابه لها.

5- نقل الفايروسات ميكانيكيا بحشرات المن

هي علاقة قليلة الأهمية جدا في نقل الفايروسات وليست تخصصية حيث يتم هذا النقل عن طريق جرح الخلايا النباتية ميكانيكيا بسبب حركة المن على سطح النبات ومع أنواع معينة من الفايروسات 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 الفايروسات المذكورة الموجودة بتراكيز عالية في النباتات والتي تمتاز بثباتيتها العالية علما بأن هذه الفايروسات لا تنقل بالمن طبيعيا، وتمخضت التجارب التي أجريت في هذا المجال على فايروس موزائيك التبغ عن النتائج التالية (1) لا يمكن لحشرات المن أن تنقل هذا الفايروس 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 وفسّر 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 فان نجاح الإصابة الفايروسية الجهازية يتطلب تضاعف الفايروس أولا داخل الخلايا المصابة ثم حركته من الخلية المصابة إلى الخلايا المجاورة السليمة وتكرار الإصابة والحركة وصولا 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 فصّلت 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 ميكانيكيا 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 الفايروسات وذلك لأن هذه التقانة ألغت مشكلة عقبة الجدار الخلوي الذي يستحيل اختراقه من قبل الفايروسات حيث اعتمدت التجارب التي كان يجريها الباحثون قبل ابتكار هذه التقانة على تلقيح خلايا النبات ميكانيكيا بالفايروس بالطريقة التقليدية وهي التي تتطلب نظريا جرح 10000 خلية نباتية لكي تصاب خلية واحدة يتحقق فيها شرط الجرح غير المميت، كذلك فان كل خلية ملقحة تتطلب 100 ألف جسيمة فايروسية لتحقيق الإصابة ولكن عند استعمال زراعة البروتوبلاست فان 50% من البروتوبلاست الملقحة ستصاب بالفايروس ولا يحتاج كل برتوبلاست لأكثر من 10-100 جسيمة لكي يصاب كما أن تركيز الفايروسات يكون عاليا فيه إذ وصل تركيز فايروس موزائيك التبغ (TMV) إلى ما يقرب من 10^6 جسيمة/بروتوبلاست بعد التحضين لمدة 24 ساعة عند 25مْ.

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

1.2.1.7. مرحلة نزع الغطاء البروتيني (إزالة الكابسيد)

تشترك كل الفايروسات وبغض النظر عن نوع جينومها في خطوة نزع الغطاء البروتيني Uncoating or Decapsidation حيث تدخل كل أنواع الفايروسات إلى النباتات بشكل فايروس كامل (الفريون)Virion أو يسمى Intact virus أي الجسيمة الفايروسية 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 الفايروس إلى الخلية ويرجح تفكيك أغطية الفايروسات بسيطة التركيب المكونة من الحامض النووي والكابسيد خلال الفترة النشطة بايوكيميائيا من دورة حياة الفايروس، فيما تتفكك أغلفة الفايروسات المعقدة ومنها فايروسي الاصفرار التماوتي للخس (LNYV) والتورم الجرحي (WTV) جزئيا خلال هذه الفترة ولكنها تبقى محتفظة بجزء قليل من البروتين المكون لجوهر الجسيمة (اللب) Core.

الجدول (7-1): أنواع جينومات فايروسات النبات

نوع الجينوم	عدد قطع الجينوم	جنس الفايروس	الفايروس الممثل

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

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 بآخر 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 الأغطية البروتينية لفايروسات النبات حسب تركيب الفايروسات وكما يلي:

أ- تفكيك الفايروسات العصوية

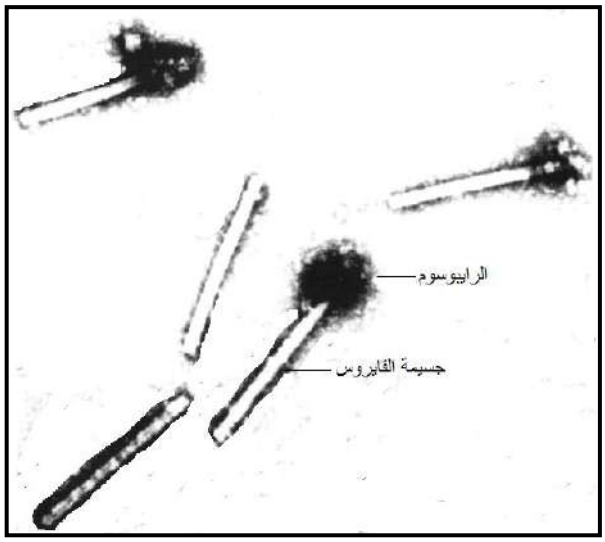
تبدأ الإصابة الفايروسية بإزالة الكابسيد عن الجينوم بما يكفي لترجمة أول هيكل تشفيري مفتوح Open Read Frame , ORF ووجد أن أيون الكالسيوم Ca^{++} يبطئ أو يعيق تفكيك وحدات الكابسيد عند الأس الهيدروجيني 9 ويدل ذلك أن مواقع إرتباط أيون الكالسيوم في الخلية Ca^{++} binding sites تعمل مفتاح سيطرة لعملية التفكيك وأن إزالة أيون الكالسيوم يحدث تغييرا في بنية الوحدات البروتينية مما يؤدي إلى تفككها، ويعتقد أن الفايروسات بسيطة التركيب ومنها فايروس موزائيك التبغ تتفكك أغطيتها 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 ألايوني 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 للفايروسSubviral 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 المخلق في البكتريا كمية كبيرة من البروتين ذو الحجم 126 كيلودالتون فيما أعطى الجينوم العادي المخلَّق 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 نيوكليوتايديا 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 ارتباط رايبوسوما واحدا أو أثنين مع حوالي 20% من الجسيمات الفايروسية.

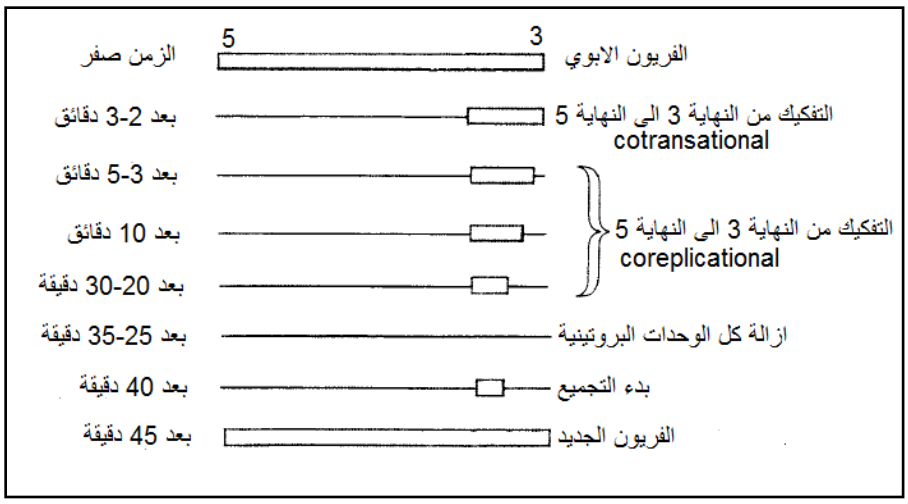
واستعمل البروتوبلاست في دراسة تجارب نزع الغطاء باستعمال القلويات الضعيفة ومادة SDS حيث لقحت برتوبلاستات بشرة نبات التبغ المصاب بفايروس موزائيك التبغ وأضيفت جزيئات الرايبوسوم 80S التي تحركت على طول الجينوم من النهاية 5 حيث أمكن عزل معقدات بروتينية مماثلة لخواص الستربتوسومات وذلك بعد فترة من تلقيح البرتوبلاستات، 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 مهيأ أصلا للتفكك ويفسر ذلك بان الوحدات البروتينية لهذا الفايروس ترتبط مع بعضها بأواصر كاربوكسيلية حيث تتكون آصرتين كاربوكسيليتين بين كل وحدتين متجاورتين مع وجود آصرة كاربوكسيلية أخرى بين كل وحدة بروتينية والجينوم وتصبح هذه الأواصر في الوسط الضعيف قاعديا موجبة الشحنة بروتونية مما يؤدي لحدوث تنافر كهربائي مستقر Electrostatic repulsion وبذلك تتفكك أغطية الفايروسات قبل أن يعمل عليها الرايبوسوم لتبدأ عملية التفكيك الترجمي المرافق بارتباط الرايبوسوم بالجينوم ويبدأ بترجمة الهيكل التشفيري المفتوح الأول لفايروس موزائيك التبغ وهو5-ORF1 فيخلق أنزيم الربلكيز بحجم 128/126 كيلودالتون مستبدلا الوحدات البروتينية للغطاء، وعندما يصل الرايبوسوم إلى " الكودون الموقف" Stop codon وهو الهيكل التشفيري المفتوح ORF 128 /126 فان الرايبوسوم ينفصل عن الجينوم، وأثيرت

