

## مقدمة

بسم الله الذى علم الانسان ما لم يعلم، لقد ترددت كثيراً فى ولوج هذا المدخل حين فكرت فى اصدار كتاب فى موضوع الفيرويدات وإنتابتنى هواجس كثيرة وذلك لأن هذا العلم صعب وحديث وإن الناقلين موجودون بالمرصاد لكل محاولة فى مجال جديد. زيادة على ذلك لا يوجد أى كتاب أو نشرة باللغة العربية تتكلم فى هذا الموضوع وخفت أن أنزلق فى مسالك الهلاك وخاصة حتى تخوض فى هذا العلم يجب أن تكون ملماً بكثير من العلوم مثل الكيمياء الحيوية والجزئية والهندسة الوراثية وأمراض النبات.

وبعد أن استخرت الله سبحانه وتعالى إنقشعت عن ذهنى هذه المخاوف واختمرت هذه الفكرة فى خيالى وبدأت السفر والترحال وأقلب وجهى فى مشارق الدنيا ومغاربها حتى أستطيع الحصول من العلماء والباحثين على أحدث الأبحاث وأشملها لكى أقدم كتاباً فيه شئ مما يصبو إليه القارئ العربى والمتخصص فى علم أمراض النبات. عقدت العزم وتوكلت على الله وبدأت أبحث وأنقب عن مراكز أبحاث الفيرويد والعلماء واقابلهم أو أتصل بهم حتى استطعت أن احصل على ما يقارب من ثمانين بحثاً ثم اكملت ذلك من المكتبات وجمعت معظم إن لم يكن كل ما كتب عن الفيرويد باللغة الانجليزية (هناك أبحاثاً كثيرة باللغة اليابانية والصينية والايطالية) من سنة ١٩٧١ حتى ١٩٩٤ ونقلته باختصار شديد ولاقت معاناة كبيرة فى التعامل مع الكم والكيف لهذه الابحاث وخاصة الاصطلاحات العلمية ونقلت كل ذلك فى صورة مبسطة فى هذا الكتاب.

إن أولى المشكلات التي قابلتني في تحضير هذا الكتاب هي المصطلحات العلمية الخاصة بالهندسة الوراثية والكيمياء الجزيئية، وهذه الشكوى مكررة في كل ما كتبت من كتب قبل هذا الكتاب وإنني أطلب من مجمع اللغة العربية أن يضعوا لنا حلاً لهذه المشكلة، وإلا بقينا نقدم رجلاً ونؤخر أخرى في تأليف وترجمة الكتب العلمية الحديثة. ونحن الآن نعتمد على اجتهادات خاصة في تفسير المصطلحات العلمية قد تكون مناسبة وقد لا تكون ولكن هذه هي الحلول الموجودة.

تعتبر الفيروسات كائنات صغيرة (كلمة كائن باللغة العربية الفصحى تعنى شئ موجود وهي مشتقة من الكينونة وليست مقتصرة على الحي أو غير الحي) جداً تقاس بالنانوميتر (واحد على بليون من المتر) وطولها يساوى ٥٠ نانوميتر ووزنها الجزيئى صغير جداً يساوى  $\frac{1}{1000}$  من الوزن الجزيئى لاصغر فيروس. يتركب الفيرويد من حمض نووى RNA احادى الخيط وتأخذ الشكل الدائرى أوالمستقيم شبه العصى وقد تتفرع احياناً أو يتكون بها تركيب دبوس الشعر أو تركيب رأس المطرقة، وكل ذلك فى اوضاع وظروف معينة مشروحة فى الكتاب بالتفصيل. يتركب الفيرويد من نيوكليتييدات حوالى ٢٤٦ لاصغر فيرويد و ٣٧٥ لأكبر فيرويد ولا نستطيع الجزم بهذه الأرقام لأن العلم كل يوم يأتى بجديد (بعض الباحثين قال إن بعض الفيروسات يتركب من ٦٠٠ نيوكليتيده وهو بذلك وقع فى خطأ علمى (وما أكثر الأخطاء العلمية فى الفيروسات) لأنه وجد جزئيين من الفيرويد كل منها ٣٠٠ نيوكليتيده مرتبطان مع بعضهما البعض).

تسبب الفيروسات امراضاً على النباتات الزهرية ولم يظهر حتى سنة ١٩٩٤ أنها تصيب النباتات غير الزهرية أو الحيوانات ولكن كما قلنا فإن العلم كل يوم يأتى بجديد. إن كثيراً من الأمراض التي كانت تعتبر أمراض فيروسية قد إنسخلت عن قسم الأمراض الفيروسية وأصبحت منضمة فى أعداد الأمراض الفيرويدية بعد أن تأكد عدم صحة التشخيص الأول لهذه المسببات. سوف لا يمضى طويل وقت حتى تصبح قائمة الأمراض الفيروسية المتحولة إلى الأمراض الفيرويدية طويلة جداً.

إن سبب هذا التحول هو التقدم العلمى الهائل الذى حصل فى الكيمياء الجزيئية والهندسة الوراثية وطرق الفصل والتحليل التى تطبق على الحمض النووى RNA.

قبل السبعينات من هذا القرن لم يكن للفيروسات أى ذكر ولم تكن قد عرفت، إلا أن العالم T.O.Diener بأبحاثه المستمرة على مرض الدرنه المغزلية فى البطاطس استطاع أن يكتشف أن مسبب المرض ليس فيروس وإنما كائن قريب الشبه بالفيروس وسماه فيروس ذلك سنة ١٩٧١. ثم بعد ذلك إنتشرت الأبحاث على هذه الكائنات وبعد ستة عشر عاماً يعنى سنة ١٩٨٧ أمكن اكتشاف عشرة فيروسات ودراستها دراسة وافية ثم بعد ذلك استمرت اكتشافات الفيروسات ولغاية سنة ١٩٩٤ أمكن اكتشاف ما يربو على ٣٠ فيروس. يعتبر فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس هو أكثر الفيروسات التى نالت قسطاً وافراً من الدراسة، وجميع أسس علم الفيروس أخذت من نتائج الدراسة على فيروس الدرنه المغزلية. كذلك فإن العالم Diener هو أكثر العلماء أبحاثاً على الفيروس.

نستطيع أن نقول إن علم الفيروس قد ولد وشب وأبغى فى فترة قياسية من الزمن أو يمكن القول بأنه ولد يافعاً وذلك لأنه فى فترة ربع قرن تقريباً حدث له تقدم سريع يقابل ما حصل لعلم الفيروس فى أكثر من ثمانين سنة تقريباً وذلك يعود للتقدم السريع فى الكيمياء الجزيئية والهندسة الوراثية.

إن طرق العزل الحديثة وطريقة PAGE وما حدث لها من تحورات وتطورات كبيرة ساعدت كثيراً فى اكتشاف الفيروس وتقديره فى مستخلصات النبات. إن هذه الطريقة أمكن بواسطتها اكتشاف الفيروس بكمية قليلة جداً تقدر بالبيكوغرام وهذا الوزن يساوى واحد من بليون (مليون مليون) غرام. زيادة على ذلك فإن طرق استعمال المنقبات والبودائى والحمض النووى المكمل والكلونة، أمكن بواسطتها السير بخطى سريعة فى مجال الفيروس حتى أصبح علم الفيروس من العلوم الشائعة فى جميع أقسام أمراض النبات وأقسام الأحماض النووية فى معظم أنحاء العالم.

إن هذا الكتاب الذى بين أيدينا يقع فى جزئين، الجزء الأول يتكلم عن

الفيروسات بشكل عال ويتكون من أربعة فصول، الفصل الأول يتكلم عن الفيروس من حيث تطور علم الفيروس وأدلة وجود الفيروس وجميع صفات الفيروس. أما الفصل الثاني يتكلم عن الفيروسات وتفاعلاتها مع العائل ومقارنة الفيروسات مع الفيروسات والفيروسات. أما الفصل الثالث فيتكلم عن الدراسات الحديثة للفيروسات من حيث النطاقات واختلاف التتابع في تنوعات الفيروسات وتشخيص الفيروسات. أما الفصل الرابع يتكلم عن الدراسات التطبيقية في علم الفيروسات من حيث بناء فيروس معدى أو المعالجة بالحرارة المنخفضة أو تثبيط الإصابة الفيروسية أو الوقاية بالتضاد والتداخل بين الفيروسات المحقونة معاً.

أما الجزء الثاني من الكتاب فيتكلم عن الأمراض الفيروسية. يتكلم عن المرض المتسبب عن الفيروس وأعراض المرض واسم الفيروس المسبب وصفاته وطرق الانتقال. وقد قسمت هذا الجزء إلى ثلاثة فصول الفصل الخامس يتكلم عن الأمراض المتسببة عن فيروسات تحت المجموعة B<sub>1</sub> الذى يمثلها فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس. أما الفصل السادس يتكلم عن فيروسات تحت مجموعة B<sub>2</sub> و B<sub>3</sub>. وحيث أن فيروسات مجموعة A تحتوى على فيروسين فقط فإنى جعلتها فى آخر الكتاب فى الفصل السابع.

هناك بعض الفيروسات لا تزال تحت الأبحاث أو فى بداية الاكتشاف وهذه الفيروسات وضعتها فى آخر الكتاب حتى تتم الفائدة، وعن كل فيروس كتبت المرجع الذى أخذ منه هذا البحث ولم اكتب هذا المرجع فى المراجع العامة. إنى كتبت مراجع هذه الفيروسات الحديثة معها فى نفس الصفحة حتى يتأكد القارئ أن كل ما فى هذا الكتاب يمكن الرجوع إليه والأستزادة منه.

أما بالنسبة للمراجع فى الجزء الأول كتبت فى نهاية كل فصل عدة مراجع خاصة جداً بهذا الفصل حتى يمكن الرجوع إليها أما فى نهاية الكتاب فكتبت حوالى ٢٩٠ مرجع سواء كتب أو مجلات وهذه المراجع التى كتبتها يمكن الرجوع إليها فى المكتبات العربية أما المراجع المنشورة ولا تصل إلى الدول العربية فإنى لم أكتبها فى المراجع. وقد رتب المراجع بطريقة حديثه وذلك حسب حداثة المرجع



وذلك لسهولة الرجوع إليها فوضعت مراجع سنة ١٩٩٤ لوحدها وسنة ١٩٩٣ لوحدها وهكذا وضمن هذه السنوات رتبت المراجع حسب الطريقة التقليدية.

في هذا الكتاب يشعر القارئ في كل فقرة أو موضوع أنه أمام تجربة أو بحث أو أنه يقرأ تفاصيل البحث والتجربة وكتبت تفاصيل بعض التجارب حتى يكون القارئ ملماً بالنتائج وطرق الوصول إليها. وهذه الطريقة في كتابة الكتب العربية نادرة جداً إلا أنها شائعة ومنتشرة في كثير من الكتب الأجنبية خاصة في الأمراض البكتيرية والفيروسية. حاولت تطبيق هذه الطريقة في هذا الكتاب حتى يخرج عن قضية سرد المعلومات مباشرة إلى قضية كيفية إجراء التجارب والحصول على النتائج. قد يكون هذا الأسلوب مستحباً عن النظام القديم حيث أنني قدمت للباحث منهلاً عذباً يستقى منه مباشرة طرق إجراء التجارب ومناقشة النتائج وسهولة الرجوع إلى المراجع العلمية. واستطيع أن أقول بأن كل فكرة في هذا الكتاب هي نتيجة تجربة علمية قام بها دارس أو باحث.

وحتى يستطيع القارئ أن يستفيد من هذا الكتاب يجب أن يكون ملماً بالكيمياء الحيوية والجزيئية والهندسة الوراثية وأمراض النبات.

وأنا إذ أقدم هذا الكتاب للباحثين أو الدارسين أسجد لله شكراً الذي الهمني الصبر وامدني بالقوة حتى يخرج هذا الكتاب في هذه الحالة التي هو عليها.

وأقدم أسفى واعتذارى عن كل خطأ في هذا الكتاب لأن الكمال لله سبحانه وتعالى

«ولله الحمد من قبل ومن بعد»

المؤلف الدكتور / محمود موسى أبو عرقوب

الأول من ربيع الآخر سنة ١٤١٦ هجرية

الموافق ٢٧ أغسطس سنة ١٩٩٥م

٢٧ آب سنة ١٩٩٥م

## الفصل الأول

### تطور علم الفيرويد

#### مقدمة:

إن اصطلاح فيرويد Viroid إستعمل ليدل على مجموعة من المسببات المرضية الجديدة والمميزة والتي هي أصغر من الفيروس Subviral. تتكون الفيرويدات المعروفة من وحدة قصيرة من سلسلة الحمض النووي RNA ذات وزن جزيئى يقارب ٧٥ - ١٠٠ ألف دالتون. عند دخول هذه الوحدات من RNA ذات الوزن الجزيئى المنخفض فى عوائل قابلة للإصابة يحدث لها تضاعف بشكل واضح وتسبب امراضاً فى العائل.

لقد ذكر اول إستعمال لكلمة فيرويد سنة ١٩٧١ وذلك أثناء المحاولات التى كانت تجرى لتنقية ومعرفة صفات العامل المسبب لمرض الدرنة المغزلية فى البطاطس والذى كان يعتقد خطأ بأنه يتسبب عن فيروس. ففى سنة ١٩٦٧ ذكر كلاً من Diener & Raymer أن المسبب المعدى لهذا المرض هو عبارة عن خيط حر من الحمض النووي RNA وأن هذه الأجزاء الفيروسية (حسب ذلك الاعتقاد) يبدو أنها لا تتواجد فى النسيج المصاب. وبعد فترة من الزمن وعند إستعمال طرق الترسيب والتحليل بالعزل الكهربائى فى الجيل، فإنه تقرر وبشكل قاطع وحاسم أن هذا الحمض المعدى من آل RNA له وزن جزيئى صغير جداً، وبالتالي فإن هذا العامل المسبب للمرض يختلف وبشكل أساسى عن الفيروسات المتعارف عليها.

بعد أن تأكد بأن مرض الدرنه المغزلية فى البطاطس يتسبب عن عامل يختلف عن الفيروس ولكن كان فيه إلتباس مع الفيروس أطلق عليه العالم Diener اسم فيروس (قريباً من لفظ فيروس). ثم بعد ذلك تبين فى سنة ١٩٧٢ و ١٩٧٣ أن هناك امراضاً أخرى مثل تقزم الاقحوان *Chrysanthemum stunt* ومرض اكسوكورتز الحمضيات *Citrus exocortis* تتسبب عن الحمض النووى RNA ذو وزن جزيئى منخفض وسميت المسببات لتلك الأمراض فيروسيدات.

## أدلة وجود الفيروسيدات Evidence For Existance of Virods.

### ١ - الصفات الترسيبية والحساسية لأنزيم نيوكلييز:

لقد أظهرت الأبحاث المبكرة التى أجريت على المستخلص الخام من أوراق البطاطس أو الطماطم المصابة بمرض الدرنه المغزلية، أن معظم المواد المعدية ترسب على معدل بطى جداً (Ca 10S) وأن هذه الصفة جعلت الباحثين أن يقرروا بشكل قاطع بأنه من غير المحتمل أن تكون المواد المعدية والموجودة فى العصير الخام هى أجزاء فيروس وكذلك وجد أن هذه المواد غير حساسة للمعاملة بالمذيبات العضوية المختلفة. إن جزيئات الفيروس المحتوية على دهون وذات الكثافة المنخفضة يبدو أنها غير واردة. كذلك فإن معاملة المستخلصات الخام بالفينول لا تؤثر على حيوية والصفات الترسيبية لهذا العامل الممرض. واعتماداً على هذه النتائج إفترض أن هذه العوامل المسببة للمرض هى حمض نووى حر.

وجد أن تخضين المستخلص الخام مع أنزيمات النيوكلييز Nucleases أظهر أن هذه العوامل المسببة للمرض حساسة لانزيم Ribonuclease وغير حساسة لانزيم De + oxyribonuclease. إن الملاحظات التى استنتجت من أن العامل الممرضى يمكن تركيزه وسهولة ترسيبه بالايثانول واعادله تعليقه Resuspension فى حجم صغير من منظم يكون متوافقاً مع فكرة أن هذا العامل الممرض هو حمض نووى حر.

وكذلك وجد أن تخضين المستخلصات مع أنزيم Ribonuclease فى بيئة ذات تركيز أيونى عال أظهرت أن هذا العامل الممرض يبقى حياً إلى حد ما بهذه المعاملة. إن هذه الصفة بالإضافة إلى صفة الغسل أو الإزالة من أعمدة Methylated serum albumin تؤدي إلى الاقتراح بأن هذا العامل الممرض المستخلص قد يكون خيط مزدوج من الحمض RNA.

لقد إستخلص كل من Singh & Bagnall حمض نووى معدى من نسيج مصاب بفيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس وقارنا بعض صفات هذا الحمض مع صفات الحمض النووى الموجود فى العصارة الخام فى المستخلص، فوجدا أن العامل الممرض فى العصارة الخام (الحمض النووى RNA) له قدرة على أحداث المرض على درجة عالية من التخفيف وله درجة تثبيط عالية وكان أكثر حساسية لأنزيم Ribonuclease، عند إزالة حيوية العصارة الخام باستعمال درجة حرارة عالية أو التخضين مع أنزيم Ribonuclease يمكن أن تسترجع هذه الحيوية بالمعاملة بالفينول. وبالدراسات التى أجريت باستعمال الطرد المركزى، تبين للباحثين أنه لا يوجد حمض نووى RNA ممرض حر فى العصارة الخام ولكنهما لم يبينا مع أية مادة كان مرتبطاً.

لقد ذكرت نتائج مشابهة لتلك التى ذكرها Diener & Raymer وذلك من قبل Semancik & Weathers سنة ١٩٦٨ عندما كانا يعملان على مرض اكسوكورترز الحمضيات. وجد الباحثان أن معظم المادة الحيوية تكون موجودة فى العصارة المنقاة والمحضرة من النسيج المصاب تبقى فى المادة الطافية فى المحلول بعد إجراء عملية الطرد المركزى عالية السرعة. من هذا استنتج الباحثان أن المادة المعدية المرضية تمتلك كفاءة ترسيب حوالى ١٠ - ١٥٠. بسبب هذه النتائج وبسبب عدم إمكانية ملاحظة أجزاء فيروسية نموذجية كاملة بواسطة التصوير بالميكروسكوب الالكترونى، فقد إقترح الباحثان أن الفيروس يمكن أن يمثل شكل من أشكال الحمض النووى المعدى، قد تكون هذه الأشكال مشابهة إما لشكل غير

ثابت من فيروس خشخشة الدخان، طفرات غير متجمعة لفيروس موزايك الدخان أو كجزئ حمض نووي RNA مزدوج السلسلة.

أما الكائن الممرض الثالث الذى درس فى تلك الفترة فهو مسبب مرض تقزم الاقحوان، حيث قام بدراسته Lawson سنة ١٩٦٨ وقد ذكر الباحث أن هذا المسبب يمتلك صفات إلى حد ما مشابهة لتلك التى يتصف بها مسبب مرض الدرنه المغزلية فى البطاطس ومسبب اكسوكورتز الحمضيات. وقد تميز مسبب تقزم الاقحوان بزيادة طول المادة المعدية والمسببة للمرض والتى تكورت أثناء عملية الطرد المركزى عالية السرعة. تبين أن الكائن المسبب للمرض حساس للمعاملة بأنزيم Ribonuclease ويمكن تركيزه بالترسيب بالايثانول المتبوع باعادة التعليق. إن معاملة مثل هذه التحضيرات المركزة بالفينول يؤدي إلى ظهور عينات ذات حيوية مشابهة لتلك العينات غير المعاملة.

## ٢ - غياب الفيروسات : Absence of Virions

مع أن هناك قليل من الشك بأن الترسيب البطئ لهذه المواد المعدية فى التحضيرات المأخوذة من الأنسجة المصابة بمرض الدرنه المغزلية فى البطاطس، اكسوكورتز الحمضيات وتقزم الاقحوان تكون خالية من جزيئات الحمض النووى RNA الحر، فإن السؤال الذى يخطر على البال هو هل توجد هذه الكائنات المعدية بذاتها فى مكان فى الخلية أم أنها تنطلق من أجزاء الفيروس العادى أثناء الاستخلاص؟؟. وللإجابة على هذا السؤال فقد درس مرض الدرنه المغزلية فى البطاطس باسهاب كبير، فقد قرر العالم Diener سنة ١٩٧١ أن الصفات الترسيبية للمواد المعدية (سريعة الترسيب) التى توجد فى المستخلصات الخام (والتي من المحتمل أن تتكون من فايرونات) لم تتغير معنوياً بمعاملة المستخلصات الخام بالفينول فقط أو بالفينول فى وجود مركب Sodium dodecyl sulfate. هذه النتائج أدت إلى القول بعدم احتمالية أن يكون RNA مرتبطاً مع بروتين أو أن يكون موجوداً بشكل فيرون كامل أو فيروسات محطمة جزئياً. لقد تأكدت هذه النتائج عن طريق

ملاحظة أن التحضيرات النقية جداً من RNA المأخوذة من نسيج مصاب بمرض الدرنه المغزلية تحتوي أيضاً مواد معدية والتي ترسب بمعدلات أسرع من تلك المتوقع الحصول عليها من RNA حر . وإذا كانت هذه المواد المعدية سريعة الترسيب مكونة من أجزاء من بروتين نووي فيروسي فإن هذه الأجزاء يمكن أن تكون بالتالي ذات صفات غير عادية . من هذه الصفات أن غلافها البروتيني يجب أن يكون فضفاضاً بشكل كبير وكاف ليسمح بوصول أنزيم Ribonuclease ( نظراً لأن نشاط وحيوية هذه المواد تكون حساسة للمعاملة بهذا الأنزيم) . علاوة على ذلك وبعض من الصفات الأخرى، فإن هذه التركيبات يمكن أن تكون مقاومة للمعاملة بالفينول ومركب Sodium dodecyl sulfate .

نظراً لعدم وجود (التأكد من وجود) بروتينات نووية في هذه الجزيئات فإن العالم Diener سنة ١٩٧١ إستنتج أن هذه المواد المعدية ذات سرعة الترسيب العالية لا يوجد فيها بروتين نووي فيروسي وبالتالي ليست أجزاء فيروسية . لقد تأكدت هذه الاستنتاجات السابقة تأكيداً جديداً بملاحظة (تجارب في الموضع In situ) أن مسبب مرض الدرنه المغزلية في البطاطس يكون حساساً للمعاملة بأنزيم Ribonuclease . وجد أن الترشيع بالتفريغ Vacuum in filtration لعصارة الأوراق المصابة بمسبب مرض الدرنه المغزلية في البطاطس والموجود فيها أنزيم Ribonuclease يؤدي إلى الفقد الكلي إلى حد ما في نشاط وحيوية هذا المسبب، في حين أنه تحت هذه الظروف لا تتأثر حيوية ونشاط جزيئات الفيروس العادي .

قام العالم Zaitlin سنة ١٩٧٢ بتجربة حلل فيها بروتينات معزولة من أوراق مصابة بمسبب مرض الدرنه المغزلية في البطاطس وأوراق مصابة بفيروس موزايك الدخان، وقارن ذلك مع بروتينات معزولة من أوراق غير مصابة فوجد أنه لا دليل على وجود بروتينات في الأوراق المصابة بمرض الدرنه المغزلية تعتبر كغطاء بروتيني لمسبب المرض في حين أنه تحت هذه الظروف يتكون الغطاء البروتيني لسلاسل فيروس موزايك الدخان ويكون واضحاً تماماً .

تساءل الباحث إذا كان الحمض النووي RNA فى المواد المعدية والتى هى سرىعة الترسىب لا يقع تحت مجموعة الفيروسات فماذا عساه أن يكون؟؟. بالنظر إلى صفة سرىعة التفكك بالفينول، فمن الصعوبة الاعتقاد أن معدل سرىعة الترسىب لبعض المواد المعدية يكون راجعاً إلى ترافقها مع بروتين، والأكثر احتمالاً هو أن RNA يكون مرتبطاً مع مكونات خلوية فى معقدات والتى لا تتحطم بالفينول، أو أنها تتواجد فى مجموعات ذات أحجام مختلفة. وبالتالى يجب التقدّم خطوة أخرى فى التعرف على هذا المسبب وذلك بتحديد موقع المسبب المرضى بالنسبة للخلايا المصابة.

### ٣ - موقع مسبب المرض فى الخلية Subcellular Location :

أجريت إختبارات حيوية على مكونات الخلية من النسيج المصاب بمرض الدرنه المغزلية فى البطاطس أظهرت أن هناك حيوية يمكن تقديرها موجودة فقط فى أجزاء من حطام الخلايا وفى الأجزاء المحتوية على الأنوية. أما البلاستيدات، الميتوكوندريا، الرايبوسومات والأجزاء الذائبة فإنها لا تحتوى إلا على آثار بسيطة جداً من الحيوية (المسبب). زيادة على ذلك عندما عزل الكروماتين من النسيج المصاب كانت هناك حيوية أكثر (وجود مسبب المرض) مرافقة لهذا الكروماتين ويمكن استخلاص مسبب المرض من هذا الكروماتين بمنظم فسفاتى وتبين أنه RNA حر.

إن هذه التجربة وتجارب أخرى أدت إلى القول بأن مسبب مرض الدرنه المغزلية فى البطاطس يكون مترافقاً مع الأنوية وبشكل خاص مع الكروماتين فى الأنسجة المصابة. وجد أن المقدار المعنوى لحيوية المسبب تكون موجودة بانتظام فى حطام النسيج المحتوى على الأنوية، أما عن احتمال وجود بعض جزيئات المسبب مترافقاً مع الأغشية الخلوية لا يمكن القول بأنها تأخذ صفة اللزوم لغاية سنة ١٩٧٢.

نظراً لأن المسبب المرضى لمرض الدرنه المغزلية فى البطاطس يكون مترافقاً مع الكروماتين، هذا يمكن أن يوضح صفاته الترسيبية المتغيرة فى المستخلص الخام.

بالإضافة لوجود جزيئات من مسبب المرض حرة، إلا أن الغالبية العظمى من جزيئات مسبب المرض تكون مترافقة مع أجزاء الكروماتين ذات الأحجام المختلفة وأن هذه الأجزاء قد تكون هي المسبب الرئيسي لصفات الترسيب السريعة للمواد المعدية المرضية.

أما التجارب التي أجريت على مسبب مرض اكسوكورترز الحمضيات أظهرت أن الحمض النووي RNA المعدى (المسبب للمرض) يكون مشابهاً لما سبقه من حيث الموقع، إذ أنه يوجد في أنوية الخلايا المصابة ويكون وجوده مترافقاً تماماً مع الكروماتين، هذا ما قرره Sanger سنة ١٩٧٢ .

#### ٤ - تقدير الوزن الجزيئي للفيروسات المعروفة:

#### Molecular Weight Estimates of Native Viroids

في أواخر الستينات أجريت محاولات كثيرة لتحديد الصفات الفيزيائية والكيميائية للفيروسات، إلا أن هذه المحاولات وقفت أمامها عوائق كثيرة أهمها (في تلك الفترة) أن الأحماض النووية RNAs يمكن تمييزها فقط بواسطة نشاطها الحيوي وليس اعتماداً على صفاتها الفيزيائية. إنعكست هذه العوائق بشكل خاص وبشدة على الجهود التي بذلت في تحديد الوزن الجزيئي للأحماض النووية.

مع أنه قد عرف لبعض الوقت أن فيروس الدرنه المغزلية في البطاطس يترسب بمعدل منخفض أقل من جزيئات الحمض النووي الفيروسي RNA وحيد الخيط، إلا أن هذه الملاحظة لم يمكن الاستفادة منها في تحديد الوزن الجزيئي للفيروسات وذلك نظراً لأن التكوين البنائي لهذا الحمض لم يكن معروفاً.

لقد استعمل العالم Loening سنة ١٩٦٧ طريقة متطورة واعتمد عليها في إمكانية تقدير الوزن الجزيئي، هذه الطريقة مبنية على النشاط الحيوي فقط. لقد إقنع هذا العالم بأن تأثيرات التركيب الثانوي لهذا الحمض RNA على صفاته الترسيبية تكون متعاكسة مع تأثيراتها على حركتها في الهجرة الكهربائية في



مركب Polyacrylamide gels وبالتالي فإن دمج هاتين الطريقتين (الهجرة الكهربائية وسرعة الترسيب) سيكون ذو فائدة في تمييز الاختلافات في التركيب نتيجة للاختلافات في الأوزان الجزيئية للأحماض RNAs. وذكر أنه مع أى من هذه الطرق فإن النشاط الحيوى هو المقياس الوحيد الضرورى لتقدير النتائج.

إن تطبيق هذا المبدأ على فيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس أدى إلى استنتاجات غير متوقعة حيث تبين أن الحمض RNA المسبب للمرض له وزن جزيئى منخفض جداً وكان هذا التقدير حوالى  $5 \times 10^4$  دالتون فى نتائج معظم التجارب. هناك تأكيدات أخرى ظهرت بشكل أوضح تؤيد الوزن الجزيئى المنخفض لهذا الفيرويد، أمكن الحصول عليها من ملاحظة أن الحمض النووى RNA له القدرة على الدخول فى الجيل Gels ذو التركيز العالى من أل Polyacrylamide (يعنى ثقبوب صغيرة الحجم) والتي لا تستطيع أن تمر منها الأحماض النووية ذات الوزن الجزيئى المرتفع. فى مثل هذا الجيل فإن فيرويد الدرنه المغزلية يتحرك كحزمة متماثلة محددة جيداً بمعدل هجرة يتفق مع الوزن الجزيئى المقدر سابقاً وهذا ما تم تقريره بواسطة العالم Diener سنة ١٩٧١.

أما كلاً من العالم Singh & Clark سنة ١٩٧١ فقد ذكرا بعض النتائج التى أظهرت أيضاً أن فيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس هو عبارة عن RNA ذو وزن جزيئى منخفض واستنتجا من تحديد حركة الفيرويد فى الهجرة الكهربائية فى Polyacrylamide gel ٧,٥% أن قمة الحيوية والنشاط للفيرويد تكون متوافقة مع حجم الجزيئات ذات ٤ - ٥ وحدة من وحدات Svedberg.

لقد ذكر العالم Diener سنة ١٩٧٣ أن الفيرويد المسبب لمرض تقزم الاقحوان هو أيضاً حمض نووى RNA ذو وزن جزيئى منخفض، وقد استعمل فى تجاربه على هذا المرض تنقية جزيئية أكثر تطوراً عن التنقية التى استعملت فى دراسة فيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس، وكانت هذه التنقية متبوعة بالترسيب والتحليل بالهجرة الكهربائية. وجد أن RNA المعدى يترسب بمعدلات تتوافق مع القيم 5 - 7.5 S، وأن عمود الهجرة الكهربائية لفيرويد تقزم الاقحوان وفيرويد الدرنه

المغزلية فى البطاطس فى ٢٠٪ polyacrylamide gels أظهرت أن الحمض النووى RNA يهاجر فى مثل هذا الجيل ويتحرك خلاله كحزمة متناسقة محددة تماماً بمعدل هجرة أكثر منه لمسبب الدرنة المغزلية فى البطاطس.

أما بالنسبة لفيروس أكسوكورتز الحمضيات فإن الهجرة الكهربائية للتحضيرات المعدة فى ال polyacrylamide gels تدل على أن الوزن الجزيئى للحمض النووى RNA لمسبب هذا المرض هو  $1,25 \times 10^6$  دالتون وإقترح أن إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية لمكوناته تتناسب مع الانتشار فى الجيل وهذا ما وجدته Semancik سنة ١٩٧٢.

كذلك فإن العالم Sanger سنة ١٩٧٢ وجد فى أبحاثه على فيروس أكسوكورتز الحمضيات باستعمال polyacrylamide gels أن الوزن الجزيئى للحمض النووى RNA لمسبب هذا المرض هو  $6 - 5 \times 10^4$  دالتون.

مما تقدم تبين أن الفيروسات المعروفة حتى ذلك الوقت سنة ١٩٧٢ عبارة عن حمض نووى RNA ذو وزن جزيئى منخفض، إلا أن هناك إنتقادات كثيرة وجهت لطريقة حساب الوزن الجزيئى لهذه الفيروسات أهم هذه الانتقادات هى:-

١ - كانت جميع التقديرات مبنية على حركة الإنتشار الكهربائى فى polyacrylamide gels لجزيئات الحمض النووى RNA المعروفة فى ذلك الوقت، ومقارنة هذه الحركة مع RNA قياسى معروف وزنه الجزيئى. وبالتالي فإنه كلما كان الحمض النووى الفيروى قريبا الشبه فى التركيب مع الحمض النووى القياسى كلما كانت النتائج أكثر دقة والعكس صحيح.

٢ - إن نتائج الدراسات التى أجريت على فيروس الدرنة المغزلية فى البطاطس أدت إلى الاقتراح بأن RNA الفيروى قد يتواجد فى تجمعات بحالات عديدة وبالتالي فإن الوزن الجزيئى المقاس بهذه الطريقة قد يكون مبنياً على هذه التجمعات وليس على الخيط المفرد الوحيد من RNA.

٣ - يختلف الوزن الجزيئى المقاس بهذه الطريقة وذلك حسب تركيز الجيل (له تأثير على حجم الثقوب) فوجد مثلاً أنه إذا كان تركيز الجيل أقل من ٨ - ١٠٪ فإن RNA موضوع الدراسة يكون ذو وزن جزيئى  $1 \times 10^6$  دالتون، بينما إذا كان التركيز للجيل أكبر من ٨ - ١٠٪ فإن الوزن الجزيئى لنفس الحمض موضوع الدراسة يكون  $5 \times 10^4$  دالتون.

وتتقدم الأبحاث أمكن التغلب على مثل هذه الانتقادات كما سيذكر فى الفصول القادمة إن شاء الله.

#### ٥ - التنقية Purification :

حيث أن هذه الأشياء (الفيروسات) مجهولة وفى بداية دراستها، أصبح من الواضح أن التقدم المستمر فى معرفة صفات الفيروسات يتطلب عزلها وتحضيرها بشكل نقى ثم يتبع ذلك تحليلات بيوكيميائية وبيوفيزيائية عادية.

إن الخطوة الأولى التى تستعمل فى تنقية فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس كما ذكرها Diener سنة ١٩٧٢، عبارة عن الحصول على الأحماض النووية من كميات كبيرة نسبياً من الأوراق المصابة والسليمة. بعد استبعاد كل من ال DNA ، rRNA ، tRNA والسكريات العديدة، فإن العينات المتبقية تحلل بواسطة الفصل الكهربائى فى الجيل Gels electrophoresis .

لقد ظهر فى الإختبارات الحيوية للشرائح المفردة من الجيل أن حيوية الفيروس متوافقة مع هذا المكون الموجود فى الشريحة. هذا التوافق (المستوى العال من الحيوية) بالإضافة إلى أن هذه المادة لا تتواجد فى تحضيرات الأوراق السليمة، هذا يشكل دليلاً قوياً على أن هذه المادة الموجودة فى شرائح الجيل هى المكون الأصلى لفيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس.

أما بالنسبة لفيروس اكسوكورتر الحمضيات فقد ذكر العالم Semancik ومساعدوه سنة ١٩٧٢ وسنة ١٩٧٣ أن امتصاص الأشعة فوق البنفسجية يكون

من قبل مواد موجودة في تحضيرات من أوراق مصابة (وإن هذه المواد غير موجودة في التحضيرات المأخوذة من الأوراق السليمة) وأن هذه المواد يمكن تعريفها بواسطة الهجرة الكهربائية في الجيل. إن الانحراف عن هذا التوافق (قمة منحني الامتصاص وقمة الإنتشار النشط في الجيل) ظهر في هذه التجربة ولكن هذه الانحرافات عزيت إلى الصعوبات التقنية (التقنية) الداخلة في تقطيع وقراءة الجيل أثناء التجربة.

إن تنقية فيروس الدرنه المغزلية في البطاطس بكميات كافية لكي يجرى عليها التحليلات الكيموحيوية والفيزيولوجية حصل عليها عن طريق إخضاع التحضيرات النباتية إلى الهجرة الكهربائية في ٢٠٪ polyacrylamide gels (مع اطالة وقت الجريان للتأكد من الفصل الكامل للحمض RNA من المكونات الطبيعية للعائل) مع ازالة أجزاء الجيل المحتوية على فيروس الدرنه المغزلية واسترداد الحمض RNA من شرائح الجيل باستعمال طريقة Diener سنة ١٩٧٣ الداخلة فيها الكروماتوغرافى Hydroxyapatite chromatography ثم رجها مع ميثوكسى إيثانول.

باستعمال التحليل بالهجرة الكهربائية للتحضيرات النهائية وجد أن هناك مكوناً واحداً فقط يمتص الأشعة فوق البنفسجية، وأن هذا المكون له نفس الحركة في الهجرة الكهربائية مثل فيروس الدرنه المغزلية في البطاطس الموجود في تحضيرات أقل تنقية، وأن هذه المادة الممتصة للأشعة فوق البنفسجية تتوافق مع نشاط الإنتشار في الجيل.

### الصفات الفيزيائية والكيميائية للفيروسات

#### Physical and Chemical Properties of Viroeids

##### ١ - الوزن الجزيئى لفيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس:

##### Molecular Weight of PSTVd

عند توفر التحضيرات النقية من فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس، فإن تحديد الوزن الجزيئى لهذا الفيروس يكون مبنياً على، ليس على نشاطه البيولوجى، بل على

إمتصاصه للأشعة فوق البنفسجية وأصبحت هذه الطريقة ممكنة. ولتحديد الوزن الجزيئي للفيرويد، فقد ذكر العالم Boedtker سنة ١٩٧١ طريقة لذلك وقد إختار هذه الطريقة لأنها تسمح بتحديد الوزن الجزيئي للأحماض النووية RNAs بشكل منفصل عن تركيبها (ثنائي أو ثلاثي)، وبهذه الطريقة فإن الأحماض النووية RNAs يجرى لها دنتره denatured بمادة الفورمالدهيد ثم تقارن حركتها النسبية في الانتشار الكهربائي مع حركة أجزاء مشابهة لها من حمض نووي RNA مدنتر وقياسي ومعروف وزنه الجزيئي.

لقد تم تطبيق هذه القاعدة على فيرويد الدرنه المغزلية في البطاطس باستعمال RNA المدنتر في كل من الفيرس المرافق للتبقع الحلقي في الدخان، الخول، الرايوسوم، 5S، وفيرس تبرقش القرنفل كأوزان جزيئية قياسية، كانت النتيجة أن الوزن الجزيئي لفيرويد الدرنه المغزلية في البطاطس يقع في مجال (٧,٥ - ٨,٥)  $\times 10^6$  دالتون وهذا ما ذكره Diener سنة ١٩٧٣.

إن هذا التعارض الواضح بين هذه القيمة للوزن الجزيئي والقيمة السابقة التي ذكرت بأنها  $5 \times 10^6$  دالتون يكون أكثر احتمالاً إلى التركيب المندمج (منضغط) للحمض النووي RNA ويوضح الخطأ الحقيقي الملازم للمحاولات التي أجريت لتقدير الوزن الجزيئي للفيرويدات بالهجرة الكهربائية في الجيل بالمقارنة للجزيئات المعروفة.

## ٢ - الدنترة الحرارية لفيرويد الدرنه المغزلية في البطاطس:

### Thermal Denaturation of PSTVd

لتحديد فيما إذا كان فيرويد الدرنه المغزلية احادى أو ثنائى الخيط، درست الدنترة الحرارية للحمض النووي RNA وكان منحنى الدنترة يدل على أن تركيب الفيرويد ليس مزدوج القواعد بانتظام مثل RNA مزدوج الخيط، وبالتالي فإنه في هذه الحالة

فمن المتوقع أن تحدث الدنترة على معدل درجات حرارة أكثر تقارباً وذات قيمة عالية. وعلى أبه حال فإن منحنى الدنترة لا يقرر بأن جزيء RNA احادى الخيط ذو قواعد مزدوجة بدون إنتظام مثل RNA المحول الذى فيه مناطق احادية الخيط تتبادل مع مناطق مزدوجة الخيط.

إن تحديد صفات الدنترة الحرارية لفيروس الدنترة المغزلية فى البطاطس المذاب فى منظم قوى عالية الايونية ( $0.1 \times SSC$ ) قد أكد الاستنتاجات السابقة وهى أن الدنترة تحدث على معدل عال من درجات الحرارة. ولقد وجد Diener سنة ١٩٧٣ أنه تحت هذه الظروف فإن درجة حرارة الدنترة تقارب  $54^\circ C$ .

### ٣ - الحساسية للإشعاع Radiation Sensitivity :

بعد أن تبين أن فيروس الدنترة المغزلية ذو وزن جزيئى منخفض، كان هناك اهتماماً فى تحديد حساسيته للإشعاع بواسطة الأشعة فوق البنفسجية، مع أن الباحث يمكن أن يتوقع أن الوزن الجزيئى المنخفض (كما فى هذا الفيروس) سيكون أكثر حساسية للإشعاع بواسطة الأشعة فوق البنفسجية من الاحماض RNA أو DNA الفيروسية ذات الحجم الأكبر بشكل واضح، إلا أن تأثير الحجم على الحساسية بالأشعة فوق البنفسجية فى الأحماض النووية لم يتوضح تماماً حتى سنة ١٩٧٠.

إن تعريض الحمض النووى RNA الموجود فى كل من فيروس الدنترة المغزلية، فيروس البقعة الحلقية فى الدخان والفيروسات المرافقة، للأشعة فوق البنفسجية  $254$  نانوميتر أظهر أن التثبيط حصل بنسبة  $70 - 90$  ضعف فى فيروس الدنترة المغزلية والفيروسات المرافقة بالمقارنة مع فيروس البقعة الحلقية فى الدخان، هذا ما وجدته Diener سنة ١٩٧٤. هذه النتائج ذات الاختلاف الواضح فى الحساسية للإشعاع بالأشعة فوق البنفسجية يكون تفسيرها بسبب الحجم الصغير للحمض RNA فى

فيروس الدرنه المغزليه والفيروسات المرافقه إذا ما قورنت بحجم RNA فى فيروس البقعة الحلقية فى الدخان.

لقد قام العالم Semancik سنة ١٩٧٣ بتعريض تحضيرات من فيروس افسوكورنز الحمضيات وفيروس موزايك الدخان إلى أشعة مؤينة، وحدد بالمعدلات المقارنة للتثبيط البيولوجى، الوزن الجزيئى فوجد أنه  $1,1 \times 10^6$  دالتون للحجم المحدد من فيروس افسوكورنز الحمضيات.

#### ٤ - الفحص بالميكروسكوب الالكترونى لفيروس الدرنه المغزليه:

##### Electron Microscopy of PSTVd

استعمل العالم Sogo ومرافقوه سنة ١٩٧٣ طريقة لدراسة فيروس الدرنه المغزليه بالميكروسكوب الالكترونى، فقد عامل تحضيرات نقيه من فيروس الدرنه المغزليه بطبقة احادية من البروتين واستعمل الطريقة التى ذكرها Zahn و Kleinschmidt سنة ١٩٥٩.