التساؤلات حول كيفية تفكيك الربع الأخير من الجسيمة الفايروسية وتحديدا 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 موزائيك 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 5–3 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 الالكتروني 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 موزائيك 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 5-3 اولا من حوالي 75% منه وذلك في أول 2-3 دقائق بعد تلقيح 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 العصوية وبذلك يعد الانتفاخ ضروريا كمرحلة تسبق مباشرة تفكيك أغطية 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 تركيبي في الأغطية 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 النتروجينية المكونة من خمس وحدات بروتينية والموجودة في الكابسومير الخماسي للكابسيد تخضع لتحول تركيبي 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.

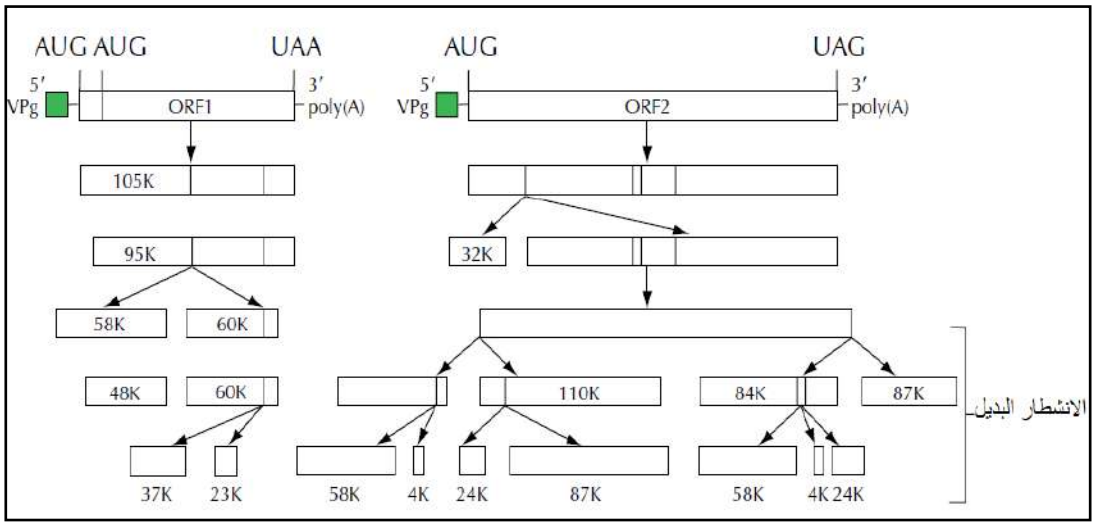
2.2.1.7. مرحلة تضاعف الحامض النووي الفايروسي

يبدأ الحامض النووي الفايروسي (الجينوم) بالتضاعف فور انتهاء عملية تفكيك الغطاء البروتيني ولكن تتباين آليات التضاعف حسب نوع الحامض النووي الفايروسي وفردية أو إزدواج خيطيه وهل هو سالب أو موجب التوجه، وتتماثل آليات تضاعف جينومات فايروسات النبات عموما 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 خصوصا 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(+) فان الجينوم بكامله يسلك سلوك الرنا المراسل mRNA، أما الأنواع الأخرى من الفايروسات فإنها لا تسلك سلوك الرنا المراسل ولكنها تخلِّق عدة نسخ من الرنا المراسل الفايروسي Viral mRNA والتي تقوم بتشفير نواتج جينية بروتينية أهمها إنزيم الربلكيز الفايروسي Viral replicase فضلا عن بروتينات أخرى تشارك في التضاعف لإنتاج أنواع من الجينومات الرايبية الثانوية Subgenomic RNAs وكذلك لتخليق جينومات فايروسية جديدة، ويتم لاحقا إنتاج بروتينات الغطاء وبروتين الحركة المسئول عن نقل الجسيمات الفايروسية من خلية لأخرى وأيضا بروتين النقل بالناقل إن كان الفايروس منقول بناقل وتنتج هذه البروتينات في مرحلة متأخرة من دورة التضاعف الفايروسي، وتشفِّر 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 جزءا بسيطا من حجم الجينوم، ولغرض إنتاج غطاء بروتيني بحجم 200 حامض أميني فان 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 2×10^{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 الفريونات في سايتوبلازم خلايا العائل عادة ثم تتحرك إلى الخلايا المجاورة لإحداث الإصابة الجهازية.

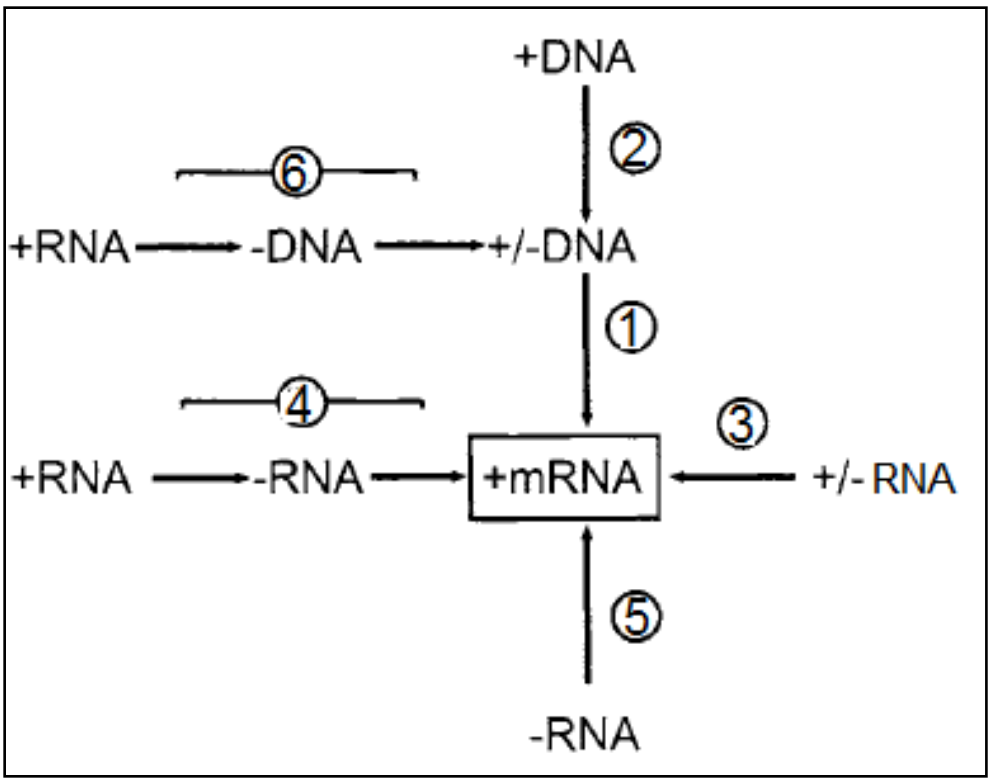
تتلخص آليات التضاعف التي ذكرت أعلاه باستنساخ الجينومات الفايروسية من الرنا المراسلة الرايبية الفايروسية mRNAs والمتمثلة بجينومات الفايروسات من النوع الرايبي مفرد الخيط موجب التوجه Sense ssRNA (+) أو المتمثلة بمسْتَنسخات Transcripts جينومات الفايروسات سالبة التوجه Sense ssRNA (-) وجينومات الفايروسات من النوع dsRNA أو dsDNA، يبين الشكل (7-4) مسارات إستنساخ 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 ينفصل 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 المشتَّت" Dispersive replication حيث تتوزع قطع الجينوم الأبوي عشوائيا في خيطي الجينوم الوليد.



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

الشكل مقتبس من Cann (2005).



الشكل (7-4): مسارات إظهار الجينوم الفايروسي عن طريق الرنا المراسلmRNA.

المصدر : فايروسات النبات ، د. نبيل عزيز قاسم 2011

محاضرة رقم (12)

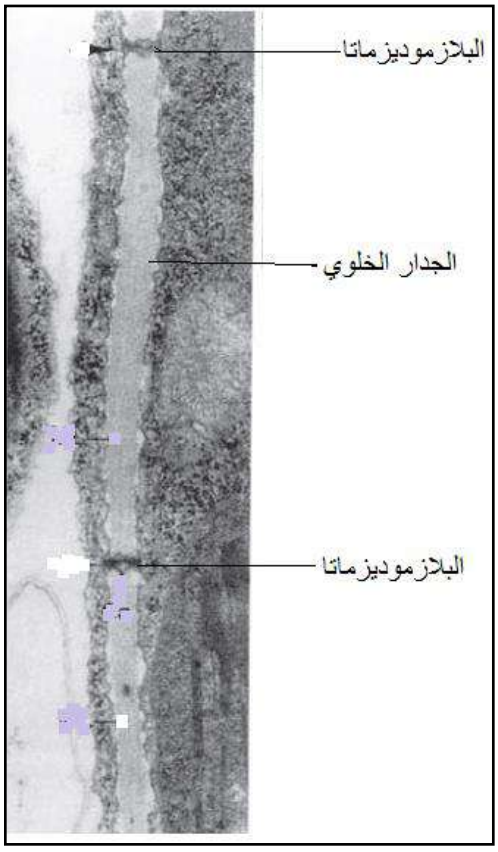
حركة الفايروسات في النباتات

هي المرحلة الثالثة من مراحل الإصابة والتي تعقب مرحلة التضاعف الفايروسي وهي تعد مرحلة أساسية لاكتمال الإصابة الفايروسية فمن دونها لا تكتمل الإصابة حتى لو نجح الفايروس 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 البلازموديزماتا والسريعة خلال اللحاء بمشاهدة الجسيمات الفايروسية فيهما وذلك عند دراسة أنماط الحركة في نوعين من الأعراض وهما الموزائيك والاصفرار حيث تحددت مناطق الإصابة في الأعراض الأولى بنوع التعريق في الأوراق
Leaf vasculature مما يدل على نقل الفايروس عبر الخلايا ثم بالأنسجة الوعائية فيما دلت أعراض الاصفرار على انتشار الفايروس 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)

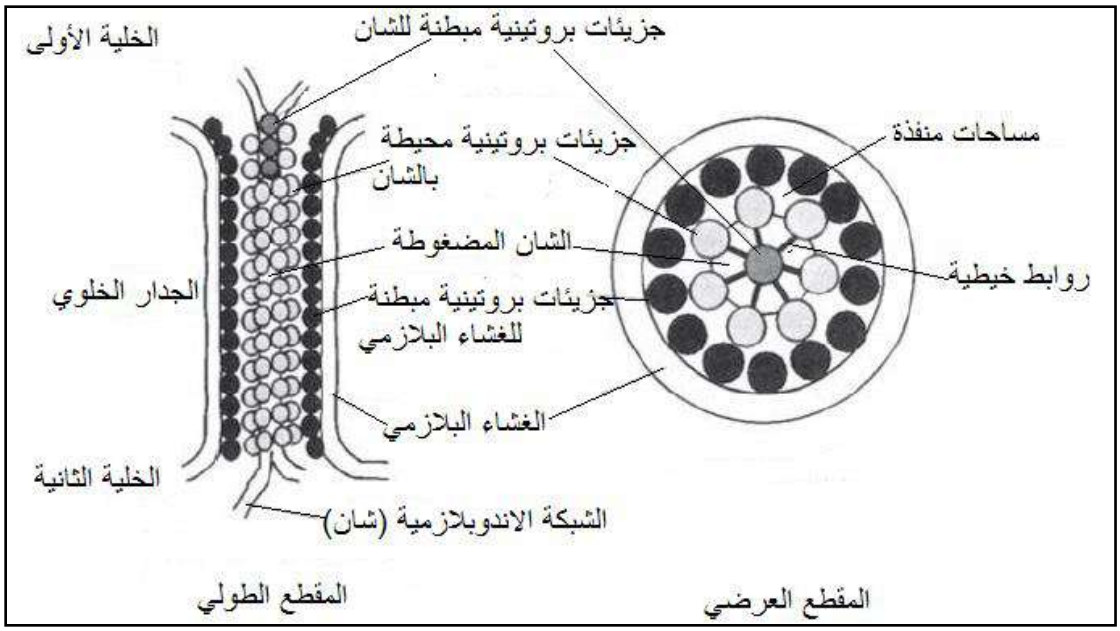
تحصل الحركة البطيئة (الحركة بين الخلايا) Slow or Cell-to-cell movement بتحرك الفايروسات الكاملة أو جينوماتها داخل الخلية المصابة في السايتوبلازم وكذلك عبر الأغشية الخلوية بالنسبة للفايروسات المتضاعفة فيه أو من النواة إلى السايتوبلازم بالنسبة للفايروسات المتضاعفة في النواة ويعتقد أن هذه الحركة تتم بظاهرة الضغط الانتشاري وحركة السايتوبلازم الدورانية وبعد اكتمال تضاعف الفايروس داخل الخلية وامتلائها بالأفراد الجديدة ثم تبدأ هذه الأفراد بالحركة من خلية لأخرى عبر الروابط السايتوبلازمية الرابطة بين سايتوبلازم كل خليتين متجاورتين والمسماة "البلازموديزماتا" Plasmodesmata وهي قنوات سايتوبلازمية مبطنة بالأغشية البلازمية تمتد عبر جدران خلايا النبات، (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 تحوير لها كي تتوسع لتسمح للجسيمات الفايروسية من العبور خلالها حيث تلعب بروتينات الحركة Movement proteins , MP التي تشفرها الفايروسات دورا في تحوير 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 ممتلئة بصف مفرد من جسيمات الفايروس، ولقد فسرت عدة آليات لتفسير الكيفية التي تحور بها البلازموديزماتا لتصبح مهيأة لعبور الفايروسات وبالاستعانة 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.