عند رش تحضيرات من فيروس الدرنه المغزليه الموجوده فى ٤ مول من محلول أسيتات الصوديوم على الصورة تحت المائيه للماء المقطر، تكشفت تركيبات قصيره جداً غالباً فى تجمعات منضغطة ولكن احياناً على شكل أجزاء منفصلة، هذه الأجزاء لم يمكن اكتشافها فى حالة الكنترول لأحماض نوويه حرة وكانت غير موجوده فى التحضيرات المعاملة بأنزيم Ribonuclease.

بسبب إتحاد جزيئات فيروس الدرنه المغزليه فى البطاطس فى تجمعات كان من الصعب وضع تصورات عن طول وتركيب الجزيء، بناء على ذلك فإن الطرق التى يكون بمقدورها تفكيك التجمعات وتجعل هناك امكانية رؤية جزيئات فيروس الدرنه المغزليه فى البطاطس بمفرده قد وضعت تحت الإختبار. وبالفعل كان هناك اعداداً كثيرة من السلاسل القصيره ذات طول متناسق نسبياً لوحظت عندما نشرت تحضيرات من فيروس الدرنه المغزليه فى البطاطس فى محلول يوريا ٨ مول، هذا ماوجده Sogo ومرافقوه سنة ١٩٧٣. لم يمكن تمييز وملاحظه مثل تلك

السلاسل في عينات الكنترول أو بعد المعاملة بأنزيم Ribonuclease . كان متوسط الطول لهذه الجزيئات حوالي ٥٠٠ أنجستروم.

نظراً لأن الكتلة لكل وحدة طول غير معروفة، فإن أطوال جزيئات فيروس الدرنه المغزلية للبطاطس كانت تقارن مع تلك الجزيئات من الأحماض النووية معروفة الوزن الجزيئي التي كانت تضاف إلى تحضيرات الفيروسات وكانت عندئذ تعامل بالتطابق بين المعلوم والمجهول.



شكل رقم ١ :

صورة الكترونية لفيروس PSTVd مختلطاً مع DNA ثنائي الخيط و DNA للفاج T<sub>7</sub> بالمقارنة النسبية يلاحظ الحجم الصغير جداً للفيروس بالمقارنة مع DNA للفاج.



يظهر شكل ١ صورة ميكروسكوبية لمخلوط من حمض DNA ثنائي الخيط، Coliphage T7 و RNA لفيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس. تدل القياسات أن DNA للفلاج T-7 حوالى ٢٨٠ ضعف طول فيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس، يظهر كذلك أن سمك فيرويد الدرنه المغزلية مشابهاً لسمك DNA للفلاج T-7. واعتماداً على أن الوزن الجزيئى للحمض DNA-T7 يساوى ٢٥ × ٦١٠ دالتون كما ذكر العالم Lang سنة ١٩٧٠ فإن الوزن الجزيئى لفيرويد الدرنه المغزلية هو ٨,٩ × ٤١٠ دالتون.

إن الفحص الميكروسكوبى لخليط من فيرويد الدرنه المغزلية وحمض RNA لفيروس تبرقش القرنفل مدتر بالفورمالدهيد أظهر أن RNA الفيرويدى أسمك من الخيط المفرد من RNA الفيروسى، إلا أن طول RNA الفيروسى حوالى ١٧ ضعف طول RNA الفيرويدى المدتر. هذه المقارنة ادت إلى تقدير الوزن الجزيئى للفيرويد بحوالى ٧,٩ × ٤١٠ دالتون.

إن تقديرات الوزن الجزيئى (للفيرويد) المتحصل عليها بواسطة الميكروسكوب الالكترونى تكون بالتالى متوافقة تماماً مع القيم المتحصل عليها من تحليل الفيرويد المدتر بالحرارة أو بالفورمالين والمستعمل فى polyacrylamide gels.

#### ٥ - تركيب جزئى الفيرويد Molecular Srtucture of Viroid

مع أن الوزن الجزيئى المنخفض للفيرويدات قد تحدد نهائياً، إلا أن الاختلاف فيما يتعلق بالتركيب الدقيق لجزئياتها لم يكن واضحاً بشكل جيد فى ضوء المعلومات فى أوائل السبعينات. فى بعض الأنظمة التحليلية فإن الفيرويدات تظهر صفات نموذجية لصفات الحمض RNA ثنائى الخيط، وفى أنظمة أخرى تظهر صفات RNA أحادى الخيط.

إن نظام الازالة المتبع مع فيرويد الدرنه المغزلية من أعمدة -Methylated serum al-bumin أدت إلى القول بأن حمض ال RNA الفيرويدى هو ثنائى الخيط، بينما

طرق الازالة من أعمدة CF - II cellulose أظهرت بأن الحمض RNA يتألف من جزيئات ثنائية السلسلة وجزيئات أحادية السلسلة. إن هذه النتائج المتضاربة قدم لها العالم Engelhardt سنة ١٩٧٢ تفسيراً وذلك بأن أظهر أن إمتداد أو طول التركيب الثانوى للحمض RNA تمتلك تأثيراً عميقاً على طرق إزالته من مثل هذه الأعمدة. لقد وجد أنه كلما زادت كمية التركيبات الثانوية للحمض RNA فى وقت الاضافة للعمود، كلما زادت القطع أو الأجزاء التى سوف تزال فى منظم Ethanol - free هذه تعنى أن الازالة التى كانت تحدث اولاً كانت تؤدي إلى الاعتقاد بأنه يتكون من حمض RNA ثنائى السلسلة فقط. بالاحتكام إلى هذا المعيار فإن فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس له تركيبات ثانوية عديدة.

من ناحية أخرى فإن إستعمال Hydroxyapatite فإن فيرويد الدرنة المغزلية يزال غالباً بمنظم فسفاتى تركيزه أكثر إنخفاضاً من ما هو متوقع لو كان الحمض ثنائى السلسلة. كما أن بعض الأجزاء من الفيرويد تزال على تركيزات أعلى من المنظم.

أما إختبارات المناعة التى أجريت مع السيرم المضاد والذى يتفاعل بشكل خاص مع RNA ثنائى السلسلة لم يعط أية دلالة لوجود RNA ثنائى السلسلة فى التحضيرات عالية الإصابة من الفيرويد. إن الدترة بالحرارة، الفيرويد المعامل بالفورمالين، على أية حال، كان يتبين أنه يتكون من مركبين لهما حركة مختلفة إلى حد ما فى الهجرة الكهربائية.

أما فيما يتعلق بفيرويد اكسوكورتر الحمضيات فإن العالمان Semancik & Weathers سنة ١٩٧٠ ذكرا بأن الحمض النووى RNA المعدى يتواجد على شكلين. الشكل الأول يترسب فى مجال (10 - 15S) أما الشكل الثانى يترسب فوق S25. وجد أن ازالة فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس وفيرويد اكسوكورتر الحمضيات من أعمدة Methylated serum albumin يكون فى مجال إزالة الحمض DNA من العائل ولكن لا يشابهها عند الازالة من أعمدة سليولوزية باستعمال منظم إيثانول حر فقط. مع أن هذه الصفات منسجمة مع صفات

الحمض ثنائي السلسلة، إلا أن هناك محاولات أجريت لتفكيك هذا الحمض RNA المتوقع أنه ثنائي السلسلة أو ملاحظة أية مقاومة يديها لأنزيم Ribonuclease فى وسط أيونى عال، وكل هذه المحاولات لم تنجح. أخيراً إتجه الباحثون إلى عملية فصل السلاسل بالحرارة وسرعة التبريد، وخلصوا إلى نتيجة بأن RNA مقاوم جزئياً عند تحضينه مع مادة Diethylpyrophosphate عندئذ ظهرت نتائج مشابهة لفيروس الدرنه المغزلية والتي ذكرها Sing & Clark سنة ١٩٧١ وإقترحاً بأن تركيب RNA الفيرويدي هو على الأقل ثنائي السلسلة جزئياً. أما بالنسبة لفيروس اكسوكورتز الحمضيات تثبط كلية بمادة الفورمالدهيد.

عند مقارنة RNA الفيرويدي مع RNA الفيروسي وحيد السلسلة، تبين أن فيروس اكسوكورتز الحمضيات مقاوم للتشبيط بالحرارة وبأنزيمات القطع الخارجى Exonucleases وفى هذه الصفة الأخيرة يشارك RNA الفيرويدي للحمضيات فيروس الدرنه المغزلية، إلا أن المقاومة للتشبيط بأنزيمات اكسوكورتز أنزيمات القطع الخارجى Exonucleases قد تؤدي إلى القول بأن تركيب RNA الفيرويدي يكون دائرياً، وهذا ما قرره Diener سنة ١٩٧١ والعالم Semancik سنة ١٩٧٠، إلا أن درجة المقاومة هذه أدت إلى زيادة الأبحاث فى هذا المجال.

واعتماداً على مبدأ الكثافة المنخفضة والتي تجعل الحمض النووى RNA الفيرويدي عائماً فى محلول متدرج الكثافة من محلول كبريتات السيزيوم القياسى، فإن بعض العلماء إقترحوا أن فيروس اكسوكورتز الحمضيات إما أن يكون حمض نووى منخفض الوزن الجزيئى أو RNA ناقل يشبه mRNA أو جزئ هجين- RNA DNA، ولكن تبين لهم فيما بعد أن مدة الترسيب غير كافية للحصول على أحماض نووية متوازنة منخفضة الوزن الجزيئى من RNA.

وبكلمة موجزة يمكن تلخيص أبحاث العلماء على تركيب جزئ الفيرويد بأنه  
أما:-

١ - أن يكون عبارة عن حمض نووى احادى السلسلة من RNA مع وجود بعض التركيبات مثل تركيب دبوس الشعر تكون ذات قواعد مزدوجة.

٢ - أن يكون الفيروس حمض نووي RNA ثنائي السلسلة ولكن بجزيئات غير كاملة ازدواج القواعد.

## الصفات الحيوية

### BIOLOGICAL PROPERTIES

#### ١ - التضاعف (التناسخ) Replication

إن إنخفاض الوزن الجزيئي للفيروسات آثار تساؤلاً، وهو إلى أى مدى تستطيع هذه الأحماض النووية RNAs أن تمتلك معلومات وراثية كافية لتحت على تضاعفها في العوائل القابلة للإصابة. إن الوزن الجزيئي لفيروس الدرنه المغزلية يكون كافياً فقط لعمل شفرة لـ ٧٠ - ٨٠ حمض أميني، هذا يعني أنه لا يكاد يستطيع أن يشفر إلا لمقدار صغير من البروتين، ولكن لا يستطيع أن يشفر إلى تحت وحدة خاصة لعمل أنزيم RNA - polymerase (للتضاعف) بحجم يمكن مقارنته مع تلك الوحدات المعروفة في التضاعف.

وعلى كل حال فإن ما يمكن تصوره هو أن فيروس الدرنه المغزلية ليس نوعاً من الجزيئات المفردة ولكن إلى حد ما عبارة عن تجمعات من جزيئات RNA عديدة متشابهة في الطول بترتيب نيوكليوتيدات مختلف والتي مع بعضها يمكن أن تشكل جينوم فيروسى بحجم عادى تقريباً. هناك بعض إنتقادات وجهت إلى هذا الرأى.

ربما يكون بناء الفيروسات بطاقة عادية من جينوم العائل والتي تبدأ نشاطها بوجود الفيروس في العائل، إلا أنها تكون مكبوتة كلية في النباتات غير المصابة. إذا كان ذلك صحيحاً فإن الفيروسات تعمل كمانعات كبت لهذه الطاقة الكامنة، إما مباشرة أو عن طريق ببتيدات عديدة مترجمة من الحمض النووي RNA. إن مثل هذا التصور يجلب سؤالاً هو لماذا قطع حمض ال DNA المكبوتة كلية والتي تحتوى معلومات وراثية غير مرغوبة للكائن الحى يجب أن يحافظ عليها أثناء النمو والتطور؟؟ أيضاً فإن الباحث يجب أن يتوقع أن الكبح الذاتى لقطع حمض

ال DNA أحياناً يمكن أن تحدث. وهذه الأسئلة بقيت بدون جواب حتى منتصف السبعينات.

إن الأكثر معقولة من الوهلة الأولى هو إفتراض أن فيروس الدرنه المغزليه مشابهاً للحمض RNA فى الفيروسات المرافقه والتي تتطلب فيرس مساعد لها لتضاعف نفسها. إن الجهود التي بذلت لاثبات وجود مثل هذا الفيرس المساعد فى نباتات الطماطم غير المحقونه أعطى نتائج سلبية. ولقد أظهر العلماء أنه إذا كان مثل هذا الفيرس موجوداً فيجب أن ينتقل رأسياً خلال البذور إلى أى وحدة تكاثرية أخرى فى النبات. وكما هو معروف فإن إنتقال فيروسات النبات عن طريق البذور بمعدلات كبيرة هو فى الواقع نسبة بسيطة جداً. نظراً لأن فيروس الدرنه المغزليه فى البطاطس عنده القدرة على التناسخ فى عدد من أنواع نباتات العائله الباذنجانية بالإضافة إلى البطاطس والطماطم، فبالتالى يجب أن يتكاثر الفيرس المرافق والمفترض وجوده مع الفيروس فى هذه الأنواع النباتية أيضاً. لقد أظهر Diener سنة ١٩٧٢ أن أنواع نباتات العائله الباذنجانية والتي يمكن أن تصاب عن طريق مستخلص خام يحتوى على فيروس الدرنه المغزليه يمكن أن تصلب أيضاً بحمض RNA ذو وزن جزيئى منخفض مفصولاً من polyacrylamide gels. وبالتالي إذا كانت الفيروسات المساعدة داخله فى تضاعف فيروس الدرنه المغزليه فإن مثل هذه الفيروسات يجب أن تكون موجودة بشكل عام فى النباتات التي تبدو سليمة من أنواع نباتات العائله الباذنجانية.

من تلك النتائج ومن غيرها يبدو من غير المحتمل وجود فيروسات مساعدة مع الفيروس، وبالتالي فإن فيروس الدرنه المغزليه بالرغم من حجمه الصغير يبدو أنه ذو مقدرة على التضاعف تلقائياً بذاته فى النباتات العائل.

## ٢ - نشوء المرض Pathogenesis

نظراً للكمية الصغيرة من المعلومات الوراثية التي تدخلها الفيروسات فى خلايا عوائلها، فإنه من المدهش أنه (فى بعض العوائل) يمكن لبعض الفيروسات أن

تحدث أمراضاً خطيرة بأعراض متنوعة مشابهة لتلك الأعراض النموذجية المتسببة عن الإصابة الفيروسية. نظراً لأن هناك كمية صغيرة جداً من الفيروسات المعروفة تكون موجودة في الأنسجة المصابة، فإنه من غير المحتمل أن يكون هناك نقصاً في النيوكليوتيدات المتوفرة لبناء الحمض النووي للعائل وتكون مسؤولة عن هذه الاضطرابات في العائل. لقد تأكد هذا الرأي بحقيقة أنه في كثير من العوائل فإن الفيروسات تتضاعف بكفاءة عالية بدون حدوث اضطراباً ظاهرة للعائل، هذا ما ذكره Sanger سنة ١٩٧٢ .

هناك عدة آراء تفسر دور الفيروسات في نشوء المرض منها: -

١ - هناك تدخلاً نوعياً من قبل الفيروسات يحدث في وظائف ميتابولزم العائل مما يؤدي إلى حدوث الأمراض .

٢ - يمكن أن تعمل الفيروسات، مثلاً، كأحماض نووية RNAs ناقلة غير عادية وهذا يؤدي إلى تكوين أو بناء بروتينات ذات عيوب تركيبية .

٣ - يمكن أن تتدخل الفيروسات مع جينوم العائل من ناحية نسخ الجينوم إما بالكبح العادي للسترونات Cistrons المعبرة أو عن طريق وقف الكبح للسترونات المثبطة عاديًا .

٤ - يمكن أن يكون التداخل إختيارياً عن طريق عديدات الببتين المترجمة عن RNA الفيرويد. بناءً على ما تقدم وبسبب محتويات الفيروسات من المعلومات المحدودة وراثياً، فإن هذه الفيروسات يمكن أن تكون موديلات أنظمة نافعة للجهود المبذولة في شرح الميكانيكية البيوكيميائية لنشوء المرض على مستوى الجزئ.

### ٣ - الإنتقال Transmission

إن الفيروسات المعروفة لغاية سنة ١٩٧٣ تنتقل بالطرق الميكانيكية، إما بسهولة مثل فيروس الدرنه المغزلية في البطاطس وفيروس تقزم الاقحوان، وإما بصعوبة إلى حد

ما مثل فيرويد اكسوكورتز الحمضيات. بالنسبة لفيرويد الدرنة المغزلية فإن الانتقال الميكانيكى يكون المسئول الرئيسى عن إنتشار المرض فى الطبيعة، هذا ما قرره Dien-er سنة ١٩٧١. ونظراً لغياب الغطاء الواقى البروتينى فإن مدة بقاء ال RNA حياً خلال عملية الانتقال من الصعوبة بمكان فهمها حتى أصبح من الواضح تماماً أن فيرويد الدرنة المغزلية وفيرويد اكسوكورتز الحمضيات يكونان موجودان ضمن الأنوية فى الخلايا المصابة، حيث فى هذه الحالة يكونان محميان جيداً من المهاجمة الانزيمية، هذا ما وجدته العالم Sanger سنة ١٩٧٢. من المحتمل أثناء الإنتقال الطبيعى أن أجزاء من الأنوية المحتوية على فيرويد الدرنة المغزلية أو قطعاً من الكروماتين المحتوية على فيرويد الدرنة المغزلية تنتقل من الخلايا المصابة إلى الخلايا العادية بطريقة أفضل من إنتقال ال RNA الحر. إن فيرويد الدرنة المغزلية ينتقل عمودياً إما خلال حبة اللقاح أو المبايض فى نباتات الطماطم والبطاطس المصابة، وإن هذا الانتقال العمودى يحدث بمعدل يختلف من صفر إلى ١٠٠٪ معتمداً على اختبارات الجمع الفردية.

### أصل الفيرويدات Viroids Origin

هناك تساؤل عن أصل الفيرويدات. هل الفيرويدات تنتمى إلى الفيروسات أو أنها تنتمى إلى الأحماض النووية الخلوية RNAs؟؟.

فى الوقت الذى ظهر فيه مفهوم الفيرويد حدث تقدم سريع فى هذا النوع من الدراسة فكان من المعقول فى البداية أن ينظر إلى الفيرويد بأنه ذو قرابة مع الفيروسات العادية وإقترح بأنه إما أن يكون شكل بدائى جداً للفيروس أو أنه نشأ عن الفيروسات بطريقة معينة (مثل التفكك) بحيث تكون النتيجة هى الفيرويد النموذجى. بعد ذلك فإن المعلومات التى تجمعت عن الفيرويدات قد جعلت كل الباحثين تتخلى عن هذه الأفكار بتزايد مستمر.

هناك عدة آراء عن أصل الفيرويدات قد لخصها العالم Diener سنة ١٩٧٩. ثم

ناقشها وأوضح كثير منها وأضاف عليها العالم Sanger سنة ١٩٨٤. من هذه الأراء.

### ١ - إن أهم الملاحظات فيما يتعلق بأصل الفيروسات يختص باكتشافها:

وهذا يمكن توضيحه بحقيقة أن كل الأمراض الفيروسية قد أمكن التعرف عليها خلال هذا القرن، في حين أن بعضاً منها اكتشف حديثاً. وهذا بجملته يختلف عن أمراض النبات المتسببة عن الفيروسات العادية حيث أن كثيراً منها لوحظ في القرن التاسع عشر وإن أول الأمراض الفيروسية قد اكتشف في هولندا في القرن السابع عشر. أما بالنسبة للأمراض المتسببة عن فيروسات مثل فيروس الدرنه المغزلية في البطاطس وفيروس اكسوكورتز الحمضيات كانت أولى الملاحظات لهما في أوائل العشرينات من هذا القرن، بينما مرض تقزم حشيشة الدينار الفيرويدي، وفيروس الثمرة الباهتة في الخيار كان أول وصف لهما في الفترة من ١٩٦٣ - ١٩٧٠ واستمر لغاية ١٩٧٤. وبشكل خاص تدل البيانات أن المرض المتسبب عن فيروس الثمرة الباهتة في الخيار كانت أول ملاحظة له في صوبه زجاجية مفردة ثم إنتشر منها، بينما مرض كادانخ - كادانخ في جوز الهند أول ذكر له كان عند ظهوره في جزيرة صغيرة في الفلبين.

من كل ما سبق يتبين أن الفيروسات حديثة الأصل، وقد افترض أنها نشأت من نشاطات الانسان مثل ادخال الزراعات الاحادية Monocultures حيث أنها قد تكون ساهمت في تكاثر وانتشار الفيروسات والأمراض الفيروسية. ونظراً لأن الفيروسات غالباً لا تسبب اعراضاً في النباتات البرية، بالتالي افترض بأنها نشأت من عائل نباتي برى غير معروف لم تكن ممرضه عليه، ثم بعد ذلك إنتقلت إلى نباتات مزروعة حساسة بواسطة التطعيم أو بالمصادفة وهذا يكون باعثاً على تكوين RNA متناسخ وممرض وهو الفيرويدي.



## ٢ - نشوء الفيروسيد بالمصادفة من أحماض نووية RNAs عادية:

هذا الاقتراح الثانى لاصل الفيروسيدات يذكر أن الفيروسيد قد نشأ بالمصادفة المحضة فى الطبيعة من أحماض نووية RNAs عادية منتظمة فى النباتات المزروعة طبيعياً أو فى النباتات البرية وتحول إلى تركيبات عالية الثبات وذات كفاءة على التناسخ الذاتى وذات قدرة على الحركة داخل وبين الخلايا. واعتماداً على ذلك فإن العالم Dren-er قد تنبأ بأن أمراض فيروسية جديدة على النباتات المزروعة سوف تستمر فى الكشف والظهور بشكل غير متوقع.

إن الأحماض النووية RNAs ذات الأوزان الجزيئية المنخفضة بالإضافة إلى mRNA وإلى rRNA ذوات 5S تتواجد فى الخلايا العادية بشكل خاص فى الأنوية والنويات وتكون مترافقة مع الكروماتين. بالرغم من أن وظيفة هذه الأحماض غير معروفة، إلا أنه كان هناك إقتراحاً بأن بعض RNAs فى النواة قد يكون لها دوراً فى تنظيم بعض وظائف النواة وتتدخل أيضاً فى تنظيم نسخ RNA من الجينوم. كذلك وجد أن بناء RNA فى نظام الخلية الحر بواسطة أنزيم Polymerase بكتيريا *E. coli* باعتبار الكروماتين قالب شجعت بإضافة RNA كروماتينى ذو الوزن الجزيئى المنخفض بينما (فى حالة DNA كقالب) فإن بناء RNA كان يشبط بإضافة مثل هذا الحمض RNA.

إن فيروسيد الدرنة المغزلية المتصور والذى يكون مرافقاً للكروماتين والذى يكون فى نفس مجال الوزن الجزيئى يمكن أن يكون متعلقاً ببعض الأحماض النووية RNAs فى النواة والنوية. وبالتالي فإن الباحث قد يتأمل فى أن فيروسيد الدرنة المغزلية، ومن المحتمل فيروسيدات أخرى نشأت من RNAs من النواة والتي تكون مكونات عادية للكائن والتي تكون أيضاً أساسية لتكشفه. إن تحول RNA من مكون عادى فى الخلية إلى مسبب مرضى ممكن أن يحدث إما بواسطة طفرة أو بواسطة دخوله مصادفة فى نوع غريب والذى يتناسخ فيه هذا ال RNA. فى أى من الحالتين فإن المرض سيكون هو نتيجة التداخل مع الوظائف العادية للأحماض RNAs فى النواة.

### ٣ - حدوث تداخل في تتابع النيوكليوتيدات في الحمض النووي RNA :

قد تكون الفيروسات نشأت من حدوث تداخل في تتابع النيوكليوتيدات في الحمض النووي RNA. هذا الافتراض يبدو أنه مدعماً بتمائل التتابع بين معظم تنوعات التتابع وتتابعات الفيروسات (باستثناء فيروس ضربة الشمس في الافوكادو) والنهاية 5' للحمض RNA U<sub>1</sub>، حمض نووي صغير RNA يعتقد بأنه يدخل في عملية التراكب للحمض mRNA.

عندما اكتشفت الجينات المنشقة Split genes في الكائنات مميزة النواة وتراكب RNA (عملية التراكب تشبه القص واللصق وتتم بواسطة معقد اسمه Spliceosome)، عندئذ إقترح بأن الفيروسات من الممكن أن تكون قد نشأت بواسطة الانترونات Introns. يمكن تعريف الانترونات بأنها التتابعات التي توجد في DNA مميزة النواة ولكنها تحذف من mRNA أثناء تجهيزه بحيث يصل إلى الطور الناضج خال منها.

يستطيع الباحث أن يتأمل بأن مثل هذه التتابعات يمكن أن تتيح الفرصة لكثير من الجزئيات الوسيطة ذات القواعد المزدوجة (كما تفعل الفيروسات)، وإذا ما أصبحت دائرية (كما هي الفيروسات) وبالتالي فإن هذه الجزئيات تصبح ثابتة وتنجو من التحطيم. إن إتخاذ الانترونات للشكل الدائري قد لوحظ في دراسات Borst سنة ١٩٨١ وذكر أن بعضاً منها تأخذ حجم الفيروسات تقريباً. والذي يمكن تصوره أن مثل هذه الانترونات يمكن أن تشكل تتابع ملائم مميز ويمكن أن تنسخ بواسطة أنزيم العائل القادر على العمل كأنزيم RNA polyme-rase للحمض RNA الموجه وبالتالي تنجو من ميكانيكية التوجيه في خلية العائل.

إن الأحماض النووية الصغيرة من RNA المترافقة مع أجزاء من رايبونوكلو بروتين يعتقد بأنها داخلة في علمية النسخ الأولية لمنتجات الجينات المنشقة. إن النهاية رقم 5' من حمض نووي مثل RNA U<sub>1</sub> قد تبين بأنه يسلك كمكمل مع

نهايات الانترونات، ومن المعتقد أن هذا يعطى ميكانيكية تؤكد الاصلاح بالحذف لتتابع الانترون ودقة ارتباط تتابع التشفير.

مع أن التركيب الأولى للأحماض النووية الصغيرة SnRNA's غير مؤكد تماماً، إلا أن الدراسات الحديثة للجين المنشق فى أنواع النباتات الراقية ومثيلاتها من تتابع أطراف إنترون - إكسون مع تلك التى فى مميزة النواة، أدت إلى الاقتراح بان SnRNA مماثل لـ RNA U1 الموجود فى النباتات الراقية وأن تتابع النهاية 5' مشابهة لـ UIRNA. وإذا كان هذا صحيحاً فإن نظرية الانترون لاصل الفيرويد تنبأ أن تتابع نيوكليتيدي معين على الفيرويدات أن تسلكه كمكمل للنهاية 5' لهذا الحمض النووى الصغير المزعوم SnRNA بالإضافة إلى UIRNA.

ومن ناحية هذه التشابهات كان من الأفضل تحديد فيما إذا كانت تتابعات النيوكليتيديات فى فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس تحتوى على مطاطية كافية لتكوين تكامل مع النهاية 5' للحمض UIRNA أو لا تحتوى، ولكن الأستقصاء عن مثل هذه التتابعات فشل فى الكشف عن امكانية تكوين معقدات ثابتة بين RNA لفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس و UIRNA. وعلى أية حال لأن RNA الفيرويدي فى البطاطس يبدو بأنه ينسخ عن قالب RNA، فإن الخيط الكامل وليس الفيرويد نفسه يمكن أن يمثل إنترون ثابت ويسلك سلوك تكميلي مع UIRNA.

#### ٤ - احتمالية نشوء الفيرويدات من الفيروسايدات Virusoids :

يمكن أن تكون الفيرويدات قد نشأت من الفيروسايدات وهى أحماض نووية RNAs دائرية صغيرة مغلقة فى بعض الفيروسات النباتية بجينوم ثنائى الشق dipartite. إن الاختلافات الاساسية بين الفيرويد والفيروسايد virusoid يبدو أنه فى كون الفيرويد يتناسخ بواسطة أنزيم العائل polymerase، بينما الفيروسايد يعتمد على أنزيم Replicase الفيروسي لتناسخه. وتختلف الفيرويدات عن الفيروسايدات فى النقاط الآتية:-

أ - لا يوجد تماثل في التتابع يمكن تقديره بين الفيرويدات والفيروسايدات.

ب - تختلف الفيروسايدات عن الفيرويدات في الصفات الثيرموديناميكية والهيدروديناميكية وهي بهذه الصفات تتشابه جداً مع التتابع العشوائي ومع طول وتركيب القاعدة ودائرية الفيرويدات.

٥ - يمكن أن تكون الفيرويدات قد نشأت من نظام تبادل المعلومات الوراثية بين خلايا مميزة النواة وعضيات الخلية:

يمكن أن تكون الفيرويدات والحمض RNA الفيروسي قد نشأت من نظام تبادل المعلومات الوراثية بين خلايا مميزة النواة وعضيات الخلية. هذا الاعتقاد متوقع جداً وهو يفترض أن الفيرويدات قادرة على إصابة النبات جهازياً ويمكنها أن تعتمد على ميكائزم العائل في الانتقال داخل الخلايا والتضاعف بسبب أن خلايا العائل (النبات) العادية تحتوي تركيبات لها صلة مع الأحماض RNAs والتي هي أيضاً قادرة على الانتقال والتضاعف لكي تسهل تكبيرها و-Extrachromosomal inheri- tance ومن الواضح أن مثل هذا النظام إذا وجد يمكن أن يكون مصدراً لتطور الفيرويدات وحمض RNA الفيروسي.

٦ - يمكن أن تكون الفيرويدات نشأت من كائنات أولية النواة:

لقد افترض أن الفيرويدات نشأت من الحمض النووي RNA في الكائنات أولية النواة عن طريق إصابة النباتات الراقية بواسطة كائنات غير مميزة النواة. بنى هذا الافتراض على ما وجد من أنه ليس فقط RNA polymerase في مميزة النواة ولكن أيضاً أنزيمات RNA and DNA - Polymerase من البكتريا E. coli قادرة على نسخ RNA الفيرويدي في المعمل إلى نسخ مكتملة من RNA و DNA. وعلى أية حال فإن التتابع المتعلق بالفيرويد لغاية الآن لم يمكن اكتشافه في أولية النواة.

## ٧ - يمكن أن تكون الفيروسات إشتقت من عناصر وراثية مترجمة:

يمكن أن تكون الفيروسات قد إشتقت من عناصر وراثية مترجمة Transposable genetic elements. لقد ذكر Kiefer et al سنة ١٩٨٣ أن تركيبات الفيروسات تحتوي تتابعات مشابهة لتلك الحادثة في نهايات بعض العناصر الوراثية القابلة للتحرك وكل من Retroviral - proviruses شاملة وجود التكرار المعكوس الذى يكون غالباً منتهاً بنائية النيوكليوتيدة U - G و C - A مطوقاً بشكل غير كامل مباشرة التكرار ومطاطية طويلة من البيورين موجودة فى كثير من الفيروسات والتي تشابه التابع التمهيدي لانزيم النسخ العكسي للخط الموجب فى بناء DNA لـ Retroviral proviruses. وبالتالي يمكن القول بأن الفيروسات نشأت من العناصر القابلة للانتقال أو Retroviral proviruses عن طريق ازالة معظم المناطق الداخلية بالإضافة إلى التدخل فى تتابعات العائل.

إن تماثل التابع لأكثر من ٧٠٪ من فيروسات مجموعة PSTVd (فيروس الدرنة المغزلية فى البطاطس) يمكن أن يدل على أن اصولها من جد واحد أو (هذا أكثر احتمالاً) أن نشوءها فى مناطق جغرافية. متفرقة يدل على أنها نشأت من حدود مختلفة من RNA. ونظراً لأن تتابع الفيروس لا يحدث فى DNA العائل يستبعد أن تكون الفيروسات من أصل RNA ناتج من DNA. ونظراً لأن التابع المتماثل مع UI RNA والصفات التركيبية تشبه العناصر القابلة للانتقال وتشبه Retroviral proviruses الناشئة من الأحماض RNAs غير المرضية من الأنواع غير المتقاربة من مميزة النواة.

### تتابع اكتشاف الفيروسات:

إن أول كائن ممرض امكن تمييزه وتعريفه على أنه فيروس هو العامل المسبب لمرض الدرنة المغزلية فى البطاطس Potato spindle tuber viroid (كان يكتب

باختصار PSTV ولكن بعد سنة ١٩٩٢ إتفق العلماء على إضافة حرف (d) لتمييزها عن اسم الفيروسات واصبح يكتب PSTVd. لذا يلاحظ أن الفيرويدات كانت تكتب بدون حرف d ثم بعد الاتفاق أصبحت جميع الأسماء يضاف إليها هذا الحرف)، والذي كان ينظر إليه لمدة طويلة بأنه فيرس. كان أول إثبات على خطأ هذا الاعتقاد بواسطة العلماء Diener & Raymer سنة ١٩٦٧ حيث ذكروا بأن الكائن الممرض عبارة عن حمض RNA حر ولا يوجد أى جزيئات يطلق عليها علمياً إسم فيرس فى النبات المصاب. عندما تأكد الوزن الجزيئى لهذا الكائن الممرض سنة ١٩٧١ بواسطة كل من Diener و Singh فقد استعمل اصطلاح فيرويد = Viroid = لكى يمكن التفريق بين هذه الأحماض النووية RNAs المعدية والخالية من البروتين، وبين الفيروسات الكلاسيكية المألوفة التى تكون مغلفة بكبسولة من البروتين.

أما الكائن الثانى الذى أمكن تمييزه كفيرويد يصيب النباتات هو مسبب مرض اكسوكورتز الحمضيات Citrus Exocortis Viroid وأطلق عليه CEVd وذلك بواسطة Semacik & Sanger سنة ١٩٧٢. ثم بعد ذلك اكتشف فيرويد تقزم الاقحوان Chrysanthemum stunt viroid (CSVd) وذلك بواسطة Hollings و Diener سنة ١٩٧٣. ثم بعد ذلك توالى اكتشافات الأمراض الفيرويدية ومسبباتها كما فى جدول رقم ١، وإن معظم هذه الأمراض ذات أهمية إقتصادية فى المحاصيل النباتية. فمثلاً فيرويد كاذانج - كاذانج Cadang - Cadang الذى يصيب نخيل جوز الهند يسبب خسائر شديدة فى مزارع واسعة وهدد بشدة إقتصاد جميع المناطق التى يزرع فيها فى الفلبين.

جدول ١ : الأمراض الفيرويدية المكتشفة حتى سنة ١٩٨٣

اسم المرض الفيرويدي	المدى العائلي	الاختصار	سنة الاكتشاف	العالم المكتشف
١ - Potato spindle tuber Viroid	معظم نباتات العائلة الباذنجانية	PSTVd	١٩٧١	Diener
الدرة المنزلة في البطاطس				Singh & Clark
٢ - Citrus exocortis Viroid	الحمضيات، العائلة المركبة	CEVd	١٩٧٢	Sanger
أكسوكورز الحمضيات	العائلة الباذنجانية			Semancik & Weathers
٣ - Chrysanthemum Stunt Viroid	أنواع من العائلة المركبة	CSVd	١٩٧٣	Hollings & Stone
تقرم الاضواء				Diener & Lowson
٤ - Chrysanthemum chlorotic mottle Viroid	أنواع من العائلة المركبة	CCMVd	١٩٧٥	Remaine & Horst
الشحوب المترقش في الاضواء				Van Dorst & Peters
٥ - Cucumber pale Fruit	العائلة القرعية والطماطم	CPFVd	١٩٧٤	Van Dorst & Peters
الثمرة الباهتة في الخيار				Sanger et al
٦ - Coconut cadang - cadang	نخيل جوز الهند	CCCVd	١٩٧٥	Randles
كادانخ - كادانخ في جوز الهند				Randles et al
٧ - Hop Stunt	العائلة الباذنجانية العائلة القرعية	HSVd	١٩٧٧	Sasaki & Shikata
تقرم حيشية الدينار				Owens et al
٨ - Columnea erythrophae		---	١٩٧٨	Owens et al
كولينا الكامن				Thomas & Mohamed
٩ - Avocado sun blotch	الأفوكادو	ASBVd	١٩٧٩	Thomas & Mohamed
ضربة الشمس في الأفوكادو	القرفة			Mohamed & Thomas
١٠ - Tomato apical Stunt	معظم نباتات العائلة الباذنجانية	TASVd	١٩٨١	Walter
تقرم قمة الطماطم				Galindo et at
١١ - Tomato planta macho	الطماطم وبعض نباتات العائلة الباذنجانية	TPMVd	١٩٨٢	Galindo et at
النبات الذكر في الطماطم				Chen et al
١٢ - Burdock Stunt	الباردوك	BSVd	١٩٨٣	Chen et al

ملاحظة هامة:

١ - كان يكتب اسم الفيرويد بأخذ الحرف الأول من كل كلمة لغاية سنة ١٩٩٢ ثم بعد ذلك إتفق العلماء على إضافة حرف (d) بعد حرف الـ (V) لتمييزه عن الفيروس ولزيادة عدد الفيرويدات المكتشفه.

٢ - كان المرض رقم (١٠) يسمى سابقاً Tomato bunchy top disease.

## مراجع خاصة بالفصل الأول

- 1 - Diener, T. O., Raymer, W. B. 1967. Science 158 : 378 - 381.
- 2 - —————1971. Comparative Virology ed. K. Maramorosch E. Kurstak, 433 - 467 New York Academic Press. 584.
- 3 - —————1972. Advance Virus Res. 17 : 295 - 313.
- 4 - —————1963. Virology 8 : 7 - 30.
- 5 - ————— et al. 1974. Virology 57 : 577 - 581.
- 6 - ————— 1979. science 205 : 859 - 866.
- 7 - Semancik, J. S., Weathers, L. G. 1968. Virology 36 : 326 - 328.
- 8 - ————— . 1970. Phytopathol. 60 : 732 - 736.
- 9 - ————— . 1972. Nature New Biol., 237 : 242 - 244.
- 10 - ————— . 1973. Virology 53 : 448 - 456.
- 11 - Singh, R. P., Bagnall, R. H. 1968. Phytopathol. 58 : 696 - 699.
- 12 ————— and Clark, M. C. 1971. Biochem. Biophys. Res. Commun 44 : 1077 - 83.
- 13 - Lawson, R. H. 1968. Phytopathol. 58 : 885 Abs.
- 14 - Loening, U. E. 1967. Biochemist J. 102 : 251 - 257.
- 15 - Kleinschmidt, A. K., Zahn, R. K. 1959. Z. Naturforsch B 14 : 770 - 779.
- 16 - Engelhardt, D. L. 1972. J. Virol. 9 : 903 - 908.



- 17 - Sogo, J. M., Koller, T., Diener, T. O. 1973. *Virology*: 55 : 168 - 170.
- 18 - Boedtker, H. 1971. *Biochem. Biophys. Acta.* 240 : 299 - 308.
- 19 - Sanger, H. L. 1972. *Advan. Biosci*, 8 : 103 - 116.
- 20 - ————— . 1984. *Microb*, 281 - 334.
- 21 - Zaitlin, M., Hariharasubramanian, V. 1972. *Virology* 47 : 296 - 305.

## الفصل الثانى

### الفيروسيدات وتفاعلاتها مع العائل

#### Viroids And Their Interaction With The Host

##### مقدمة Introduction :

الفيروسيدات هى عبارة عن أحماض نووية ذات وزن جزيئى منخفض (1,1 × 10<sup>5</sup>) دالتون وذات تركيب فريد، يمكن عزلها من أنواع معينة من النباتات الراقية التى تعانى من أمراض معينة مميزة. الفيروسيدات لم تكتشف ولم تعرف فى الأفراد السليمة من نفس تلك الأنواع التى تظهر عليها الأعراض، ولكن عند ادخالها فى مثل تلك الأفراد فإنها تتضاعف (تنسخ) تلقائياً بذاتها بالرغم من صغر حجمها وتسبب مجموعة الأعراض المرضية التى تظهر على النبات. وبالتالي فإن الفيروسيدات هى عوامل مسببة للأمراض.

إن الفيروسيدات غير مشابهة للأحماض النووية الفيروسية حيث أنها أحماض نووية غير مغلقة، وكذلك فهى غير مشابهة للفيروسات Virions حيث أنه لم يعزل أى فايرون من النسيج المصاب (الفايرون هو جزيء واحد من الفيروس)، وتختلف فى جميع صفاتها عن الفايرونات. جميع أفراد الفيروسيدات التى عرفت حتى الآن تتكون من حمض نووى RNA وجميعها قد عزلت من نباتات راقية. تشكل الفيروسيدات صف Class جديد من الكائنات الممرضة تحت الفيروسية وهى أصغر العوامل المعروفة المسببة لأمراض معدية.

حصل تقدم كبير في مفهوم الفيروسيدات منذ تسميتها سنة ١٩٧١ بواسطة العالم Diener وذلك عندما وضع أسس جديدة لهذا العلم مبنية على صفات العامل المعدى المسئول عن مرض الدرنه المغزلية في البطاطس. لقد وجد أن هذه الصفات تختلف أساسياً عن تلك الصفات التقليدية والمعروفة للفيروسات على الأقل في خمسة إعتبارات هامة.

١ - يوجد الفيرويد في الطبيعة على شكل حمض نووى RNA غير مغلف بكبسولة أو غطاء بروتينى .

٢ - لم يكتشف فايرون أو أجسام شبيهة بالفايرون فى النسيج المصاب بالفيروسيدات.

٣ - الحمض النووى RNA فى الفيروسيدات ذو وزن جزيئى منخفض.

٤ - بالرغم من صغر حجم الحمض النووى RNA المعدى إلا أنه ينسخ ويتضاعف تلقائياً بذاته فى الخلايا القابلة للإصابة، هذا يعنى أنه لا يتطلب فيروس مساعد (كان فى بداية الأبحاث يعتقد بضرورة وجود فيروس مساعد مع الفيرويد لكى يتكاثر).

٥ - يتكون الفيرويد من حمض نووى ذو تركيب أولى وثانوى وثالث وفى النهاية يأخذ شكل دائرة.

مما سبق يمكن القول بأن الفيرويد عبارة عن كائن حيوى متميز عن مسببات الأمراض الأخرى.

إذا ما نظر الباحث إلى الكتب الحديثة التى تبحث فى الكيمياء الحيوية، البيولوجيا الجزيئية أو الكائنات الحية الدقيقة، فإنه يمكن أن يلاحظ فى هذه الكتب ما ملخصه أن الفيروسيدات هى أصغر مسببات الأمراض تتكون من RNA وهى أصغر التركيبات ذات التضاعف (التناسخ) الذاتى وهى أقل المستويات فى التسلسل الهرمى فى الحياة.

تعتبر الفيروسات من المسائل المثيرة والمربية، ليس فقط من ناحية البيولوجيا الجزيئية ولكن أيضاً من ناحية علم الفيروس، علم أمراض النبات، الفيزياء الحيوية وفي علوم أخرى ذات صلة بها. إن الزيادة الواضحة في معرفتنا عن الفيروسات يمكن أن تلاحظ بزيادة الأبحاث التي تجرى عليها باستمرار.