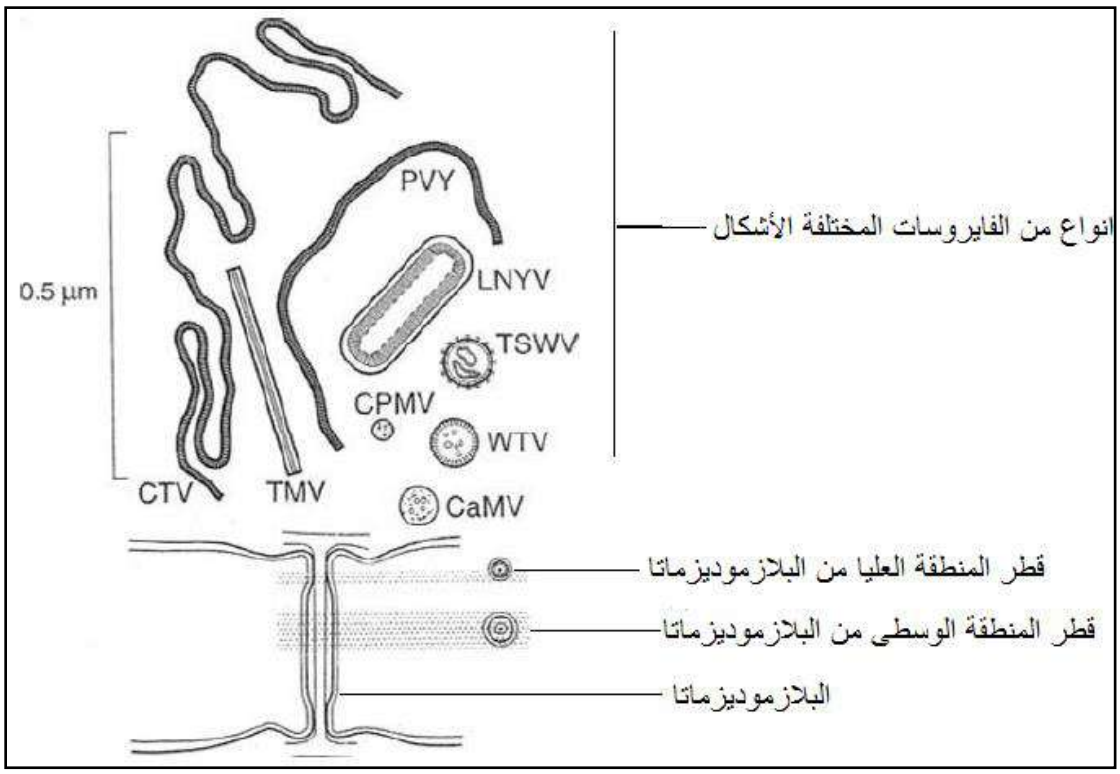
الشكل (7-12): صورة بالمجهر الالكتروني يبين مواقع البلازموديزماتا في الجدار الخلوي الفاصل بين خليتين.

الشكل مقتبس من Hull (2009).



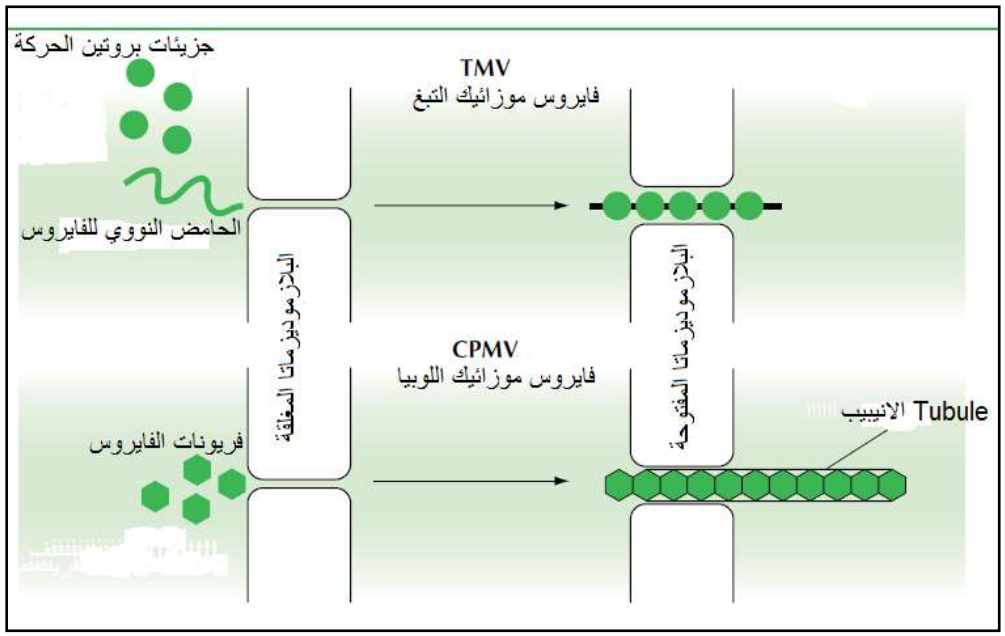
الشكل (7-13): التركيب التشريحي للبلازموديزماتا بالمقطعين الطولي والعرضي، (الرمز "شان" يعني الشبكة الاندوبلازمية).

الشكل مقتبس من Hull (2009).

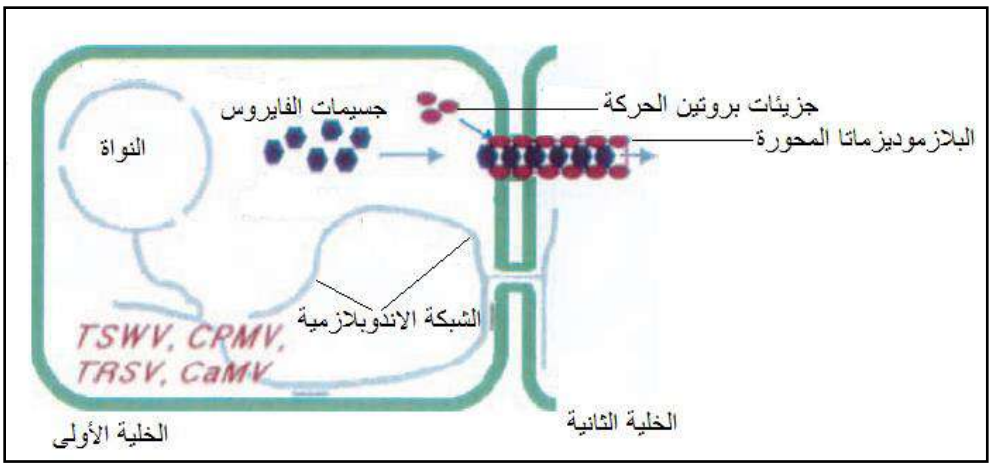


الشكل (7-14): مخطط يبين صغر حجم قطر البلازموديزماتا الطبيعية والذي لا يزيد عن 3 نانومتر، مقارنة بحجوم عدد من أنواع الفايروسات المختلفة الاشكال.

الشكل مقتبس من Hull (2009).



(أ)



(ب)

الشكل (7-15): (أ) نموذج مقترح لآلية عمل بروتينات الحركة لتسهيل عبور الفايروسات العصوية والايزومترية عبر البلازموديزماتا بعد توسعتها بتلك البروتينات، حيث يظهر الشكل العلوي أن جزيئات بروتين الحركة ترتبط بالحامض النووي لفايروس موزائيك التبغ الممثل للفايروسات العصوية وليس بالفايروس الكامل وتمرره عبر البلازموديزماتا، أما الآلية الثانية فهي اصطفاف جزيئات بروتين الحركة بشكل أنيبيب Tubule في فجوة البلازموديزماتا وتوسعتها لتمر منها الجسيمات الفايروسية الآيزومترية الكاملة كما موضح مع فايروس موزائيك اللوبيا. (ب) نموذج لحركة أربعة أنواع من الفايروسات الآيزومترية 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 الآندوبلازمية في هذه الحركة، (مختصرات اسماء الفايروسات مبينة داخل الشكل).