يمكن القول بأن الفيروس عبارة عن حمض نووي RNA احادى الخيط تتخلله أجزاء دائرية، يتكون من بضع مئات من النيوكليوتيدات ويكون ممرض في النباتات الراقية فقط. لوحظت الأهمية الاقتصادية للأمراض الفيروسية في النباتات منذ الربع الأول من القرن العشرين، ولكن في تلك الفترة كانت تعتبر هذه الأمراض متسببة عن فيروسات.

في بعض الاعتبارات هناك ظاهرة تشبه الفيروسات وهي الفيروسسايدات Virusoids، وهذه الأخيرة عبارة عن جزيئات من الحمض RNA بحجم وتركيب يشبه الفيروس وتكون مغلفة مع بعضها البعض بحجم كبير من RNA كما في كثير من الفيروسات النباتية وهي لا تتناسخ ذاتياً ولكن بعضها يسلك مثل RNAs المرافقة للفيروسات العادية والبعض الآخر يمكن أن يكون جزء مكمل في آلية التناسخ في الفيروس.

### تفاعلات خلية عائل الفيروس Viriod - Host Cell Interactions

عندما تدخل الفيروسات في الخلايا القابلة للإصابة فإنها تتضاعف ذاتياً، هذا يعنى بدون الحاجة إلى فيروس مساعد. هذه القاعدة البيولوجية الحقيقية أثارت عدداً من الأسئلة مثيرة للاهتمام أهم هذه التساؤلات هي :-

١ - باى ميكانيكية تتضاعف الفيروسات؟؟. ونظراً لأن الفيروسات قد تحددت على أنها أنواع مميزة ذات وزن جزيئى منخفض من الحمض النووى RNA هذا الذى يدخل كمية قليلة جداً من المعلومات الوراثية في خلايا العائل. لذا يبدو أولاً أن أنزيمات العائل الموجودة قبل دخول الفيروسات، معمظها أو كلها تكون مسئولة عن تضاعف الفيروس.

٢ - باى ميكانيكية تحدث الفيروسات المرض فى عوائل معينة؟؟ علاوة على ذلك فإنها تتكاثر فى أنواع نباتية أخرى قابلة للإصابة بدون إحداث أضرار مميزة فى العائل!!.

فى الصفحات اللاحقة إن شاء الله سوف نجد أجوبة لهذه التساؤلات.

### موقع الفيروسات فى الخلية : Subcellular Location

لقد أظهرت الإختبارات الحيوية للأجزاء تحت الخلوية من أوراق طماطم مصابة بفيروس PSTVd أن أجزاء النواة فقط تحتوى على فيروس يمكن تقديره. أما الكلوروبلاست، الميتوكوندريا، الرايوسومات والأجزاء الذائبة تحتوى على آثار فقط من الفيروس. إن معظم كمية الفيروس فى النبات تكون مرافقة للكروماتين ويمكن استخلاصها على شكل حمض نووى RNA حر بدون منظم فسفاتى. إن فيروس اكسوكورتز الحمضيات CEVd يكون أيضاً بشكل أساسى فى مكونات النواة ملاصقاً تماماً للكروماتين أما بالنسبة لهذا الفيروس عندما يصيب نبات *Gynura aurantiaca* فإن كمية لا بأس بها من الفيروس تكون مرافقة لمكونات شبه غشائية للبلازما فى الجهاز الغشائى الداخلى، هذا ما ذكره العالم Semancik سنة ١٩٧٦.

إن الحقيقة التى تقول بأن PSTVd المعدى يكون موجوداً أولاً فى أنوية الخلايا لم تقدم الدليل على أنه يبنى هناك، وعلى أية حال فإن التجارب المعملية على نظام بناء RNA والتى فيها يستعمل أنوية خلايا نقية من أوراق طماطم مصابة كمصدر أنزيمى، أعطت هذه النتائج المذكورة، وبالتالي يبدو أن الفيروس المعدى الداخلى فى النبات يتحرك إلى النواة (بميكانيكية معينة) ويتكاثر هناك. إن غياب كميات معنوية من PSTVd من أجزاء أو مكونات السيتوبلازم فى الخلايا المصابة يؤدى إلى القول بأن معظم الذرية الناتجة من تكاثر الفيروس تبقى فى النواة.

وبشكل عام فإن الفيروسات توجد فى الطبيعة على شكل معقدات مع المكونات النووية وموجودة فى أجزاء خاصة أو عضيات الخلية. إن الدراسات

الحديثة التي بنيت على إختبارات الحيوية قد أثبتت أن الفيروسات مرافقة بشكل أساسي مع الأنوية و / أو الأغشية النووية. وفي أبحاث أخرى فإن الأنوية عالية النقاوة والكلوروبلاست من نسيج ورقة طاطم قد استعمل في الدراسة ومحتواها من PSTVd قد حدد كميأ بواسطة الاتجاه المزدوج من الهجرة الكهربائية في الجيل، فقد وجد أن ٩٥٪ من RNA الفيرويدي في الأنوية، لا يوجد تجانس في التوزيع داخل النواة ولكنه مترافقاً مع أجزاء النوية. عند زيادة القوة الأيونية، هذا يؤدي إلى إنطلاق الفيروسات. لقد استنتج من كل ما سبق أن الفيروسات مترافقة مع النوية بواسطة بروتين حمض نووي. اعتماداً على ما تقدم وجد أن متوسط عدد نسخ الفيرويد بين ٦٠٠ - ١٠٠٠٠ نسخة في الخلية.

#### ترجمة الفيرويد Viriod Translation :

إن الفيروسات ذات سلسلة طولها كاف لأن يشفر لعديد من الببتيدات حوالي ١٠٠٠٠ دالتون، مع أنه في حالة PSTVd الدائري فإن العدد الفردي للنيوكليوتيدات والذي من ناحية نظرية يسمح بثلاثة دورات في الترجمة بطريقة تتغير كل مرة.

الإختبارات التي أجريت في المعمل على RNA لفيرويد PSTVd و CEVd لكي يقوم بوظيفة tRNA في أنظمة مختلفة لبناء البروتين في الخلية المفردة الحرة، أعطى دليلاً على أنه لا يوجد أى من هذين الفيرويديين عنده كفاءة لمثل هذه الوظيفة. وجد أن CEVd أيضاً لا يترجم في بويضات *Xenopus laevis* حتى بعد أن أجرى له عملية polyadenylation في المعمل ولم يمكنه أن يتدخل في ترجمة mRNAs الداخلي. إن إفتقار PSTVd إلى حيوية ونشاط mRNA ليست غريبة بالنظر إلى حقيقة أنه لا يوجد كودون الابتداء AUG في ترتيب نيوكليوتيداته (هناك عديداً من المجموعات الثلاثية GUG من الممكن أن تعمل كبادئ).

مع أن الفيروسات لا تعمل مثل mRNA's في هذه الأنظمة، إلا أنها يمكن أن تترجم في الطبيعة عن سلسلة مكاملة من RNA مبنية بواسطة أنزيمات العائل الموجودة مسبقاً مع استعمال RNA الفيرويدي المعدى كقالب. لقد حددت

وعرفت تتابعات النيوكليوتيدات فى RNA المكمل للفيروس فى النسيج المصلب وذلك بواسطة العالم Owens سنة ١٩٨٠. ولقد إقترح أن هذه السلسلة المكملة للفيروس يمكن أن تعمل عمل RNA's. أما بالنسبة لفيروس PSTVd فإن السلسلة المكملة له (cPSTVd) كما أنشأت حسب تتابع نيوكليوتيدات الفيروس يمكن نظرياً أن تعمل عمل mRNA. مع أن cPSTVd لا يحتوى على أى من الوحدات الثلاثة الابتدائية (لبء البناء) AUG إلا أنه يحتوى أربعة وحدات ثلاثية GUG وستة وحدات ثلاثية لتوقف البناء والتي نظرياً تؤدي إلى أربعة عديدات الببتين تحتوى ١٠٨، ٧٩، ٤٣ أو ٢٨ حمض أمينى. وسواء كان أم لم يكن RNA's المكمل للفيروس يعمل عمل mRNA's (لا يعرف حتى الآن) إلا أنها إذا كانت تعمل فإن بروتينات خاصة فيروسية غريبة يمكن أن تكتشف فى تخضيرات البروتين من نسيج العائل المصاب.

إن المقارنة بين أنواع البروتين فى الطماطم السليمة والمصابة بفيروس PSTVd وفى نباتات *Gynura aurantiaca* سليمة ومصابة بفيروس CEVd، على أية حال، لم تظهر إختلافات نوعية بين النباتات السليمة والمصابة. فى تلك الدراستين ظهر أن هناك زيادة فى بناء إثنين من البروتينات على الأقل فى النباتات المصابة عنه فى نسيج النباتات السليمة، ولكن تبين بعد ذلك أن هذين البروتينين خاصين بالعائل وليس بالفيروس. كذلك فإن التحليل بالهجرة الكهربائية فى الجيل ذات الاتجاهين للبروتينات المصنعة فى كل من خلايا الطماطم المصابة أو غير المصابة بفيروس PSTVd والمأخوذ من المزارع المعلقة أظهرت أنه لا يوجد تغيرات كمية ولا كيفية تنتج عن بقاء الفيروس داخل الخلية.

علاوة على ذلك برغم أن طرقاً أكثر حساسية فى التحليل يمكن أن تكشف عن وجود عديد من بروتينات خاصة بالفيروس فى الخلايا المصابة، إلا أنه فى ضوء المعلومات الحالية يجب أن نخرج بنتيجة أن الفيروسات لا تعمل عمل mRNA's. وإذا كان كذلك فإن ترتيب نيوكليوتيدات cRNA الموجود فى النسيج المصاب يجب أن يكون قد صنع كلية بواسطة أنزيمات العائل الموجودة سابقاً إلا أنها من الممكن أن تكون قد استحثت.

## تركيب الجزيء Molecular Structure

### مقدمة :-

الفيروسات هي جزيئات من RNA احادى السلسلة مكون من شكلين دائري مغلق ومستقيم ويتخلل هذين الشكلين من RNA مناطق قصيرة تأخذ شكل قريب من الحلزون المزدوج والتي تتكون نتيجة لتكوين ما يسمى بتركيب دبوس الشعر hairpin بين تتابعات متكاملة كثيرة موجودة فى الجزيء بحيث تتزواج عند إتواءها وتكون مناطق مزدوجة السلسلة والتي تظهر تحت الميكروسكوب الالكترونى كأنها عصيات مزدوجة السلسلة.

لقد تحدد ترتيب النيوكليتيديات كاملاً فى فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس وذلك بواسطة العالم Gross سنة ١٩٧٨. واعتماداً على أساسيات هذا الترتيب بالإضافة إلى دراسات الدنميك الحرارية Thermodynamic والنشاط الانتقالى لدرجات الحرارة المدنترة لهذا الفيروس، إقترح نموذجاً للتركيب الثانوى لفيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس. واعتماداً على هذا النموذج فإن الفيروسات توجد فى شكلها الطبيعى على هيئة تركيب يشبه العصى ممتد يتميز بسلسلة من قطع ذات شكل حلزوني مع وجود عروات داخلية. وبالتالي فإن التركيب شبه العصى الذى كان يفترض للفيروسات الطبيعية يعتبر الآن غير صحيح ومبنياً على النقص ويفضل عليه التركيب شبه العصى ذو العروات الداخلية وأطراف شبه دائرية مع تركيب دبوس الشعر.

بعد ذلك فإن الترتيب الكامل لنيوكليتيديات فيروس تقزم الاقحوان CSVd قد تحدد بواسطة العالم Haseloff سنة ١٩٨١. وبالمقارنة الواضحة مع فيروس الدرنه المغزلية PSTVd والذى يتكون من ٣٥٩ نيوكليتيديداً فإن فيروس CSVd يتكون من حمض نووى RNA وحيد السلسلة دائري مغلق يتكون من ٣٥٦ نيوكليتيديداً، من



بين هذه النيوكليوتيدات المتتابعة هناك ٦٩٪ منها موجود في فيروس PSTVd وبالتالي فإن كلا الفيرويديين يمكن أن يشكلوا تركيب ثانوي متماثل.

كذلك فإن السلالات المعتدلة من PSTVd قد أُجريت لها عملية ترتيب، وإن نتائج التركيب الأولى قورنت مع تلك التي حددت سابقاً للسلالات الشديدة. تبين أن السلالات المعتدلة تختلف عن السلالات الشديدة بثلاثة نيوكليوتيدات تتواجد في مواقع مختلفة من الجزئ وهي AA إلى U في الموقع ١٢٠ - ١٢١، A إلى U في الموقع ٣١٠ ودخول U بين موقعي ٣١٢، ٣١٣ كما حدده Gross سنة ١٩٨١.

إن هذه النتائج متسقة مع النتائج السابقة والتي ذكرت أن الفيرويدات تتكون من أنظمة وراثية صفاتها مشفرة في ترتيب النيوكليوتيدات في RNAs. وبالتالي فإن ترتيب النيوكليوتيدات في النوع المفرد من الفيرويدات يختلف بشكل واضح عن بعضها البعض، بينما ترتيب سلالات النوع الواحد يختلف إختلافاً بسيطاً فقط. ومن المهم أن نذكر أن الاختلافات البسيطة في ترتيب السلالتين المعتدلة والشديدة في فيروس PSTVd لم يكن يتوقع أن يكون لها مثل هذه النتيجة البيولوجية العميقة.

## ١ - التركيب الأولى والثانوي Primary and Secondary Structure

إن وصف الفيرويدات بأنها حمض نووي RNA خال من البروتين وثبوت صغر حجمها والتعرف على شكلها الدائري، كل ذلك كان سبباً أساسياً لدراسة تتابع النيوكليوتيدات فيها وتركيبها الثانوي المعقد. وعلى كل حال فإن الإسهاب في شرح التركيب، الشكل شبه العصوي والخيط المفرد، موديل التركيب الثانوي الذي يتكون من عروات وحلزون Loops and helices أصبحت معروفة جيداً قبل أن يتحدد تتابع النيوكليوتيدات.

هناك طريقة واحدة يبدو أنها تبشر بنجاح الحصول على تفصيل متقن للترتيب الكامل للنيوكليوتيدات في الفيرويد:

في المعمل فإن تعليم 5<sup>'</sup> لأجزاء الفيرويد التي حصل عليها بواسطة الهضم الكلى أو الجزئي باستعمال أنزيم رايونيوكليز النوعى مع 5<sup>'</sup>- polynucleotide Ki-nase و ATP (γ - p)<sup>32</sup>. إن أول تركيب كامل للفيرويد كان قد تحدد بواسطة هذه الطريقة، كان للفيرويد PSTVd. هذا يؤكد دون التباس وجود الشكل الدائرى فى الجزئ ويظهر عديداً من صفات التركيب والتي أصبحت نموذجية لجميع الفيرويدات. أما النيوكليوتيدات المتحورة نوعاً ما كما فى تلك الموجودة فى tRNA لم يمكن تعريفها.

إن التركيب الثانوى للفيرويدات كان قد أستنتج من نتائج التجارب ومن مدلولات النظريات. إن التركيب الثانوى للفيرويدات يكون فى شكل سلسلة غير متفرعة من لولب قصير مضاعف ذو عروات داخلية صغيرة. كل هذا كان واضحاً تماماً فى فيرويد PSTVd وتأكد بواسطة كل التتابعات التى حددت فيما بعد.

وأخيراً فإن نظام التتابع الثانوى قد استعمل بنجاح فى كل من :-

١ - نسخ الفيرويد المستقيم إلى cDNA .

٢ - الكلونة Cloning .

٣ - تتابع cDNA للفيرويد المكلون وذلك بالاعتماد على تكنيك تتابع ال DNA .

مع أن مراقبة التتابع بواسطة التعليم بالاشعاع فى المعمل قد أظهر بأن تجمعات الفيرويد تحتوى على تتابع مختلف وأن ترتيب العديد من cDNA المكلون للفيرويد



شكل رقم ٢ :

التتابع والتركيب الثانوي للفيرويدات. CCCVd 1 - small تحوي ٢٤٧ نيوكليوتيدة. التتابع في المنطقة المحفوظة كعلب تسمى المنطقة عالية الحفظ.

الواحد يسمح بتوطيد وتثبيت التتابع الفردي للمتغيرات حتى في تلك الحالات حيث أن عدم التجانس لا يعرف بواسطة التتابع المباشر للحمض RNA.

في شكل (٢) تتابع بعض الفيروسيدات مرسوم في تركيبها الثانوى والذى هو مأخوذ من ورقة البحث الأساسية وإن المقارنة بين تتابع هذه الفيروسيدات يدل على أن هناك على الأقل ثلاثة مجموعات من الفيروسيدات:-

١ - مجموعة PSTVd والتي تضم CEVd, TASVd, TPMVd, PSTVd, CSVd, وإلى حد ما تضم HSVd و CPFVd.

٢ - مجموعة ASBVd.

٣ - مجموعة CCCVd. إلا أن هذا سيوضح بالتفصيل في دراسة التصنيف فيما بعد.

في جدول رقم ٢ هناك بعض المعلومات الكمية عن التتابع والتركيب الثانوى للفيروسيد. إن أفراد مجموعة PSTVd تتميز بالتتابع المتماثل (المتناظر) لحوالى ٦٠% أو أكثر من حيث نيوكليوتيداتها A:U, G:C, وبالتالي فإن نسبة البيورين إلى البيريميدين تكون واحدة تقريباً وهناك حوالى الضعف من ازواج القواعد G:C بالنسبة إلى A:U. إن بين ٤ - ١٦% من ازواج القواعد تكون ازواج G:U. بالقرب من منتصف التركيب الثانوى هناك يوجد منطقة تتابعها متناظر جداً تظهر كمنطقة معلبة في شكل ٢. هناك خيط ممتد طويل من ال polypurine موجود بالقرب من هذه المنطقة المركزية المحفوظة وإن تماثل التتابع يكون عالياً فى النصف جهة اليسار من التركيب الثانوى عنه فى النصف اليمين. إن النصف اليسارى يكون أقل ثباتاً من ناحية ديناميكية عنه فى النصف اليمينى. وبشكل واضح فإن التركيب الثانوى لهذه الفيروسيدات يمكن تقسيمه إلى جزء يسارى والذى يحتاج تتابعات محفوظة مع بعضها البعض إلى حد ما بتركيب لولبى بسبب إنخفاض الثبات الديناميكي، والنصف اليمينى، والذى يكون فيه الثبات أكثر أهمية من تتابع النيوكليوتيدات.

بالنسبة لإثنين من الفيروسيدات في مجموعة PSTVd، فإن الفيروس PSTVd نفسه والفيروس CEVd هما عزلات مختلفة (طفرات) معروفة بأنها تختلف بواسطة تتابعها وجزئياً بشدة الإصابة مثل التعبير بالأعراض. أما ASBVd، CCCVd فهي تختلف عن بعضها البعض بمقدار ما تختلف عن فيروسات مجموعة PSTVd. فمثلاً ASBVd، CCCVd لا تحتوي على تتابع polypurin. في CCCVd يوجد منطقة محفوظة مركزية، بينما في ASBVd يوجد فقط تعاقب مشترك من GAAAC. كذلك فإن هذه الـ GAAAC موجودة في الفيروسات في المنطقة المركزية في التركيب الثانوي. كذلك فإن ASBVd يظهر أقل تناظراً مع الفيروسات الأخرى.

بالإضافة إلى أن CCCVd يختلف عن جميع الفيروسات بسبب أن هناك أربعة تنوعات من CCCVd ذات أطوال مختلفة تكون مترافقة مع مرض كادانج - كادانج في جوز الهند فهي تسمى:

١ - Small - 1 - CCCVd به ٢٤٦ نوكليوتيدة وهو عبارة عن تضاعف تماماً في Small - 2 - CCCVd حيث يحوى الأخير ٤٩٢ نوكليوتيدة. وهي تحدث في الأطوار المبكرة من المرض بينما يظهر إثنان من الأحماض النووية RNA متأخراً بعد عدة سنوات من الإصابة.

٢ - Large - 1 - CCCVd فيه ٢٨٧ نوكليوتيدة.

٣ - Large - 2 - CCCVd فيه ٥٧٤ نوكليوتيدة.

يختلف CCCVd نوع Large - 1 عن نوع Small - 1 عن نوع في تضاعف ٤١ نوكليوتيدة في النهاية اليمنى في التركيب الثانوي وهذا سبب ظهور العزلة Baa054. إن حجم المنطقة المضاعفة يختلف بين ٤١ - ٥٥ بين العزلات المختلفة من CCCV.

جدول ٢: التركيب الأولي والثانوي للفيرويدات.

ازواج القواعد					اعداد النيوكليوتيدات المتغيرة بين المرات			التتابع المتماثل %		النيوكليوتيدات				الفيرويد	
A:U %	G:C %	G:U %	العدد الكلي	درجة %	مزاله	مكسبة	مستبدلة	بين المرات	مع PSTVd	C	G	U	A		المجموع
٢٩	٥٨	١٣	١٢٦	٧٠	-	-	-	١٠٠	١٠٠	١٠٨	١٠١	٧٧	٧٣	٣٥٩	PSTVd
٣٠	٥٧	١٣	١٢٨	٧١	١	١	٢	٩٩	-	١٠٨	١٠١	٨٠	٧٠	٣٥٩	PSTVd عزل مستقلة
٣٠	٥٨	١٢	١٢٤	٦٩	٠	٠	٤	-	-	١٠٨	١٠٠	٧٧	٧٤	٣٥٩	PSTVd عزلة جديدة
٣١	٦٠	٩	١٢٢	٦٨	-	-	-	٩٩	٨٣	١٠٨	٩٩	٨١	٧٢	٣٦٠	TPMVd
٣٢	٥٧	١١	١٣١	٧٣	-	-	-	-	٧٣	٩٩	١٠١	٩٠	٧٠	٣٦٠	TASVd
٢٨	٥٦	١٦	١٢٨	٦٩	-	-	-	١٠٠	٧٣	١١٢	١١٢	٧٥	٧٢	٣٧١	A-CEVd
٢٨	٥٦	١٦	١٢٨	٦٩	٠	٠	٤	٩٩	-	١١٢	١١٠	٧٦	٧٣	٣٧١	C-CEVd
٢٨	٥٦	١٦	١٢٥	٦٧	٠	٠	٤	٩٩	-	١١٣	١١٠	٧٦	٧٢	٣٧١	AM-CEVd
٢٨	٥٦	١٦	١٢٨	٦٩	٠	٠	٤	٩٩	-	١١٢	١١٢	٧٦	٧١	٣٧١	DE 25-CEVd
٢٨	٥٨	١٤	١٢٦	٦٨	٦	٦	١٥	٩٣	-	١١٠	١١٢	٨٠	٦٩	٣٧١	DE 26-CEVd
٣٤	٥٦	١٠	١٢٢	٦٩	-	-	-	١٠٠	٧٣	٩٧	٩٠	٩٣	٧٤	٣٥٤	E-CSVd
٣٥	٥٢	١٣	١٢٤	٧٠	٢	٤	٦	٩٧	٦٩	٩٩	٨٩	٩٣	٧٥	٣٥٦	A-CSVd
٢٩	٦٤	٧	١٠٠	٦٧	-	-	-	١٠٠	٥٥	٨٨	٧٩	٦٩	٦١	٢٩٧	HSVd
٣١	٦٥	٤	١٠٥	٦٩	١	٧	٨	٩٧	٥٥	٨٨	٨١	٧٠	٦٤	٣٠٣	CPFVd
٥١	٣٤	١٤	٨٣	٦٧	-	-	-	-	١٨	٤٣	٥١	٨٥	٦٨	٢٤٧	ASBVd
٢٤	٦٩	٨	٨٠	٦٥	-	-	-	١٠٠	١١	٧٣	٧٣	٤٧	٥٣	٢٤٦	صغير 1- CCCVd
٢٥	٦٧	٨	٩٢	٦٤	٠	٤٦	٠	١٠٠	-	٨٤	٨٦	٥٨	٥٩	٢٨٧	كبير 54 Baao
٢٤	٦٨	٨	٩٦	٦٥	٠	٥٠	٠	١٠٠	-	٨٧	٩١	٥٩	٥٩	٢٩٦	Ligao 14 B
٢٤	٦٨	٨	٩٧	٦٤	٠	٥٥	٠	١٠٠	-	٨٩	٩٣	٥٩	٦٠	٣٠١	Ligao T1
٢٤	٦٨	٨	٩٦	٦٥	٠	٥١	٠	١٠٠	-	٨٨	٩١	٥٩	٥٩	٢٩٧	San Nascisco

ملاحظات:

١ - يعتبر CPFVd بالنظر إلى تنابعه المتناظر تنوع من HSVd.

٢ - 1- CCCVd الصغير هو خليط من الأنواع واحد يحتوى 197 فى موقع C والآخر يحتوى CC

فى ذلك الموقع. وهناك 2- CCCVd لم يذكر فى الجدول لأنه تضاعف لـ RNAs

المتناظرة.

٣ - جميع عزلات CCCVd1 الكبير تختلف عن عزلة الصغير وذلك بتضاعف التابع على النهاية اليمنى فى التركيب الثانوى وبالتالي يكون تناظر التابع 7.100. إن المنطقة المتضاعفة قد ذكرت تحت بند المفحمة. أما عزلة 54 Baa، Ligoa 14B، Ligao T1 قد إشتقت من CCCVd1 الصغير مع ٢٤٦ نيوكليتيده. أما Aan Nascisco هو مشتق من CCCVd1 الصغير ٢٤٧ نيوكليتيده.

## ٢ - التركيب الثانوى Secondary Structure :

كما ذكر سابقاً فإن التركيب الثانوى للفيرويدات قد استنتج من نتائج التجارب بالإضافة إلى الحسابات النظرية. إن التجارب باستعمال المواد الكيماوية المحورة مثل :-

١ - Dye binding .

٢ - Oligonucleotide binding .

٣ - تقدير الروابط الفسفورية (الفسفات ثنائية المجموعة الاسترية) القابلة للمهاجمة بواسطة الانزيمات.

أظهرت بوضوح وجود الخيط المفرد بالإضافة إلى مناطق ثنائية الخيط. وكذلك لقد استنتج أيضاً أن معظم الجزئ يكون قابلاً للتفاعل الاشارى Ligand وغير مغلف بواسطة أى تركيب ثلاثى مؤدياً إلى شكل كروي. وعلى أية حال فإن حقيقة أن المناطق احادية الخيط والحلزونية المزدوجة تكون مرتبة فى نمط أو طريقة تسلسلية بدون تشعب أو تفرع، وهذا يمكن استنتاجه فقط من التقدير الكمى لمنحنيات الدنترة الحرارية للفيرويدات.

إن الأصل النظري للتركيب الثانوى قام وفقاً لثلاثة مستويات:

الأول:- الشكل العصى المتطاوول للجزئ وهذا كان قد أخذ من نتائج التجارب وبواسطة النظام التجريبي والخطأ، فإن مخططات القاعدة المزدوجة جعلته أقرب مايكون إلى أعلى رقم من القواعد المزدوجة، ٦٩ مثلاً.

الثانى:- المستوى العال من التنقية. إن الأبحاث الـثيرموديناميكية أثبتت وجود التركيب الثانوى للفيرويد.

الثالث:- إن نظام العد العشرى والحساب الذى إتبعه كثير من العلماء مثل كل من Nussinov & Jacobson سنة ١٩٧١ و Zuker & Stiegler سنة ١٩٨٠ قد طبقوه فى الحساب الدقيق للتركيب الأقل حفظاً للطاقة. وإن هذا النظام قد أحدث فيه تحسناً وتحرراً لحساب الخيوط الدائرية والقيم الأحدث لازواج القواعد الثابتة والعروات.

يمكن القول باختصار إن أبسط الطرق للحصول على أقرب مايمكن من الدقة لأعلى رقم من القواعد المزدوجة وأكثر الحسابات تعقيداً أدت إلى القول بوجود تركيب ثانوى متناظر تقريباً. الاختلافات وجدت فقط فى مناطق محدودة من الجزئ. كما أن تركيبات ثانوية متماثلة جداً حصل عليها أيضاً عندما استعملت مجموعات مختلفة من معلومات الثبات العنصرى. فمثلاً إن التركيب الثانوى للفيرويد PSTVd الذى ذكر بواسطة Riesner et al سنة ١٩٧٩ أو الذى ذكر بواسطة Jacobson سنة ١٩٨٠ كان متوافقاً تماماً. يمكن القول بكل أمان أن تركيب الفيرويد غير غامض ولا عليه التباس وبالتالي حتى التقديرات التقريبية تؤدى إلى التركيب الصحيح. جدول رقم ٣.



جدول رقم ٣: القياسات الترموديناميكية للتركيب المقطعي للفيروسيدات،  
الفيروسايدات وتتابعات عشوائية

	$\Delta G/N$ (KJ/mel)	$T_m$ [ c ]	$\Delta T_{1/2}$ [ c ]	Mechanism
Viroids				
PSTVd	1.67	51	0.9	Formation of stable hairpins
CEVd	1.62	51	1.0	
CSVd	1.61	48.5	1.1	
CCCvd - 1- Large	1.53	49.1	1.2	
CCCvd - 1- small	1.53	49.1	1.4	
ASBVd	1.13	37.5	1.5	not determined
Virusoids				
SNMV2	1.43	38	2.8	—
VTMoV2	1.32	38	2.0	—
Random sequences	$1.27 \mp 0.1$	$36 \pm 5$	$> 5$	—

ملاحظات:

في التتابع العشوائي عدد النيوكليوتيدات ومحتويات من  $G, C, U, A$  مأخوذة من PSTVd. التتابع العشوائي متوسط لخمسة مكررات.  $T_m$  و  $\Delta T_{1/2}$  قيمها تشير إلى قوة أيونية  $0.1, Na^+$ ، رقم حموضة 6.8.

### ٣ - التركيب المقطعي Structural Transitions :

إن التراكيب المقطعية للفيروسيدات قد درست بعدة طرق منها: -

أ - منحنيات الدنترة بالحرارة.

ب - طرق قياس الحرارة الدقيقة.

ج- الطرق الديناميكية.

د- طرق الارتفاعات المفاجئة لدرجات الحرارة.

إن منحنيات التفكك سواء التي حصلت بواسطة UV - hypochromicity أو بواسطة الاختلافات الحرارية، تظهر مقطع رئيسي ضيق على حوالى ٥٠م في ٠,٠١١ أيون صوديوم  $Na^+$  ودرجة حموضة (6.8) pH. كذلك فإن درجة حرارة النقطة الوسطى  $T_m$  تكون أقل بحوالى ٢٠م عن قيمة ال  $T_m$  للحمض DNA ثنائى الخيط وأقل بحوالى ٣٠م عن الحمض RNA ثنائى الشريط عند مقارنة كليهما بمحتوياتهما من GC. إن قيمة  $T_m$  لمعظم أنواع الفيروسات تتراوح ما بين ٥١ - ٣٦م. أما قيمتها لمنتصف العروض لمعظم التراكيب المقطعية للفيروسات هي  $\Delta T 1/2$  تتراوح ما بين ٠,٩ إلى ٥م. إن متوسط الطاقات الحرة لكل نيوكليتيده  $\Delta G / N$  يتراوح ما بين ١,٦٧ إلى ١,٢٧ كيلو جول (KJ) لكل مول. إن مقطع واحد أو اثنين من ذات ال hypochromicity المنخفض وذات  $\Delta T 1/2$  قد لوحظت على درجة حرارة ١٠ - ٢٠م اعلى من المقطع الرئيسى. فى المقطع الرئيسى عال التعاون فإن جميع ازواج القواعد فى التركيب الطبيعى تتفكك وتكون قطع متكاملة تكون فى أجزاء متباعدة من التركيب الطبيعى تعود تتحد ثانية لتكون شكل دبوس الشعر الأكثر ثباتاً. فى درجات الحرارة العالية فإن دبائيس الشعر هذه يحدث لها دترة على شكل مقاطع أو أشكال حرارية منفصلة. ولقد لوحظت هذه الأشكال فى Electron micrographs. لقد وجدت دبائيس الشعر الثابتة فى التجارب على درجات الحرارة العالية. يجب أن نذكر أن دبوس الشعر رقم I موجود فى المنطقة المحفوظة جيداً.

إن شكل رقم ٣ يوضح أشكال دبائيس الشعر فى بعض الفيروسات.

إن طريقة اعادة الترتيب لشكل الفيرويد من التركيب المتطاوول الطبيعى إلى تركيب مدنتر جزئياً مع تكوين أشكال دبوس الشعر جديدة لوحظت أول مرة

بالتجارب. نفس الميكانيكية يمكن الحصول عليها نظرياً بدون إفتراض سابق عن التركيب الثانوى. إن الحسابات التى إتبعها العالم Nussinov سنة ١٩٨١ قد استعملت على درجات حرارة مختلفة وأظهرت أن الشكل المتحصل عليه يمكن أن يلتوى ويأخذ شكل ضيق يتراوح ما بين الشكل المتطاوول إلى الشكل المتفرع وأن الشكل الرئيسى سهل عليه القيام بهذه الأشكال إلى حد كبير. وإن الحسابات قد أظهرت أن الدنترة تبدأ فى النصف اليسارى من التركيب الثانوى. هناك منطقتان حيث يكون التركيب الثانوى أكثر قابلية للتغير هما منطقة البولى بيورين الأكثر قابلية للمط polypurine stretch والمنطقة المجاورة إلى الجانب اليسارى من المنطقة المحفوظة. هاتان النقطتان الضعيفتان فى التركيب تقريباً متماثلتان فى الفيروسيدات CSVd، CEVd، PSTVd.

Viroids	-Hairpins-		
	I	II	III
PSTVd	<pre> 79      87 CGCUUCAGG : : : : : GCGAGGUCC 110      102                     </pre> <p>14</p>	<pre> 227      236 CCCUCGCCCC : : : : : GGGAGCGGGG 328      319                     </pre> <p>82</p>	<pre> 127      135 CGGUGGGGA : : : : : GCCGCCUUU 168      150                     </pre> <p>28</p>
CEVd	(possible but not studied)	<pre> 239      251 CCCUCGCCCGAG : : : : : GGGAGCGGGCCUC 339      327                     </pre> <p>79</p>	not possible
CSVd	(possible but not studied)	<pre> 223      233 CCCUAGCCCGG : : : : : GGGAUCGGGCC 322      312                     </pre> <p>76</p>	not possible
CCCVd-large	<pre> 46      54 CGCUUGAGG : : : : : GCGAACUCC 77      69                     </pre> <p>14</p>	not possible	not possible

شكل رقم ٣ :

دبابيس الشعر لأربعة فيروسيدات. العدد يدل على منطقة القواعد المزدوجة والرقم فى الدائرة يدل على حجم العروة. يلاحظ دبوس الشعر رقم ٣ لا يوجد إلا فى الفيروسيد PSTVd.

## الوزن الجزيئي والشكل Molecular Weight and shape :

إن الأوزان الجزيئية قد حددت أصلاً من ١ - الهجرة الكهربية في الجيل. ٢ - Sucrose gradient ٣ - Electron micrographs. إن أولى الأوزان الجزيئية الدقيقة (الصحيحة) قد حصل عليها باستعمال آلة الطرد عن المركز فائقة السرعة ثم بعد ذلك يتم إجراء توازن على الترسيبات بطرق معينة. ونظراً لأن تتابع تركيب الفيرويدات معروف الآن، فإن معظم الأوزان الدقيقة يمكن حسابها من هذا التتابع. يمكن الحصول على قيم جيدة بمعدل وزن جزيئي ٣٣٣ لكل نيوكليتيده تشمل Bound cations.

أما بالنسبة للشكل، فتظهر الفيرويدات في الصور المأخوذة بواسطة Electron micrographs على شكل تركيب عصوي إذا ما حضرت تحت ظروف طبيعية (١, ٠). مول كلوريد صوديوم و pH 7). هذه النتيجة معروفة بالنسبة لكثير من الفيرويدات مثل PSTVd، CPVd، CCCVd، و HCVd. كذلك أيضاً من دراسات سرعة الترسيب على فيرويد PSTVd والأشكال الأربعة لفيرويد CCCVd، أمكن الاستنتاج بأن الفيرويدات تمتلك تركيب شبه عصوي في المحلول، زيادة على ذلك فإنها تأخذ في المحلول بعض المرونة التي تجعل شكلها شبه دائري والتي يمكن تمييزها أيضاً بوجود مسافة قصيرة تتكرر في الفيرويد، هذا الطول المتكرر يكون تقريباً نصف قطر الدائرة التي يمكن أن ينحني إليه البوليمر، هذا الطول يساوي ٣٠٠ أنجستروم. وعند إجراء مقارنة بين هذا الطول والطول المتكرر في حمض DNA ثنائي الشريط فيكون ٦٠٠ أنجستروم، يعنى الضعف تقريباً. إن هذا الطول ليس له علاقة بطول الفيرويد نفسه لأن طول الفيرويد لا يتجاوز ٥٠ نانوميتر.

نتيجة التحليل بطريقة Sedimentation coefficient أمكن الاستنتاج بأنه حتى في الأشكال المضاعفة من CCCVd والتي تسمى RNA2 فإنها تتخذ في المحلول الشكل المتطاوول. العالم Haseloff et al سنة ١٩٨٢ استنتج بدراسته على أساس

التتابع فى النيوكلييتيدات أن الفيرويدات تأخذ الشكل المتطاوول بالإضافة إلى الشكل الصليبي .

يمكن القول بأن الفيرويد يأخذ الشكل المتطاوول ذو الانتفاخات فى النهايتين ويتكون عروات بين هذين الانتفاخين، بالإضافة إلى حدوث إنثناءات التى تشكل ما يسمى دبوس الشعر.

هناك وصف آخر لشكل الفيرويد يذكره Agrios سنة ١٩٨٧ يقول فيه تظهر الفيرويدات على شكل جزئيات دائرية من RNA وحيد الخيط بأزواج عديدة من القواعد فى أجزاء هذا الخيط، تؤدى ازواج القواعد هذه إلى ظهور بعض أنواع تركيبات تشبه دبوس الشعر بخيط مفرد ومناطق مزدوجة الخيط على نفس الفيرويد.

مع أن الفيرويدات تمتلك كثيراً من صفات الأحماض النووية RNAs المفردة الخيط، إلا أنه عندما تفحص بالميكروسكوب الالكترونى تظهر بطول حوالى ٥٠ نانوميتر ولها سمك الخيط المزدوج من الحمض النووى DNA.

ولقد ذكر Maramorosch فى كتابه سنة ١٩٩١ «قال» تتخذ جزئيات الفيرويد غير المدنترة كثير من أزواج القواعد الداخلية بحيث تكون هذه الأزواج مرتبطة لتعطى تركيب شبه عصوى بطول ٥٠ نانوميتر، أما عند دنترة هذه الجزئيات فإنها تعطى دوائر احادية الشريط يكون طول محيطها ١٠٠ نانوميتر. أما الوزن الجزيئى يساوى  $(٨٠ - ١٢٢) \times ٣١٠$  أما  $S_{20w} = ٨ - ١٠$  أما  $Tm$  فى ١٠ ملى مول أيون صوديوم = ٥٠م. أما الكثافة فى كبريتات السيزيوم تساوى تقريباً ١,٦ غم / سم<sup>٣</sup>.

أما الصفات الكيماوية فذكر أن الفيرويدات تتكون من ٢٤٦ - ٣٧٠ نيوكلييتيدة. كل الفيرويدات باستثناء ASBVd غنية بأزواج القواعد G:C بالمنطقة المحفوظة المركزية إن ال oligomers عندها الكفاءة لتشكيل تركيبات بلاندرميه

(من الأمام تشبه التركيب من الخلف) تشمل الجزء العلوى من المنطقة المحفوظة المركزية. إن الفيرويدات ليس لها القدرة على أن تشفر للبروتين.

## تناسخ (تضاعف) الفيرويدات

### VIROIDS REPLICATION

إن تضاعف الفيرويد من ناحية نظرية يشمل النسخ إما عن قالب RNA أو DNA. إن ميكانيكية RNA الموجه تتطلب وجود تتابع مكمل للحمض RNA فى الفيرويد الكامل فى النسيج المصاب، بالإضافة إلى وجود أنزيمات مسبقة فى العائل مع أنزيم RNA - polymerase المتخصص للحمض RNA الموجه.

أما ميكانيكية توجيه DNA فإنها تتطلب أيضاً وجود تتابعات مكاملة للحمض DNA للفيرويد الكامل. هذه التتابعات للحمض DNA يمكن أن تكون موجودة مسبقاً - بشكل مثبت - فى العوائل غير المصابة أو أنها يمكن أن تصنع نتيجة للإصابة بالفيرويد، وفى هذه الحالة فإن أنزيمات العائل الموجودة مسبقاً مع أنزيم DNA - polymerase المتخصص للحمض RNA الموجه أيضاً تكون ضرورية الوجود.

هل يحدث تضاعف لـ RNA أو DNA الموجه:

هناك أبحاث قديمة فى أوائل السبعينات ذكرت أن التضاعف يحدث فى كلا الحمضين RNA و DNA، إلا أنه تبين واضحاً أن تضاعف الفيرويد يحدث على قالب من RNA وليس من DNA، وإن الفيرويد الداخلى هو الذى يعمل كقالب لبناء ذرية جديدة من الفيرويد وليس DNA الخاص بالعائل.

ولكى نميز بين تضاعف RNA أو DNA الموجه، فإنه تأثيرات بعض مركبات المضادات الحيوية على تضاعف الفيرويد قد درست جيداً. فى الدراسة على الطبيعة كانت تؤخذ شرائح من ورقة نبات سليم وأخرى مصابة بفيرويد PSTVd وكانت

تعامل بالماء أو بـ Actinomycin - D، وجد أن تضاعف الفيرويد كان حساساً للمثبط الذى يشبط بناء RNA من DNA الموجه وهذا وجده العالم Diener سنة ١٩٧٥. وحصل على مثل هذه النتائج فى الدراسة المعملية على نظام بناء RNA والذى فيه كانت تؤخذ أنوية الخلايا من النباتات السليمة أو المصابة بالفيرويد PSTVd من نباتات الطماطم وتنقى جيداً وتستعمل كمصدر للانزيم.

إن حساسية تضاعف الفيرويد لمادة Actinomycin - D قد تأكدت فى دراسة قام بها العالم Muhlbach سنة ١٩٧٩ وذلك على فيرويد الثمرة الباهتة فى الخيار (CPFVd) الذى يبنى فى البروتوبلاست المعزول من أوراق الطماطم. فى نفس هذه الدراسة فإن تأثير amanitine - ∞ على بناء الفيرويد قد تميزت تماماً. إن وجود مادة amanitine - ∞ بتركيز ١٠-٨ مول بين الخلايا يكون كافياً لتثبيط أنزيم RNA polymerase II (الذى يختص بنسخ سلاسل جزيئات RNA المراسل mRNA) على DNA الموجه فى نباتات الطماطم، إلا أنه لا يشبط أنزيم RNA polymerase III (الذى يقوم ببناء عدد من سلاسل RNA القصيرة الناقل tRNA و rRNA) وبالتالي لا يشبط تضاعف الفيرويد CPFVd. وعلى النقيض من الدراسات التى أجريت باستعمال Actinomycin - D التى استعمل فيها amanitine - ∞ والذى فيها يكون تأثير هذا المركب على بناء الفيرويد ذو نتيجة غير متوقعة ليس بتثبيط نوعى لبناء RNA من DNA الموجه، ولكن تأثير سام كلى على البناء الحيوى، وأن التأثير المثبط لمادة amanitine - ∞ ليس من المحتمل أن يكون بسبب عدم التخصص النوعى ولكن بسبب التأثيرات الثانوية للمركب على ميتابولزم الخلية. إن هذا الملخص قد تأكد بالتقريرات التى بينت أن تركيز مادة amanitine بين الخلايا الكاف لتثبيط تضاعف الفيرويد بحوالى ٧٥٪ لم يكن له تأثير ملحوظ على البناء الحيوى لكل من RNA لفيروس موزايك الدخان أو أنواع RNA الخلوية مثل tRNA، 5S RNA، 7S RNA و rRNA.

هناك بعض الدراسات تبين أن بناء RNA من DNA الموجه هو الداخلى فى

تضاعف الفيرويد وهذا يكون أكثر وضوحاً بالتجارب التي يستعمل فيها  $\alpha$ -amanitin، هذه النتائج التي لم توافق تلك المتحصل عليها باستعمال Actinomycin - D فقط ولكن بالإضافة إلى استعمال أنزيم نوعى والذي يسمى RNA polymerase II الذى يعمل على DNA.

إن هذه النتائج أدت إلى القول بثقة أن أنزيم polymerase II يكون داخلاً مباشرة أو غير مباشر فى تناسخ الفيرويد. زيادة على ذلك فإن الاعتماد فى بناء CEVd على أجزاء النواة فى النبات *Gynura aurantiaca* وعلى التركيز الأيونى مثل  $Mg^{2+}$ ،  $Mn^{2+}$ ،  $(NH_4)_2SO_4$  مستوى خط بناء CEVd حتى على تركيز عال من  $\alpha$ -amanitin  $10^{-8}$  -  $10^{-6}$  مول يمكن إعتبار تشارك RNA polymerase رقم I و III.

إن امكانية تناسخ الفيرويد بواسطة polymerase II قد دعمت بالدراسات المعملية باستعمال أنزيم RNA polymerase II نقى من نسيج طماطم سليمة أو من جنين قمح. ولقد تبين أنه بوجود أيونات  $Mn^{2+}$  فإن الأنزيم ينسخ RNA الفيرويدى إلى خيوط مستقيمة سالبة ذات طول كامل وأن هذا الفيرويد يكون مقبولاً لأن يكون قالب ذو كفاءة عالية بالمقارنة مع RNA الطبيعى أو المبنى. زيادة على ذلك أنه خلال بناء الوسيطات للطول المعين فإنه يتجمع، هذا يدل على إفتراض واضح فى ادخاله فى المعمل. ولقد ذكر أن أيونات  $Mn^{2+}$  والتي عادة تخفض تخصص القالب لانزيم البولى ميريز polymerase لا يحتاج إليها هنا (وأن الفيرويدات) حتى إذا قورنت مع الفيروسايدات تظهر درجة أعلى فى الأهمية لنشاط القالب.

فى تجارب التحليل بواسطة الة الطرز عن المركز فائقة السرعة، فإن الارتباط الثابت بين polymerase II من جنين القمح والفيرويد PSTVd وجد أنه  $710 M^{-1}$ . إن هذا الرقم منخفضاً بالمقارنة مع إرتباط محفز ال polymerase، ولكن حوالى درجة أعلى من التكبير منه فى ارتباط ال polymerase إلى أحماض نووى RNAs طبيعية شاملة الفيروسايدات. فى التصوير الالكترونى Electron micrographs لقد



تبين أن RNA polymerase II من جنين القمح يمكن أن يرتبط من كلتا النهايتين لفيرويد PSTVd التركيب الثانوى.

إن الحقيقة التى تقول بأن الفيرويدات من الممكن أنها تستطيع أيضاً أن تنسخ فى الطبيعة بواسطة أنزيم العائل RNA polymerase II والذى عادة يقبل العمل على ال DNA ثنائى الخيط كقالب، يمكن أن تؤدى إلى الاقتراح بأن الفيرويدات تكون أخطاء فى الخلية لقطع من ال DNA. هذا يمكن أن يعكس التركيب الاستثنائى والصفات الديناميكية للفيرويدات والتى قد وصفت سابقاً بأنها شبيهة بـ DNA.

فى المعمل فإن النسخ للحمض RNA للفيرويد PSTVd إلى نسخ كاملة الطول بواسطة أنزيم RNA polymerase المعتمد على RNA من نسيج ورقة سليمة قد ذكرت أيضاً. هذا الأنزيم يكون بوضوح مرشح لتناسخ RNA الفيروسى للنبات. لا يكون تناسخ الفيرويد فى المعمل مثبطاً بواسطة amanitine - ∞. وبالتالى فإن هذه النتائج سوف لا تشرح الحساسية فى الطبيعة لمادة amanitine - ∞ لبناء الفيرويد الملاحظة فى البروتوبلاست.

### الانزيمات الداخلة فى تضاعف الفيرويد Enzymes Involved :

لقد أظهر العالم Rackwitz سنة ١٩٨١ أن أنزيم RNA polymerase II (الذى يعمل على DNA الموجه) المأخوذ من جنين القمح أو من خلايا كالوس أو أوراق خضراء من أنواع طماطم برية *Lycopersicon peruvianum* تكون قادرة فى المعمل على نسخ العديد من قوالب RNA طبيعياً وتخليقياً، مع أنه على كفاءة أقل بمقدار الضعف من كفاءة قوالب ال DNA، ولقد أظهر الباحث أنه فى جميع قوالب ال RNA الطبيعية المختبرة، فإن الفيرويدات تنسخ بكفاءة عالية بواسطة أى أنزيم. إن التحليل بواسطة الهجرة الكهربائية فى الجيل تحت ظروف الدنترة فى منتجات النسخ فى المعمل مع فيرويدات منقاة تستعمل كقوالب كشفت بالإضافة إلى عديد من الجزيئات المكاملة للفيرويدات الصغيرة.

باعتبار كل النتائج السابقة نستنتج أن الفيرويدات تتضاعف بطريقة غريبة والتي فيها تكون جزيئات RNA المعدى منسوخة كلية بواسطة أنزيم العائل الموجود سابقاً، وبالتالي فإن هذا الأنزيم يكون عادة RNA polymerase II لحمض DNA الموجه. يبدو واضحاً أن الأنزيم المسئول عن بناء حمض mRNA الموجود مسبقاً تحت ظروف معينة يمكن أن يعمل كأنزيم polymerase أو RNA replicase للحمض RNA الموجه. إن هذا يكون حائماً على التأمل بأن التركيب الطبيعي للفيرويدات يكون عبارة عن تركيب يشبه DNA ثنائي الشريط والذي يسمح للأنزيمات أن تقوم بعملها بشكل جيد نسبياً بهذه الكفاءة. لقد تبين أن الفيرويدات يمكنها بسهولة أن تشكل معقدات ثنائية مع RNA polymerase II والتي تشترك (تتنافس) مع DNA لعمل قالب لمواقع الربط على الأنزيم، وبالتالي فإنها تثبط وبشدة بناء RNA من DNA الموجه. من هذه الناحية فإن جزيئات الفيرويد المعدية تجند وتجر RNA polymerase II الموجود في النواة لتكاثرها الخاص. بالتالي يمكن اعتبار الفيرويدات بأنها أحماض نووية RNA أنانية (هذا ما قاله Lewin سنة ١٩٨١).

لغاية الآن لا يوجد تقارير على بناء الفيرويد باستعمال RNA polymerase رقم I أو III المعتمد على DNA النقي، وبالتالي لا يمكن اعتبارها داخلة في تضاعف الفيرويد. إن موقع الفيرويدات الناضجة في النوية سوف تظهر لصالح polymerase I الذي عادة يجرى تناسخ RNA الرايوسومي في النوية. إن تماثل التتابع بين تتابع محفز DNA من كائن حي آخر مع التتابعات على النهاية اليمنى في التركيب الثانوي للفيرويد PSTVd، CSVd أو CEVd قد وجد بواسطة كثير من الباحثين. ومن ناحية أخرى فإن موقع الفيرويدات الناضجة في النوية لا يستثنى بناؤها بواسطة الأنزيم polymerase II والذي يعرف بأنه موجود في البلازما النووية أو مترافقاً مع الكروماتين. هذا يمكن أن يكون متوقعاً من المقارنة مع الحمض النووي الصغير U3 والذي على الأقل في الخلايا الحيوانية ينسخ بواسطة polymerase II من الكروماتين وبعد ذلك يصبح مترافقاً مع النوية.

## : المنقبات Probes

هناك طريقة أخرى لدراسة تناسخ الفيروس تكمن في تطوير المنقبات أو جزيئات من المنقبات الخاصة بالفيروس وتعريف تتابع القواعد في DNA أو RNA المتعلق بالفيروس قياساً على الحمض النووي المستخلص من النباتات وذلك بواسطة التهجين الجزيئي.

لقد استعملت ثلاثة أنواع من المنقبات هي :-

- ١ - فيروسات نقية معلمة في المعمل باليود المشع ١٢٥.
- ٢ - خيط مفرد (محضر في المعمل) من DNA تكميلي للفيروس (cDNA).
- ٣ - خيط مزدوج من الفيروس ومكملة من ال DNA يحصل عليه بطرق فنية معينة.

في البداية يمكن القول بأن استعمال الفيروسات الممثلة باليود المشع ١٢٥ كمنقبات في تجارب التهجين أدى إلى نتائج متضاربة. على أساس مثل هذه التجارب فإن مجموعتين من الأبحاث قد ذكرتا وجود تعاقب مكمل للفيروس في DNA الفيروس المعدي وحتى في نباتات العائل غير المصابة، لكن الأبحاث اللاحقة أثبتت بوضوح خطأ النتائج السابقة. وبالمثل فإنه في تجارب التهجين الجزيئي بين cDNA المعلم بالفسفور المشع ٣٢ وفيروس تقزم الاقحوان CSVd فإن أَل Genomes سواء في العوائل السليمة أو المصابة بفيروس CSVd لم يلاحظ فيها تطابق في ترتيب وتعاقب النيوكليوتيدات.

وعلى أية حال فإن أى من هذه التجارب لم تستبعد إمكانية أن التتابعات المتعلقة بالفيروس قد تكون موجودة عشوائياً على كروموزومات العائل أو أن ال DNA للعائل يحتوى على مجموعة صغيرة فقط من جينوم PSTVd. وفي هذه الحالة الأخيرة فإنه من الممكن تصور أن هناك ترتيب قصير من قواعد ال DNA المكمل للفيروس قد تقوم بعملها كمواقع تمييز وقد تتدخل في تولد المرض بواسطة

الفيرويد. إنه من الواضح على أية حال أن أى من مثل هذه التتابعات من DNA المتعلقة بالفيرويد لا يمكن أن تعمل كقوالب لبناء أفراد جدد من الفيرويدات، ويصبح بالضرورة أن الفيرويدات يجب أن تتناسخ عن قوالب RNA. وإن هذا التقرير الأخير قد دعم بعدة ملاحظات تدل على أن التركيب الرئيسى للفيرويد لا يتغير بغض النظر عن العائل الذى يتناسخ فيه، وكما هو متوقع من أن الفيرويد الداخلى هو الذى يعمل كقالب لبناء ذرية جديدة من الفيرويد وليس DNA الخاص بالعائل.

### المركبات الوسيطة فى تناسخ الفيرويد:

#### Intermediates of Viroid Replication

إن أكثر البراهين إقناعاً على أن RNA الموجه هو المسئول الرئيسى عن ميكانيكية تضاعف الفيرويد تكمن فى النتائج التى حصل عليها عدة مجموعات من الباحثين بأن جزيئات RNA المكتملة للفيرويد تتكون فى مستخلصات أحماض نووية من نباتات مصابة ولا تتكون فى مستخلصات الأحماض النووية من النباتات غير المصابة. ويبدو واضحاً أن مثل هذه الجزيئات تمثل مركبات وسيطة فى عملية تناسخ الفيرويد. إن تعاقب RNA المكمل للفيرويد أمكن التعرف عليه لأول مرة فى مستخلصات من نباتات طماطم مصابة بفيرويد CEVd وأوراق نبات *Gynura auran-tiaca* بواسطة التهجين فى المحلول بمنقّب فيرويد معلم بيود مشع ١٢٥. كما أن بعض الأحماض النووية RNAs المكتملة للفيرويد أمكن التعرف عليها فى الأجزاء الطافية من كلوريد الليثيوم، ولكن الغالبية العظمى كانت فى الأجزاء المترسبة من كلوريد الليثيوم. لقد ذكر العالم Grill سنة ١٩٧٨ أن RNA المكمل للفيرويد يكون مرافقاً لـ DNA العائل يكون على شكل جزيئات RF (شكل تناسخى) RI (وسيط التناسخ) وكذلك مرافقاً لجزيئات تكثر فيها مناطق ذات خيط واحد وأخرى طويلة ذات مناطق ثنائية الخيط واحادية الخيط وأخرى على شكل بلمرة بالإضافة إلى تجمعات أو تكتلات ذات وزن جزيئى عال من الجزيئات المكتملة للفيرويد، إلا أن الباحث Grill سنة ١٩٨٠ لم يوافق على مثل هذه التصنيفات.

إذا فرض أن الأحماض النووية RNAs المكملة للفيروسات تقوم كقالب ينسخ عنه فيروسات جديدة فمن الواضح أنها يجب أن تحتوى على تعاقب كامل مكمل للفيروس، هذا يعنى أنها يجب أن تكون مساوية فى الطول أو أطول من الفيروس. ونظراً للطريقة غير السليمة التى إتبعها العالم Grill سنة ١٩٨٠ فى تحديد أحجام مكملات الفيروس لفيروس CEVd فإنه لم يصل إلى نتيجة فى تحديد حجم مكملات الفيروس. ويعود الخطأ فى طريقة Grill إلى أنه استعمل RNA غير مدنتر قبل التحليل وكانت تجرى عملية الفصل الكهربائى على الجيل تحت ظروف غير مدنتر.

إن الدليل المقنع لوجود جزيئات كاملة الطول من RNA مكملة للفيروس حصل عليه بواسطة كل من Owens و Cress سنة ١٩٨٠ فى تجارب Blot hybridization والتى فيها يستعمل خيط مزدوج من DNA معاد تركيبه كمنقب خاص للفيروس. إن هذا المنقب قد تم بناؤه عن طريق تخضين PSTVd polyadenylated مع أنزيم النسخ العكسى ويتبع ذلك ازالة قالب الفيروس بالتسخين. كانت النتائج بأن الشريط المفرد من DNA (الذى هو cDNA تكملى للفيروس PSTVd) قد إنقلب إلى cDNA ثنائى الخيط مقاوم لأنزيم S1 nuclease فى تفاعل استعمل فيه أنزيم DNA polymerase 1 للبكتيريا E. coli. إن cDNA الثنائى الشريط المكمل للفيروس PSTVd بعدئذ قد غرس فى pst I فى مواقع أنزيمات القطع الداخلى للبللازم PBR 322 عن طريق استعمال اجراءات تعاقبات Oligo (dc) و Oligo (dg). إن المقاومة للتراسيكلين، تحول الحساسية للبنسلين، تحتوى على تتابعات مكملة لـ cDNA الفيرودى PSTVd المعلم بالفسفور المشع ٣٢ و كلون واحد أعيد تركيبه (29 - pDc) يحتوى ٤٦٠ زوج من القواعد المغروسة فيه. إن هذا الحمض ثنائى الخيط cDNA PSTVd يحتوى مواقع للتقسيم لسته مواقع محددة لانزيمات القطع الداخلى مؤكدة بالتتابع المذكور سابقاً للفيروس PSTVd. إن نتائج هذه التجارب وغيرها تدل على أن كل التعاقب الكامل للفيروس PSTVd قد حصل لها كلونة.

إن تجارب التهجين بواسطة بعض المنقبات أثبتت وجود جزيئات RNA في مستخلصات من خلايا مصابة لها نفس قابلية التحرك (ووزن جزيئي محتمل) كما في فيروس PSTVd المستقيم ولكن ذو قطبيه عكسية. إن جزيئات RNA المكمل للفيروس PSTVd التي لها نفس هذا الحجم قد وجدت بعد معاملة مستخلصات الحمض النووي بأنزيم RNase، دنتره الأحماض النووية RNAs باستعمال الحرارة لمدة دقيقتين على درجة حرارة 100م في 50% Formamide ثم تبرد وبعد ذلك تحلل بالهجرة الكهربائية بالجيل على درجة 55م في وجود 8 مول يوريا. إلا أن العالم Branch ومرافقه سنة 1981 قد ذكروا نتائج تخالف هذه النتائج حيث استعمالاً أحماض نووية RNAs مدنتره قبل التحليل وإن التحليل بواسطة الجيل كان يفضل تحت ظروف يعرف أنها تمنع إعادة التقوية الكبيرة للحمض RNA.

وعلى العكس من ذلك فإن نتائج التجارب التي أجريت على فيروس CEVd، فإن cPSTVd كان موجوداً دائماً على وجه الحصر في الأجزاء الطافية من كلوريد الليثيوم (وزن جزيئي منخفض وخيط ثنائي)، وكذلك فإن النتائج أكدت أن معظم إن لم يكن كل cPSTVd كان موجوداً في مستخلصات الحمض النووي في شكل جزيئات مزدوجة مقاومة لأنزيم RNase، هذا يعني قاعدة مزدوجة مع PSTVd. هذا أمكن تفسيره بواسطة الملاحظات التي تدل على أن إنتاج cPSTVd لم يخف بشكل كاف إذا أزيلت تقوية RNA - RNA قبل المعاملة بأنزيم RNase.

ولقد أورد بعض الباحثين عدة براهين تثبت أن الخلايا المصابة بالفيروس تحتوي بالإضافة إلى خيط مكمل للفيروس كامل الطول تحتوي على جزيئات خاصة بالفيروس أطول من وحدة الفيروس الواحدة. إن أول إقتراح يدل على أن مثل هذه الأحماض النووية RNAs القريبة من الفيروس يمكن أن توجد في الخلية حصل عليه بواسطة إختبارات Blot hybridization مع مستخلصات حمض نووي من النباتات المصابة بالفيروس PSTVd، والتي فيها نوعين من RNA يحتويان على

مكمل للفيرويد cPSTVd لوحظ أن هجرتهما أكثر بطأً من هجرة PSTVd. هذا ما ذكره Hadidi سنة ١٩٨١.

إن جزيئات RNA الخاصة بالفيرويد PSTVd تكون ذات حركة أثناء الهجرة الكهربائية أكثر بطأً من جزيئات الفيرويد PSTVd الدائرية والمستقيمة، هذا ما لوحظ في بعض الدراسات والتي فيها استعمل مستخلص حمض نووي من نباتات مصابة بالفيرويد PSTVd والتي استعمل فيها الهجرة الكهربائية على الجيل والتي فيها كانت الجزيئات الخاصة بالفيرويد قد عرفت بواسطة طريقة التهجين Northern bolt التي استعمل فيها منقبات معلمه إما بيود مشع ١٢٥ مع PSTVd أو فسفور مشع ٣٢ مع cDNA. لقد لوحظ سبعة أنواع من cPSTVd، ستة منها تحركت في الهجرة الكهربائية أكثر بطأً من الفيرويد PSTVd الدائري والآخر تحرك تقريباً بنفس سرعة PSTVd الخيطي، إلا أن هذه التجارب قد إنتقدتها Hadidi سنة ١٩٨١ وأثبت عدم دقتها.

إن البرهان المقنع على وجود جزيئات من cPSTVd ذات طول أطول من وحدة الطول قد حصل عليه في دراسة مشابهة لطريقة Blot hybridization والتي فيها إستعمل نظامين من الدنترة الكاملة في الجيل. لقد ظهرت وعرفت أربعة حزم متميزة من جزيئات cPSTVd. وباستعمال حسابات معينة تبين أن هذه الحزم تحتوي أطوال ٧٠٠، ١٠٥٠، ١٥٠٠ و ١٨٠٠ نيوكليتيده وهذا أدى إلى القول بأنها تمثل مرادفات للفيرويد PSTVd والتي تحتوي ٧١٨ قاعدة (ثنائي)، ١٠٧٧ قاعدة (ثلاثي)، ١٤٣٦ قاعدة رباعي، ١٧٩٥ قاعدة خماسي. لم يمكن التعرف على حزم لوحدة الطول من cPSTVd، قد يكون هذا بسبب التداخل في التهجين بكميات كبيرة من PSTVd غير المعلمة الموجودة في RNA من النباتات المصابة متحركة إلى نفس الموقع في الجيل كما في cPSTVd الاحادي. إن الدراسات الأنزيمية دلت على أن حزم cPSTVd تتكون على وجه الحصر من RNA موجود في معقدات محتوية على مناطق ذات خيط مضاعف. وبسبب التعريف الجيد للحزمة من cPSTVd فقد تبين أن حوالي ٤٠ نيوكليتيده تكون زيادة في طول

الوحدة الواحدة من PSTVd يمكن ملاحظتها بعد المعاملة بأنزيم RNase T<sub>1</sub>، كذلك فلقد اقترح الباحث أن هناك كمية قليلة من RNA الداخلة في cPSTVd، يبدو أنها مكونة من مناطق ذات وحدات طول ثنائية الخيط محاطة جانبياً بمناطق احادية الخيط ويبدو أن هذه المناطق الأخيرة تتكون من تتابعات مقاومة لـ RNase T<sub>1</sub>.

وبناء على النتائج السابقة فإن الباحثين افترضوا أن الحزم التي هي أطول من وحدة الطول الواحدة من cPSTVd تلعب دوراً في تناسخ الفيروس وأن معقدات cPSTVd تحتوي مناطق ثنائية الخيط من طول PSTVd تمثل مركبات وسيطية في التناسخ تدخل في تركيب حزم cPSTVd بطول تقريباً يساوى طول الفيروس مكرراً ترادفياً وأن حزم PSTVd الموجودة في هذه المعقدات تكون مساوية لطول الوحدة الواحدة من الفيروس. إن هذه الفرضيات بالإضافة إلى الاقتراح بميكانيكية تناسخ الفيروس بطريقة الدائرة الملتفة كلها كانت إفتراضات يمكن إثباتها وستكلم عنها فيما بعد.

هناك أبحاثاً أخرى وهي أيضاً مبنية على الفصل بالتفريد الكهربائي في الجيل للأحماض النووية RNAs تكون متبوعة بعملية Blot hybridization أثبتت أن التركيب الجزيئي للجزئيات الخاصة بالفيروس كانت أكثر وضوحاً وإن بعض الأدلة قد أثبتت أن هذه التركيبات هي فعلاً قد تمثل مركبات وسيطية في تناسخ الفيروس.

بالانفاق مع الأبحاث السابقة فإن تجارب Blot hybridization المستعملة منقبات DNA أعيد تركيبها أظهرت أن معظم مكونات الفيروس هي RNA ثنائية الخيط (وذلك باستعمال مستخلصات RNA من نسيج مصاب) والتي تهاجر في الجيل أكثر بطئاً من الوحدة الكاملة من PSTVd. إن أكثر الأحماض النووية RNAs شهرة والتي هي أكثر بطئاً في الهجرة هما حمضان قد فصل كل منهما عن الآخر بواسطة الكروماتوغرافى السيلولوزية والهجرة الكهربائية في الجيل، وإن



التركيب والحجم والشكل ومكونات PSTVd و cPSTVd لكل منهما قد تحللت في نظام الجيل والذى لا يحدث دنتره للحمض RNA ثنائى الخيط، ولكن يمنع إعادة التقوية والتركيب للأحماض RNAs المدنترة مسبقاً. إن هذا النظام من الجيل له فوائد أخرى فى فصل الجزيئات الدائرية عن الجزيئات المستقيمة فى PSTVd. إن المكونات ثنائية الخيط المعاملة وغير المعاملة بأنزيم RNase قد حللت بهذا النظام مع أو بدون الدنتره المسبقة. لقد أظهرت نتائج هذه التحليلات أن هناك مركبان كبيران هما أحماض نووية RNAs ثنائية الخيط خاصة بالفيروس وتهاجر ببطء ذات تركيب قريب الصلة وأنها تتكون من حزم ذات وحدة طول دائرية وخطية وذات قطبية تشبه PSTVd مختلطة مع حزم RNA أطول من وحدة الطول للفيروس وعكسية القطبية.

بعد ذلك أجريت تجارب عديدة كانت نتائجها قد بددت السر الذى كان يحيط بميكانيكية تناسخ الفيروس، وبالرغم من أن هناك إختلافاً فى تفصيل تلك النتائج، إلا أنها كانت تكمل كل منها الأخرى وتميل بوضوح إلى الالتقاء فى مفهوم واحد وفكرة واحدة عن جزئ الفيروس وميكانيكية تناسخه هذا المفهوم يشمل الفرضيات الآتية:-

١ - تنسخ الفيروسات عن RNA تكميلي complementary وليس عن قوالب DNA.

٢ - هذه القوالب (RNA تكميلي) بالإضافة إلى الفيروسات الناشئة (الذرية المتكونة) كلها تبنى بواسطة أنزيم العائل الموجود مسبقاً والأكثر احتمالاً هو أنزيم RNA polymerase II ويقوم بعمله مثل أنزيم Replicase أو كأنزيم RNA polymerase للحمض النووى RNA الموجه.

٣ - ينسخ الحمض النووى RNA المكمل للفيروس من جزئ فيروس دائرى بواسطة ميكانيكية اللف الدائرى والتي تؤدى إلى تكوين قوالب Multimeric وكميات كبيرة من معقدات تناسخ شبه وسيطية.

بعد هذه المقدمة الطويلة نستطيع أن نقول أن نتائج دراسات التهجين من عدة معامل قد أثبتت أن نباتات العائل سواء كانت سليمة أو مصابة لا تحتوي كميات يمكن التعرف عليها من DNA خاص بالفيروس. عندما إختبر RNA الموجود في الخلية للتتابع الخاص بالفيروس فإن RNA المكمل للفيروس وجد للفيروسات PSTVd، CEVd وفي ASBVd. إن الأنسجة المصابة بالفيروس PSTVd تحتوي RNA تكميلي للفيروس الكامل. ولقد ثبت نهائياً أن RNA فقط هو الوسيط الداخلى فى تناسخ الفيروس، ولزيادة الوصف للحمض RNA الخاص بالفيروس فإن التهجين بالمنقبات الخاصة بتتابع الشريط (-) أو الشريط (+) قد إستعمل. إن المنقبات الخاصة بالأشرطة السالبة كانت فيروسات معلمة باليود المشع ١٢٥، أما الشريط الموجب دى او كسى نيوكليوتايدز، M13 mp 93 ملونة تحتوي تتابع الشريط الموجب. لقد إختبر تتابع الشريط الموجب بشريط دى او كسى نيوكليوتايد سالب cDNA، معلم بفسفور مشع ٣٢ أو كلونات M13 mp 99 تحتوي تتابع شريط سالب.

إن التحليل بطريقة Northern Blotting للشريط السالب ذو التتابع الفيرويدي أظهر أن الشرائط السالبة من نوع كثير الوحدات (multimers) باثنين إلى خمسة أضعاف طول وحدة الفيروس، ولقد أمكن التعرف على تتابع أطول من طول وحدة الطول فى فيروس CEVd، ASBVd. إن الشرائط السالبة لوحدة الطول لا يمكن التعرف عليها بسهولة، وعلى أية حال متى وجد زوج واحد من الشرائط التكميلية فى كميات كبيرة أكثر من الأخرى فإن الشريط الأقل من الصعب أو لا يمكن أن يتعرف عليه بطريقة Northern hybridization.

لقد أمكن التعرف على الشرائط الموجبة قليلة ازواج الوحدات Oligomeric للفيروسات. فى النسيج المصاب بالفيروس PSTVd هناك مستوى قليل من ال dimers و trimers وفى النسيج المصاب بالفيروس ASBVd قد أمكن التعرف على مستويات عالية من ال Oligomers إلى حد eightmers. أما فى

الفيروسيد ASBVd فقد وصفت أجزاء دائرية ثنائية مشابهة لتلك الموجودة في RNA2 في الكادانج - كادانج.

### إنشطار بوادين الفيروسيد قليلة الأزواج والتخليق في الفيروسيدات

## Splitting of Oligomer Viroid Precursors and Circularization of Viroids

إن التركيب الدائري للفيروسيدات يمنحها فائدة القدرة الهائلة على الانتقاء أو الاختيار، نظراً لأن أنزيم ال polymerase حالماً يترافق مع RNA يكون عنده القدرة لإنتاج نسخاً عديدة الأزواج طويلة والتي عندئذ يمكن أن تنشطر إلى نسخ وحيدة (هذا يعنى إلى جزيئات تكون ذات طول يساوى طول وحدة واحدة). إن الوحدات المستقيمة، على الأقل الشروط الموجبة يجب أن تتحلل لتشكيل فيروسيدات ناضجة.

ليس من الواضح تماماً بأي كفاءة تنشطر الوحدات العديدة إلى وحدة طول واحدة من الأحماض RNAs. إن الوحدات العديدة من الممكن أن تحتوى على تركيبات ثانوية مسبقة من وحدات monomers، وبالتالي فإن أنزيم Ribonuclease يمكن أن يحرر هذه الوحدات. أما في مجال الدراسات التي أجريت على تحكيم الفيروسيدات، فإن هناك نوعان من الجزيئات المستقيمة قد عرفت في تحضيرات الفيروسيد PSTVd الدائري والتي تختلف بوجود فتحة بين C181 و C182 وبين C348 و A349 بالترتيب. على الأقل فإن واحداً من هذه المستقيمات الطبيعية كان يعتقد أنها نتجت من إنشطار بادئ ال multimers. ولأسباب ثيرموديناميكية يجب على الباحث أن يتوقع تركيب لـ multimers يشبه تسلسل التركيبات الثانوية للفيروسيد المتطاوول. في هذا التسلسل فإن الفتحة موجودة بين C181 و C182 يمكن أن تكون الوصلة بين التركيبات المتطاولة. إن تجاوز كل من C - A قد عرف أيضاً في RNAs كنقط ضعيفة بشكل خاص، وذكر أيضاً في بادئ RNA من البكتروفاج T<sub>4</sub> إنشطار ذاتي على هذه المنطقة. بجانب أنزيم Ribonuclease فإن

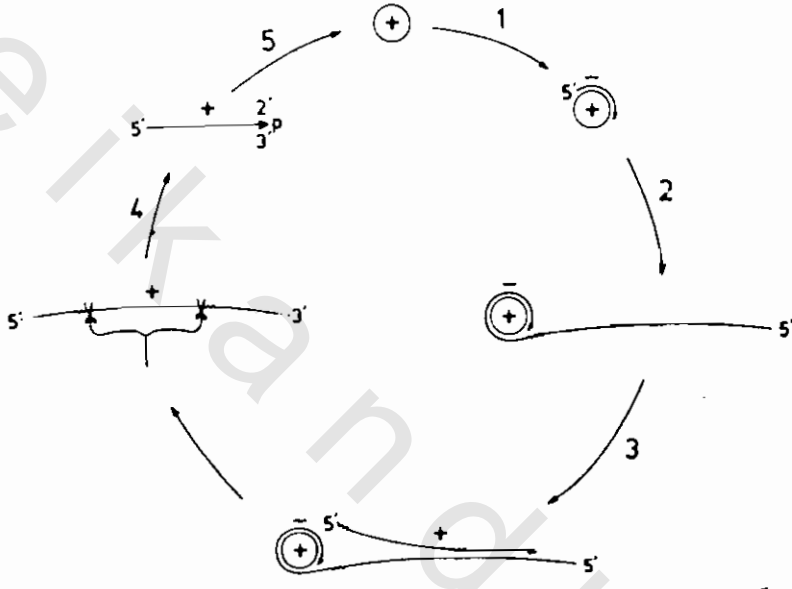
الهضم والتقطيع (الانشطار) الذاتى يتم حتى إتحاد القطع الذاتية وتوصيلها (هذا يعنى وصل ذاتى للقطعة ليشكل وحدات دائرية مباشرة كما هو واضح فى Pre- (rRNA Tetrahymena). ومن ناحية أخرى فإذا كان الانشطار والوصل هى تفاعلات منفصلة فيجب أن يتعرف على أنزيم فى النبات الذى يربط- 2', 3'- cyclophos- 2'- phos- 5 - phosphorylated RNA ليشكل روابط- 2'- phos- 3', 5'- phosphodiester. هذا الأنزيم قد تبين أنه يحلق بكفاءة ما يسمى جزئيات الفيرويد المستقيمة فى وضعها الطبيعي بالإضافة إلى جزئيات الفيرويد التى حدث لها استقامه صناعياً.

### أشكال التناسخ Models of Teplication :

إن أشكال تناسخ الفيرويد استنتجت بشكل أساسى من نتائج التجارب والتى عرف فيها التتابعات الخاصة بالفيرويد لأطوال مختلفة وقطبية مختلفة. مع أنه لم يثبت بشكل كامل إلا أنه من المفروض أن الخيوط ال Oligomeric الموجبة والسالبة تعتبر وسيطات فى التناسخ إذا قورنت بالمنتجات النهائية وهى تعتبر ملازمة لتقدم المرض. ولقد ذكر Branch & Robertson سنة ١٩٨٤ وصفاً طويلاً لتناسخ الفيرويد.

على أساس الدليل بأن الخيوط السالبة هى ال multimeric للفيرويد PSTVd وعلى أساس تحلق الفيرويدات الناضجة فقد إفترض ميكانيكية الالتفاف الدائرى فى تحليق الفيرويدات وتتم كالاتى: - يبدأ بناء الشريط السالب من الشريط الدائرى الموجب المعدى (خطوة رقم ١ فى شكل ٤). تؤدى ميكانيكية الالتفاف الدائرى إلى شريط سالب multimeric (خطوة رقم ٢). عندئذ تسلك الشرائط السالبة multimeric كقالب لانتاج أشرطة موجبة multimeric (خطوة رقم ٣) هذه الشرائط يجب أن تقطع لتعطى جزئيات مكونة وحدة طول واحدة بصفات نهاية المجموعات (خطوة ٤) ثم تتحلق (خطوة ٥) لتنتج ذرية من الدوائر. إن هذا الشكل الافتراضى يطبق على وجه الحصر على أنواع الحمض النووى لخاص بالفيرويد

والذى يمكن بسهولة التعرف عليه فى النباتات المصابة بالفيروس PSTVd. زيادة على ذلك وكما ذكر سابقاً فإن النشاطات الأنزيمية المفترضة قد وجدت أيضاً فى خلايا النبات، مع أن أى منها لم يبرهن عليه بشكل محدد بأنه يدخل كجزء فى تناسخ الفيروس فى الطبيعة كما إقترح فى شكل ٤.



شكل رقم ٤ :

رسم إفتراضى لتناسخ فيروس PSTVd. الشكل مأخوذ من Robertson و Branch سنة ١٩٨٤.

لقد تبين من دراسات Bruening et al سنة ١٩٨٢ أن هناك مستويات عالية من الشرائط الموجبة multimeric من ASBVd ومستويات منخفضة جداً من التتابع السالب، وهذا أدى إلى الاستنتاج بوجود ميكانيكية لف دائرى مختلفة. إن الفيروس ASBVd المخترق للنبات والذى هو monomeric يمكن أن ينقلب بواسطة أنزيمات العائل إلى جزئى دائرى سالب والذى عندئذ يعمل كقالب لبناء الدائرة الملتفة من تتابع ASBVd موجب مستمر والذى يعامل ليعطى ASBVd monomeric مستقيم كامل الطول بعد ربط ASBVd الدائرى ال monomer السائد.

هناك ميكانيكية ثالثة تشمل التفاف دائرتين. تبنى الشرائط السالبة Multimeric كما في شكل (٤) ولكنها تعامل لتعطي دائرة monomeric من شريط سالب والذي يعمل كقالب للتفاف دائرة ثانية لينتج شريط موجب multimers. يؤدي القطع والتوصيل إلى إنتاج ذراري من الفيرويد.

### تناسخ الدائرة الملتفة Rolling circle Replication :

هناك إتفاق عام على أن RNAs في الفيروسات تتناسخ بواسطة ميكانيكية الدائرة الملتفة. هناك طريقتين أمكن تعريفهما في هذا المجال كما في شكل ٤ ب. في الجزء الأول من شكل (٤ب) فإن الدائرة الغازية ذات الخيط الموجب تنسخ بأنزيم RNA polymerase المعتمد على RNA ويسمى RNA dependent RNA polymerase ويتكون خيط سالب مرتبط مع بعضه (ملتف) خطوة ١. يحدث في مناطق معينة إنشطار لهذا الخيط خطوة ٢ تعطي مونومير monomer والذي عندئذ يتحلق بواسطة أنزيم اللحام في العائل RNA ligase خطوة ٣. يتكون RNA دائري سالب هذا ينسخ بواسطة أنزيم RNA polymerase خطوة ٤. RNA الموجب المستقيم الطويل ينشطر في أماكن مخصصة ويكون Monomers خطوة ٥، هذه تتحلق لتعطي الذرية الجديدة RNA دائري والذي يكون عادة الشكل السائد في الطبيعة. إن فيرويد واحد هو ASBVd وفيروسايد واحد هو vLTSV ومرافق واحد sTRSV و HDV RNA أكثر احتمالاً لأن تتبع هذا الطريق في تناسخها.

أما الميكانيكية الثانية فهي في شكل ٤ ب القسم الأيمن. وهي تشبه شكل القسم الأيسر باستثناء أن الخيط السالب الملتف في الخطوة الأولى لا يحدث فيه إنشطار ولكنه ينسخ مباشرة ليعطي خيط مستقيم موجب (خطوة ٣) والذي ينشطر ليعطي Monomers ثم تتحلق الذرية الناتجة. إن مجموعة PSTVd من الفيروسات والثلاثة أنواع الأخرى من الفيروسات تتكاثر كما في هذه الطريقة.

إن الدليل على هذه الطرق المذكورة يستند على وجود RNAs السالب الموجب المتحلق في الأنسجة المصابة ومعلومات مفصلة أخرى مثل وجود RNA ligase في

النباتات الذى يمكن أن يُحَلَّق RNAs الفيرويدى المستقيم فى المعمل. كما وان RNA polymerase (s) فى نسخ RNAs السالبة والموجبة لم يمكن تحديدها مع أن RNA polymerases الأول والثانى والثالث (I, II, III) كلها قد استخدمت فى تجارب مختلفة.

### الإِنْشِطَارُ الْمَتَخَصُّ لـ RNA أَثْنَاءِ تَنَاسُخِ الدَائِرَةِ الْمَلْتَفَةِ

#### Specific Cleavage of RNA during Rolling Circle Replication

تفاعلات الانشطار فى شكل ٤ يجب أن تكون فى مواقع متخصصة لانتاج Monomeric ونظراً لأن جميع البراهين توضح فى الفيرويدات، الفيروسايدات وجميع مرافقات RNAs الصغيرة لا يمكن أن تشفر لأى بروتينات من الحجم المطلوب لأنزيم Ribonuclease وبالتالي فإن هذا الانشطار يجب أن يتم بواسطة أنزيمات العائل أو بواسطة بعض الميكانيكات غير الأنزيمية كلاهما ذو تخصص عال فى التابع. من الواضح أنه يجب أن يكون هناك نقطة إنشطار واحدة لكل وحدة Monomeric.

إن الفيروسايدات vLTSV، vSNMN، vSCMoV، vVTMov بالإضافة إلى الفيرويد ASBVd كلها تخضع لتفاعل الانشطار الذاتى فى المعمل فى الغياب الكامل للبروتين. يكون التفاعل عبارة عن إنشطار غير مائى بسيط حيث أن الرابطة داخل النيوكليتيده تخضع لتفاعل نقل فسفرة فى وجود  $Mg^{2+}$  تهاجم بواسطة 2'-hydroxyl على الفسفور تقود إلى 3'-cyclic phosphate، 2' على النهاية 3' لواحد من أجزاء RNA المنشطرة و 5'-hydroxyl على النهاية الأخرى. يكون التفاعل أبسط ومختلف تماماً عن العملية غير الأنزيمية للانترونات من بوادئ الرايوسومال فى Protozoan Tetrahymena حيث Guanosine عامل مساعد يكون مطلوباً والنهايات المنشطرة تحتوى 5'-phosphate و 3'-hydroxyl.

يكون تفاعل الانشطار الذاتى هذا بشكل واضح هو الأساس للانشطار المتخصص المطلوب فى الطبيعة خلال تناسخ الدائرة الملتفة.

العقبة الكبرى التي تعترض هنا هي الميكانيكية التي بواسطتها جميع الفيرويدات التابعة لمجموعة PSTVd تكون قد نشأت من أطول من وحدة طول نواتج تناسخ الدائرة الملتفة. لا يبدو أنها محتوية النيوكليوتيدات المحفوظة المطلوبة لتفاعلات الانشطار الذاتي الموصوفة لغاية الآن. هناك محاولات أجريت للحصول على إنشطار ذاتي هام تخصصي في المعمل إلا أنها كانت غير ناجحة، إلا أن بعض الباحثين استطاع الحصول على انشطار تخصصي معقول لبواديء من PSTVd وإنتاج monomers دائرية عندما استعمل بواديء أطول من وحدة طول وحضنها مع مستخلصات أنوية النبات. أخذت هذه النتائج لتدل على أن عمليات الانشاء في الطبيعة لبواديء من PSTVd تتطلب عمل أنزيمات RNase التخصصية في النبات.

بالرغم من هذا الدليل المفصل، إلا أن الميكانيكية الأكثر احتمالاً في الطبيعة سوف تكون نوعاً من تفاعل الانشطار الذاتي. هناك ثلاثة أنواع من تفاعل الإنشطار الذاتي قد تم تحديدها فعلاً في ١٢ إنشطار ذاتي فقط لـ RNAs التي تم وصفها لغاية ١٩٩١. تسعة خلال تركيب رأس المطرقة وتركيب غير معروف في RNA السالب من sTRSV وتركيب آخر غير معروف لـ RNAs الموجب والسالب في HDV. يبدو من المعقول جداً أن هناك نوعاً آخر من تفاعل الانشطار الذاتي يمكن أن يحسب لمعاملة (بناء) البواديء في جميع أفراد مجموعة PSTVd.

تظهر نتيجة الأبحاث المنشورة أن كلونات cDNA المونوميرك PSTVd أو CEVd معتمدة على وجود التتابع في النهاية 5' للفيرويد المقحم والتي تتكرر بعد النهاية 3' في هذه القطعة المنفرزة. دراسات أخرى على الطفرات اقترحت بأن مواقع البناء في بواديء ال CEVd تحدث في واحد من ثلاثة مواقع في الجهة العلوية من النطاق C.