الشكل مقتبس من Cann (2005) وHull (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 تحويرات تركيبية في البلازموديزماتا لغرض توسعة تجويفها عن طريق تكوين الأنيبيبات البلازموديزماتية Plasmodesmata tubules والتي لوحظت في العديد من أنواع النباتات المصابة بفايروسات Comoviruses و Nepoviruses و Tospoviruses، Badnaviruses، ويشفر فايروس موزائيك اللوبيا (CpMV) بروتينين بحجم 48 و 58 كيلودالتون المسئولين عن تكوين الأنيبيبات التي تعمل على توسعة الشكل الأنبوبي للبلازموديزماتا وبالتالي تعمل هذه الأنيبيبات تحوير 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 وتقزم 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 السايتوبلازم والبروتين BC1 الذي ينقله عبر البلازموديزماتا 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 المسئولة عن الحركة البطيئة للفايروسات

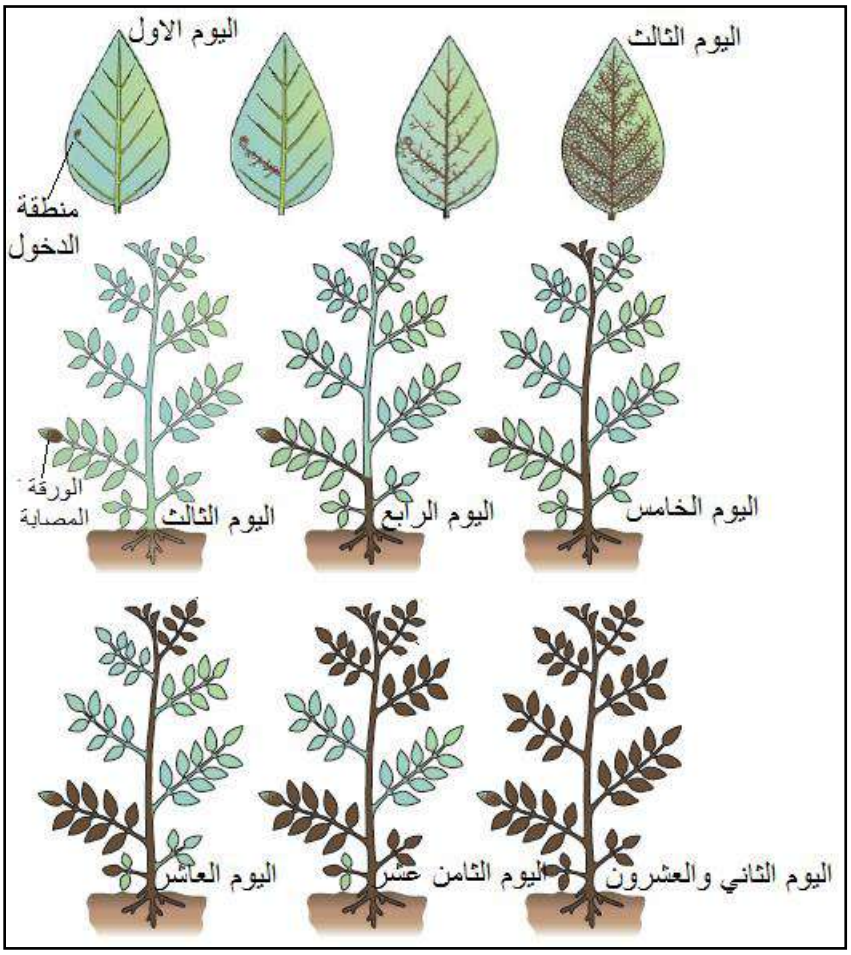
ساعدت تقانة الاستنساخ الجزيئي Molecular cloning في الكشف عن الجينات المسئولة عن تشفير بروتينات الحركة في الفايروسات فقد عرف الجين المشفِّر لبروتين الحركة في فايروسات Tobamoviruses وهو بحجم 30 كيلوداتون وذلك بدراسة طفرات من فايروس موزائيك التبغ (TMV) حساسة حراريا وخاصة الطفرة Ls1 التي تفقد قدرتها على 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 البطئ 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" Triple gene block , TGB وهي تشفر بروتينات الحركة البطيئة والسريعة لهذه الفايروسات. أما الفايروسات التوأمية 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 المسئولة 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 الاصابة الجهازية بعد أسبوعين – ثلاثة اسابيع في معظم النباتات العشبية، (الشكل 7-16) ولقد شوهدت جسيمات العديد من فايروسات النبات بواسطة المجهر الالكتروني في الأنابيب الغربالية وفي ثقوب صفائحها وتصل سرعة نقل الفايروس في هذه الحركة إلى عدة سنتمترات في الساعة وحسب نوع الفايروس والنبات فمثلا تصل سرعة نقل فايروس موزائيك 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 كفوءة 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 موزائيك 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 النشوئية" Developmental resistance وهي المقاومة المرتبطة بتطور النبات من مرحلة النمو الخضري إلى النمو الزهري ولوحظت الظاهرة ذاتها مع فايروس موزائيك 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 بالأيض 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 معلَّمة إشعاعيا يطلق عليها الجينات المُخْبِرة Reporter gene إذ يتم إدخال جين مُعلَّم Tagged virus 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 المعلَّمين 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 اللحاء.

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 الاصابة في النبات الادنى الايمن، يلاحظ أن الفايروس يتجه اولا إلى الجذور في اليوم الرابع من الاصابة حيث يوضح اللون البني مسار الفايروس في النبات ثم

يتحرك صعودا إلى بقية اجزاء النبات، والتوقيتات المثبتة تقريبية تتباين حسب نوع النبات والفايروس وظروف الاصابة.

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

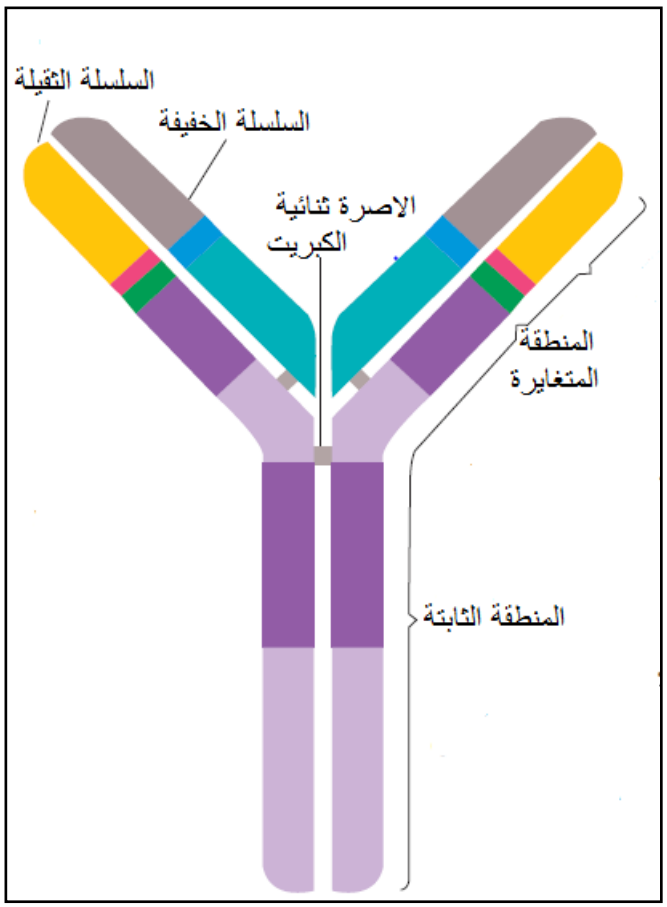
هي إحدى أهم طرق تشخيص الفايروسات المعتمدة الآن عالميا والتي سهلت عملية التشخيص بشكل كبير حيث تمتاز بسرعتها ودقتها العالية وتتلخص مميزاتها بما يأتي:

(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) وفَّرت 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 وخزنها 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 جلوبيولينية Immunoglobulins , Igs 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" Variable region (V) 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 إرتباطية متعددة قادرة على الارتباط مع جسيمات المستضد (الفايروس) أما الطرف الآخر للسلسلتين فيسمى "الجزء الثابت" Constant fragment (FC)، (الشكل 9-1)، تنتج هذه الأضداد في أجسام الحيوانات اللبونة ذات الجهاز المناعي المتطور من قبل خلايا مناعية لمفية 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).

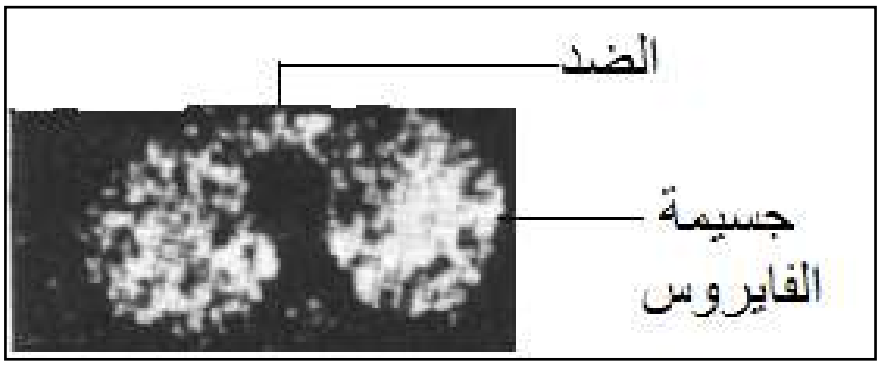
2.1.9. المستضدات (الأنتجينات)

المستضدات Antigens وتسمى أيضا "العوامل الممنِّعة 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 ستتفاعل 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 وتحوي 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 والمتكونة 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 المُحدَثة" Neotopes والتي تتكون من عدد من سلاسل الأحماض الأمينية المتباعدة مكانيا ولكنها تتقارب بسبب الالتفاف الذي يحصل في تلك السلاسل (3) "المحددات المستضدية المختفية" Cryptotopes وهي التي لا تظهر إلا حين تفكك (دنترة) 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 × 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 منطقته المتغيرة مع الجسيمة الفايروسية المتخصص عليها أي أن كل جزيئة ضد لها قدرة ارتباط مع جسيمتين فايروسيتين 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) الآصرة الهيدروجينية Hydrogen bond (2) الآصرة الكهربائية المستقرة Electrostatic bond (3)الآصرة الكاره للماء Hydrophobic bond (4) آصرة 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 تزاحم 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 المصول المضادة

يوجد نوعين من المصول 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 المصول أحادية النسيلة مثل تلك المنتجة ضد فايروسات Potyviruses تتفاعل مع كل أنواع هذه الفايروسات وذلك لاشتراكها بنفس المحددات المستضدية كذلك تفشل المصول 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 وخنازير غينيا والماعز في إنتاج المصول المضادة كما تستعمل الخيول لإنتاج المصل المضادة لفايروسات البطاطا ولكنها صعبة الترسيب في الاختبارات المصلية.

يتم إنتاج المصل بحقن الأرنب بجرعة مقدارها مللتر واحد من المحلول الفايروسي 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 الفايروسي بكمية مساوية له حجما من مادة "فرند المساعدة الكاملة" Complete Freunds 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 Freunds adjuvant والتي تنقصها البكتريا حيث تعمل هذه المادة سواء كانت كاملة أو ناقصة على تحسين القدرة الإمناعية للحيوان بسبب إعاقتها لتقدم الفايروس في الدم مما يعطي الفرصة للجهاز المناعي للتعرف الأفضل على الفايروس 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 المصول المضادة من دون الحاجة لحقن الحيوان بالفايروس الكامل ولكن ببروتين الغطاء الفايروسي فقط والمحضر في خلايا بكترية معدلة وراثيا لإنتاج هذا البروتين والذي ينقى ويمنع به الحيوان وتتوفر الآن تجاريا مستحضرات للعديد من بروتينات الأغطية الفايروسية المعدة لإنتاج المصول المضادة للفايروسات ومنها فايروس الاصفرار 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 Polymerase Chain Reaction , PCR 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 كالآتي "هي العملية المتضمنة إنتاج خيوط تكاملية منفصلة للحامض النووي المستهدف بواسطة فائض مولاري من بادئين قصيري النيوكليوتايدات ثم إطالة البادئين لإنتاج نواتج مستنسخة تعمل قالبا 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 (الكَلْوَنَة) 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 والتخصص 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 : dsRNA , dsDNA , ssDNA ssRNA حيث شخصت به أنواع تعود لأجناس *Alfamovirus* و *Capillovirus* و*Caulimovirus* و*Cucumovirus* و*Fijivirus* و *Foveavirus* 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 لجزء 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 والثربس وقفازات الأوراق والنيماتودا، واستعمل أيضا في الكشف عن الفايروسات في الحشرات السابتة 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 أثنين من "البوادئ قصيرة النيوكليوتايدات" Oligonucleotide primers كل منها بحجم 16- 30 نيوكليوتايدة 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) دنترة الدنا المزدوج بتسخينه إلى 94-98مْ فينفصل خيطاه ويصبحان مهيئين للارتباط بالبوادئ (2) تبريد المتفاعلين إلى 72مْ عندها سيرتبط كل بادئ مع الجزء المناسب له من خيط الدنا ويتكامل معه وبذلك يتحول إلى "بادئ مهجَّن متطاول" Annealed primer (3) يحضَّن المزيج عند 37-65مْ للسماح لإنزيم بلمرة الدنا بإطالة البادئ 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 الاختبار بكامل دوراته الثلاثة في "جهاز PCR machine" والمبين في

الشكل
(9 - 29). وجرى تطوير على الاختبار الأساسي لتفاعل تسلسل البوليميريز ليكون ملائما للتمييز بين سلالات الفايروسات حيث طورت طريقة "التعدد الشكلي المقيد لطول الشظيّة" Restriction fragment length polymorphism , RFLP 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 البوادئ المتخصصة وبالتالي قلصت هذه الطريقة من كلف التشخيص بتقليصها لعدد الاختبارات المطلوب انجازها.