### تفاعل الإنشطار الذاتي لرأس المطرقة في ASBVd

#### Hammerhead selt - cleavage Reaction in ASBVd

لقد درس هذا الموضوع من قبل كثير من الباحثين منذ سنة ١٩٨٩ وحتى سنة ١٩٩١ وفيما يلي نذكر ملخصاً لهذا الموضوع:-

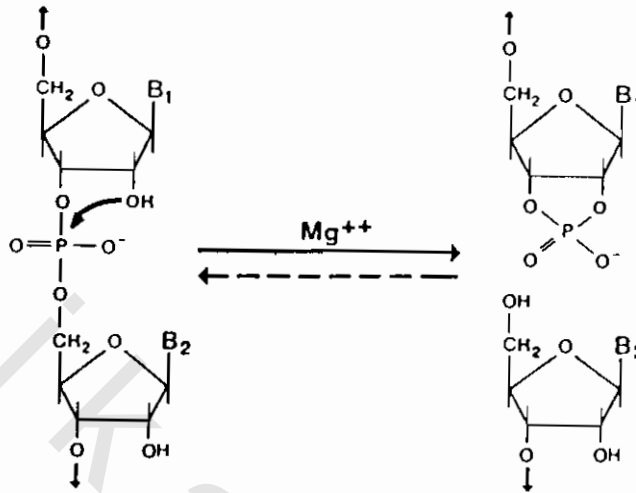


تخضّر نسخاً من RNA سالب وموجب من كلونات cDNA من ASBVd و vLTSV ذات إنشطار ذاتي بصفة تخصصية عالية أثناء النسخ وبعد العزل في الغياب الكامل للبروتين. يشمل التفاعل  $Mg^{2+}$  عامل مساعد لتفاعل نقل الفسفرة الذي يشطر ال RNA ليعطي نهايات ذات 2', 3'- cyclic phosphate و 5'- hy droxyl شكل (٥). على أساس مواقع متخصصة في الانشطار يتكشف تركيب رأس المطرقة ثنائي الأبعاد محفوظ (شكل ٦) هذا يمكن أن يضاف إلى RNAs ذاتي الانشطار من ASBVd سالب وموجب.

إن تركيب رأس المطرقة لشكل ٦ يتركب من ثلاثة سيقان زوجية القاعدة (III, II, I) حول منطقة احادية الخيط مفتوحة ذات ١٣ نيوكليتيده (شكل صندوق) والتي تكون محفوظة في تسعة RNAs ذات إنشطار ذاتي معروفة (لغاية ١٩٩١) والتي تنشطر خلال هذا التركيب. مع أن الدليل الواضح لم يحصل عليه، إلا أنه يبدو من المحتمل أن تفاعل الانشطار الذاتي الموصوف في المعمل يكون أيضاً مسؤولاً عن بناء بوادئ من ال Oligomeric في الطبيعة.

تركيب رأس المطرقة ثنائي الأبعاد كما في شكل ٦ لا يستطيع أن يشرح بوضوح لماذا يكون هناك إنشطار غير أنزيمي لـ RNA على مواقع معينة. من المعتبر أنه في وجود  $Mg^{2+}$ ، فإن تركيب رأس المطرقة يتخذ تركيب ثلاثي نشيط والذي يخفض كفاءة الطاقة التنشيطية ويختص بعمله على رابطة النيوكليتيده الداخلية من مواقع الانشطار الذاتي ليسمح بنقل الفسفرة في تفاعل الانشطار الذاتي. عند الإنشطار فإن التركيب يتراخي وبالتالي يمنع التفاعل العكسي من الحدوث مع العلم أنه من ناحية نظرية جميع التفاعل يكون منعكس.

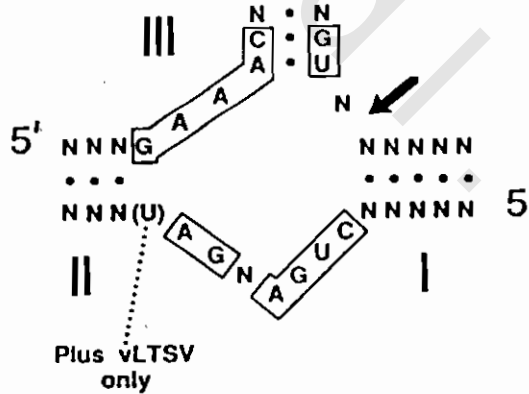
أما في حالة ASBVd فإن التتابعات الداخلة في تفاعل رأس المطرقة تزودنا بمعلومات عن الخطوة التي تعتبر مفتاحاً في دورة التناسخ، وهو أيضاً التابع الوحيد في هذه الممرضات RNAs. وبالتالي ففي حالة ASBVd فإن مواقع الانشطار الذاتي الموجب والسالب تكون ١٤ نيوكليتيده منفصلة وأن التابع في تركيبات رأس المطرقة تشمل تقريباً الثلث المركزي لجميع الجزئ.



شكل رقم ٥ :

تفاعل الانشطار الذاتي الذي يشمل تفاعل نقل الفسفرة من

5'- hydroxyl of the 3' nucleotide residue to the 2'- hydroxyl of the 5' residue.



شكل رقم ٦ :

تركيب رأس المطرقة حول منطقة الانشطار الذاتي لفيروس ضربة الشمس في الافوكادو ولأربعة فيروسات ومرافقات. هناك ١٣ نيوكليتيده محفوظة في عليه والنيوكليتيدهات غير المحفوظة يشار إليها N.

## غياب منتجات الترجمة : Absence of Translation Products

تعتبر الفيرويدات هي الكائنات الوحيدة ذات نظام التناسخ الذاتي والذي لا يعمل شفرة لتناسخه ولا وحدات صغيرة subunit لأنزيم التناسخ الخاص به. مع أنه لا يوجد برهان تجريبي نهائي يدل على أن المعلومات الوراثية للفيرويدات لا تعبر عن نفسها في بروتين صغير، هناك عدة نقاط ذات توضيح سلبي في مناقشة ذلك.

إن كفاءة الفيرويدات على التشفير يمكن أن تؤدي إلى بروتين ليس أكثر من ١٢٠ حمض أميني، فمثلاً بالنسبة للفيرويد PSTVd فإن أطول بروتين، يمكن أن ينتج من أكثر من دورتين من الترجمة، شريطة أنه في هذه الحالة أن مشطبات كودون UGA يجب أن تكبح. إن الافتقار إلى مواقع ربط الرايبوسومات وغياب التركيب القلنسوي، التابع المجاور مباشرة، ثبات التركيب الثانوي والدائرية كلها لاتناسب نشاط mRNA. أما في المعمل فإن أنظمة الترجمة لا يمكن التعرف على منتجات خاصة بها إذا كان الفيرويد PSTVd أو CEVd يمكن أن يظهر عمل مثل mRNA. إن المقارنة الدقيقة لنماذج بروتين من نبات *Gynura aurantiaca* المصابة بالفيرويد CEVd ونباتات الطماطم المصابة بالفيرويد PSTVd مع نباتات كتنترول متماثلة من نباتات سليمة أظهر بأنه لا يوجد شفرة فيرويدة مختلفة. وباختصار يمكن القول بأن تناسخ الفيرويد يعتمد على أنزيمات polymerase العائل ولا يشفر لنفسه.

## دراسة المرض الفيرويدي

### ١ - المصادر The Sources :

تمتلك بعض الفيرويدات مدى عائلي واسع بشكل واضح، وهذا يعني أن RNA الفيرويدي يمكن تحضيره ليس فقط من العائل الذي فيه اكتشف الفيرويد اصلاً، ولكن أيضاً من النباتات الأخرى والتي يمكن أن تكون أكثر ملائمة لتحضير الفيرويد. في كثير من الحالات فإن نقل الفيرويدات إلى عوائل نباتية أخرى لا يؤدي إلى ظهور أعراض معبرة عن الإصابة وبالتالي يجب أن

يستعمل طرق تشخيصية أخرى. ذكرت أنواع كثيرة من النباتات بأنها قابلة للإصابة بفيروس PSTVd معظمها يتبع العائلة الباذنجانية. كذلك فقد تبين أن فيروس تقزم قمة الطماطم TASVd يكون مشابهاً لفيروس PSTVd فى المدى العائلى. أما فيروس اكسوكورنز الحمضيات CEVd فإنه يتضاعف ليس فقط فى نباتات الحمضيات ولكن أيضاً فى نباتات العائلة المركبة مثل نبات *Gynura aurantiaca* وفى نباتات العائلة الباذنجانية. أما فيروس الاقحوان (التقزم والشحوب المتبرقش) تنتقل فقط إلى أنواع أخرى من العائلة المركبة. أما فيروس الثمرة الباهتة فى الخيار يبدو أنه منحصر أساساً فى العائلة القرعية وذكر أنه ينتقل إلى الطماطم. وكذلك فإن فيروس تقزم حشيشة الدينار يصيب العائلة الباذنجانية، القرعية، التوتية. لقد وجد أن فيروس ضربة الشمس فى الافوكادو يصيب فقط الافوكادو والقرفه وكلاهما يتبع العائلة الشفوية. إن المدى العائلى لفيروس كادانج - كادانج فى جوز الهند يختلف عن بقية الفيروسات فى أنه يصيب نخيل جوز الهند فقط وهو الفيروس الوحيد الذى يصيب نباتات احادية الفلقه.

إن نقل الإصابة الفيروسية إلى نباتات العائل تحت الإختبار يكون مهماً للدراسات الكيموحيوية وذلك لأن العوائل الاصطناعية فى بعض الحالات تنمو بسرعة أكثر تحت ظروف جوية متحكم بها، وتكون أنسجتها أكثر سهولة فى التعامل لتحضير عزلات من الفيروس. لقد ثبت بالبرهان العملى أن نباتات الطماطم أكثر ملائمة لتجارب المدى العوائلى. ولقد تبين أن PSTVd و CEVd تخضع لتغيرات بسيطة فقط بعد نقلها من نباتات الطماطم إلى نباتات *Gynura*.

وكقاعدة عامة فإن التعبير بالأعراض يحدث فى نباتات الطماطم بعد ١٠ - ١٤ يوم من الحقن عندما تنمو النباتات تحت كثافة ضوئية عالية ودرجة حرارة مرتفعة ٣٠ - ٣٥ م خلال النهار وحوالى ٢٠ م خلال الليل. هذه المدة يمكن أن تطول إلى ٢ - ٣ شهور إذا نمت النباتات تحت درجة حرارة ٢٠ م. ولقد تبين أن تناسخ الفيروس وتعبيره بالأعراض يأخذ مجراة تقريباً فى نفس الوقت وأن أفضل إنتاج من RNA الفيرويدي يحصل عليه بعد ٣ - ٦ أسابيع من الحقن.

نظراً لأن الفيروسات تصيب النبات جهازياً فمن الممكن أن تخضر بشكل رئيسي من أى جزء فى النبات. إذا نمت نباتات طماطم مصابة تحت ظروف مثلى فى الصوبا الزجاجية، فإن طريقة التنقية تضم كبريتات السيزيوم  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$ ، آلة الطرد عن المركز عالية السرعة - سائل كروماتوغرافى عال الكفاءة HPLC. استعمال هذه المواد يؤدي إلى الحصول على كمية من PSTVd كالآتى :-

كمية الفيروس	وزن الجزء النباتى
٥٠٠ ميكوگرام	$\frac{1}{4}$ كيلو غرام اوراق
٣٠٠ ميكوگرام	$\frac{1}{4}$ كيلو غرام سيقان
١٨٠ ميكوگرام	$\frac{1}{4}$ كيلو غرام جذور

تم معظم طرق التحضير اساساً من الأوراق، ولكن السيقان يمكن أن تستعمل أيضاً، إذا كان من الممكن عمل مسحوق متجانس منها كما فى حالة نباتات الطماطم.

تستطيع الفيروسات أن تنمو باستمرار فى المعلقات الخلوية، فى البروتوبلاست وفى مزارع الكالوس كما كان واضحاً فى التجارب على مزارع من الطماطم والبطاطس.

## ٢ - التشخيص Diagnosis :

يكون هناك نوعاً من الالتباس عند تمييز الاصابة الفيروسية اعتماداً على الأعراض فقط، حتى بعد نقل الإصابة الفيروسية إلى العوائل المشخصة والنظر إليها نظرة خبير متمرس فى أمراض النبات، فإن التشخيص بواسطة التعرف على الأعراض يكون غير موثوق ولا ملائم بشكل عام. كذلك فإن الفيروسات لا يمكن تعريفها بالطرق السيرولوجية وذلك بسبب عدم المقدرة على الحصول على أجسام مضادة ضد RNA الفيرويدي بالرغم من المحاولات العديدة التى أجريت بهذا الشأن.

إن التشخيص السليم يتم الحصول عليه بواسطة التعرف على الحزم الفيرويدية فى الهجرة الكهربائية فى الجيل Gel electrophoretic أو بواسطة التهجين الجزيئى . إن طرق الهجرة الكهربائية فى الجيل Gel electrophoretic تتضمن الحصول على محلول متجانس من غرام أو بضعة غرامات من النسيج النباتى، مستخلص حمض نووى. فى بعض الحالات تستبعد الأحماض النووية ذات الوزن الجزيئى العال وذلك بواسطة الترسيب فى كلوريد الليثيوم، ثم الترسيب بالايثانول للأحماض النووية الباقية. يحلل المستخلص الخام من الحمض النووى الناتج على مادة polyacrylamide slab gels. أيضاً يستعمل ٥٪ polyacrylamide gels بالنسبة للفيرويدات ذات الوزن الجزيئى لغاية ١٢٠٠٠٠ دالتون (PSTVd) أو ٢,٥ - ٣٪ للفيرويدات الكبيرة مثل كاداخج - كاداخج. عند إضافة ٨ مول يوريا يحصل على حزم ضيقة. هناك زيادة يمكن ادراكها فى الحساسية وخفض فى الزمن مطلوبة للتشخيص بالهجرة الكهربائية حصل عليها عندما كان السير فى ظروف طبيعية مشتركاً مع سير متعاقب تحت ظروف دنتره فى الهجرة الكهربائية ذات الاتجاهين. هذه الطريقة ادت إلى فصل نقى لجزيئات الفيرويد الدائرية عن جميع الأحماض النووية الخلوية. يمكن أن تستعمل مع مستخلصات خام غير مجزأة كلية. علاوة على ذلك فإن طريقة الصبغ بالفضة أدت إلى الحصول على كمية قليلة تقدر ٦٠ نانو غرام من ال RNA الفيرويدى لكل غرام من نسيج ورقة الطماطم وأعطت ٦٠٠ بيكوغرام فى حزمة مفردة، وفى أبحاث أخرى أعطت ٢ نانوغرام فيرويد لكل غرام من نسيج الطماطم و ٨٠ بيكوغرام فى حزمة مفردة. إن استعمال الهجرة ذات الاتجاهين فى العزل الكهربائى سهلت العمل فى تطبيقات روتينية لكثير من عينات الأنسجة فى وقت واحد.

إن إختبارات التشخيص للفيرويدات المبنية على تهجين DNA تكميلى ذو قوة إشعاعية عالية قد استعملت مع كثير من الفيرويدات وكانت الإختبارات تجرى بواسطة Dot - spot hybridization مع cDNA مكولون للفيرويد

cDNA أو عن طريق Liquid hybridization مع منقبات HSVd، CSVd، PSTVd وذلك بالنسبة لكل من RNA في فيروس كادانج - كادانج وفيروس ASBVd. أما هذا الفيروس الأخير ASBVd فقد أمكن تعريفه بالتهجين الذاتي self-hybridization مع RNA للفيروس نفسه المعلم بالفسفور المشع <sup>32</sup>P. إن حساسية إختبارات التهجين قد ذكرت بأنها تصل ما بين ٢٠ - ٨٠ نانوغرام فيروس لكل غرام من النسيج المصاب. ويتقدم طرق التهجين وباستعمال منقبات معلمة M13 يمكن زيادة حساسية الإختبار إلى الضعف. يعتبر إختبار الهجرة الكهربائية بالجيل أسرع حيث يحتاج إلى يوم واحد بالمقارنة مع أربعة أيام بالنسبة لطرق التهجين، إلا أن طرق التهجين تحتاج إلى عينات أكثر. تكون طريقة الهجرة الكهربائية فى الجيل حساسة لتركيب فيروس معينة (الدائرى) كما أنها لا تستطيع التفريق بين تتابعات مختلفة، بينما طريقة التهجين تعرف فقط تعاقبات معينة بغض النظر عن التركيب، وبالتالي فإن كلتا الطريقتين تكمل كل منها الأخرى فى صفاتها.

### ٣ - كلونة الجزيء Molecular Cloning :

فى الوقت الحالى فإن تتابعات الفيروس المكلون وجدت لها مجالاً كبيراً فى التطبيق فى أبحاث الفيروس مثل :-

أ :- التتابع Sequencing .

ب: التهجين لتشخيص الفيروس، الدراسات التى تجرى لمعرفة المركبات الوسيطة فى تناسخ الفيروس وانتشار الفيروس فى الخلية.

ج: حيوية cDNA المكلون والمواقع الموجهة للمطفرات.

إن جدول رقم ٤ يلخص الطور الكامل، والكلونات ذات الحجم الصغير مذكورة مع البلازميد، موقع وإتجاه الإدخال والمحفزات. بالإضافة إلى الكلونة الجزيئية لكل من TASVd، TPMVd، CPFVd.

جدول ٤ : كلونات cDNA لبعض الفيروسات.

الفيروس	البلازمو	المحفز	موقع الإدخال	الحجم والاتجاه
PSTVd	pGI 101 H	lac	Hae III 146	monomerid (+) and (-)
PSTVd	pBR 322	tet	Bam H 1 87	monomeric (+) and (-) dimeric (+) and (-)
PSTVd	pBR 322	_	Bam H 1 87	monomeric +
HSVd	pGL 101	lac UV5	Eco R 1 296	monomeric (+) and (-) dimeric (+) and (-) tetrameric (+) and (-)
CEVd	pBR 322	_	Bam H1 87	monomeric (+)
ASBVd	pBR 322	_	_	-

٤ - التنقية Purification :

تكمن تنقية الفيروس في خطوتين أساسيتين هما: -

١ - تحضير مستخلص من RNA ذو وزن جزيئي منخفض.

٢ - التنقية النهائية للمستخلص الفيرويدي RNA من هذا المستخلص.

في معظم الاجراءات فإن الحمض النووي الكلي يستخلص من مزيج النسيج المتجانس بواسطة نظام Buffer / phenol المحتوى على بديل الصوابين SDS وعلى benfonite مثبت أنزيم RNase. تفصل عديدات التسكر وال DNA من ال RNA بواسطة استعمال نظامى الاستخلاص والترسيب بمادة Cetyl trimethyl ammonium bromide. عندئذ يستبعد RNA ذو الوزن الجزيئى العال عن طريق الترسيب باستعمال ٢ مول من كلوريد الليثيوم. بعد ذلك يمكن الحصول على



المحتويات الخصبية من الفيروسيد في مستخلص RNA ذو الوزن الجزيئى المنخفض بعدة خطوات من العملية التى تسمى كروماتوغرامى. هناك طرق حديثة مشابهة لما سبق تستعمل فى تحضير مستخلص خام من فيروسيدات HSVd، TPMVd، TASVd.

فى بعض الطرق المختلفة فإن مستخلص RNA ذو الوزن الجزيئى المنخفض كان يحصل عليه بعد استعمال كبريتات السيزيوم الكثيفة فى آلة الطرد عن المركز، هذا يعنى أن عديدات التسكر، ال DNA، RNA ذوات الوزن الجزيئى العال ومكونات أخرى فى النسيج يمكن استبعادها بخطوة واحدة. إن استعمال طريقتى الترسيب باستعمال ٢ مول من كلوريد الليثيوم والترسيب المتعاقب للمواد الطافية باستعمال ٥,٠ حجم من الايثانول يعطى مستخلص RNA خال من أى من ال DNA وال RNA ذوات الوزن الجزيئى المرتفع مع بقاء قليل من tRNA. إن ترسيب RNA من محلول عال الملوحة باستعمال تركيز منخفض من الايثانول يمكن أيضاً إستعماله للاستعادة السريعة للحمض RNA ذو الوزن الجزيئى المنخفض من كبريتات السيزيوم المنحدرة إذا ما ضبطت الأجزاء المتماثلة على كثافة نهائية ١,١٨ غم / سم<sup>٣</sup>.

أما الخطوة الثانية فإن الفيروسيدات تنقى من مستخلص RNA الخام إلى الحالة المتجانسة ثم تستعمل طريقة Polyacrylamide gel electrophoresis. ويفضل استعمال هذه الطريقة ذات الاتجاهين (سذكر ذلك بالتفصيل إن شاء الله فى الفصل الثالث). أو يمكن استعمال هذه الطريقة باستعمال الجريان مرتين، المرة الأولى تحت الوضع الطبيعى أما الثانية فتكون تحت ظروف الدنترة. إن المأخذ على هذه الطريقة Preparative gel electrophoresis هو الكمية القليلة المتحصل عليها من الفيروسيد وطول الوقت، يمكن التقليل من هذه العيوب باستعمال عامل التبادل الأيونى وهو الراتنج للاستعمال فى سائل الكروماتوغرافى ذو الكفاءة العالية. لقد أمكن الحصول على ٢٠٠ ميكروغرام RNA للفيروسيد PSTVd متجانس من مستخلص خام للحمض RNA (محضر بواسطة كبريتات السيزيوم فى آلة الطرد عن المركز) من جريان مرة واحدة فى الكروماتوغرافى. كانت نسبة الانتاج والتنقية تزيد عن ٩٥٪.

## ميكانيكية نشوء المرض (المرضية)

### Mechanism of Pathogenesis

هناك تساؤلاً يطرح نفسه على الباحث وهو ما هي الميكانيكية التي بها تحدث الفيروسات أمراضاً في عوائل معينة، علاوة على ذلك فإنها تتضاعف (تتناسخ) في أنواع نباتية أخرى بدون إحداث أضراراً مميزة؟؟.

للإجابة على هذا السؤال هناك ثلاثة تفسيرات قد تكون موضحة لهذا التساؤل وإلا فإن الأبحاث المستقبلية سوف توضح ذلك. هذه التفسيرات هي:-

١ - إن وجود الفيروس في نواة العائل وعدم مقدرته الظاهرة ليعمل عمل mRNA يؤدي إلى القول بأن أعراض المرض المتسببة عنه قد تكون ناتجة عن التداخل أو التفاعل المباشر للفيروس مع جينوم Genome العائل، هذا يعني عن طريق تداخله في التنظيم الجيني في الخلايا المصابة.

٢ - إذا كان التفسير السابق حادناً بالفعل، فإن الفيروسات يجب أن تعتبر بأنها جزيئات تقوم بإحداث خلل في التنظيم الطبيعي في الخلية أو تقوم بتنظيم غير طبيعي في الخلية. وإذا كانت الفيروسات نشأت فعلاً من إنترونات، فإن تأثيراتها الضارة على وظائف خلية العائل قد تكون نتيجة التداخل في عمليات نضج mRNA.

٣ - هناك إقتراحاً ثالثاً لنشوء المرضية بالفيروس، هذا الإقتراح يفترض بأن الفيروس يقوم بتجنيد RNA polymerase II للحمض DNA التابع للنوى بواسطة جزيئات الفيروس المعدى وذلك لاستكمال أو إنجاز تناسخه (الانانية في التناسخ)، ويشبط أو يكبح بناء mRNA's جينومي في خلية العائل وبالتالي يعوق أو يفسد عمليات التمييز أو التخليق في الخلية.

يجب أن نؤكد على أن جميع هذه التفسيرات هي عبارة عن إقتراحات إلى حد بعيد ولكي يكون أى من هذه التفسيرات الثلاثة المذكورة سابقاً معقولاً يجب أن لا ينظر إلى نتيجة الإصابة الفيروية الملاحظة وهي الأعراض، ولكن أيضاً يجب النظر إلى الحقيقة المذكورة سابقاً وهي أنه في بعض الأنواع النباتية فإن الفيروسات تتناسخ بشكل كاف دون أحداث ضرر واضح مميز على العائل، وفيما يلي بعض المعلومات قد تلقى بعض الأضواء على هذا الموضوع.

## ١ - علاقة المرض مع البروتينات والمركبات الأخرى:

كما ذكر سابقاً فإنه لم يوجد فيروس يعمل شفرة لبناء البروتين. وعلى أية حال فإنه في نسيج مصاب بالفيروس CEVd من نبات *Gynura aurantiaca*، طماطم والبطاطس، فإن هناك نوعان من البروتينات ذات أوزان جزيئية تتراوح ما بين ١٢ - ١٨ ألف دالتون، تتراكم في النسيج. وفي نسيج نبات الطماطم المصاب بالفيروس PSTVd وجد بروتين ذو وزن جزيئي ١٤ ألف دالتون، وهذا كان وجوده بتركيز أعلى في النباتات المصابة عنه في النباتات السليمة، إلا أن هذه البروتينات ليست متخصصة بالإصابات الفيروية، ولكنها تظهر أيضاً بعد الإصابة الفيروسية وفي النباتات الطبيعية التي وصلت طور الشيخوخة. قد ينظر إلى هذه البروتينات على أنها إستجابة فيسيومرضية Pathophysiological للنبات العائل. كذلك ذكر حدوث بعض التغيرات بعد حدوث الإصابة بالفيروس، في التركيز الكلي للأحماض DNA ، RNA ، والبروتينات وفي المحتوى والتركيز للعناصر المعدنية وفي تركيز حمض الكلورجنك. هذا يدعم التفسير الأول الذي ذكر سابقاً.

## ٢ - تماثل التتابع مع الأحماض النووية RNAs الصغيرة:

عند إجراء دراسات حول الفيروسات والأحماض النووية الصغيرة RNAs (U1 - U6) في الكائنات الحية الدقيقة مميزة النواة، أمكن التعرف على بعض التماثل في تتابع النيوكليوتيدات هذا التتابع كان واضحاً بشكل جيد.

إن الأكثر وضوحاً في هذا المجال هو تماثل التتابع بين النهاية<sup>5</sup> في U1 RNA والمنطقة الأكثر حفظاً في الخيط السفلى في التركيب الثانوي (سيذكر ذلك بالتفصيل إن شاء الله في الفصل الثالث) في الفيرويدات من مجموعة PSTVd. وبالاعتماد على الأبحاث اللاحقة فإن U1 RNA يتدخل في عملية التراكب splicing (سبق ذكرها) والتي فيها تقطع الانترونات من الحمض النووي RNA غير المتجانس ويتكون mRNA المطلوب. في هذه الأشكال فإن النهاية<sup>5</sup> من U1 RNA تشكل أزواج قواعد بنهائيتين من الانترون. ويعتقد أن الفيرويد يمكن أن يحل محل U1 RNA ويتدخل في عملية التراكب، وأيضاً يعتقد أن خيط الفيرويد السالب يتفاعل مع ويوقف عمل U1 RNA. إن تكوين دبابيس الشعر (في تركيب الفيرويد) يمكن أن تكون ناتجة عن مثل هذا التفاعل أو أن دبابيس الشعر الثابتة يمكن أن تناسب هذا التفاعل. وفي أشكال مختلفة من PSTVd يمكن أن يحدث تفاعل بواسطة منطقتين غير متجاورتين مع مواقع التراكب في mRNA للعائل. هناك مناطق مشابهة ولكن غير متماثلة تماماً وتكون أيضاً موجودة في العزلات المعتدلة من الفيرويدات PSTVd و CSVd. إن الأعراض غير الشديدة في الاقحوان والتي تظهر بعد الإصابة بثلاثة فيرويدات تكون في حالة توازي مع التفاعل المتوقع للفيرويدات مع مواقع التراكب على الأحماض mRNAs.

وعلى أية حال فإن تواجد الفيرويدات الناضجة في النوية ووجود U1 RNA في أجزاء الرايونيوكليوبروتين تبطل الشكل المذكور سابقاً في نشوء المرض. فقط فإن الحمض النووي الصغير-RNA U<sub>3</sub>B المعروف بأنه موجود في النوية. وكذلك وجد أن تتابع متماثل بين PSTVd و snRNA U<sub>3</sub>B من خلايا No-vik off hepatoma قد وجد فعلاً في النوية. لم يمكن التوصل إلى أشكال (من هذه المذكورة) تساهم في نشوء المرضية تشبه هذا التماثل.

### ٣ - إختلاف التتابع Sequence Variation :

إن تتابع النيوكليوتيدات فى سلالات الفيرويد ذات الاختلافات فى تعبيراتها بالأعراض المرضية قد حددت لكل من PSTVd، CEVd. أما فى هذا الأخير فإن الأعراض الناتجة عن عزلات مختلفة لا يمكن تقسيمها من المعتدلة إلى البقع الميتة ولا يمكن أن تفسر فى اصطلاحات محددة تماماً متضمنة مناطق الشدة على الفيرويد. يمكن أن تصنف الأعراض بسهولة من المعتدلة إلى أعراض البقع الميتة وإن الاختلافات فى التتابع يكون محدوداً على الجزء الكبير من التركيب الثانوى المتكون بواسطة النيوكليوتيدات ٤٠ - ٥٥، ٣٠٥ - ٣٢٠ وإلى مقدار بسيط حول النيوكليوتيدات ١١٥ - ١٢٥. إن العالم Sanger وتلاميذه قد إقتنعا بأن الاختلاف الكبير يؤثر فى الشدة وذلك عن طريق تغيير الثبات الثيرموديناميكى لتلك المنطقة، وأن الاختلاف القليل يعدل بحيث يحدت توازناً مع العدد الكلى من النيوكليوتيدات والتي هى ٣٥٩ لجميع السلالات. تقع المنطقة ذات الإختلاف البسيط المرنة من ال Oligopurine. ولقد تبين أن هذه المنطقة هى واحدة من المناطق ذات الثبات الثيرموديناميكى المنخفض جداً والذي يمكن أن يخضع إلى عملية التفكك المسبقة. إن تقدير الثبات الحرارى لهذه المناطق المتفككة مسبقاً ينتج العلاقة التى تقلل الثبات، هذا يعنى كلما كان هناك زيادة فى إظهار التفكك المسبق يكون هناك زيادة فى الشدة يتبع ذلك.

### ٤ - cDNA المكون للفيرويد المعدى Infectious Viroid cDNA Clones :

لقد ذكر العالم Owens سنة ١٩٨١ أن DNA للبلازميد المحتوى cDNA dimers للفيرويد PSTVd كانت معدية. عندما ينسخ RNA من هذه البلازميدات وعندما يحتوى التتابع لـ PSTVd تكون أيضاً معدية. إن التتابع فى ذرية الفيرويد و DNA المكون كانت متماثلة. أما عن الحيوية فلم يمكن إظهارها بالبلازميدات المحتوية monomers للحمض cDNA للفيرويد PSTVd. لقد تمكن Ohno et al

سنة ١٩٨٣ فى المعمل من بناء جزيئات RNA معدية من cDNA مكلون للفيروس HSVd. لقد ذكر Meshi et al سنة ١٩٨٤ حتى الخيوط المزدوجة من cDNAs تحتوى من ١ - ٣ وحدات من تتابع الفيروس HSVd بدون محفزات promoters كانت معدية. كانت حيوية تتابع الوحدة الواحدة منخفضة، لكنها وجدت فى cDNA الذى أخذ من قطع فى دائرة الفيروس فى مواقع مختلفة. كما أن الباحثين قد توقعوا أن وحدة الطول الواحدة cDNA من يمكن أن تلتحم مع Dimers فى النباتات المصابة قبل أن يبنى RNA معدى.

لقد أكد جميع الباحثين الذين يعملون على cDNA المكلون الفيروى المعدى على أن تتابع الفيروس يمكن أن يحدث فيه تغير بواسطة مطفرات تعمل مباشرة على المواقع المخصصة لذلك، وهذا يمكن أن يستعمل كأداة مؤكدة لدراسة ميكانيكية نشوء المرضية وتناسخ الفيروس.

ونستطيع أن نختم هذا الموضوع بالفقرة التى ذكرها العالم Symons فى مقاله المنشور فى مجلة Virology عدد واحد صفحة ٨٠ لسنة ١٩٩٠ حيث قال:

بالرغم من معرفتنا الكبيرة عن تتابع الفيروسات وتركيبها وتفهمنا الزائد لتناسخها، إلا أننا بشكل أساسى لا نمتلك الادراك الحقيقى لكيفية حدوث الأعراض من قبل الفيروسات. ونظراً لأن الفيروسات لا يبدو بأنها تشفر لأى بروتين أو عديد بيتايد، فمن المحتمل أنها تمارس تأثيرها خلال تتابعها والتركيب الثانوى والثلاثى Tertiary structure، حيث أن هذه الصفة وهذا التركيب تتداخل بشكل خاص مع واحد أو أكثر من مكونات الخلية. إن كفاءة الفيروسات لتتداخل مع بعض الأحماض النووية RNAs فى الخلية له أهمية ونتائج كبيرة.

ومن ناحية أخرى فإن أهمية تداخل الفيروسات وطرق هذا التداخل مشروحة باسهاب كبير من قبل العالم Sanger فى بحثه سنة ١٩٨٨.

## مقارنة بين الفيروسات وبعض الكائنات الأخرى

## ١ - مقارنة بين الفيروسات والفيروسات :-

كما سبق وذكرنا فإن الفيروسات هي كائنات صغيرة ذات وزن جزيئي منخفض من الحمض النووي RNA والتي تستطيع أن تهاجم خلايا النبات وتكاثر أنفسها اعتماداً على نفسها وتسبب أمراضاً للنبات. تختلف الفيروسات عن الفيروسات في بعض الصفات هي :-

أ - حجم الحمض النووي RNA. إن حجم هذا الحمض في الفيروسات له وزن جزيئي صغير يتراوح ما بين (١١٠٠٠٠ - ١٣٠٠٠٠) دالتون. أما في الفيروسات فيكون وزنه الجزيئي من مليون إلى عشرة ملايين دالتون.

ب - الصفة الثانية وهي حقيقة أن الحمض النووي RNA الفيروسي أو أَل DNA يكون مغلفاً بغطاء بروتيني، بينما الفيروسات لا يوجد عليها غطاء بروتيني، وتوجد بوضوح بدون غطاء بروتيني يعني أنها حمض نووي حر ليس عليه غطاء.

ج - تتابع النيوكليوتيدات ووجود النطاقات في الفيروسات تختلف عنه في الفيروسات.

د - الفيروسات تستطيع أن تشفر للبروتين أما الفيروسات فلا تستطيع.

هـ - تتناسخ الفيروسات ويزداد عددها بطرق مختلفة عن التي تتبعها الفيروسات.

و - تظهر أعراض الأمراض الفيروسية بعد فترة حضانة تقل كثيراً عن التي تحتاجها الأمراض الفيرويدية حيث أن بعض الأمراض الفيرويدية تحتاج إلى سنتين بعد الحقن لتظهر الأعراض على العائل.

ز - الفيروسات تهاجم النباتات الراقية والحيوانات والفطريات والبكتريا أما الفيروسيدات لم يعرف حتى الآن أنها تهاجم غير النباتات الراقية.

وإن جدول رقم ٥ يبين بعض الفروق بين الفيروسات والفيروسيدات والكائنات الدقيقة.

جدول رقم ٥: بعض الفروق بين مسببات مرضية

الفيروسيدات	الفيروسات	الكائنات الحية الدقيقة	الصفة
لا يحدث نمو	لا يحدث نمو	يحدث فيها نمو	النمو
لا تنقسم	لا تنقسم	تنقسم	الانقسام
مطلقة التطفل	مطلقة التطفل	غير مطلقة التطفل	التطفل المطلق
RNA	DNA أو RNA	DNA و RNA	نوع الحمض النووي
$١٠ \times (١,٣ - ١,١)$	$٣ \times (١٠ - ١١٠)$	أكبر من $٣ \times ١٠$	الوزن الجزيئي للحمض النووي
غير مغلف	مغلف مع بعض الاستثناء	غير قابل للاستعمال	التغليف
لا تشفر	تشفر	تشفر	تشفير للبروتين

## ٢ - مقارنة بين الفيروسيدات والفيروسسايدات:

### Comperison of Viroids and Virusoids

تعتبر الفيروسسايدات Virusoids من مرافقات RNAs النباتية. حيث أن هذه المرافقات تقسم إلى مجموعتين:

المجموعة الأولى: مجموعة مغلفة توجد بشكل دائري مثل الفيرويد ويوجد ضمن هذا الغلاف فيروس مساعد. ويوجد من هذه المجموعة أربعة أفراد معروفة وتسمى Virusoids (يعنى فيها RNA شبيه بالفيرويد Viroid-like RNAs) واعطيت هذا الاسم لتمييزها عن المجموعة الأخرى.



المجموعة الثانية: مجموعة مغلقة وتوجد بشكل مستقيم وتسمى مرافقات RNAs أو Satellite RNAs ويعرف من هذه المجموعة واحد فقط ويسمى sTRSV وقد درس جيداً.

جميع أفراد هذه المرافقات تتكاثر بميكانيكية الدائرة المفتوحة. في حالة sTRSV الأشكال الدائرية تكون موجودة في النباتات المصابة ولكن فقط الشكل المستقيم هو الذى يختار ويكون مغلفاً مع جزيئات الفيروس.

إن مرافق RNA الحيوانى الوحيد والذى يشارك صفات الإنشطار الذاتى فى المعمل والمفترض تناسخه بالدائرة المفتوحة والانشطار الذاتى فى الطبيعة مثل المرافقات النباتية هو فيروس دلتا الكبد hepatitis ويسمى Hepatitis delta virus (HDV) RNA. وإن هذا ال RNA الدائرى يتكون من 1700 نيوكليتيده وحجمه خمسة أضعاف RNA فى النبات ويكون مغلفاً على شكل أجزاء فيروسية منفصلة عن RNA الفيروسي.

ويبين جدول رقم ٦ مرافقات RNAs التى تخضع للانشطار الذاتى.

جدول رقم ٦ : مرافقات RNAs التى تخضع للانشطار الذاتى

طول النيوكليوتيدات	الاسم باختصار	الفيروس المساعد	
324	vLTSV	أ- فيروس التخطيط المنقول فى البرسيم الحجازى Lucerne transiend strak virus	النبات ١ - RNAs شبيه بالفيرويد مغلقة Virusoide
377	vSNMV	ب- فيروس التبرقش العقدى فى البطاطس Solanum nodiflorum mottle virus	
332 & 388	vScMov	ج- فيروس تبرقش البرسيم الأرضى Subterranean clover mottle virus	
365 - 360	vVTMoV	د- فيروس التبرقش القطيفى فى الدخان Velvet tobacco mottle virus	
359	STRSV - sTobTSV	فيروس البقعة الحلقية فى الدخان Tobacco ringspot virus	٢ - RNA مستقيم مغلف
1,700	HDV RNA	Hepatitis B virus	٣ - الحيوان RNA دائرى مغلف لفيروس دلتا الكبد

إن الصفات الخاصة للفيروسات يمكن ملاحظتها جيداً عند إجراء مقارنة مع جزيئات RNA الشبيهة بالفيروسات مثل الفيروسسايدات virusoids، الأحماض النووية RNAs الدائرية ذات الحجم المشابه المحتوى المماثل من GC ولكن بشكل عشوائي مثل المتتابع المخلوق بالكومبيوتر. إن تتابع النيوكليوتيدات والتركييب الثانوى لاثنين من الفيروسسايدات تختلف عن فيروسايد vTMOV فيرس التبقيع المخملى (القيطفى) فى الدخان، وفيرس تبقيع نبات *Solanum nodiflorum* (SNMV). إن درجة تزواج القواعد يكون ٥٦٪ فى vTMOV و ٥٧٪ فى SNMV وقيمة متوسطة من ٥٧٪ حسبت من أقرب ما يمكن من الترييب الثانوى لخمسة تتابعات مختلفة عشوائية. هذا ويظهر أن درجة تزواج القواعد فى بعض الفيروسات ٦٤٪ فى CCCVd ليست أعلى بكثير من الفيروسسايدات أو التتابعات العشوائية. إن غياب التشعبات صفة مميزة والتي هى من مميزات الفيروسات. كذلك فإن هناك صفة مميزة أخرى هى الثبات التيرموديناميك، وهى إما أن توضح بواسطة  $\Delta G/N$  أو بواسطة قيمة  $T_m$ . إن التعاون الممثل بواسطة  $\Delta T_{1/2}$  يكون فقط عال فى التراكيب المقطعية للفيروسات. وأن تكوين دبوس الشعر الثابت خلال تكون ترييب مقطعى مترافق يحدث فقط فى الفيروسات.

### ماذا عن الفيروسات الحيوانية

#### Question of Animal Viroids

مع أن الفيروسات قد عرفت تماماً بأنها تصيب النباتات الراقية، إلا أن هناك عوامل مشابهة قد توجد فى أشكال الحياة الأخرى. يبدو من المعقول البحث عن الفيروسات فى كثير من الحالات التى فيها مسببات الأمراض يفترض أنها فيروسية ولكن العامل المسبب لم يتأكد تعريفه. وبكلمة أدق يمكن البحث عن الفيروسات فى الأمراض التى يشك فى أنها تتسبب عن فيروسات.

هناك أمراضاً كثيرة تصيب الإنسان والحيوان وتعزى إلى فيروسات ولكن العامل

المسبب الحقيقي مشكوك فيه، من هذه الأمراض، المرض شبه الحاد من التهاب الدماغ وبعض أمراض التهابات المفصالية، ومرض سكرابيا Scrapie فى الحيوانات، يشك فى أنها تتسبب عن فيروسات.

على أساس مقارنة الصفات المعروفة عن فيروس PSTVd وصفات العامل المسبب لمرض سكرابيا تبين من ناحية نظرية أنه يتسبب عن فيروس، لكن من ناحية عملية لم يثبت بشكل قاطع أنه يتسبب عن فيروس.

إن المحاولات التى بذلت لعزل الحمض النووى المعدى من عينات الدماغ التى أخذت من الحيوانات المصابة بالمرض باءت بالفشل. كذلك فإن الادعاءات التى تقول إن هناك DNA منخفض الوزن الجزيئى مكون أساسى وضرورى لظهور أعراض مرض سكرابيا لم تتأكد. ومن ناحية أخرى فإن هناك أدلة مقنعة على أن وجود hydrophobic protein فى العامل المسبب للمرض يكون أساسياً للتعبير عن حيوية العامل الممرض. إلا أن نفس الباحثين لم يكونوا قادرين على إثبات المتطلبات الضرورية من الحمض النووى لإحداث المرض.

لقد ذكر كثير من الباحثين أن مرض سكرابيا هو محل خلاف كبير. إن مسبب المرض شديد العدوى، ثابت ظاهرياً، غير صعب فى تنقيته ويبدو أنه مقاوم للإجراءات العادية لتنقية العوامل المعدية. ولقد ذكر أن هناك أدلة وافرة لثبات سلالاته الوراثية مع المتطلبات التالية من جينوم حمض نووى. وعلى أية حال فإن المحاولات للتأكد المطلق من وجود أو عدم وجود الحمض النووى فى المادة المنقاه جيداً لحد الآن لم يكتب لها النجاح.

عند مقارنة العامل المسبب لمرض سكرابيا مع الفيروسات من حيث صغر الحجم والمقدرة على إحداث أعراض واضحة فى العوائل القابلة للإصابة، والوقت الطويل الذى يحتاجه بالمقارنة مع الفيروسات، أصبح هناك احتمالاً من أن يكون عامل المرض يحتوى على جينوم شبيه بالفيروس.