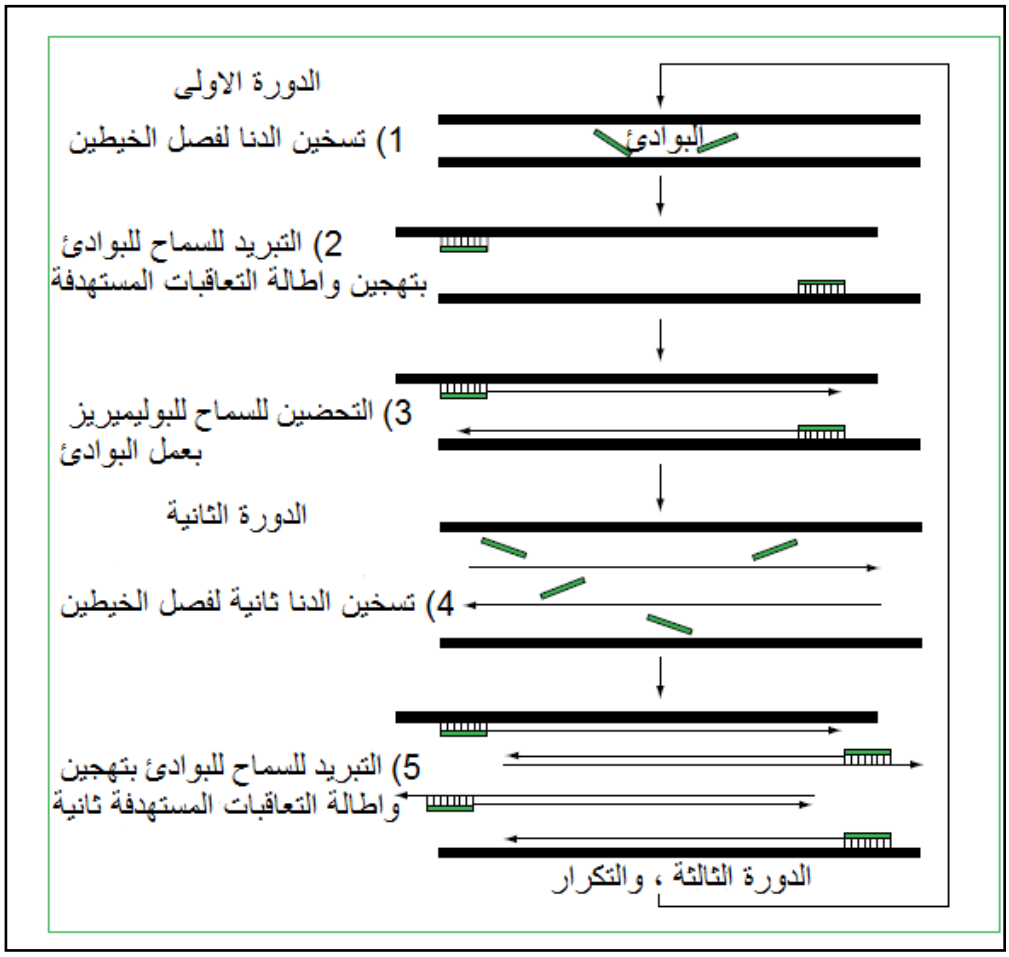
2.8.9. إعداد العينة النباتية للفحص بتقانة PCR

يعد إعداد العينات النباتية للفحص أصعب من إعداد العينات البشرية والحيوانية حيث يتطلب سحقها مما يؤدي إلى إطلاق مواد تتداخل سلبيا 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 فان البديل هو(1) استخلاص الأحماض النووية بواسطة الفينول أو الكلوروفورم لإزالة البروتينات النباتية ثم استرجاع الأحماض النووية من المستخلص بترسيبها بواسطة الايثانول أو الآيزوبروبانول 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 الفايروسية نقية من العصير النباتي وهي طريقة طورت أصلا للتعامل مع الفايروسات الحيوانية وتسمى "تفاعل تسلسل البوليميريز باصطياد المستضد" Antigen-Capture-PCR، (4) استعمال طريقة "تفاعل تسلسل البوليميريز بالاصطياد البصمي " Print-Capture-PCR والتي يطلق عليه إختصارا 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) أستعمال طريقة "الراتنج المحرر للجين" Gene Relaser ^{Tm} Matrix ويتوفر هذا الراتنج تجاريا ويستعمل مع العصير النباتي الخام لقدرته على إزالة الملوثات من عصير أنواع مختلفة من النباتات منها التبغ والعنب والتفاح والخوخ والمشمش.

3.8.9. الإنزيمات المستعملة في تقانة PCR

تتوفر حاليا أنواع من إنزيم "بلمرة الدنا الثابت حراريا" وأكثرها إستعمالا هو الإنزيم المعروف باسم T*aq* 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.



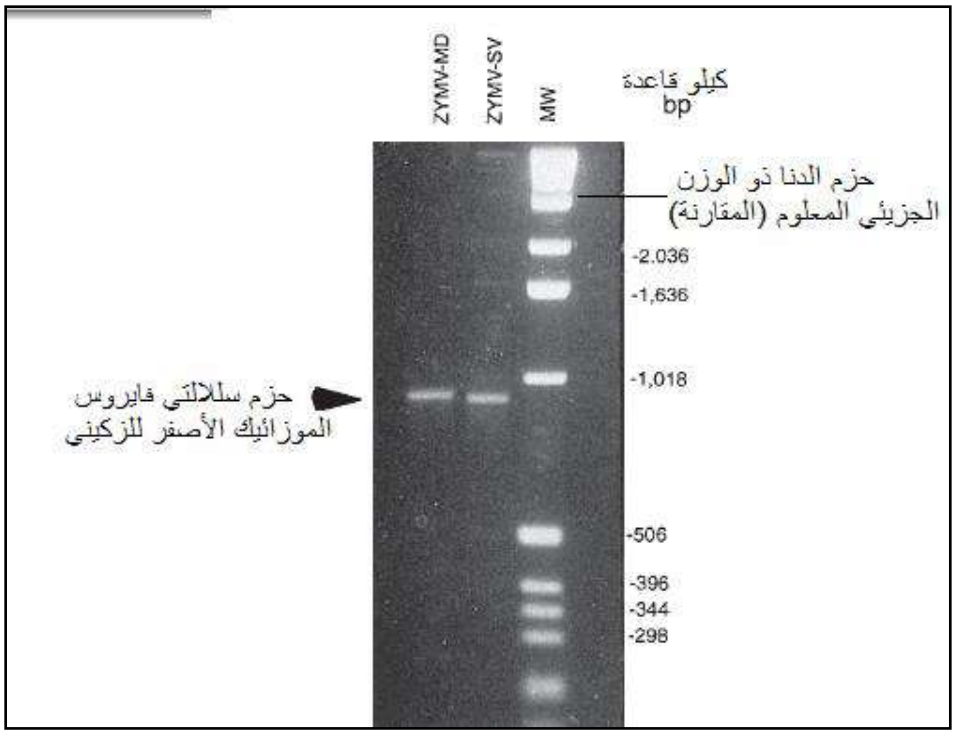
الشكل (9-27): آلية تفاعل تسلسل البوليميريز (PCR).

الدورة الأولى (1) تسخين الدنا لفصل (صهر) الخيطين (2) التبريد للسماح للبادئين بالتهجين والإطالة Annealing مع التعاقبات الهدف (3) التحضين 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. البوادئ

استعملت العديد من أنواع بوادئ التضخيم المتخصصة Primers إزاء عدة عوائل فايروسية وهي Geminiviridae و Luteoviridae و Potyviridae و Tombusviridae حيث تستهدف هذه البوادئ المناطق المحفوظة في الجينوم Conserved regions والتي تتماثل في العديد من الفايروسات، ولكن قد يتم اختيار بوادئ متخصصة جدا قادرة على التمييز بين سلالات النوع الفايروسي الواحد وبذلك طورت بوادئ على مستوى السلالة واستعملت لتمييز سلالات فايروس جدري الأجاص (PPV) وكذلك لتشخيص سلالة الكرز التابعة لفايروس التبقع الحلقي التماوتي للأجاص (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 المستحثَّة 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 أستمر 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 (12-2): حقل مزروع بصنفين من الطماطة الأول مقاوم لفايروس تجعد واصفرار أوراق الطماطة (TYLCV) والثاني حساس له وتبدوا الفروقات واضحة في نمو الصنفين.