إن الصعوبة في اكتشاف حمض نووي في تخضيرات سكريا المختلفة النقية يمكن أن يكون راجعاً إلى الوزن الجزيئي المنخفض جداً لجينوم سكريا. وإذا كان هذا المسبب المرضي يتكون من جزئ دائري ٥٠ نيوكليتيده، فإن تناسخ الدائرة الملتفة لهذا ال RNA سوف يولد جزيئات concatameric والتي يمكن أن تكون الشكل الوظيفي للمادة الوراثية. زيادة على ذلك فإن الانشطار الذاتي الجزيئي لهذه ال concatamers يمكن أن تولد جزيئات أصغر بأطوال مختلفة كل منها ينجز وظيفة مختلفة إلى حد ما بسبب اختلاف الطول.

بعد كل هذا من الممكن أن نتخيل جزئ RNA دائري صغير جداً يبدو قادراً على إحداث تأثيرات Phenotypic معنوية كتتابعات لتكاثر concatameric RNAs مختلفة، مثل هذه ال RNAs يمكن أن تتداخل مع العمليات الطبيعية الخلوية بطرق مشابهة لتلك التي تقوم بها الفيروسات. إن جميع المعلومات المتوفرة عن مسبب مرض سكريا تسمح بأن يكون من ناحية نظرية فيرويد، ولكن هذا التأكيد يحتاج إلى أبحاث طويلة حيث أن العمل على هذا المسبب قد بدأ في سنة ١٩٧٤ ولغاية ١٩٩٢ لم يتأكد الموضوع.

**فرضية Diener: هل الفيروسات مستحاثات (بقايا) جزئ من عالم RNA**

### Are Viroids Molecular Fossils of the RNA World

لقد تقدم العالم Diener سنة ١٩٨٩ بفرضية يقول فيها إن الفيروسات عبارة عن مستحاثات أو بقايا جزئ من عالم RNA. وإن هذه الفرضية لاقت معارضة كثيرة من قبل كثير من الباحثين، إلا أن هناك من وافق عليها وقدم الأدلة والبراهين على صحتها. وفيما يلي نعرض التقرير الذي تقدم به J.C.Flores سنة ١٩٩٤ وفيه يؤكد صحة فرضية Diener ويدعمها بالبراهين والاثباتات.

## تقرير العالم J.C.Flores :

نحن نناقش اعتراضاً قد ارتفع ضد فرضية العالم Diener والذي يقول فيها أنه يمكن تفسير ظهور الفيروسات على أنها جزئى مستحات من عالم RNA. نحن سلكننا طريقاً سليماً لازالة مثل هذا الاعتراض ونكون بذلك قد عضدنا وساندنا فرضية Diener. وعلى أية حال فإن استنتاجاتنا تستلزم زيادة فى العمل من قبل علماء أمراض النبات فى هذا الموضوع. يبدو أن هذه الفرضية لها أهمية من ناحية بيولوجية ومن ناحية تطورية.

مقدمة :-

## ١ - عالم RNA :

هناك بعض الافتراضات التى وضعها كثير من العلماء حول عالم RNA وكانت هذه الافتراضات ناجحة فى كثير من الحالات وقد قمنا بتلخيص هذه الافتراضات وهى كالآتى :-

أ- ازدواجية الفيوتايب والجينوتايب لـ RNA :

إن هذه الجزيئات الكبيرة جداً من RNA تعتبر بأنها تقوم بالعملين فى تجارب تطور الخلية الحرة. إن تتابع النيوكليتيده فى القواعد يكون الـ Genotype، بينما التركيب الفراغى أو الحيزى لجزئى الـ RNA هو الـ Phenotype، ويمكن الاستفادة من الشرح الذى ذكر عن التركيب الثالثى Tertiary المعروف جيداً لـ tRNA مع الانتيكودونات Anticodons.

ب - التطور لأنواع ظاهرية إلى حد ما جديدة على طول أنابيب الجيل يزودنا بأمثلة من الحيز الاختيارى Spatial selection فى أعمال كثير من العلماء.

ج - إن التراكب الذاتى Self - Splicing فى Protozoan genomes يمكن أن يفسر كأنه بقايا من عالم الـ RNA، ومن الضرورى أن نذكر فى هذا

المجال أنه عند تتبع سلسلة مراحل التطور، هذا يؤدي إلى التعرف على أصل الحياة وإن عالم RNA إعتياداً على هذه المعلومات يظهر أنه قد تطور متأخراً. يمكن القياس على أعمال العالم De Duve سنة ١٩٩١ عندما بحث في عالم Thioester وعالم ال Pyrophosphate. وعلى أية حال إذا تركنا المراحل الأولى من عالم ما قبل النيوكليتيدي إلى عالم النيوكليتيدي، فمن الممكن أن نلمح إشارات مفيدة لا يزال يستدل بها على مستحاثات الجزئ موجودة في الخلايا المعاصرة.

٢ - إن ال RNAs الممرضة للنبات يمكن أن تكون بقايا من التطور ما قبل الخلوي:

في هذا المجال يمكن أن نقوم بتلخيص إقتراحات العالم Diener والتي يقول فيها إن ال RNAs الممرضة للنبات تتصف بأنها دائرية صغيرة يمكن أن تكون بقايا من التطور ما قبل الخلوي. ونؤكد هذا الكلام بقولنا إن الفيروسات قد درست جيداً خاصة تلك التي لها أهمية في الزراعة منذ ظهور تأثيرها الأول على العائلة الباذنجانية خاصة *Solanum tuberosum* (البطاطس)، فمثلاً إن أول فيروس عرف هو فيروس الدرنة المغزلية في البطاطس PSTVd وفيه ٣٥٩ نيوكليتيدي (Diener 1971). وإن أول تتابع للنيوكليتيديات الكاملة في الفيروس قد حدد أيضاً في PSTVd سنة ١٩٧٨ من قبل العالم Gross.

من هذا يتبين أن هناك ثقة واسعة لصالح تفسير الفيروسات كجزئ مستحاث. بعد ذلك ظهر هناك آراء معارضة كثيرة تفند هذه الفرضية وتطلب توضيحاً على استفساراتها. وقبل أن نذكر الآراء المعارضة فإننا نقوم بتوضيح بعض النقاط التي تدعم البراهين التي تؤيد بأن الفيروسات هي بقايا من عالم RNA هذه النقاط هي :-

أ - طول الفيروسات القصير ٢٤٦ - ٣٧٥ نيوكليتيدي.

ب - بعض الفيروسات يحدث فيها ظاهرة الانشطار الذاتي الذى فيه تحدث ظاهرة مثيرة للاهتمام. إن أنزيمات العائل RNase لا تتدخل. فعلاً فإن عملية الانشطار الذاتي تحدث فى الغياب الكامل للبروتينات. ومن ناحية أخرى ففي حالة الفيروسات غير ذاتية الانشطار، فإن بعض العوامل أو الوسطاء تتدخل فى ذلك. من الممكن أن يكون RNase تزود به الفيروسات من قبل خلايا العائل.

ج - إن البناء الداخلى للفيروسات يعطيها ميكانيكية دفاعية، نظراً لأنها تتكون من دوائر أحادية الخيط مع وجود ازواج قواعد عديدة تسمح لهذا ال RNA ليشكل حلزون ثنائي كامل بأبعاد تجعل الفيروس مقاوم للأشعة UV.

د - إن تتابع النيوكليوتيدات فى الفيروسات يبرز قليلاً من النشاط لـ RNA أو لا يظهر أى شئ من هذا النشاط فى الفيروس PSTVd، فمثلاً هناك stop codons متكررة فى كل القراءات للطار العام للفيروس.

### الآراء المعارضة لنظرية Diener والرد عليها

#### ١ - التناقض الظاهرى لهذه الفرضية :

هناك تناقض ظاهرى ينشأ من الفرضية التى تقول بأن الفيروس قد يكون جزئ مستحاث من عالم RNA. إن الفيروسات فى إحداثها المرض متخصصة مع نباتات مغطاة البذور فقط. إن هذه النباتات قد ظهرت فوق سطح الأرض فى العصر الطباشيرى فمن المفترض حسب رأى Diener أن الفيروسات يجب أن تكون ظهرت مع مغطاة البذور منذ تلك الفترة، ولكن هذا لا يؤيده الواقع.

إن أقدم مستحاثات لمغطاة البذور يؤرخ من نهاية العصر الجيولوجى المتوسط ١٠٠ - ١٤٠ مليون سنة قبل ظهور الأوراق الحالية وحبوب اللقاح الحالية. كذلك فإن

التقارير التي تتكلم عن أجزاء التكاثر في مغطاة البذور تؤرخ من العصر الطباشيري المتأخر وهي في فترة Turonian، كذلك فإن الترسبات القديمة للنباتات المتحجرة كانت قبل العصر الطباشيري وبعده بمدة طويلة جداً أنتجت تركيبات تكاثرية. وبالتالي فإن عالم ال RNA قد ظهر أولاً على الأقل في الدهور السحيقة إذا لم يكن قبل ذلك. اعتماداً على هذا الكلام فمن المفروض أن الفيرويدات بقايا من الدهور السحيقة (3.3 - 3.9 Gybp)، إلا أن الأقرب للصحة أنها متخصصة للحياة في فترة العصر الطباشيري وخاصة على مغطاة البذور.

للرد على هذه المعارضة يجب أن نطرح السؤال التالي.

أين كانت هذه الأجزاء المحفوظة على حياتها منذ الدهر السحيق قبل أن تصبح متخصصة على النباتات في العصر الجيولوجي المتوسط نسبياً؟.

مع أن طرق إحداث المرضية من قبل الفيرويدات ليست واضحة تماماً، إلا أن إحدى هذه الطرق الممكنة وقد اعتمدها كثير من الباحثين وهي إحداث تغير في مستويات البروتين في خلية العائل قد يكون مسئولاً عن إحداث الأعراض عند الإصابة، أو يمكن أن يحدث تحورات في البروتين بعد نسخه في خلية العائل، فمثلاً، بواسطة عملية Phosphorylation. إن الاحتمالين المذكورين سابقاً، إلى حد ما، قد يكونا من خصائص البكتيريا الزرقاء كطور من مراحل الحياة الحرة لبدايات النواة، إلا أن هذا لم يتأكد حتى الآن، ولكن الذي تأكد هو أن الفيرويدات متخصصة في خلايا النبات الذي فيه الكلوروبلاست عبارة عن عضيات organelles نشأت من البكتيريا الزرقاء عن طريق التكافل. نحن نتذكر هذا الافتراض ونعتمد عليه بالاعتماد على نظرية التكافل الداخلي المتسلسل Serial endosymbiosis theory، بأن بعض الكلوروبلاست نشأت خلال مرافقة ال polyphyletic بين البكتيريا الزرقاء المختلفة أسلاف خلايا مميزة النواة.



## ٢ - البحث عن البكتيريا الزرقاء المميزة:

في هذا الموضوع، بين الاختيارات المختلفة المتوفرة في البحث عن البكتيريا الزرقاء المميزة يجب أن نذكر أن صفة الفيرويدات ذات التضاعف الموجب بسبب أنزيمات العائل تؤدي إلى الاقتراح بأن Cyanobacteria RNA replicase قد استكشف من وجهة النظر هذه (هذا يعني أن RNA - polymerase المعتمد على RNA الذي يمكن أن يكون مسؤولاً عن تضاعف الفيرويد، من الآن فصاعداً نشير إلى هذا البروتين باسم العامل X. نحن لا نملك إلا القليل من المعلومات عن طرق تناسخ البكتيريا الزرقاء باستثناء الهستونات شبيهة بالبروتينات ذات الحجم المشابه لبروتين HU في *E. coli*.

لكي نرد على هذا الاعتراض يجب أن نستذكر تسلسل فرضيات التكافل الداخلي Endosymbiosis. يجب أن نفترض أن الاسترقاق Holobionts (متكافل Symbionts وعائل hosts) الأول يستفيد من العائل ولا يقدم للعائل أية فائدة، هي أهداف جديدة للانتخاب الطبيعي بسبب التداخل بين المشاركين في التكافل، في هذه الحالة فإن المشارك قوة رائدة مهمة جداً في التطور، وهذا دعم بأسانيد قوية من كثير من الباحثين. مثل هذا التداخل بين العوائل والمتكافلين يمكن، مثلاً، أن يكون إنتقال وراثي أو متكافل مشارك مثل العضيات Organelles.

نرجع ثانية إلى العلاقة مع الفيرويدات فإن الاحتمالات المتوقعة والقائمة تكمن في:

بعض الانزيمات المعروفة في نسخ الفيرويدات مثل (QB replicase). بعض التكافل بين الخلايا البكتيرية التي تمتلك فعلاً جينومات مخفضة، فمثلاً الكائن *Cyanophora paradoxa* وحيد الخلية ذو أسواط، يوجلينا تأوى Cyanelles والتي تكون مثل البكتيريا الزرقاء متكافل ينقصه جدران الخلية وتكون له كلوروبلاست عاملة. ولقد عرفت ال Cyanelles بأنها تمتلك ١٠٪ فقط من

محتويات ال DNA فى البكتيريا الزرقاء غير المتكافلة. هذه المتكافلات الداخلية من بدائية النواة يمكن أن تقترب من الطور الذى وصل إليه بواسطة الكلوروبلاستس الذى يرجع بناء بروتينها الذى فصل. ولكن كثيراً من هذه البروتينات شفرت بواسطة جينات نووية.

والذى يهمنى هنا احتمال واحد ومهم أن نذكره هو أنه فى فرضيتنا أن-Viroid Containing cyanobacteria وتكاثر الفيرويد يكون بسبب العامل X، بعد التكافل فإن الفرد المتكافل يمكن أن يمتلك جينوم أصغر كثيراً كما فى Cyanelles. الفيرويدات يجب عليها أن تعتمد على جينوم العائل لبناء عامل X.

هذه إثباتات نظرية وبقي على علماء أمراض النبات أن يثبتوا ذلك عملياً بالتطبيق على أمراض النبات والعوائل القابلة للإصابة منذ العصر الجيولوجى الأول إلى هذا الزمن.

## مراجع خاصة بالفصل الثاني

- 1 - Agrios, M. J. 1987. Plant Pathology. Academic Press. 800 pp.
- 2 - Branch, A. D., Robertson, H. D., Dickson, E. 1981. Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A. 78: 6381 - 6385.
- 3 - ——— A. P., ——— 1984. Science 223 : 450 - 455.
- 4 - Bruening, G. et al. 1982. FEBS Lett. 148 : 71 - 78.
- 5 - Diener, T. O., Smith, D. R. 1975. Virology 63 : 421 - 427.
- 6 - ——— , ——— 1989. Proc. natn, Acad. Sci U. S. A. 86 : 9370 - 9374.
- 7 - D. Duve, C. 1991. Blueprint for a cell: The nature and origin of life, Neil Patterson Publishers.
- 8 - Grill, L. K., et al. 1980. Virology 107 : 24 - 33.
- 9 - ——— , ——— , Semancik, J. S. 1978. Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A. 75 : 896 - 900.
- 10 - Gross, J. H., Dornedy, H., Lossow, C. 1978. Nature 273 : 203 - 208.
- 11 - ——— , ——— , ——— 1981. Biosci, Rep., 1 : 235 - 241.
- 12 - Hadidi, A., Cress, D. E., Diener, T. O. 1981. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 78 : 6932 - 6935.
- 13 - Haseloff, J., Symons, R. H. 1981. Nucleic Acids Res. 9 : 2491 - 2452.
- 14 - Lewin, R. 1981. Science 213 : 634 - 636.
- 15 - Meshi, T. et al. 1984. J. Biochem., 95 : 1521 - 1524.

- 16 - Muhlach, H. P., Sanger, H. L. 1979. *Nature* 278 : 185 - 188.
- 17 - Ohne, T., Takamatsu, N., Meshi, T., Okado, Y. 1983. *Nucli Acid Res.* 11 : 6185 - 6197.
- 18 - Owens, R. A., Cress, D. E. 1980. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 : 5302 - 5306.
- 19 - Owens, R. A., Diener, T. O. 1981. *Science* 213 : 670 - 672.
- 20 - Rackwitz, H. R., Rohde, W., Sanger, H. L. 1981, *Nature* 291 : 297 - 301.
- 21 - Riesner, D., et al. 1979. *J. Mol. Biol.* 133 : 85 - 115.
- 22 - Semancik, J. S., Tsurnda, O., Zaner, L. 1976. *Virology* 47 : 456 - 466.

## الفصل الثالث

### الدراسات الحديثة للفيروسات

### تصنيف - نطاقات - تنوع المتابع وتشخيص الفيروسات

### classification - Domains - Sequence Variants and Diagnosis of Viroids

أولاً: - تصنيف الفيروسات : Classification of Viroids

ظهرت آراء كثيرة فيما يتعلق بتصنيف الفيروسات وسواء صنفت الفيروسات تحت الفيروسات أم لا فإن ذلك يعتمد على التعريف الدقيق والمقبول لكلمة فيروس Virus. وبالتالي فإن التعريف الذي ذكر في الطبعة الثالثة من كتاب General Virology الصادر سنة ١٩٧٨ لمؤلفه Luria et al والذي يرى فيه أن التركيب الذي أقل من الخلية والذي يمتلك طور حيوى معدى يتمثل بشكل خاص فى الفيروسات وهذه الفيروسات تنتج تحت نظام وراثى لا يختلف عنه فى الفيروس، والنظام الوراثى فى الفيروس يختلف عنه فى الفيروس، اعتماداً على ذلك فإن الفيروسات لا تقع فى هذا المجال من التعريف وبالتالي لا تدرج فى التصنيف تحت الفيروسات.

ومن ناحية أخرى فإن العالم Lwoff سنة ١٩٨١ يرى أن الفيروسات هى كائنات ذات قدرة حيوية على إحداث العدوى وذات قدرة على إحداث المرض وهى طفيليات مطلقة بكل ما فى الكلمة من معنى. وقد أكد فى تعريفه للطفيليات المطلقة على أنها تلك الطفيليات التى تستخدم النظم الأنزيمية لخلايا

عوائلها فى إنتاج الطاقة (نظام Lipmann) وبناء البروتين وتستخدم رايبوسومات خلايا العائل وكذلك tRNAs للعائل. حسب هذا التعريف فإن الفيروسات تكون فيروسات بشكل واضح.

بغض النظر عن أى من هذين التعريفين هو الأصح، إلا أن هناك إختلافات واضحة بين الفيروسات التقليدية والفيروسات. مع أن العالم Lwoff ذكر فى تعريفه للفيروسات بأنها أنواع من الفيروسات، إلا أنه إقترح تقسيم مملكة الفيروسات إلى مجموعتين، الأولى الفيروسات الحقيقية The True Viruses أو Euviruses والثانية الفيروسات Viroids.

إن العالم Lwoff إعتد فى تقسيمه على درجة وطبيعة التطفل ولم يضع فى إعتباره عمق الاختلافات بين الفيروسات والفيروسات. من الملاحظ أنه إذا كانت الفيروسات طفيليات مطلقة فى رأى العالم Lwoff، فمن الممكن اعتبار الفيروسات فوق التطفل المطلق Ultra - absolute parasites (يعنى أكثر من تطفل مطلق)، وذلك لأنها تعتمد إلى حد بعيد وكبير (زيادة عن الفيروسات) على آلية البناء الحيوى لخلايا عوائلها. مع أن الفيروسات تحتوى بشكل ثابت معلومات وراثية والتي بمساعدة النظام البنائى لبروتين العائل فإنها يمكن أن تترجم (فى طور واحد أو أكثر من دورة تضاعف الفيروس) إلى واحد أو أكثر من البروتينات الخاصة بالفيروس، إلا أن الفيروسات يبدو أنها لا تمتلك هذه الكفاءة. وبالتالي فإن الفيروسات حتى يحدث لها تضاعف فإنها يجب أن تعتمد كلية على أنزيمات موجودة بشكل طبيعى فى خلايا عوائلها. وبالتالي يمكن القول بأن الفيروسات هى الكائنات الممرضة الوحيدة المعروفة التى لا تعمل شفرة لأى بروتينات.

بعد تلك المناقشة مع العالم Lwoff تبين له ضعف وعدم دقة إقتراحه بتصنيف الفيروسات كأنها فيروسات وزاد هذا الاقتراح ضعفاً عند معرفة التركيب الجزيئى الفريد والغريب للفيروسات والذي ليس له نظير بين الفيروسات، هذا التركيب الذى جعل أى علاقة تطورية بين هذين الكائنين الممرضين الفيروسات والفيروسات فى قفص الاتهام.

يعتبر التتابع القاعدة الأساسية لمقارنة الفيروسات (تتابع النيوكليوتيدات في خيط الـ RNA) مع بعضها البعض. إن تتابع المنطقة المركزية المحفوظة يسمح لجميع الفيروسات الموصوفة (التي درست) بأن تصنف إلى أربعة مجموعات. الإختلاف الذى يقع ضمن كل فيروس ينسب إليه الأنواع وإن الأساس الذى يعتمد عليه فى التفريق بين التنوع Variants والنوع Species، هو أنه فى التنوع يكون هناك تشابه فى التتابع بحدود ٩٠٪، أما فى النوع Species فإن تشابه التتابع يكون أقل من هذا المستوى.

إعتماداً على هذا الأساس من التقسيم صنف الفيروسات إلى مجموعتين رئيسيتين وثلاثة تحت مجموعة.

لقد وضع Koltunow & Rezaian سنة ١٩٨٩ أساس تصنيف الفيروسات اعتماداً على مقارنة تحليل التتابعات فى الفيروسات ويوصى باستعمال جدول رقم ٧. حيث تقسم الفيروسات إلى مجموعتين رئيسيتين A و B وإن فيروس ASBVd هو الذى يمثل فى مجموعة A، لأن هذا الفيروس لا يظهر بشكل أساسى أية علاقات تتابع مع أى من الفيروسات الأخرى، مع أنه من المعقول جداً أن هناك أفراداً أخرى من هذه المجموعة (وقد وضع فيروس الموزايك الكامن للخوخ فى هذه المجموعة) وسوف تكتشف أفراداً أخرى مستقبلاً.

تقع الفيروسات الأخرى كلها ضمن المجموعة B والتي تسمى مجموعة Pospivroids. هذه المجموعة يمكن أن تقسم إلى ثلاثة تحت مجموعات هي  $B_1$ ،  $B_2$ ،  $B_3$ . إن تحت المجموعة  $B_1$  يمثلها الفيروس PSTVd وتحتوى ١٥ فيروس بدأت معرفة أولها منذ عشرين عاماً، مع أن بعضاً منها مثل CTiVd، CLVd قد عرف تتابعها حديثاً سنة ١٩٨٨ - ١٩٨٩. كل هذه الفيروسات تمتلك تتابع محفوظ وصفات تركيبية فى القمة المركزية للخيط فى جزئ الفيروس. أما تحت المجموعة  $B_2$  الذى يمثلها ASSVd وتسمى مجموعة Apscaviroids فهى تحتوى ثمانية فيروسات والتي قد وصفت حديثاً. هذه الفيروسات تتشارك فى مسافة (قطعة) كبيرة من تماثل التتابع خاصة ضمن المنطقة المركزية لجزئ الفيروس والذى هو الأساس فى وضعها فى مجموعات.

إن أحدث الفيرويدات وصفاً هو فيرويد (Columnnea blumei Viroid) CbVd وهو أيضاً واحداً من أصغر الفيرويدات به ٢٤٨ نيوكليتيده إكتشف سنة ١٩٩٠ يصيب الكوليس. إن تتابعه غير متعلق بشكل أساسي مع أى من الفيرويدات، ولكن صفات منطقتها المركزية تشابه لتلك الصفات الموجودة في عدد من أفراد تحت المجموعة B<sub>1</sub>، B<sub>2</sub> وبالتالي فإنه وضع في تحت مجموعة جديدة هي B<sub>3</sub>.

جدول رقم ٧ : تصنيف الفيرويدات

عدد النيوكليوتيدات في الفيرويد	اسم الفيرويد مختصر	اسم الفيرويد بالتفصيل	تحت مجموعة الفيرويد	مجموعة الفيرويد
٢٤٧ (٢٥٠ - ٢٥١)	ASBVd	Avocado Sunblotch Viroid	تحت مجموعة ASBVd	مجموعة A أو Avsunviroids
٢٣٧	PLMVd	Peach Latent Mosaic Viroid		
٣٥٩	PSTVd	Potato Spindle tuber Viroid	تحت مجموعة B1	مجموعة B أو Pospiviroids
٣٧٥ - ٣٧٠	CEVd	Citrus Exocortis Viroid	تحت مجموعة أو PSTVd	
٢٤٠ - ٢٧٥	CVd	Citrus Viroids		
٢٤٧ - ٢٤٦	CCCVd	Coconut Cadang - Cadang Viroid		
٢٥٤	CTiVd	Coconut Tinangaja Viroid		
٣٥٦ - ٣٥٤	CSVd	Chrysanthemum Stunt Viroid		
—	ChCMVd	Chrysanthemum Chlorotic Mottle V.		
٣٠٣ - ٢٩٧	HSVd	Hop Stunt Viroid		
٢٥٦	HLVd	Hop Latent Viroid		
٣٦٠	TPMVd	Tomato Planta Macho Viroid		
٣٦٠	TASVd	Tomato Apical Stunt Viroid		
٣٧٢	ITBTVd	Tomato Bunchy Top Viroid (Indian)		
٢٩٧	CPFVd	Cucumber Pale Fruit Viroid		
٣٧٢	CLVd	Nematanthus Viroid		
٣٧٠	CLVd	Cloumnea Latent Viroid		
٣٣٠	ASSVd	Apple Scar Skin Viroid	تحت مجموعة B2 أو تحت مجموعة ASSVd	مجموعة Apscaviroids
٣٣٨	DAVd	Dapple Apple Viroid		
٣٤٠	AFCVd	Apple Fruit Crinkle Viroid		
٣١٥	PBCVd	Pear Blister Canker Viroid		
—	CBLVd	Citrus Bent Leaf Viroid		
٣٦٩	AGVd	Australian Grapevine Viroid		
٣٦٧	GYSVd-1	Grapevine Yellow Speckle Viroid - 1		
٣٦٣	GYSVd-2	Grapevine Yellow Speckle Viroid - 2		
٢٤٨	CYVd	Coleus Yellow Viroid	تحت مجموعة B3	
٢٤٨	CbVd-1	Coleus Blumei Viroid		

ملاحظات:

- ١ - فيرويدات الحمضيات لها تصنيف لوحدة في الجزء الثاني من الكتاب.
- ٢ - الفيرويد المسبب الشجرة الباهتة في الخيار، تقر الشجرة في الخوخ والبرقوق يعزل من الحمضيات والعنب.
- ٣ - يعتبر فيرويد الشجرة الباهتة في الخيار تنوع تابع لفيرويد حشيشة الدبنار.



بالإضافة إلى الفيروسات المذكورة في جدول رقم ٧ هناك عدة فيروسات تحت الدراسة وهذه الفيروسات هي:

- |                                       |   |
|---------------------------------------|---|
| 1 - Burdock stunt Viroid.             | 7 - Privet Viroid.                          |
| 2 - Pear Rusty Skin Viroid.           | 8 - Oil Palm Fatal Viroid.                  |
| 3 - Apple Scar Skin latent Viroid.    | 9 - Pigeon Pea Mosaic Mottle Viroid.        |
| 4 - Nicotiana glutinosa Strnt Viroid. | 10 - Dapple Fruit Viroid of Plum and Peach. |
| 5 - Carnation stunt Viroid.           |   |
| 6 - Wheat Leaf Blight Viroid.         | 11 - Nematanthys Viroid.                    |

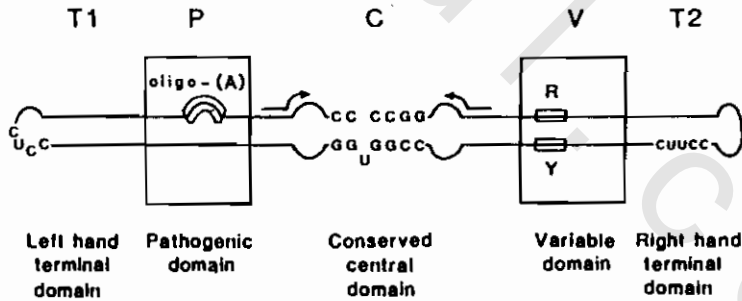
إن تحليل مقارنة التابع في النيوكليوتيدات لتسعة عشر فيروساً قد تم تحديد تتابعاتها وهذا يسمح بتصنيفها إلى مجموعتين كبيرتين. مجموعة A تحتوي فرد واحد لغاية سنة ١٩٩٢ وهو فيروس ضربة الشمس في الافوكادو ASBVd وهو ثاني أصغر الفيروسات المعروفة وهو الوحيد لغاية ١٩٩٢ الذي يحدث له إنشطار في المعمل ثم أضيف إليه فيروس آخر. الفيروسات الباقية في مجموعة B وتسمى مجموعة PSTVd - group B وهذه تقسم إلى تحت مجموعات ثلاثة هي PSTVd sub group B<sub>1</sub> - والثانية B<sub>2</sub> - sub - group B<sub>2</sub> والثالثة B<sub>3</sub> - sub - group B<sub>3</sub> .

الأسس التي بنى عليها تصنيف مجموعة B هي وجود تتابعات محفوظة في الجزء المركزي لجزئ الفيروس. في نموذج النطاق للفيروسات شكل ٧، فإن جميع جزيئات الفيروس في PSTVd مجموعة B يكن أن تقسم إلى خمسة نطاقات هي T<sub>1</sub>، P، C، V، و T<sub>2</sub>. وإن حدود هذه النطاقات قد حددت بواسطة مقارنة التابع للفيروسات في أزواج. إن التغيرات الشديدة في تماثل التابع من الأعلى إلى الأقل أو العكس يبين مواقع الحدود والتي كانت دائماً ثابتة مع مقارنة الأزواج المختلفة. إن نموذج النطاق كان قد تكشف باستعمال تتابعات الفيروس فقط من تحت مجموعة B<sub>1</sub> لـ PSTVd بسبب أن أفراد هذه المجموعة كانت

متوفرة في ذلك الوقت. وعلى أية حال فإن فيروسات تحت المجموعة B<sub>2</sub> التابعة لـ ASSVd أيضاً تمتلك نفس النطاقات كما حدثت بواسطة نفس البحث وهو المقارنة الزوجية لتمائل التابع.

إن تحت مجموعة B<sub>2</sub> من ASSVd قد فصلت عن تحت مجموعة B<sub>1</sub> على أساس التابع في نطاق C. إن المنطقة المحفوظة المركزية ضمن نطاق C لكل تحت مجموعة فيها تتابعات بحوالي ٣٠ نيوكليتيدها وهي محافظ عليها بشكل كبير بين جميع أفراد تحت المجموعة والتي تمثل حوالي ثلث مجموع النيوكليتيديات في نطاق C. بشكل أساسي لا يوجد هناك تماثل بين هذه الثلاثين أو ما يقاربها في تحت المجموعتين وهذا يشكل الأساس في تحت التقسيم. أما تحت مجموعة B<sub>3</sub> فهي لا تزال تحت الدراسة وتشمل فيروسين.

يؤدي نموذج النطاقات إلى الاقتراح بأن نشوء الفيروسات يشمل إعادة ترتيب النطاقات بين الفيروسات المهاجمة لنفس الخلية. سوف نتكلم عن النطاقات بالتفصيل في صفحات لاحقة إن شاء الله.



شكل رقم ٧ :

نموذج لخمسة نطاقات في مجموعة PSTVd. حدود نطاقات T<sub>1</sub>، P، C، V، T<sub>2</sub> محددة بتغير ملحوظ في تماثل التابع في أزواج القواعد بين الفيروسات. الاسهم تدل على التابع المتكرر المقلوب والذي يمكن أن يشكل ساق دبوس شعر مكون من تسعة قواعد زوجية. هذا دبوس الشعر رقم واحد.

## فيروسات مجموعة PSTVd :

هناك ١٥ فيروساً معروفاً وحددت تنابعاتها بالتفصيل في هذه المجموعة، تقسم هذه الفيروسات إلى ثلاثة تحت مجموعات (جدول ٧) وذلك مبنياً على تحليل التابع المقارن للمنطقة المركزية لكل جزئ. إنه من المحتمل أن يكون هناك أكثر من تحت قسم Subdivision ضمن كل تحت مجموعة، يمكن أن يكون هذا أكثر احتمالاً كلما زاد عدد الأفراد ضمن كل تحت مجموعة ووصفت جيداً. فمثلاً CCCVd وCTiVd مع أنها تشترك فقط في ٦٤٪ من عموم تماثل التابع، إلا أنها متقاربة جداً إلى حد ما على أساس كل من التابع وتنظيم التابع، صغر حجم جزيئات الفيروس، المدى العائلي المحدود في عائلة النخيل ومستوى منخفض من تماثل التابع الكلي مع الفيروسات الأخرى من تحت المجموعة الخاصة بها. هناك أمثلة أخرى في تحت مجموعة B<sub>1</sub> ليس محددة جيداً أيضاً.

كما سبق وقلنا فإن تقسيم أفراد هذه المجموعة إلى ثلاثة تحت مجموعات قد أعتمد على النطاق الفيرويدي Domain.

## مميزات مجموعة ASBVd . فيروس ضربة الشمس في الافوكادو:

بالإضافة إلى عدم وجود تشابه من حيث التابع والصفات التركيبية مع الفيروسات الأخرى، إلا أن هناك صفات أخرى مميزة، هي مقدرة كلتا الخيطين الموجب والسالب للحمض RNA للفيروس ASBVd لأن يخضع إلى تفاعل كامل من التقطيع الذاتي والذي يعتبر بأنه يلعب دوراً أساسياً في تناسخ الدائرة الملتفة لهذا الفيروس. يحدث تفاعل التقطيع الذاتي هذا في المعمل على مواقع معينة (لكنها مختلفة) في الحمض النووي RNA السالب والموجب في الغياب الكامل للبروتين، ولكن في وجود  $Mg^{++}$  يعطى RNA مقطع بنهايات من -Cyclic phospho 2', 3'- phosphate و 5'- hydroxyl شكل (٥). أما في المعمل فإن تفاعل التقطيع يعتبر هو المسئول عن تقطيع ال monomers السالب والموجب من التكرار الترادفي لـ monomeric الخيوط السالبة والموجبة والتي تنتج باستمرار خلال تناسخ الدائرة الملتفة.

إن الميزة الهامة للتقطيع الذاتى للفيروس ASBVd السالب والموجب والذى يشارك بواسطة أربعة فايروسايدات معروفة (الدائرية، شبه الفيرويد، RNAs التوايح) و RNA الموجب للحمض RNA التابع لفيروس البقعة الحلقية فى الدخان، هى وجود ١٣ نيوكليتيده محفوظة والتي يمكن أن ترتب فى تركيب يشبه رأس المطرقة (شكل ٦) حول منطقة التقطيع الذاتى.

التركيب المجمع لشكل ٦ يحتوى ١٣ نيوكليتيده محفوظة (شكل صندوق) مع سيقان مكونة من ثلاثة أزواج من القواعد كما هو فى الشكل تأخذ I ، II ، III، حول منطقة مفتوحة مركزية تحتوى على شريط واحد من RNA. هذا التركيب نشأ من تسعة RNAs ذاتية القطع والتي وصفت لغاية الآن والذى يكون التقطيع الذاتى خلال تركيب رأس المطرقة هذا.

إن التركيب ثنائى الأبعاد لا يفسر بوضوح تفاعل القطع الذاتى الخاص العال. يمكن الاعتقاد بأنه فى وجود  $Mg^{++}$  يتكون تركيب ثلاثى نشيط والذى يسمح بالخفض فى الطاقة التنشيطية فى نقطة التقطيع الذاتى، وبالتالي فإن تفاعل نقل الفسفرة شكل ٥ يمكن أن يحدث. مع أن تفاعل القطع الذاتى من ناحية نظرية منعكس إلا أنه لم يلاحظ إطلاقاً مع الفيرويد ASBVd. الممكن إفتراضه أنه طالما تحدث عملية الانشقاق الذاتى فإن التركيب الثالثى المنشط يسترسل (يرتخى) وبالتالي فإن نهايات 3'، 5' لا تكون أطول من مجاوراتها ولا يحدث التفاعل العكسى.

من الممكن التنبؤ بأن أفراداً جديدة لمجموعة ASBVd (كما هى قد أكتشفت) سوف تحتوى تتابعات عامة وصفات تركيبية واحداً منها سيكون كلا الشريطين السالب والموجب فى RNAs لينقطع ذاتياً خلال تركيب رأس المطرقة. لا يوجد أى فرد من فايرويدات مجموعة PSTVd يمتلك بشكل مقنع صفة الانشطار

الذاتي، ولكن هناك فقط محاولات محدودة أجريت لغاية الآن للبحث عن مثل هذا التفاعل. يبدو من المحتمل تماماً أن هذ الفيروسات سوف تكون أيضاً ذاتية الانشطار ولكن سوف يكون عن طريق ميكائزم مختلف نظراً لأن تركيب رأس المطرقة يحتوى ١٣ نيوكليتيده محفوظة لا يمكن أن تتشكل من تتابع هذه الفيروسات.

### ثانياً: - النطاقات Domains :

المقصود بالنطاقات هو تقسيم جسم الفيروس المستقيم إلى عدة مناطق كل منطقة مميزة عن الأخرى فى تتابع نيوكليتيدها وفى وظيفتها وفى صفاتها، ودراسة هذه النطاقات لها فوائد كثيرة من حيث التصنيف ومن حيث نشوء الفيروسات. من حيث التصنيف ذكرنا جزءاً منه سابقاً وسنكمل بعد ذلك. أما من حيث أهميتها فى نشوء الفيروس، فإن نموذج النطاق يؤدي إلى الاقتراح بأن نشوء الفيروسات يشمل إعادة ترتيب النطاقات بين الفيروسات المهاجمة لنفس الخلية. إنه من الصعوبة بمكان إيجاد دليل محدد لدعم هذا الاقتراح. إن الميكانيكية المحتملة لمثل إعادة الترتيب هذه يكون بعدم استمرارية النسخ حيث RNA polymerase ينسخ قالب فيروس واحد ينقلب لينسخ قالب ثانى يضعه بجانبه فى بعض النقاط الأكثر احتمالاً ليتحدد بواسطته التركيب الثالثى للفيروس. مثل هذا النموذج يدعم المضاعفة الجزئية التى تحدث فى نطاق T<sub>2</sub> للفيروس CCCVd وإعادة الترتيب للحمض RNA والذى يحدث لانتاج فيروس حيوانى من RNAs ناقص التداخل.

إن زيادة تفهمنا عن تتابع النطاقات فى الفيروسات يسمح بزيادة قربنا المنطقى إلى علاقة وظائف التركيب ضمن واحد أو أكثر من النطاقات.

## نموذج النطاق لمجموعة PSTVd من الفيرويدات

### The Domain Model For The PSTVd Group of Viroids

نتيجة فحص تماثل التابع مع أكثر من ٤٠ تنوع تتابع، وهي توضع الآن تحت مجموعة PSTVd للفيرويدات. إن كلا من Keese & Symons سنة ١٩٨٥ قد وضحا بالتفصيل نموذج النطاق للفيرويدات والذي يكون أيضاً ملائماً للفيرويدات من تحت مجموعة  $B_2$  و  $B_3$  ويزود الأساس المبنى عليه تقسيم الثلاثة تحت قسم Subdivisions ضمن مجموعة PSTVd الكلية. وبالتالي فإن طراز النطاق مناسباً لجميع الفيرويدات لغاية الآن (المعروف تتابعها) باستثناء ASBVd.

عند دراسة المعلومات الموجودة في جدول رقم ٨ فإنه من المهم أن نتذكر أن مقارنة التابع في PSTVd مع ٢٥ تتابع عشوائي من حيث الحجم وتركيب القاعدة بنفس الطريقة يعطى تماثل تابع بنسبة  $29,5 \pm 4,2\%$ . وبالتالي فإن أى تماثل فى التابع الكلى يصل لـ ٢٥ - ٣٥٪ بين فيرويديين يمكن أن يؤخذ بعين الاعتبار ليدل على عدم العلاقة بينهما، فمثلاً بالنسبة لـ ASBVd بمقارنته مع جميع الفيرويدات الأخرى كما فى جدول ٨ يظهر عدم العلاقة بينه وبينها.

حتى بالنسبة للفيرويدات ضمن نفس تحت المجموعة Subgroup، فإن المقارنة يمكن أن تظهر إنخفاضاً فى تماثل التابع الكلى. فى تحت مجموعة PSTVd هناك مقارنة ثمانية حالات فى حالة زوجية أظهرت التماثل والذي يتراوح ما بين ٤٢ - ٣٣٪. يجب أن نعرف أن تماثل التابع الكلى يكون له قيمة محدودة فى تصنيف الفيرويدات ولا يعتمد عليه بشكل كامل، حيث أن كلاً من Koltunow & Rezaian سنة ١٩٨٩ ذكرا بعض الانتقادات للذين يعتمدون اعتماداً كلياً فى التصنيف على تماثل التابع الكلى بين الفيرويدات.

جدول ٨: نماذج التتابع بين أزواج من الفيرويدات كما حددت باستعمال طريقة Wilbur & Lipman سنة ١٩٨٣.

TPMVd	77																		
TASVd	96	73																	
CEVd	60	65	77																
CSVd	66	68	72	63															
CCCVd	47	48	44	44	44														
CTVd	43	45	43	46	37	64													
HSH	44	41	36	47	33	44	40												
HLVd	44	45	47	40	37	50	49	42											
GVd IB	42	49	42	40	37	34	34	34	38										
GYSVd	37	44	40	40	40	30	31	38	42	73									
ASSVd	42	36	40	40	44	31	38	36	30	46	42								
ASBVd	32	30	32	29	33	26	32	35	31	29	31	28							
	PSTVd	TPMVd	TASVd	CEVd	CSVd	CCCVd	CTVd	HSH	HLVd	GVd IB	GYSVd	ASSVd							

المقاسات التي استخدمت في هذا الجدول:  $g=4$ ,  $W=100$ ,  $K=4$ .

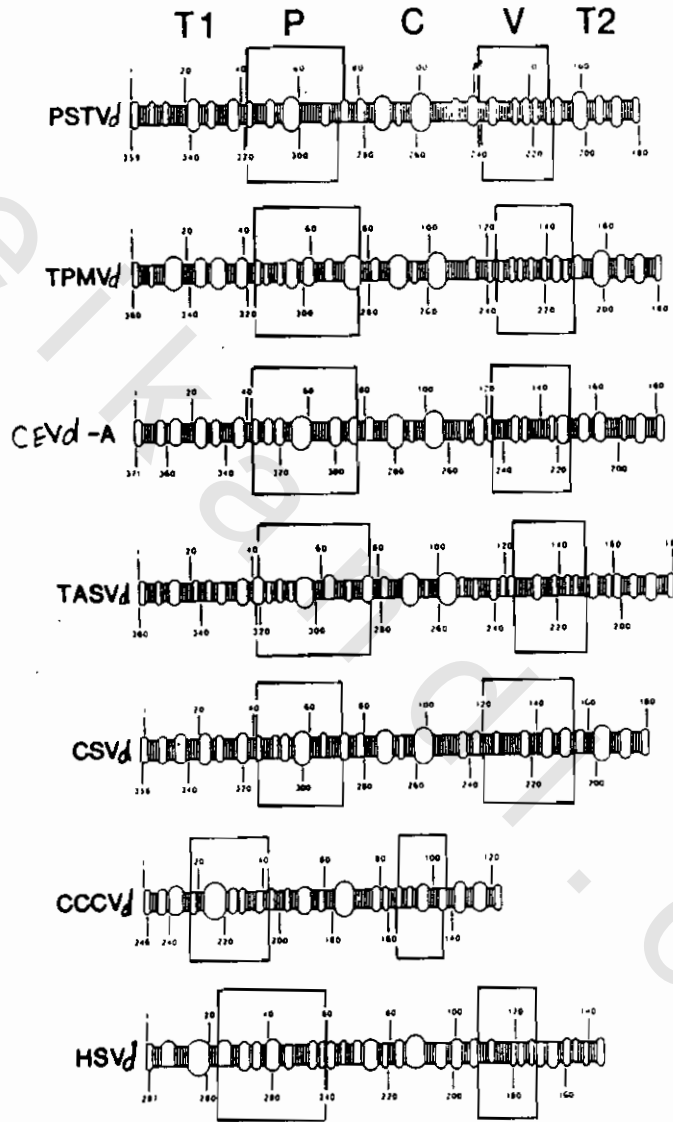
## نموذج النطاق لتحت مجموعة $B_1$ من PSTVd

### The Domain Model For The PSTVd Subgroup $B_1$

إن مقارنة تحليل تتابع الحالة المزدوجة لأفراد من تحت مجموعة  $B_1$  من PSTVd أظهرت وجود خمسة نطاقات (شكل ٧) وقد عرفت حدودها بواسطة ملاحظة تغييرات حادة في تماثل التتابع من المرتفع إلى المنخفض والعكس بالعكس. هناك مقارنات لحالات ازدواجية مختلفة كانت دائماً ثابتة في تحديد الموقع الدقيق (الصحيح) لحدود النطاقات. هناك شكل توضيحي يشرح هذه الحدود في سبعة فيرويدات في شكل ٨. وبالتالي فإن هذه النطاقات كانت قد اكتشفت بواسطة مقارنة تماثل التتابع بين قطاعات من كل جزئ للفيرويد مفضلاً ذلك على طريقة تماثل التتابع الكلى في جزئ الفيرويد.

هناك صفات أخرى لهذه النطاقات مكتوبة باختصار في جدول ٩، ١٠. بالرغم من التنوع في طول أفراد من فيرويدات تحت مجموعة PSTVd، إلا أن عدد النيوكليوتيدات في نطاق C ثابت بشكل واضح والاختلاف فقط في مواقع ٩٥ - ٩٧ في أفراد هذه المجموعة. بالنسبة لاصغر الفيرويدات فإن أكثر النقص في الحجم يحدث في النطاقين  $(V, T_1)$ . إن تماثل التتابع بين النطاقات في مختلف الفيرويدات (جدول ١٠) ذو درجة عالية من الأهمية، بسبب الاختلافات الملحوظة والتي يمكن أن تحدث بين النطاقات المتجاورة. كانت مثل هذه المقارنة هي التي أدت إلى الاقتراح بأن الفيرويدات نشأت (تطورت) عن طريقة إعادة ترتيب النطاقات بين مختلف أفراد الفيرويدات المهاجمة لنفس الخلية وما يتبع ذلك من طفرات ضمن كل نطاق.





شكل رقم ٨ :

رسم يوضح النطاقات لسبعة فيروسات في تحت مجموعة PSTVd.

جدول ٩ : بين حجم نطاقات الفيرويد

المجموع	نطاق $T_2$	نطاق V	نطاق C	نطاق P	نطاق $T_1$	اسم الفيرويد
٣٥٩	٦٤	٥٤	٩٥	٦٣	٨٣	PSTVd
٣٦٠	٦٢	٥٢	٩٥	٦٣	٨٨	TMPVd
٣٦٠	٦٢	٤٩	٩٧	٧٠	٨٢	TASVd
٣٧١	٦٤	٥٧	٩٧	٦٩	٨٤	CEVd
٣٥٦	٥٢	٦٦	٩٥	٦٠	٨٣	CSVd
٢٤٦	٤١	٢٨	٩٥	٤٩	٣٣	CCCVd
٢٥٤	٤١	٣٩	٩٥	٤٧	٣٢	CTiVd
٢٩٧	٤٧	٣٧	٩٧	٧١	٤٥	HSVd
٣٣٠	٦١	٢٩	٩٢	٥٦	٩٢	ASSVd
٣٦٩	٧٢	٣٦	١١٠	٥٠	١٠١	AGVd
٣٦٧	٨١	٣١	٩٧	٤٥	١١٣	GySVd
٣٦٣	٧٥	٢٩	٩٧	٥٠	١١٢	GVd 1B

ملاحظة:

إن الحدود بين نطاقى  $T_1$ ، P قد تغير قليلاً كما ذكر Keese & Symons سنة

١٩٨٥.

جدول ١٠ : تماثل التتابع بين النطاقات في الفيرويدات المختلفة .

% تماثل التتابع في النطاقات						الفيرويدات المستعملة في المقارنة المزدوجة	
الكلية	T <sub>2</sub>	V	C	P	T <sub>1</sub>	2	1
٦٠	٤٨	٤٩	٧٢	٦٤	٧١	CEVd - A	PSTVd
٧٧	٩٤	٣٨	٩٨	٧٦	٧٠	TPMVd	
٦٩	٩٠	٤١	٧٢	٦٠	٧٢	TASVd	
٦٦	٨٣	٤٥	٧٩	٤٧	٧٨	CSVd	
٤٧	٣٥	٣٧	٧٥	٢٧	٢٦	CCCvd	
٤٣	٣٦	٢٨	٦٣	٣٦	٢٨	CTiVd	
٤٤	٢٩	٣٥	٤٤	٦٤	٣٤	HSVd	
٦٥	٤٨	٤٦	٧٢	٦٤	٧٤	TPMVd ←	CEVd - A
٧٧	٥١	٤٥	٩٩	٧٢	٩٣	TASVd	
٦٣	٣٨	٣٩	٨٤	٤٨	٧١	CSVd	
٤٤	٤٦	٣٥	٦١	٣٢	٣١	CCCvd	
٤٦	٣٨	٤٠	٦٧	٣٨	٣٨	CTiVd	
٤٧	٣٤	٣٢	٤٥	٦٧	٤٢	HSVd	
٧٣	٩٨	٣٨	٧٤	٥٧	٧٤	TASVd ←	TPMVd
٦٨	٨٨	٥٩	٧٤	٥٢	٦٩	CSVd	
٧٢	٨٩	٥٢	٨٢	٥٦	٧٢	CSVd ←	TASVd
٦٤	٥٩	٧٥	٦٦	٥٠	٦٨	CTiVd ←	CCCvd (246)
٤٤	٤٣	٣٤	٤٣	٤٥	٦٤	HSVd	
٤٠	٤١	٣٢	٤٧	٣٩	٦٠	HSVd ←	CTiVd

استعملت المقاسات 4 ، W = 4 ، g = 4

## ١ - نطاق C = C Domain :

هذا النطاق من أكثر النطاقات حفظاً Conserved ، في المقارنة الازدواجية بين الفيرويدات فإن تماثل التتابع يختلف بين ٤٤٪ و ٩٩٪، هذه القيم تكون مساوية لـ أو أكثر من تماثل التتابع الكلى (جدول ١٠). إن المميزات الأساسية لهذا النطاق هو وجود إنتفاخ لولبي (حلزوني) على نحو تام يسمى U - bulged كما في شكل ٧ وتتابع متكرر مقلوب (الاسهم في شكل ٧) والتي معاً تحدد ما يسمى بالمنطقة المركزية المحفوظة Central conserved region (CCR) ضمن مجال C. إن هذه المنطقة CCR هي التي تحدد تحت قسم subdivision لمجموعة PSTVd إلى ثلاثة تحت مجموعات.

## ٢ - نطاق P = P Domain :

تكون هذه المنطقة مترافقة مع التعبير بالأعراض المرضية، هذا ما قرره كثير من الباحثين. إن الميزة الأساسية لهذا النطاق هي قطعة من-Adenine dominated Oli gopurine بحوالى ١٥ - ٢٠ نيوكليتيده على الشريط العلوى لجميع الفيرويدات باستثناء CCCVd حيث يوجد تتابع (As) Oligo. أما على قاعدة نطاق P فإن Oli- (U<sub>4</sub>-7) go غالباً ما تكون موجودة باستثناء مما هو فى CCCVd و CTiVd والتي تحتوى على قطعة غنية من (A) Oligo بسبعة نيوكليتيدهات.

## نطاق P فى فيرويد CEVd يلعب دوراً فى المرضية:

إن العزلات التى تحدث طبيعياً فى الفيرويد وتؤخذ من نبات مفرد، غالباً ما تحتوى أكثر من تنوع تتابع من الفيرويد، وهذا التنوع يمكن أن يفصل ويحدد تتابعه عن طريق تحضير كلونات cDNA الكامل الطول من مخلوط فيرويد. نظراً لأن كلونات cDNA للفيرويدات ونسخها من RNA والتي هى معدية عندما تحقن على نباتات قابلة للإصابة يمكن أن تحضر، هذا يقدم فرصة فريدة لعلاقة تتابع ومن ثم تركيب ذو مرضية.

إن تحليل تتابع تنوعات كل من HSVd، CEVd، PSTVd، أظهر أن جميع إختلافات التتابع (تقريباً) لكل فيروس تقع ضمن نطاقى P و V. هذا يدل على أن التنوع فى شدة التعبير عن الأعراض المرضية فى تنوعات التتابع، يكون أكثر احتمالاً لأن يحدد عن طريق إختلاف التتابع فى واحد أو كلا هذين النطاقين. معظم المعلومات المتوفرة عن CEVd والنتائج تظهر أنه فى ١٧ من تنوعات التتابع، فإن جميع إختلافات التتابع تحدث ضمن نطاقى P و V فى مناطق تسمى PL و PR شكل ٩.

لتحديد أى من النطاقين P أو V كليهما كان مسؤولاً عن تغيير التعبير المرضى. حضرت إصابة تجريبية بكلونات cDNA والتي فيها احدى نصفى تنوع تتابع كان قد إرتبط خلال نطاق C مع النصف الثانى من تنوع ثانى (شكل ١٠). استعمل إثنان من تنوعات التتابع احدهما من الذين يحثون على إحداث أعراض شديدة على بادرات الطماطم والآخر من الذين يحثون على إحداث أعراض شديدة البساطة (معتدلة جداً). كانت تركيبات cDNA ملائمة حضرت باستعمال مناطق ال Bam HI و Hind III فى نطاق C. أظهرت النتائج الحيوية بوضوح أن نطاق P يحدد تعبيرات العرض المرضى، بينما نطاق V يمكن أن يكون له تأثير على مستوى الفيروس الذى يتكشف فى النباتات المصابة. ولقد تأكد أن تتابع الفيروسات الجديدة (الذرية) كانت دائماً نفسها كما فى تلك المكلونة المستعملة فى الحقن.

نطاق V = V Domain :

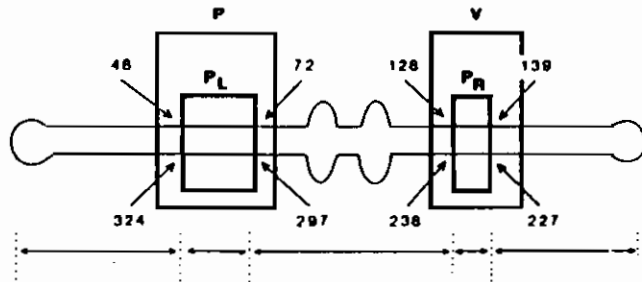
هذا النطاق يظهر الاختلافات الكبيرة فى التتابع بين الفيروسات قريبة الصلة. يظهر هذا النطاق أقل من ٦٠٪ تماثل فى التتابع بين أى زوج من الفيروسات باستثناء بين CCCVd و CTIVd (جدول ١٠) وهو أيضاً الأصغر حجماً يختلف من ٢٨ - ٦٦ نيوكليتيده (جدول ٩).

إن العلاقة الوحيدة المعنوية في التتابع في هذا النطاق بين فيروسات تحت المجموعة B<sub>1</sub>. تكون منطقة Oligo - purine: Oligopyrimidine عادة في أقل الحالات ثلاثة أزواج قواعد C: G. في حالة الفيروس CEVd فإن نطاق V قد يكون له دوراً في تحديد المستوى من CEVd في نباتات الطماطم المصابة. هناك أيضاً تنوع كبير في التتابع في هذا النطاق بين تنوعات التتابع للفيروس CEVd.

### نطاقات T : T Domains

إن النطاقين الطرفين لهما أهمية كبيرة وذلك بسبب الأدوار التي يمكن أن تقوم بها في تناسخ الفيروس وفي الكشف التطوري لجميع الفيروسات في مجموعة PSTVd. فمثلاً فإن هذه النطاقات يعتقد بأنها واقعة في جزئ ال RNA المتبادل بين إثنين أو أكثر من الفيروسات المهاجمة لنفس الخلية لتكون باعثة على فيروسات جديدة متوقعة. مع أن الأدوار الوظيفية لهذه النطاقات غير واضحة تماماً، إلا أن المحافظة العالية للتتابع في تنوعات نفس الفيروس يدل على الدور الهام في التضاعف (التناسخ). إن نطاق T<sub>2</sub> في الفيروس CCCVd يكون غير مألوف في ذلك الاختلاف في التتابع الجزئي الناشئ خلال تكشف مرض كادانج - كادانج في نخيل جوز الهند.

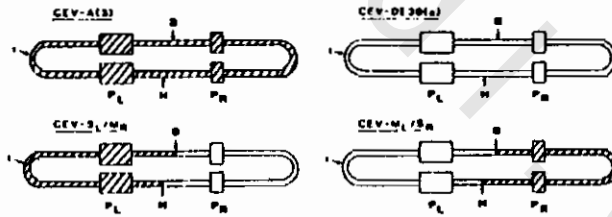
إن تماثل التتابع في نطاقات T في تحت مجموعة B<sub>1</sub> للفيروس PSTVd يظهر تتابع محفوظ بشكل تام لـ C - C - U - C في نهاية العروة لنطاق T<sub>1</sub> ولتتابع مجموعات C - C - U - U - C في نطاق T<sub>2</sub> شكل V. هذه الحوافز تكون أيضاً موجودة في التتابعات الحديثة لكل من CLVd و HLVD. وعلى أية حال فإن هذه الحوافز لا تكون محفوظة في فيروسات ASSVd وتحت مجموعة B<sub>2</sub> أو فيروسات CbVd تحت مجموعة B<sub>3</sub> مع استثناء المواقع الصحيحة لـ C - C - U - C في النهاية اليسارية للنطاق T<sub>1</sub> في GVd 1B.



Total number of nucleotides in each domain	96	49	116-117	20-24	89
Maximum number of nucleotide differences between any two variants in each domain	0	12	4	17	0
Maximum variation (%) between any two variants	0%	25%	3%	77%	0%

شكل رقم ٩ :

ملخص لتحليل التتابع لسبعة عشر تنوع تتابع من فيروسات اكسوكورتز الحمضيات. يحدث معظم تغيرات النيوكليوتيدات في نطاقى P<sub>L</sub> و P<sub>R</sub> ضمن نطاق المرضية العادى P ونطاقات V المتغيرة.



شكل رقم ١٠ :

رسم توضيحي لأبوين من فيروسات اكسوكورتز الحمضيات وفيروسين من وحى الخيال. الاب CEVd - A (2) يسبب أعراض شديدة على بادرات الطماطم، بينما الاب الثانى - CEVd - DE 30 (a) يسبب أعراض معتدلة. P<sub>L</sub>، P<sub>R</sub> تendl على النطاقات المعروفة. B تendl على موقع Bam أما HI تendl على موقع Hind III فى كلونات cDNA. هذه المعلومات استعملت فى بناء الفيروسين الآخرين.

## النطاقات في ال ASSVd تحت مجموعة B<sub>2</sub> من الفيروسيدات:

يمكن تقسيم كل فيروس من الثمانية فيروسات التابعة لتحت مجموعة ASSVd إلى خمسة نطاقات بواسطة المقارنة بالتتابع الزوجي بنفس الطريقة المتبعة في تحت مجموعة PSTVd. إن الصفة الأساسية المشتركة بينهم هي وجود منطقة محفوظة مركزية ضمن نطاق C والتي تكون محدودة على قمة الشريط بواسطة تكرار طرفي، ولكنها هي التي تظهر نيوكليوتيدات مختلفة على ال CCR من فيروسات تحت مجموعة PSTVd. أيضاً ففي وسط نطاق T<sub>1</sub> فإن هناك مجموعة (تكتل) من ٢٠ نيوكليوتيدة محفوظة بشدة موجودة في كلا الخيطين.

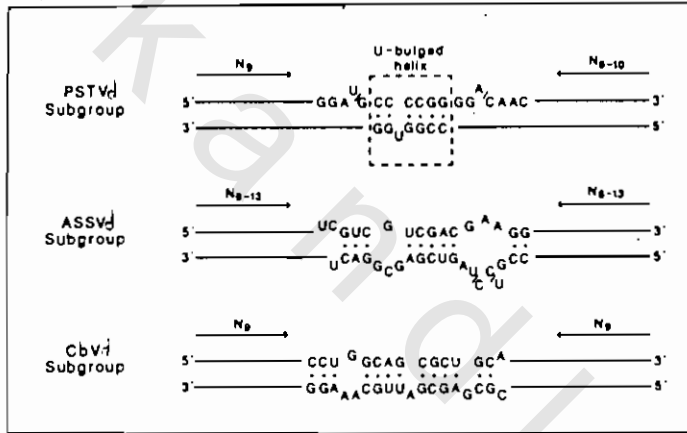
## نطاق C في مجموعة PSTVd من الفيروسيدات:

ضمن نطاق C في أفراد تحت مجموعة B<sub>1</sub> من فيروسات PSTVd وتحت مجموعة B<sub>2</sub> في فيروسات ASSVd، فإن هناك منطقة مركزية محفوظة محددة جيداً تسمى Central conserved region (CCR) والتي لها مميزات عامة مشتركة بين التحت مجموعتين حتى برغم عدم وجود تتابع مشترك. كذلك فإن الصفات المشتركة تكون موجودة في الفرد الوحيد من تحت مجموعة B<sub>3</sub> من فيروس CbVd. وبناءً على هذه القواعد فإن جميع تتابعات الفيروسات (لغاية سنة ١٩٩١) باستثناء ASBVd يمكن تصنيفها ضمن مجموعة PSTVd وتقسم إلى ثلاثة تحت مجموعات. بالإضافة لذلك فإن علاقات ارتباط زيادة عن ذلك تكون موجودة بين أفراد من تحت مجموعة PSTVd و ASSVd قد تم اظهارها عن طريق وجود خمسة نطاقات متتابعة في هذه الفيروسات. يمكن التنبؤ بتركيب خمسة نطاقات مشابهة لتحت مجموعة CbVd كفيروسات جديدة مكتشفة تتابعاتها تحدد على تحت المجموعة هذه.

إن المميزات العامة لمنطقة CCR في التحت ثلاثة مجموعات موضحة في شكل ١١. إن حدود منطقة CCR تكون واضحة ومحددة بواسطة تتابع متكرر مقلوب



في قمة الشريط والتي يمكن أن تزود بساق دبوس الشعر والذي لا يكون دائماً ثنائي القاعدة تماماً. إن طول كل ساق يختلف من ٨ - ١٣ نيوكليتيده، مع أنه بشكل أكثر شيوعاً يكون بطول ٩ نيوكليتيده خاصة في تحت مجموعة PSTVd يكون طول الشريط العلوي عادة ٣٢ نيوكليتيده بالنسبة لتحت مجموعة PSTVd، إلا أنه يختلف من ٣٢ - ٤٢ نيوكليتيده لتحت مجموعة ASSVd، ويكون ٣٤ نيوكليتيده مقصوراً على أفراد تحت مجموعة CbVd. هناك نيوكليتيده مفردة أو استثنائية محفوظة على كلا الشريطين في منتصف كل من CCR وهذه واضحة في شكل ١١.

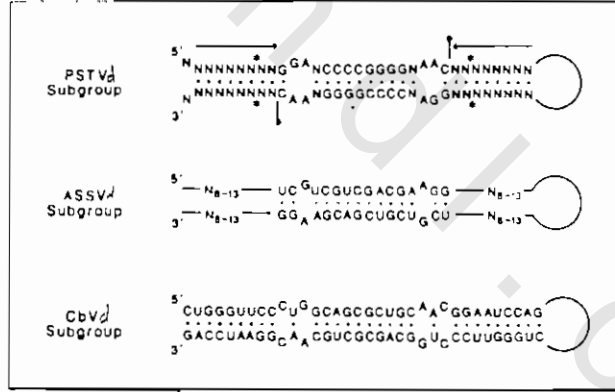


شكل رقم ١١ :

المنطقة المحفوظة المركزية CCR لثلاثة من تحت مجموعة PSTVd تحدد هذه المنطقة بنهايات التابع المتكرر المقلوب. ويظهر طول كل واحدة منها.

إن الانتفاخ اللولبي (الحلزوني) الذي على شكل حرف U يكون ذو أهمية خاصة في فيروسات تحت مجموعة PSTVd. إنه يظهر تركيب متجانس مع رايوسومال L 18 على منطقة الارتباط في 5S RNA في البكتيريا *E. coli* ومع المنطقة اللولبية المنتفخة المركزية المحفوظة على 5S RNAs للنباتات الراقية. ومن المحتمل أن بروتينات العائل المرتبطة لهذه المنطقة يمكن أن تلعب دوراً في تناسخ هذه المجموعة من الفيروسات.

إن التتابع المتكرر المقلوب في الشريط العلوي لمنطقة CCR لفيرويدات مجموعة PSTVd يسمح بتكوين تركيبات غالباً ثنائية الخيط ذات رأسين (تركيبها من الامام يشبهه من الخلف) في أزواج Dimeric أو تكرارات أطول قليلة الأزواج Oligomeric من هذه الفيرويدات شكل ١٢. هناك اعتقاداً هاماً بأن هذه التركيبات يمكن أن تلعب دوراً في بناء البودائ قليلة الازدواج الناتجة خلال تناسخ الدائرة المتلفة ليعطى خيط آحادي الأزواج و / أو جزيئات دائرية في المعمل وبالتالي تجهز الخطوة الأخيرة في عملية التناسخ. وعلى كل حال فإن الدليل يكون عادة غير مباشر في التجارب العادية، بينما في التجارب المعملية لم تزود بدليل واضح لنتيجة العمليات الخاصة. أحياناً فإن البيانات الواضحة للخيط العلوي في منطقة CCR يبدو أنها داخلة في سلسلة العمليات في الظروف الطبيعية كانت قد زودت من دراسات الحيوية مستعملة نسخاً من CEVd محتوية طفرات آحادية القاعدة في الشريط العلوي في منطقة الحلزون المنتفخ على شكل حرف U في شكل ١١.



شكل رقم ١٢:

تركيب متعكس الذي من الممكن أن يكون في ترادفات monomeric متكررة من أفراد كل تحت مجموعة من مجموعة PSTVd. جميع التتابعات مأخوذة من الخيط العلوي من CCR. موقع التكرار المنقلب في الثلاثة تحت مجموعات يشار عليه بالأشهر. أما حرف N فهي نيوكليوتيدات غير محفوظة. في فيروس HSVd فإن U مغروزة في موقع معلم بالدائرة المطموسة في تحت مجموعة PSTVd، علامة النجمة تدل لمواقع غرز لاثنين غير مزدوجين من النيوكليوتيدات في فيروس HLVd.

## الدور المقترح في إعادة تنظيم النطاقات في نشوء الفيروسات

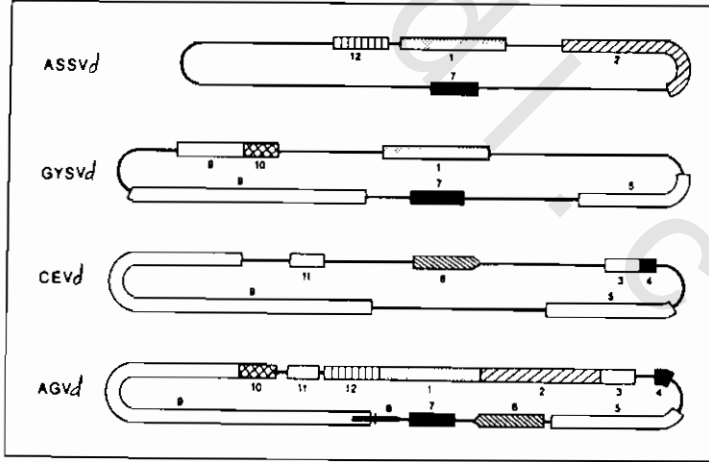
## Proposed Role of Rearrangement of Domains In The Evolution of Viroids

إن نموذج النطاق بمجرد وصفه يؤدي إلى الاقتراح بأن نشوء الفيروسات يتضمن إعادة ترتيب النطاقات بين إثنين أو أكثر من الفيروسات والتي تهاجم نفس الخلية متبوعاً بواسطة طفرات أخرى. يكون دائماً هناك شيء من الصعوبة للتزويد بأدلة مباشرة لمثل هذه الاقتراحات، ولكن بسبب ظهور تنابعات لفيروس جديد فإن أدلة قوية غير مباشرة تكون واضحة وتؤكد الاقتراح. والمثل الجيد على ذلك هو التنابع الحديث لفيروس CLVd والذي فيه نطاقات T<sub>1</sub> و T<sub>2</sub> تظهر تماثل عال في التنابع لنفس النطاقات في PSTVd و TASVd بالترتيب، وتكون الحدود محددة جيداً بواسطة المقارنة بالطريقة الزوجية بين أعداد من تحت مجموعة PSTVd (شكل ١٠). إن وجود أطوال تحت نطاقية Sub - domain lengths في تنابعات TPMVd في نطاق P، وفي تنابعات PSTVd و HSVd في نطاق C يدل على أن إعادة ترتيب RNA يمكن أن تحدث ضمن النطاق بالإضافة إلى منطقة الحدود (شكل ١٠).

إن مقارنة تحليل التنابع لـ AGVd في تحت مجموعة ASSVd قد أظهر أيضاً خليط متزاخم من قطع والتي تبدو وكأنها مأخوذة من ASSVd، PSTVd، CEVd و GYSVd شكل ١٣. هذه القطع لها تماثل في التنابع والذي يختلف من ٥٢ - ١٠٠٪ من التنابع المتطابق في فيروسات الآباء المفترضة. لهذا فإن هذا الفيروس يكون مثلاً آخر والذي فيه يظهر إعادة الترتيب للحمض النووي RNA والتي يمكن أن تحدث ضمن النطاقات. إنه المثل الأول والذي يظهر فيه مثل إعادة الترتيب هذه والتي يجب أن تأخذ مجراها بين الفيروسات ضمن تحت مجموعتين من الفيروسات منفصلتين.

### الدليل المباشر على إعادة الاتحاد في RNA بين ال RNAs الفيروية:

إن إعادة الاتحاد المفترض في RNA في النطاقات وتحت النطاقات بين الفيروسات مشتركة الإصابة (كما قد بينا) مبنياً على مقارنة تحليل التتابع. مع أن جميع الأدلة تكون مؤيدة لإعادة الاتحاد في RNA، إلا أنه لا يوجد بيانات تدل على الفترة الزمنية التي تلزم لمثل إعادة الاتحاد هذه لكي تحدث بين الفيروسات مشتركة الإصابة، كذلك لا يوجد أية محاولات ذكرت عن إنتاج فيروسات خيالية (وهمية) بواسطة الحقن المشترك لفيروسين بينهما علاقة على عائل نباتي مشترك. إن مثل هذه التجارب أصبحت الآن معقولة بواسطة استعمال سلسلة تفاعل ال Polymerase والاختيار الدقيق المحكم للسودائ (سلسلة قصيرة من DNA) والتي يمكن أن تسمح بالتعرف على الجزيئات الناتجة المتوقعة. إن مثل هذا الاقتراح يمكن أن يكون أساسياً نظراً لأن أى من الذرية المتوقعة قد تكون ذات أضرار في التناسخ عندما تقارن مع الأبوين وبالتالي يمكن أن تتواجد فقد بتركيزات منخفضة.



شكل رقم ١٣:

علاقات التتابع بين فيروس AGVd وثلاثة فيروسات أخرى، القطع ذات تماثل التتابع العال بين فيروسين أو أكثر محفوظة في علب ومرقمة.

إن الأحماض النووية RNAs الفيروسية تكون وسيلة مزودة بأدلة أكثر ثباتاً عن إعادة الاتحاد في RNA. إن أكثر الأمثلة توضيحاً لذلك هو العمل الذي قام به Allison et al سنة ١٩٩٠ والذي إقترح بأن إعادة التكاثر لجينوم RNA الفعال بواسطة إعادة التكاثر بين نواتج الطفرات المقتضبة Deletion mutants. في هذا البحث فإن فيروس التبرقش الشاحب في اللوبيا Cowpea chlorotic mottle Virus (CCMV) كان يستعمل في هذه الدراسة نظراً لأنه يحتوي على جينوم ثلاثي في ثلاثة أحماض RNAs أحادية الشريط. إن الحقن المشترك لهؤلاء الثلاثة جميعاً يبدو أنه يكون مطلوباً لمقدرته (حيويته) على أوراق اللوبيا. إن الأحماض النووية الكبيرة من RNA<sub>1</sub> و RNA<sub>2</sub> تكون أحادية السسترونك monocistronic أما RNA<sub>3</sub> فإنه ثنائي السسترونك discistronic ويعمل شفرة لبروتينات 3a وللغلاف البروتيني. إن DNA المكون عن كل من هذه الأحماض الثلاثة حضرت بحيث زودت RNA transcripts لدراسة الحيوية. إن الالغاء الذي يتم ضمن أى من الجين 3a أو جين الغطاء البروتيني يبطل حيوية الفيروس. وعلى أية حال فإن الحقن المشترك للأحماض RNA<sub>1</sub>، RNA<sub>2</sub> كل منهما مع RNA<sub>3</sub> يبطل الطفرات التي تؤدي إلى إنتاج ذراري فيروس تحتوي النوع الأصلي RNA<sub>3</sub> وهذا ثبت بطريقة تحليل التتابع. ونظراً لأن إعادة الاتحاد في RNA قد حدثت بين الناتجات من طفرة RNAs<sub>3</sub> ومستويات عالية من الفيروس قد حصل عليها في اليوم السابع أو بضع أيام بعد الحقن.

لقد ذكر العالم Robert H. Symons في مقالة المنشور في مجلة Molecular Plant - Microbe Interaction عدد ٤ صفحة ١١١ - ١٢١ الصادر في سنة ١٩٩١ تحت عنوان دورية التتابع في الفيرويدات تدل على أن النشوء يتم بواسطة التضاعف كما يلي:-

Periodicity of Sequences in Viroids indicates Origin by duplication.

تبدى معظم الفيروسات تركيبات دورية (تركيب معين يتكرر بالترتيب) يتميز بتكرار وحدات من ١١ أو ١٢ نيوكليتيده في تحت مجموعة PSTVd، و ٦٠ نيوكليتيده في ASSVd و ٨٠ نيوكليتيده في ASBVd. مع أن التابع المتكرر وجد فقط في حوالي  $\frac{1}{3}$  من مجموع التابع في أفراد تحت مجموعة PSTVd، فإن أطول المتكررات في ASSVd و ASBVd تشغل الطول الكامل في كل جزئ.

إن الدوريات في جدول ١١ يبدو أنها متخصصة في الفيروسات، نظراً لعدم وجودها في RNAs الصغيرة الأخرى أو الفيروسات. وعلى أية حال فإن الدورية الواضحة لم توجد في HSVd أو في تنوعات التابع الخاصة بها في فيروس الثمرة الباهتة في الخيار، ولا في أفراد كلتا تحت مجموعة PSTVd وهذا الشيء يبقى محيراً. ولقد إقترح بعض العلماء أن الدورية الملاحظة في الفيروسات يمكن أن تلعب دوراً في تفاعل RNA الفيرويدي الشبيه بال DNA مع البروتينات نظراً لأن واحدة من صفات DNA هي المقدرة على ربط البروتين لتكون دورية تركيبية.

هناك احتمالية أخرى هي ذلك التركيب الدورى لمعظم الفيروسات يعكس أصلها التطورى حيث تضاعف التابع يكون متبوعاً بطفرة تسمح بزيادة في حجم وتكشف جزيئات الإصابة. المثل الممتاز لهذا التضاعف الجزئى لجزئى الفيرويدي يظهر خلال الإصابة لنخيل جوز الهند بواسطة فيروس CCCVd. إن الفيرويدي المتكون من ٢٤٦ نيوكليتيده تظهر مبكرة في الإصابة، لكن كلما تكشفت الأعراض تنشأ أشكالاً ذات وزن جزئى أكبر جديدة، وفي آخر الأمر تسيطر على تجمعات الفيرويدي كلما تقدم المرض. يحدث تضاعف لجميع نطاق T<sub>2</sub> ويبدأ على ثلاثة مواقع منفصلة ضمن نطاق V ليعطى تناوبات زيادة من ٤١، ٥٠، ٥٥ أو ٢ × ٥٠ نيوكليتيده.

المضمون الوظيفي لتكشف هذه الأشكال الأعلى من CCCVd خلال تقدم المرض لم تعرف بعد. هنا بعض الفوائد تؤخذ من التضاعف، فمثلاً زيادة التنافس لربط هذه التتابعات المتكررة لبعض مكونات العائل ضرورياً للتضاعف ولكن هذا يكون بصفة محدودة.

لقد ذكر أن التضاعف لنطاق T<sub>2</sub> من CCCVd يحدث بواسطة إنقطاع النسخ بأنزيم RNA polymerase ملتفاً أو قافزاً من قالب إلى آخر. هناك نموذجاً مماثلاً لتلك المقترح في فيروس الانفلونزا. فرضاً فإن تضاعف التابع في الأفراد الأخرى من فيروسات مجموعة PSTVd يمكن أن تحدث بطريقة متماثلة للمرحلة الأخيرة لبناء جزئ كامل الطول.

جدول ١١: أمثلة على الدورية التركيبية في الفيروسات.

الاجماع	وحدات متكررة نيوكليتيديّة	الفيروس
CNGRRGRRAYCN نيوكليتيديّة ٦٩ - ١٧٢	١٢	PSTVd
CNGRRGRRAYCN نيوكليتيديّة من ٢٤٤ - ١٢٩	١٢	CCCVd
متكررة ٤,٥ - ٥,٥ مرة في ٣٣٠ نيوكليتيديّة	٦٠	ASSVd
متكررة ٣ مرات في ٢٤٧ نيوكليتيديّة	٨٠	ASBVd

ملاحظات:

N = a non conserved nucleotide A, C, G, or U, Y = Pyrimidene, R = Purine.

تتابع النطاقات فى الفيروسيدات والفيروسايدات يدل على النشوء بواسطة أعادت ترتيب RNA .

### Sequence Domain In Viroids and Virusoids indicate Evolution by RNA Rearrangement.

بمقارنة تحليل تتابع الأزواج لأفراد تحت مجموعة B<sub>1</sub> من PSTVd دلت على وجود خمسة نطاقات والتي تعينت حدودها عن طريق التغيرات الحادة فى تماثل التتابع من العالى إلى المنخفض والعكس بالعكس. المقارنات الزوجية المختلفة كانت دائماً متناسقة مع الموقع الصحيح مع الحدود لكل نطاق. لقد تبين نموذج النطاقات باستعمال التتابع فى الفيرويد فقط من تحت مجموعة B<sub>1</sub> لمجموعة PSTVd. وعلى أية حال فإن فيروسيدات مرض ندب الجلد فى التفاح ASSVd تحت مجموعة B<sub>2</sub> لها نفس النطاقات كما يظهر بواسطة مقارنة الأزواج فى التتابع.

تقسم مجموعة PSTVd إلى تحت مجموعتين على أساس التتابع فى المنطقة المركزية المحفوظة لنطاق C. ضمن نطاق C فى كل تحت مجموعة هناك تتابعات حوالى ٣٠ نيوكليوتيدة والتي هى محفوظة تماماً highly conserved بين كل الأفراد لكل تحت مجموعة ولكنها تختلف تماماً عن تلك الموجودة فى تحت المجموعات الأخرى. تتابعات المنطقة المركزية المحفوظة هذه تشكل ثلث نطاق C فى كل حالة. وعلى أية حال فإن الميزة العامة لكلا تحت المجموعتين هو وجود تتابع متكرر مقلوب قصير Short inverted repeat sequence ضمن النيوكليوتيدات المحفوظة والتي تظهر على شكل أسهم فى شكل ٧.

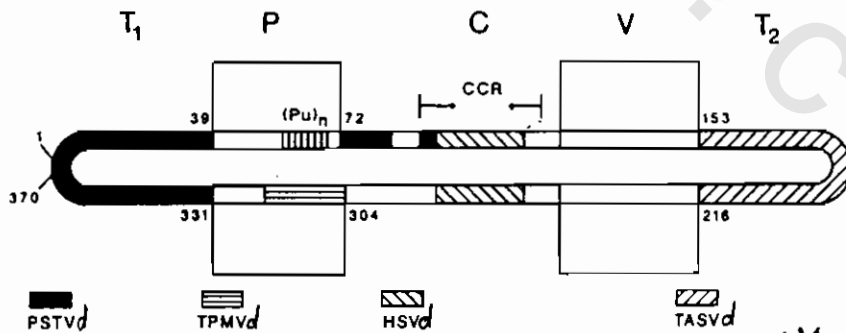
هذا النموذج للنطاق يؤدي إلى الافتراض بأن نشوء الفيروسيدات داخلاً فى إعادة الترتيب للنطاقات بين الفيروسيدات المهاجمة لنفس الخلية متبوعاً بنشوءات أخرى. إن الإنبات التجريبى لهذا الافتراض صعب تحقيقه ولكن التتابعات للفيرويد الجديد والتي تستمر فى الظهور أعطت إثبات قوى غير مباشر. فمثلاً فى تتابع Columnnea latent viroid ، فإن نطاقات نهاية اليد اليسرى T<sub>1</sub> ونهاية اليد اليمنى T<sub>2</sub> تظهر بتجانس



تتابع مرتفع لنفس النطاقات في PSTVd في فيروس تدقزم قمة الطماطم مع حدود محددة جيداً ومتناسقة مع مقارنات الأزواج الأخرى شكل ١٤. إن وجود أطوال لتحت نطاق من تتابعات في فيروس النبات الذكر في الطماطم TPMVd في النطاق المرض P وفي PSTVd، HSVd، في نطاق C شكل ١٤، يدل على إعادة الترتيب التي يمكن أن تحدث ضمن النطاق بالإضافة إلى الحدود. أيضاً كذلك فإن الفيروس المتسلق Scrambled وهو فيروس العنب الاسترالي AGVd من ASSVd تحت مجموعة B<sub>2</sub> الذي فيه تقريباً جميع ال ٣٧٠ نيوكليوتيدة يبدو وأنها مأخوذة من أجزاء من فيروسات CEVd، PSTVd، ASSVd وGySVd. إن تشابه التتابع في أجزاء من AGVd يختلف من ٥٢ - ١٠٠٪ من التتابعات المتشابهة في الفيروسات الآباء المفترضة.

إن الميكانيكية التي يتم بها إعادة الترتيب للحمض RNA غير معروفة. إحدى الميكانيكيات المحتملة هي عدم استمرارية النسخ حيث أن RNA polymerase الذي ينسخ قالباً من فيروس واحد أو فيروسايد يتحول إلى نسخ قالب ثانوي متجاور على بعض المواقع والأكثر احتمالية تحديدها بواسطة التركيب الثالث tertiary للقالبين.

من الأمثلة على إعادة الاتحاد بين الشريط الموجب لـ RNA للفيروسات هي التجمعات. في حالة فيروسات النبات فإنه في بعض الأحيان فإن المثال الأكثر تحديداً هو الذي ذكر بواسطة Allison et al سنة ١٩٩٠ عن فيروس التبرقش الشاحب الثلاثي في اللوبيا.



شكل رقم ١٤ :

رسم توضيحي للفيروس CLVd يظهر القطع عالية تماثل تتابع مع فيروسات أخرى. CCR منطقة مركزية عالية الحفظ.

ثالثاً: - إختلاف التتابع فى تنوعات التتابع فى الفيرويدات:

### Sequence Variability in Sequence Variants of Viroids

مقدمة:

قبل أن ندخل فى هذا الموضوع يجب أن يكون لدينا فهماً واضحاً للاصطلاحات المستعملة والتي نذكر تعريفها فيما يلى:-

١ - عزلة الفيرويد A Viroid Isolation: هى مجموع جزيئات الفيرويد الكاملة الموجودة فى نبات مصاب واحد. إن مثل هذه العزلة يمكن أن تحتوى نوعاً واحداً أو أكثر من الفيرويد وتحتوى واحداً أو أكثر من تنوعات التتابع لكل أنواع الفيرويد.

٢ - أنواع الفيرويد A Viroid Species: تتكون أنواع الفيرويد من واحد أو أكثر من تنوعات التتابع مستقلة التناسخ والتي تظهر أكثر من ٩٠٪ من تماثل التتابع بواسطة المقارنة المزدوجة. جميع أفراد النوع الواحد تمتلك أقل من ٨٠٪ من تماثل التتابع مع أفراد من أنواع فيرويد آخر.

٣ - تنوع التتابع A Sequence Variant: هو جزيء فيرويد مفرد ذو تتابع محدد. وبالتالي فإن أنواع الفيرويد تحتوى واحداً أو أكثر من تنوع التتابع تحدث طبيعياً والذي كل منها يختلف بوحدة أو أكثر من النيوكليوتيدات عن تنوعات التتابع الأخرى ولكن كلها تظهر أكثر من ٩٠٪ من تجانس التتابع بواسطة المقارنة الزوجية.

٤ - النسبة المئوية لتماثل التتابع Percent Sequence homology: يستعمل هذا الاصطلاح للمقارنة بين فيرويدين وهذا يحدد بواسطة طرق معتمدة على الكومبيوتر التي ذكرها Wilbur & Lipman سنة ١٩٨٣ وتستعمل فيها القياسات،  $g, W, K$  حيث أن  $K = 4$  وهذا يستعمل للمقارنة فى الطول حيث المقارنة تساوى  $K$  أو أكثر.

(Windo size)  $W = 100$  حجم الشق.

gap penalty  $g = 4$ .

في هذه التعريفات نفترض وجود أنواع الفيرويد منفصلة عن بعضها تماماً وليست إختلافات مستمرة في التتابع في الفيرويدات تحدث طبيعياً. مع أن هذا الأخير يعتبر غير محتمل فنحن نحتاج إلى وصف أنواع كثيرة من الفيرويدات وإلى العديد من تنوعات التتابع في كل نوع قبل أن نستطيع أن نكون واثقين عند التمييز الواضح بين أنواع الفيرويد.