الشكل مقتبس من Mahy و Van Regenmortel (2008).

الجدول (12–2): أنواع من جينات المقاومة النباتية المكتشفة ضد عدد من فايروسات النبات

الجين	النبات المعزول منه	الفايروس الذي يعمل ضده
جينات كاملة السيادة		
N	*Nicotiana glutinosa*	فايروس موزائيك التبغ (TMV)
N^-	*N. sylvestris*	فايروس موزائيك التبغ (TMV)
Zym^a	*Cucurbita moschata*	موزائيك قرع الزكيني الأصفر (ZYMV)
Tm-2	*Lycopersicon esculentum*	فايروس موزائيك الطماطة (ToMV)
$Tm\text{-}2^2$	*L. esculentum*	فايروس موزائيك الطماطة (ToMV)
Nx , Nb	*Solanum tuberosum*	فايروس البطاطا أكس (PVX)
By , By-2	*Phaseolus vulgaris*	فايروس الموزائيك الأصفر للفاصوليا (BYMV)
RSV_1 , RSV_2	*Glycine max*	فايروس موزائيك فول الصويا (SMV)
جينات ناقصة السيادة		

الجين	النبات المعزول منه	الفايروس الذي يعمل ضده
Tm-1	*L. esculentum*	فايروس موزائيك الطماطة (ToMV)
L1 , L , L3	*Capsicum* spp.	فايروس موزائيك التبغ (TMV)
جينين غير مسميين	*Hordeum vulgare*	فايروس الموزائيك التخططي للشعير (BSMV)
مجموعة جينات	*Vigna sinensis*	فايروس موزائيك اللوبيا الجنوبي (SCPMV)
جينات متنحية		
By^3	*P. vulgaris*	فايروس الموزائيك الأصفر للفاصوليا (BYMV)
SW_2 , SW_3 , SW_4	*L. esculentum*	فايروس الذبول المبقع للطماطة (TSWV)

إن العلاقة الوراثية بين الفايروسات وعوائلها النباتية تفسرها ظاهرة "الجين مقابل الجين" أي وجود جين التقبلية في العائل الحساس وجين الإمراضية 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 الامراضية الفايروسي ويعمل بالضد منه مما يعني أن النبات الذي يمتلكه سيكون مقاوما أو متحملا للفايروس، وتعبّر جينات المقاومة عن فعلها الجيني بآليات مختلفة حيث تعمل

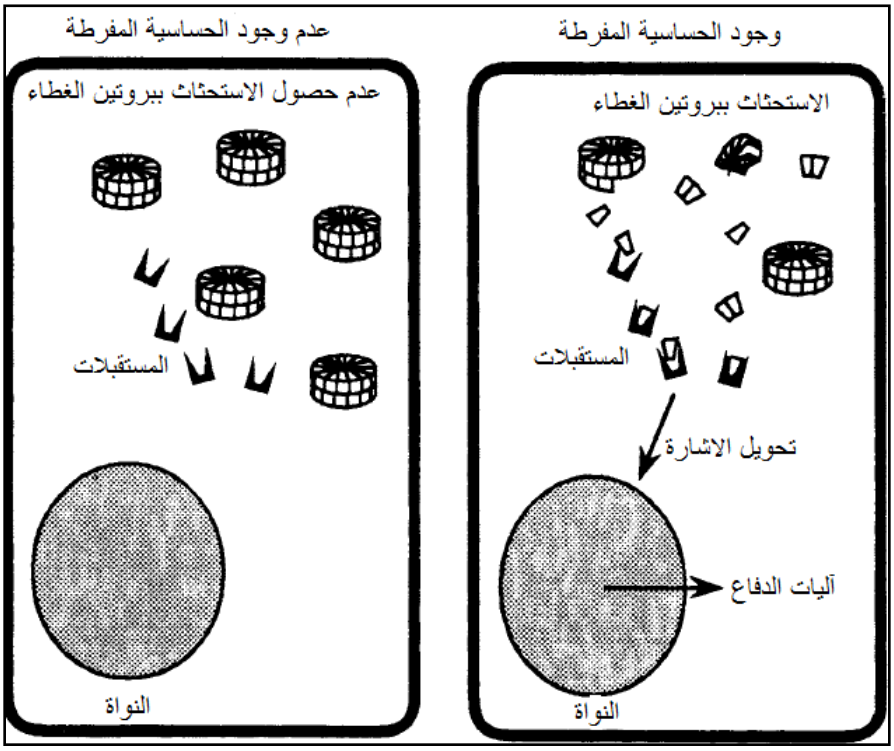
نواتج جين المقاومة في الطماطة Tm-1 على منع تضاعف فايروس موزائيك الطماطة (ToMV) فيما تعمل نواتج الجين Tm-2 على إعاقة حركة الفايروس بين الخلايا فيما يعمل جيني المقاومة N , N^- في التبغ على مقاومة فايروس موزائيك التبغ بآلية "الحساسية المفرطة" Hypersensitive reaction والتي كان يعتقد سابقا أن الناتج الجيني لجين المقاومة Nوهو البروتين 126/183 KDa هو المسئول عن حدوثها ولكن تبين أن جزئا منه فقط هو المسئول عن ذلك وهي القطعة المحصورة بين الحامضين الأمينيين رقم 692 و1116، فيما يستَّحث الجين N^- 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 البيروكسيديز Peroxidase و Hexose monophosphatase في المنطقة المحيطة بالبقعة الموضعية المتكونة مع تراكم السكريات وخاصة البنتوز وزيادة في نشاط الفينولات والكينونات التي يبدأ تكونها 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 الموضعية بلا إصابة جهازية، كما تنتج النباتات المقاومة مركبات دفاعية تظهر بعد الإصابة بالفايروس والتي تسمى "العوامل المضادة للفايروسات" Antiviral factors , AVF 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 بالانتباذ، 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 لفايرويد الدرنة المغزلية (PSTVd) إلا المعضلة التي واجهت استعمال هذه الأصناف هي "درجة تحمليتها

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 التغايرية تسبب حدوث تغير جينومي وتحطيم لحالة المقاومة في النبات وهذا يتطلب حصول تطور تطفيري في تعاقبات الجينات الفايروسية أو في العناصر الحاكمة Controling elements الموجودة في الجينوم وهي تعاقبات غير جينية وهذا ما لوحظ عند دراسة التعاقب النيوكليوتايدي لسلالة لفايروس موزائيك الطماطة
(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 لطفيل 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 الطماطة 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 الاستحثاث 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 فايروسات البطاطا أي (PVA) والبطاطا أكس(PVX) والبطاطا واي (PVY) من نوع البطاطا البري *Solanum brevidens* حيث تعمل هذه الجينات على إعاقة حركة هذه الفايروسات في نباتات البطاطا، وعزل الجين Ryadg المقاوم لفايروسي 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 المستحثَّة 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 تحمِّلية طبيعية للفايروس المعني وهذا يتطلب إجراء فحص حقلي 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 المتكاثرة التي ستحصل فيها تغيرات وراثية جسميةSomaclonal variations قد تؤدي لظهور صفة المقاومة، ويمكن زيادة تكرارية هذا التغاير الوراثي بإضافة مواد مطفِّرة إلى الوسط الزرعي الذي تنموا فيه الخلايا، فوجد أن هجن الطماطة المنتجة من أقراص أخذت من أوراق مصابة أظهرت حالة مقاومة ضد فايروس موزائيك الطماطة (ToMV)، كذلك استعملت طريقة دمج الروتوبلاستات Protoplast fusion لنباتات متباعدة القرابة لإعطاء فرصة أكبر لإدخال جينات المقاومة إلى الصنف الجديد وعادة ما يتم تشعيع 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)