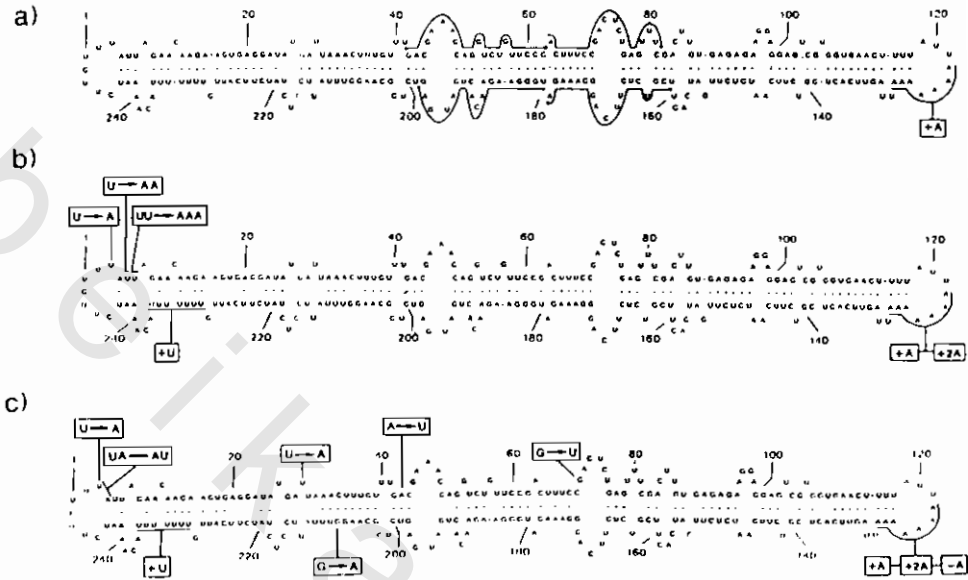
إن أكثر تنوعات التتابع دراسة وتمييزاً في صفاتها هي تلك التابعة لكل من HSVd و ASBVd و CEVd وإلى حد ما PSTVd و CCCVd وهناك توضيح كامل ومطول عن تنوعات التتابع مذكورة في كتاب Keese et al سنة ١٩٨٨.

I - تنوعات التتابع في ASBVd :

#### Sequence Variants of ASBVd

كان أول تحليل واضح لتنوعات التتابع في ASBVd قام به Rakowski & Sy mons سنة ١٩٨٩. لقد حدا تنابعات ١٦ تنوع من ٢٤٧ نيوكليتيده ذات علاقة مع ASBVd مثل تنوع SB - 1 والتي كانت قد عزلت من أوراق ثلاثة أشجار أفوكادو في مناطق منعزلة في استراليا. كانت معظم النيوكليتيدهات المختلفة موجودة في اليد اليمنى واليسرى للعروات في جزئ ASBVd بينما العدد الباقي يختلف من ٢٤٦ إلى ٢٥١ نيوكليتيده.

يظهر في شكل ١٥ مواقع هذه التغيرات



شكل رقم ١٥ :

الاختلافات في تنوعات النتابع المأخوذة من ثلاثة عزلات (a) ، (b) و (c) من فيروس ASBVd. النيوكليوتيدة المتغيرة موضوعة في علبة وهي ذات علاقة بالنتابع وتقترح التركيب الثانوي في تنوعات النتابع SB - I من الفيروس ASBVd الموجودة في عزلة (a). في عزلة a فإن الأربعة مواقع من الطبقة الأولى في مركز الجزيء الذي كان يستعمل لتوالد كلونات cDNA للنتابع تكون معلمة بخط.

## II - تنوعات النتابع في مجموعة PSTVd :

### Sequence Variants of PSTVd Group of Viroids

#### ١ : تنوعات النتابع في CEVd

لقد أجرى معظم هذا البحث على خمسة عزلات استرالية مستخلصة من حمضيات ثم بعد ذلك تكاثرت في الأقحوان والطماطم، وكان من المثير للاهتمام أنه على بادرات الطماطم فقد أعطت هذه العزلات الخمسة نوعين من الأعراض

فقط ١ - معتدلة أو صعبة الظهور. ٢ - شديدة حيث ظهر تدلى للأوراق شديد مع أوراق متجمدة وتقرزم. كانت هذه العزلات كما يلي :-

١ - العزلات المسببة لأعراض شديدة هي CEVd - A ، CEVd - DE 25 ، CEVd - J .

٢ - العزلات المسببة لأعراض معتدلة CEVd - DE 26 ، CEVd - DE 30 .

إن مقارنة التنوعات المتتابعة مع كل عزلة يتطلب تحضير الطول الكامل لكلونات cDNA والتحديد الكامل لتتابعها. فقط في هذه الطريقة يمكن لاختلاف التتابع ضمن تنوعات التتابع بالإضافة إلى تقدير عدد تنوعات التتابع في كل عزلة يمكن تحديده. وعلى أية حال فإنه من المهم أن ندرك أن التتابع في عدد كبير من كلونات cDNA يكون مطلوباً لاكتشاف عدد قليل من تنوعات التتابع. مثلاً إذا كان فرد معين من تنوع متتابع موجوداً بمستوى ٠.٥٪ من مجموع التنوعات عندئذ على الأقل يجب أن يكون هناك ٢٠ كلونة من cDNA معروفة التتابع لتزويدنا باحتمالية معقولة لاكتشاف هذا الفرد. زيادة على ذلك فإن الكمية النسبية لكل تنوع تتابع في أى عزلة يكون محتمل جداً لأن يتغير معتمداً على ظروف النمو وبشكل خاص أكثر على العائل النباتي المستعمل. وبالتالي فإن أعداد تنوعات التتابع في أى عزلة واحدة حددت بواسطة تنوعات كلونات cDNA بالتأكيد سوف يكون تقديراً غير سليم.

وبالنسبة للعزلات السابقة فإن عزلة CEVd - A تحتوي على الأقل إثنين من تنوعات التتابع والتي تختلف بواسطة قليل من النيوكليوتيدات، بينما CEVd - DE 25 وعزلة CEVd - DE 26 يبدو أنها تحتوي على تنوع متتابع واحد فقط. أما تنوعات التتابع في عزلة CEVd - A وعزلة CEVd - DE 25 فإنها كانت متشابهة جداً مع التنوع المتتابع المسمى Californian والتي تحددت بواسطة Gross et al سنة ١٩٨٢. أما التنوع المتتابع في CEVd - DE 26 فإنه يحتوي ٢٧ نيوكليوتيدة تختلف نسبياً مع التنوع المتتابع في CEVd - A. أما في عزلة CEVd - J يظهر أكبر إختلاط

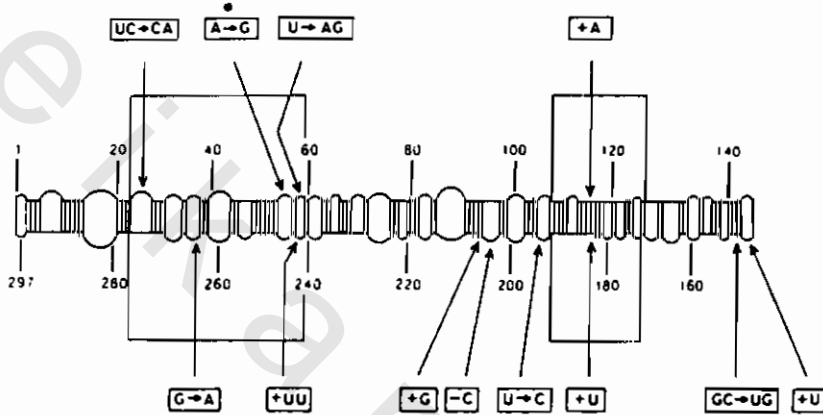
من تنوعات التتابع، فقد وجد أنه من تتابع حوالي ٢٠ كلونة من cDNA فقد وجد تسعة تنوعات متتابعة مختلفة. وهناك تجارب أخرى تدل نتائجها على وجود عدد كبير من تنوعات التتابع أكثر من تسعة في حقل واحد مزروع بأشجار البرتقال المطعمة على أصول *Poncirus trifoliata* والتي تظهر عليها الأعراض الكلاسيكية لمرض اكسوكورتز الحمضيات، مثل انفصال القلف عن جذع الأصل. بعد ذلك فإن أشجار الحقل يمكن أن تختلف بشكل كبير في عدد التنوعات المتتابعة لـ CEVd الموجودة فيها.

إن إختلافات التتابع الموجودة في ١٥ تنوع من CEVd الأسترالي بالإضافة إلى إثنين من تنوعات التتابع في كاليفورنيا كانت واقعة بشكل أكثر وضوحاً في نطاقى P و V (شكل ٩)، وبشكل أساسى فإن جميع التنوعات المتتابعة تكون زيادة على ذلك منحصرة في مناطق أصغر والتي نطلق عليها  $P_L$  و  $P_R$ . إن منطقة  $P_R$  تتكون من ٢٠ - ٢٤ نيوكليتيده من المجموع الكلى ٣٧٠ - ٣٧٥ نيوكليتيده (٦٪ من جزئ CEVd) يكون قابل للتغير جداً مع كثير من تغير النيوكليتيدهات، بينما منطقة  $P_L$  تتكون من ٤٩ نيوكليتيده تحتوى قليل من التغيرات.

## ٢ - تنوعات التتابع فى HSVd :

إن فيروس الثمرة الباهتة فى الخيار CPFVd وفيروس تقزم حشيشة الدينار HSVd تعتبر أصلاً كأنواع فيروس منفصلة عندما حددت التتابعات النيوكليتيده فيها لأول مرة فوجد أن طول الأول ٣٠٣ وطول الثانى ٢٩٧. وعلى أية حال فإنهما تنوعات تتابع حقيقية لنفس الفيروس بسبب أنها تمتلك أكثر من ٩٠٪ تتابع متماثل وعن طريق الاستعمال الشائع فقط يعتبر الفيروس HSVd هو الاسم المستعمل للفيروس وكأنه فيروس منفصل. تنوعات التتابع بين التنوعات الأصلية لـ HSVd و CPFVd المذكورة فى شكل ١٦، وهى تقع غالباً فى نطاقى P، V. وفى دراسات حديثة فإن Shikata سنة ١٩٩٠ لخص التوزيع والعلاقة بين تنوعات التتابع لـ HSVd المعزولة من مدى واسع لأنواع أشجار الفاكهة، وبالنسبة لعزلة حشيشة الدينار من HSVd،

فإن هناك سبعة تنوعات تتابع أخرى تختلف في الطول من ٢٩٧ - ٣٠٣ نيوكليتيده تصل إلى ١٣ متبادل، منها سبعة insertions داخلات وثلاثة deletions مشطوبات. وبالتالي فإن HSVd يكون مماثل لـ CEVd في إظهار مجال من تنوعات التتابع في العزلات الحقلية للفيروس ومع معظم الاختلافات الحادثة في نطاقى P و V.



شكل رقم ١٦ :

رسم توضيحي للنيوكليتيدهات الواجب تغييرها لقلب HSVd ليصبح CPFVd وإن مناطق النطاقات لكل من P و V معبر عنها بشكل مستطيلات.

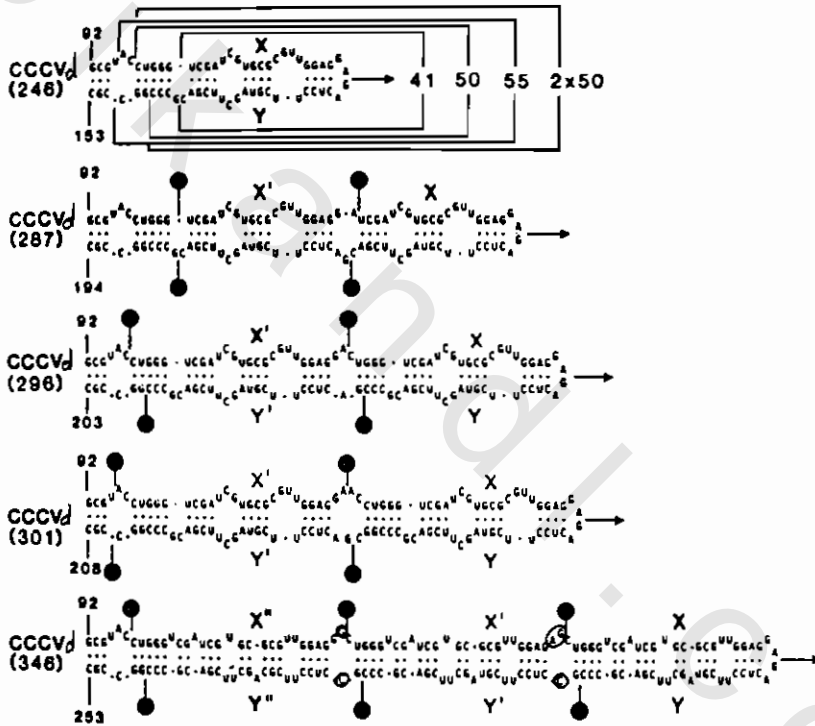
### ٣ - تنوعات التتابع فى فيروسات أخرى :

#### Sequence Variants of Other Viroids

لقد ذكر أن هناك إختلافاً فى النيوكليتيدهات فى تنوعات تتابع كانت قد وصفت فى PSTVd وبشكل أقل ذكرت فى CSVd. وكما قد ذكر سابقاً فى حالة CEVd و HSVd فإن معظم التغيرات تحدث فى نطاقى P و V.

أما فيروسد CCCVd فإنه يتميز عن جميع الفيروسات الأخرى فى كونه نوع غير عادى من تنوع التتابع ينشأ منه مثل مرض كادانج - كادانج ويتقدم فى نخيل جوز الهند المصاب. إن التتابع فى عزلات CCCVd المأخوذة من نخيل محدد ومن أوراق ذات أعمار مختلفة ضمن نخلة مفردة أظهرت ثلاثة أنواع من تنوعات التتابع

بالإضافة إلى ٢٤٦ نيوكليتيده وهي القواعد الأساسية للأنواع. هذه تشمل C in- serton في موقع ١٩٨ من نطاق C ومضاعفات نطاق T<sub>2</sub> بالإضافة إلى جزء من نطاق V من ٤١، ٥٠، ٥٥ أو ١٠٠ (٢ × ٥٠) نيوكليتيده شكل ١٧ وطفرات في القواعد المجاورة للحدود لبعض التضاعف الجزئي. يبدو أنه لا يوجد هناك إختلافاً في نطاقي P و V في تسعة عزلات منفصلة من CCCVd مأخوذة من مناطق مختلفة في الفلبين والتي أيضاً تتعارض مع المواقع في الفيرويدات الأخرى.



شكل رقم ١٧ :

تضاعف التابع في نطاقي V و T<sub>2</sub> للفيرويد CCCVd. إن طولى التابع X و Y إما ٤١، ٥٠ أو ٥٥ نيوكليتيده، تكون مضاعفة أما مرة واحدة في CCCVd (٢٨٧)، CCCVd (٢٩٦) و CCCVd (٣٠١)، أو مرتين في CCCVd (٣٤٦). تدل الأسهم في الجهة اليمنى على روابط في تتابعات X و Y بينما الدوائر المظلمة تدل على روابط التابع المضاعف. الحروف المحاطة بدائرة تدل على إختلاف تتابع في تنوع التابع.



## رابعاً: - تشخيص الفيرويدات : Diagnosis of Viroids

### مقدمة:

هناك متطلبات ضرورية لتحسين وتطوير الإجراءات لسرعة وتخصص اكتشاف الفيرويدات ذات الأهمية الزراعية ويجب أن تكون هذه الإجراءات جاهزة للاستعمال في مثل تلك المعامل كما في أقسام كليات الزراعة وشركات البذور بالإضافة إلى مراكز الأبحاث. في حالة بعض المحاصيل، مثل البطاطس وفي تحليل عينات البذور فإن هذه الإجراءات يجب أن تسمح بإجراء الإختبار يومياً لكميات كبيرة من العينات. زيادة على ذلك فإن حساسية الطريقة يجب أن تكون عالية بشكل يكفي لاكتشاف موثوق به للمستويات المنخفضة لمسببات المرض الفيرويدي بالإضافة إلى أى تنوعات تتابع يمكن أن تحدث في الحقل.

هناك عدة طرق استعملت وتستعمل في الكشف عن وتشخيص الفيرويدات نذكر هذه الطرق للإستفادة.

### ١ - الإختبارات الحيوية Bioassays :

على نحو تقليدي فإن إجراءات التشخيص لمسببات الأمراض النباتية (الفيرويدات والفيروسات النباتية) هي إجراءات حيوية وتعتبر سهلة بشكل عام وتعتبر حساسة عند مقارنتها مع بعض الطرق الأخرى. منذ اكتشاف الفيرويدات سنة ١٩٧١ أجريت أبحاثاً كثيرة لإيجاد العوائل الطبيعية للفيرويد والتي تسمى العوائل المفرقة Differential hosts والتي تعطى أعراضاً جيدة. فمثلاً فيرويد الثمرة الباهتة في الخيار CPFDV يعطى أعراضاً مميزة في الخيار لذلك ليس هناك حاجة للبحث عن عوائل معرفة أخرى. ولكن لسوء الحظ فإن معظم الفيرويدات الأخرى تظهر أعراضاً ضعيفة غير مميزة في عوائلها الطبيعية الأخرى أو تسبب أعراضاً يمكن بسهولة أن تختلط مع أعراض مسببات أخرى. فمثلاً تقزم الاقحوان المتسبب عن CSVd تختلف أعراضه كثيراً باختلاف أنواع الأقحوان التي يصيبها وكثيراً ما

يكون من الصعب توفر قاعدة تعريف تعتمد على الأعراض فى العوائل الطبيعية فقط. إلا أن الصنف المزروع Mistletoe تظهر عليه الأعراض على شكل بقع عديدة على الأوراق مميزة وبالتالي يمكن استعماله فى الفهرسة. فمثلاً تؤخذ قمم نبات ال Mistletoe وتطعم على النباتات المراد إختبارها، بعد حوالى سبعة أسابيع يمكن قراءة النتائج. إلا أن هناك عيوباً لهذه الطريقة.

أما بالنسبة لفيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس PSTVd فإن الكاشف المناسب له مهم جداً بسبب أن الأعراض على البطاطس من الصعب التعرف عليها، زيادة على ذلك فإن الإصابة فى السنة الأولى عادة ما تبقى بدون أعراض، هذا يعنى أنه من المستحيل استبعاد الفيروس من الأصول المستعملة للسنة القادمة. مع أن الفهرسة بالحقن فى نباتات الطماطم النوع Rutgers قد سبب تقدماً كبيراً فى التشخيص وأن نسبة كبيرة قد حلت، إلا أنه ليس كل الإصابات يمكن أن تظهر وتوجد وتحل بهذه الطريقة.

أجريت أبحاثاً كثيرة لزيادة تعبيرات الأعراض فى الإصابة الفيروسية على نباتات الاختبار. وجد أن ظروف النمو مهمة جداً، درجات الحرارة المرتفعة والكثافة الضوئية وطول فترة الإضاءة بشكل عام تخفض مدة الكمون وتلائم ظهور تعبيرات الأعراض. ولكن لا يوجد قانون عام فى هذا الموضوع كما ذكر Diener سنة ١٩٧٩.

هناك قليل من العوائل التى تعطى بقعاً موضعية Local lesions عند الإصابة الفيروسية (حيث أن هذه العوائل هامة فى التشخيص)، فمثلاً فيروس CSVd يسبب بقعاً موضعية على أوراق نبات Senecio cruentus بعد ١٢ - ١٨ يوم من الحقن. وكذلك وجد أن فيروس PSTVd يسبب بقعاً موضعية على نبات Scopolia sinensis.

إن التشخيص بالطرق الحيوية هى إجراءات حيوية فى الطبيعة شاملة الحقن بالعصارة أو بالتطعيم لنباتات كاشفة. هذه الإختبارات التى يبدو بأنها حساسة ودالة

على طبيعة العدوى للعامل المسبب، قد ثبت بأنها غير فعالة إلى حد ما. إن التعبير العرضي (بالأعراض المرضية) لبعض المسببات الخاصة يكون معتمداً على الجينوتايب Genotype وال phenotype وبالتالي فإن تلك الدراسات لهذه الظاهرة تصبح مؤكدة معملياً وكثيراً ما تتطلب أصناف نباتات كاشفة وفترة حضانة طويلة.

في حالة كثير من الفيروسات فإن تكشف الأعراض عادة ما يأخذ وقتاً طويلاً عنه في حالة الفيروسات. فمثلاً تكشف أعراض فيروس ASBVd يحتاج من ستة شهور إلى أكثر من سنتين بعد حقن بادران الأفوكادو القابلة للإصابة، وظهور الأعراض ليس مؤكداً ١٠٠٪. وبالتالي فإن هذا الإجراء الحيوي للتشخيص يكون عملياً فقط مع الفيروسات مثل PSTVd والتي تظهر أعراضاً خلال ٢ - ٤ أسابيع على بادران الطماطم. حتى في هذا الإجراء يمكن أن تظهر بعض الصعوبات، فمثلاً بعض سلالات الفيروس تعطي أعراضاً بسيطة جداً على نباتات الطماطم، وإن مثل هذه النباتات المصابة من الصعب تمييزها عن نباتات الكنترول السليمة. زيادة على ذلك فإنه نظراً لأن الفيروسات المختلفة يمكن أن تعطي بشكل أساسي نفس الأعراض على بادران الطماطم، لذا فإن إختبارات أخرى تكون ضرورية لتعريف الفيروس الحقيقي المسبب لإحداث الإصابة.

كثيراً من المشاكل المذكورة سابقاً والتي ترافق الإختبارات الحيوية للكائنات الممرضة الفيروسية أمكن التغلب عليها باستعمال الإختبارات المبنية على السيرولوجي. إن أكثر هذه الإختبارات شيوعاً هو إختبار ELISA الذي هو Enzyme linked immunosorbent assay الذي استعمله Clark سنة ١٩٨٤ و Cooper سنة ١٩٨٦. يعتمد هذا الإختبار على التعرف على أو تمييز الغطاء البروتيني بواسطة الأجسام المضادة Antibodies، لقد ثبت أن هذا الإختبار موثوق به ومتعدد الاستعمالات. وعلى كل حال فإن إختبار ELISA لا يتلائم مع الفيروسات نظراً لأن هذه العوامل المرضية (الفيروسات) هي أحماض نووية RNAs غير مغلفة فهي تفتقر إلى الغطاء البروتيني وبالتالي لا يمكن اكتشافها بالطرق السيرولوجية.

## ٢ - الهجرة الكهربائية في بولي اكريلاميدجيل:

## Polyacrylamide Gel Electrophoresis

إن أول إختبار بيوكيميائي - بيوفيزيائي للفيرويدات كان طريقة الهجرة الكهربائية في البولي اكريلاميد جيل (PAGE). هذه الطريقة اكتشفت بواسطة Morris & Wright سنة ١٩٧٥. وهي تعتمد على استخلاص الأحماض النووية من النسيج المصاب يتبع ذلك التحليل بواسطة Electrophoretic على ٧.٥ polyacrylamide gel. هذه الطريقة أجري عليها تحسينات وتتبع مع كثير من الفيرويدات.

تحتاج هذه الطريقة إلى يومين لكي تكتمل أما الإختبارات الحيوية مثلاً لفيرويد CSVd يحتاج ٤٩ - ٥٦ يوم. زيادة على ذلك فإن السلالات المعتدلة يمكن اكتشافها بسهولة كما هو الحال في السلالات الشديدة. إن المأخذ الوحيد على هذه الطريقة هو عدد العينات التي يمكن أن تستعمل في يوم واحد وهي محدودة في ٢٠ - ٤٠ عينة. إلا أن هناك تحسينات أدخلت على هذه الطريقة بحيث يمكن استعمال ١٠٠ - ٢٥٠ عينة ويمكن أكثر الفيرويد في نباتات الطماطم كخطوة وسيطة. هذه الخطوة الوسيطة حلت مشكلة كبيرة في هذه الطريقة وهي مشكلة النسبة المنخفضة جداً من الفيرويد في العينة النباتية.

هناك بعض الملاحظات على هذه الطريقة وهي أن سلوك الحزمة في الجيل يختلف كثيراً مع النباتات مثل الأقحوان أو أنواع البطاطس المستعملة، وبالتالي فإن قراءة النتائج غالباً ما تكون صعبة جداً. لكن بالنسبة للفيرويد PSTVd فإن هذه المشكلة قد وجد لها حلاً عن طريق استعمال الطماطم كمائل وسيط. عندئذ فإن سلوك الحزمة لـ RNA المستخلص من نباتات الطماطم يكون جيداً، وهناك فائدة أخرى لإستعمال نباتات الطماطم وهي أن الفيرويد يتكاثر في العائل الوسيط. وقد أجرى تحسين على هذه الطريقة وذلك باستبدال خطوة ال Dialysis

بخطوة Desalting باستعمال مرشح Sephadex. إن استعمال طريقة- Tomato PAGE لها ثلاثة مآخذ رئيسية هي :-

١ - تحتاج حوالى ستة أسابيع لاكتمالها.

٢ - تحتاج إلى جهد كبير.

٣ - تحتاج إلى تكاليف مادية كبيرة.

أما بالنسبة لاستعمال هذه الطريقة مع فيروسات الخيار فمن الصعب وجود عائل وسيط لها.

٣ - الهجرة الكهربائية ثنائية الاتجاه:

#### Bi - Directional Electrophoresis

إن طريقة الصبغ بمادة Toluidin blue تستعمل عادة فى طريقة - Tomato PAGE وهى ليست شديدة الحساسية. إن استعمال طريقة صبغ أكثر حساسية يمكن أن تزيد كثيراً إمكانية اكتشاف الفيروسات. وعلى أية حال إذا كانت الحزم فى الجيل الطبيعى يمكن أن تصبغ بنترات الفضة، فإن المنطقة بأجمعها التى فيها حزمة الفيروس تعين ويكون لونها مسود بسبب وجود مستوى مرتفع نسبياً من الاضطرابات فى تلك المنطقة.

عند قطع حزمة الفيروس بعيداً عن الجيل الفاصل ثم وضعها عند قاعدة جيل آخر، فإن موقع حزمة الفيروس يمكن أن يتحدد بسهولة إذا أضيف Xylene cyanol FF فى المنظم الحامل الأساسى ولكى يهاجر ال Xylene - cyanol أسرع إلى حد ما من الفيروس. الجيل الثانى هو جيل مدنتر يحتوى ٧ مول يوريا ويسيل على حرارة ٦٥ م.

كما هو معروف فإن الفيروسات هى جزيئات ذات تركيب دائرى، تحت ظروف الدنترة فإن الجزيء يفقد تركيبه المعقد وعند الهجرة الكهربائية فإن الجزيئات

الدائرية سوف تتحرك ببطء أكثر من الأفراد الملتوية (غير الدائرية). أما الجزيئات الأخرى الموجودة في منطقة الفيرويد والتركييب المستقيم سوف لا تتأثر في حركتها النسبية بواسطة التغير في ظروف ال Electro phoretic. نتائج هذه الطريقة واضحة في شكل ١٨. كل الجزيئات المسببة للاضطرابات حول حزمة الفيرويد في الجيل الأول تتحرك بسرعة أكثر نسبياً، بينما جزيئات الفيرويد التي تتحرك ببطء تكون موجودة بالقرب من موقع الإبتداء في منطقة تكون خالية كلية من أى أحماض نووية أخرى والتي تسمح بالاستعمال لنظام الصبغ الحساس مثل نترات الفضة.

ولكى نثبت أن هذه المنطقة (الحزمة) هي فعلاً حزمة للفيرويد المطلوب، تقطع هذه الحزمة بعيداً عن الجيل ويستخلص الحمض النووي من الحزمة ويحقن في نباتات كاشف (مثلاً الطماطم لفيرويد PSTVd) عندها تتكشف أعراض نموذجية لتلك الفيرويد.



شكل رقم ١٨ :

إختبار الهجرة الكهربائية ثنائية الاتجاه للفيرويد PSTVd. في الجزء السفلى في الجيل - الفيرويد - ملاحظ في مستخلص النباتات المريضة ويشار إليه بالسهم.

## تحضير العينات:

يؤخذ ١ غرام من الأوراق وتسحق في ضاغط بينما يضاف ٠,٤ مول منظم الذى تركيبه (10 mM tris - HCl, 1 mM EDTA, 2% SDS, pH8) و ٠,٦ مول فينول مشبع بالماء يحتوى ١,٠٪ من hydroxyquinoline - 8 تضاف إلى عجلات الضغط، يضرب المخلوط ليتجانس لمدة ١,٥ دقيقة باستعمال Whirlmix. يوضع فى آلة الطرد عن المركز، بعد ذلك يؤخذ ٤٠٠ ميكولتر من العائم وترسب الأحماض النووية التى فيه بالايثانول. يعاد تعليق الكريات الصغيرة فى ٥٠ ميكولتر ماء وبعد إضافة ١٠ ميكولتر محلول مائى محتوياً ٤٠٪ سكروز، ٢٥٪ من Xylene - Cyanol FF و ٠,١٪ بروموفينول أزرق، يوضع المخلوط كله فوق الجيل.

يمكن تبسيط الإجراءات كالتالى:-

تستمر الهجرة الكهربائية تحت الظروف الطبيعية حتى يصبح The Xylene - Cyanol FF فى قاع الجيل، بعد ذلك تعكس قوة القطبية ونفس الجيل بهاجر كهربائياً على حرارة ٧٥م. فى هذه الحالة يمكن استعمال منظم واحد 20 mM tris 19 mM PO3 H3 ، 0.06 mM EDTA pH 8.3 ، . هذا الإجراء يحتاج قليل من التعديل فى الصبغ بالفضة: يجرى غسيل وتثبيت لمدة ١٥ ثانية بدلاً من ٢ × ١٠ ثانية، يكون الصبغ بـ ٠,٠٩٥٪ نترات فضة بدلاً من ١,١٩٪ نترات فضة. السائل المتكون يخفف بنسبة ١ : ١ بماء، هذا يحتاج لوقت من ١ - ٤٠ دقيقة. ويمكن ملاحظة ما يلى:-

١ - إن هذه الطريقة سريعة حيث أن الإجراء كله إبتداءً من قطف الأوراق حتى قراءة النتائج يكون فى حوالى ٨ ساعات.

٢ - الطريقة حساسة جداً حيث يمكن اكتشاف ٥ نانوغرام من الفيرويد / أثر فى الجيل. وبإجراء حسابات بالكمبيوتر يمكن أن نكتشف ١٠ نانوغرام فيرويد لكل غرام من الأوراق، وبهذه الحالة فإن هذه الطريقة تكون حساسة كما فى حالة طريقة التهجين الجزيئى (جدول ١٢).

٣ - هذه الطريقة أكثر أماناً حيث أنها مبنية على معيارين يصبح الفيرويد واضحاً عن طريق الصبغ وإن الصبغ يكون في مكان منخفض في الجبل وبالتالي فإن الفرصة الخاطئة بواسطة false positives (الكولونات الخاطئة) تكون منخفضة.

٤ - لا تتطلب كيمويات خطيرة مثل الفسفور المشع.

جدول ١٢: مقارنة بين طريقة الهجرة الكهربائية ثنائية الاتجاه BDE وطريقة التهجين الجزيئي لـ cDNA في مقدرتها على اكتشاف فيرويد PSTVd.

حجم العينة	الكمية المكتشفة		الطريقة
	مطلقة	تركيز / غرام من الأوراق	
٦٠ ميكولتر (٠,٥ غرام من الأوراق)	٥ نانوغرام	١٠ نانوغرام	BDE
٣ ميكولتر (٠,٠٠٦ غرام من الأوراق)	١٢٥ - ٢٥٠ بيكوغرام	٢٠ - ٤٠ نانوغرام	cDNA

وإذا وضعنا في الاعتبار المعلومات الآتية:

١ - تركيز الفيرويد PSTVd ١٥٠٠ - ١٩٠٠ نانوغرام / غرام أوراق.

٢ - تركيز الفيرويد PSTVd ١٢٦٠ نانوغرام / غرام من القمة النامية في النبات.

٣ - تركيز الفيرويد CSVd ١٢٠٠ نانوغرام / غرام أوراق.

يتبين لنا أن كلا الطريقتين تلائم متطلبات اكتشاف PSTVd و CSVd في النباتات المريضة. كذلك فإن المعلومات تدل على أن العينات يمكن أن تختبر بنجاح. في تجربة مع PSTVd وجد أن تحضير العينة كما سبق ذكره، بها نستطيع اكتشاف عينة مريضة واحدة مع ٤٩٩ عينة سليمة وأن حذف الترسيب بالإيثانول



واستعمال طور مائي مباشرة للهجرة الكهربائية، عندها يمكن إكتشاف عينة مريضة واحدة من بين ١٩٩ عينة سليمة.

#### ٤ - التهجين الجزيئي Molecular Hybridization :

بسبب أن طريقة التهجين الجزيئي ذات حساسية عالية وتسمح باستعمال اعداداً كبيرة من العينات فى وقت واحد، لذلك يجب استعمال منقبات cDNA . يجب أن يحضر نسخة كاملة الطول من cDNA للفيروس ويجرى لها كلونة فى البكتريا E. coli .

فى طريقة التهجين الجزيئى يؤخذ 3 UI aliquots من العصارة أو من مستخلص الحمض النووى من المادة المراد إختبارها وتوضع على Nitrocellulose filter . يرتبط الحمض النووى مع الفلتر عن طريق التحميص baking و-The Filter Pre - hybridized . وبعد ذلك يحضن الفلتر مع العينات - nick - translated PSTVd - p<sup>32</sup> cDNA وذلك لإحداث تهجين جزيئى فى هذه البقع حيث يوجد الفيروس. هذه البقع تصطاد النشاط الاشعاعى الذى بعد ذلك يمكن اكتشافه باستعمال التصوير بالاشعاع الذاتى .

من كمية مطلقة فى الصغر ١٢٥ - ٢٥٠ بيكوغرام / بقعة وعلى إفتراض أن ١ غرام من الأوراق تحتوى ٠,٥ مل عصارة يمكن أن نحسب بأن هذا النبات فيه تركيز ٢٠ - ٤٠ نانوغرام من الفيروس لكل غرام من الأوراق ويمكن أن تكتشف بهذه الطريقة. يمكن أن يضاف عينات كبيرة إلى الفلتر. إلا أن هذه التجارب فشلت بسبب أن بعض المواد لا ترتبط بشكل خاص مع الفلتر وتفقد خلال Pre - hybridization .

إن إختبار PAGE أقل حساسية ويمكنه أن يكتشف أى كمية مطلقة بحدود ٢٠٠ نانوغرام من الفيروس لكل حزمة فى الإختبار، ويمكن أن يكتشف تركيز ١٠٠ نانوغرام من الفيروس لكل غرام من الأوراق. أما طريقة cDNA تستطيع أن تكتشف ١٢٥ - ٢٥٠ بيكوغرام من الفيروس لكل حزمة فى الإختبار، ويمكن

أن يكتشف ٢٠ - ٤٠ نانوغرام / غرام أوراق. يعود ذلك بسبب أن العينات تكون أكبر من طاقة PAGE منه في طريقة cDNA.

مع أن إختبار التهجين الجزيئي على الحساسية ويمكن أن يستوعب أعداداً كبيرة من العينات إلا أنه ليس مناسباً للتطبيقات على نطاق واسع في معامل وقاية النبات.

#### ٥ . طريقة Dot - Blot Hybridization وتكتب DBH :

##### مقدمة :

إن أكثر طرق التشخيص حساسية وملائمة ومتخصصة لاكتشاف الفيرويدات ولا يزال استعمالها جارٍ هي الطريقة القياسية التي تسمى - Standered dot - blot hybridization. كان أول تقرير عن اكتشاف كائن ممرض للنبات بواسطة DBH استعمال DBH عن الفيرويد PSTVd وذلك بواسطة العالم Owens et al سنة ١٩٨١. في هذا التكنيك يستعمل شظية من حمض نووي (منقوب Probe) إما مشعة أو غير مشعة. هذه الطريقة أصبحت شائعة الاستعمال الآن في كثير من البلدان كطريقة روتينية لاكتشاف مجال واسع من الفيرويدات. على الرغم من أن طريقة DBH ملائمة التخصص وعالية الحساسية لبعض الفيرويدات حيث أنها يمكن أن تكتشف مدى منخفض جداً ١٠-١٢ غرام (picogram) في كثير من المستخلصات النباتية، إلا أن لها بعض العيوب وهو طول الوقت اللازم للحصول على تحضيرات مستخلص النبات الشامل (٢٤ ساعة تقريباً) ويمكن أن تحتاج ٤٨ - ٧٢ ساعة لاكتشاف المنقوب المرتبط. وبالتالي فإنه من المرغوب فيه أن يكون هناك تصميمات لطريقة أسرع، أبسط وحتى أكثر حساسية في التشخيص.

إن الدراسات المبكرة التي كانت تجرى على تهجين الأحماض النووية الفيروسيية في النبات كانت تستعمل السائل أو محلول التهجين وذلك من قبل Gould & Symons سنة ١٩٨٣. في هذه الطريقة يحضر خيط مفرد من cDNA فيه فسفور مشع ٣٢ (p<sup>32</sup> - cDNA) مقابل لـ RNA لفيرس معين أو فيرويد وهذا يهجن في

محلول لمدة ١٩ - ٢٤ ساعة مع تحضير من حمض نووي منقى جزيئاً من نباتات مصابة. عندئذ يعامل مخلوط التهجين بأنزيم Nuclease S1 والذي هو مخصص للأحماض النووية أحادية الخيط. تحت الظروف المستعملة فإن أى من cDNA - p<sup>32</sup> احادى الخيط غير مهجن يجرى له عملية تحليل مائية إلى أحادى النيوكليوتيدات أو قطعة صغيرة من قليلة النيوكليوتيدات Oligonucleotides بينما لا يتأثر التهجين الناتج وهو RNA : cDNA - p<sup>32</sup>، ما عدا التحليل المائى لأطراف أى حمض نووي احادى الخيط. بالإضافة لذلك فإن أى جزء من cDNA - p<sup>32</sup> الموجود فى مناطق عدم التزواج يعنى (عدم التطابق Mismatched) من التهجين الخاطى لـ: cDNA RNA فإنه يذهبهم. أما التهجينات الباقية الثابتة RNA : cDNA - p<sup>32</sup> عندئذ تجمع بالترسيب الحمضى وتعد. كان الكنترول دائماً يشمل cDNA - p<sup>32</sup> مهجناً مع نظيره RNA (هذا يعنى مع RNA الذى عنه كان قد حضر cDNA)، بسبب تهجينات الكنترول هذه فإنه ينشأ ٨٠ - ٩٠٪ من أقصى حد نظرى. بالإضافة لذلك فإن هناك Background control أساسى يتكون من منقب cDNA - p<sup>32</sup> مهجن مع مستخلص حمض نووي محضر من نباتات سليمة.

هذا التكنيك وصف أساساً لفهرسة فيروس ASBVd وله عدة إنتقادات هي: -

- ١ - الطبيعة المملة لهذا التكنيك نفسه.
  - ٢ - يظهر قيم غير واضحة للكميات المحسوبة دائماً أو أحياناً.
  - ٣ - غير مناسبة لدراسة كميات كبيرة من العينات.
- وبالتالى فإن تكنيك التهجين فى السائل قد توقف حالياً بواسطة استعمال طرق أكثر كفاءة وحدائة من DBH.

إن أساسيات DBH سهلة حيث أن DNA أو RNA المدتر يجمد فى مكانه على دعامة غير فعالة مثل نترولوسيلوز أو أغشية نايلون بطريقة يمنع فيها التلدن

الذاتي Self annealing بجانب توفر تتابعات للتهجين مع منقّب من حمض نووي مضاف. هذا المنقّب يمكن أن يعلم بنوع من النظائر isotope ( $p^{32}$ ) أو بإشارى غير نظير nonisotopic ligand مثل بيوتين أو Digoxigenin أو معلم مباشرة بأنزيم Horseradish peroxidase أو alkaline phosphatase. بعد التهجين يجرى عملية غسل واسعة للراشح يزيل المنقّب المهجن بنسبة بسيطة أو غير المتفاعل. يكون اكتشاف الهجن المرتبطة بواسطة أى من :-

١ - Autoradiography .

٢ - Enzymatic Colorimetric Detection .

٣ - Chemiluminescence .

بينما تعتبر طريقة DBH هى حالياً على نحو عام الطريقة الممتازة لتشخيص مسببات أمراض النبات، إلا أنه يجب أن نتذكر أنها يجب أن تشمل تطبيق مباشر على راشح الحمض النووى غير المجزئ. إن هذه الطريقة لا تميز حجم جزيئات الهجن وبالتالي فإن علامة التهجين تكون عبارة عن مجموع التتابعات المهجنة مع المنقّب تحت الظروف المستعملة. هناك تكتيكات يسمحان بالتحليل الكيفى لأنواع الحمض النووى هى Northern blotting protocole و Southern blotting proto- cole. هنا فإن أنواع DNA أو RNA أولاً تقسم إلى أجزاء تحلل بواسطة ال Agarose أو بالهجرة الكهربائية فى الجيل-Polyacrylamide gel electrophore. ثم بعد ذلك تنقل بواسطة Blotting من الجيل إلى مرشح نتروسليلوز بيولوجى والذي بعد ذلك يستعمل فى التهجين. تدل النتائج على اختلاف الحجم والكميات النسبية التقريبية للأنواع المفردة.

أ: التعرف على الفيرويد باستعمال منقّبات مشعة:

#### Detection of Viroid by Using Radioactive Probes

إن طرق التعرف على الفيرويدات المبنية على طريقة DBH والمتضمنة استعمال منقّبات مشعة قد استخدمت بنجاح فى السنوات الحديثة. لقد أثبتت هذه الطريقة

ثقة وحساسية كبيرتين، وأمكن بواسطتها التعرف وإكتشاف الفيروسات الموجودة على مدى منخفض جداً يقدر بالبيكوغرام فى كثير من عصارات النبات. كما هو واضح فى جدول رقم ١٣ قائمة بالدراسات التى استعملت فى هذا المجال للتعرف وإكتشاف العديد من الفيروسات فى المدة من ١٩٨٥ - ١٩٩٠. كما يمكن أن نلاحظ فإن هذا التكنيك له مدى استعمال واسع وهو فى الوقت الحاضر الطريقة الروتينية المستعملة فى التعرف على الفيروسات فى كثير من البلدان.

من جدول رقم ١٣ يمكن ملاحظة أن هناك أنواعاً مختلفة من المنقبات قد استعملت فى التعرف على الفيروسات من هذه المنقبات.

١ - cDNAs أحادى الخيط (هذا يحضر أما بواسطة primer extension لإعادة الاتحاد فى الفاج  $M_{13}$  DNA أو بواسطة النسخ العكسى للحمض RNA الفيروى).

٢ - إعادة الاتحاد Recombinant لـ DNA ثنائى الخيط.

٣ - RNAs ذات خيط وحيد مصنعة فى المعمل.

٤ - نيوكليوتيدات قصيرة محضرة صناعياً.

إن أكثر الطرق شيوعاً لتحضير المنقب هى إعادة الاتحاد لكلونات DNA، مثل هذه الكلونات تسمح بالعزل لكميات كبيرة من الحمض النووى، وهكذا تكون ضرورية للمدى الواسع من العمل التشخيصى. وكذلك فإنها تزود العمل بتخصص عال ومصدر يمكن تجديده بسهولة. هناك شرح كبير عن المنقبات وتحضيرها واستعمالها مذكور بواسطة McInnes & Symons سنة ١٩٨٩ فى كتاب Nucleic acie probes.

جدول رقم ١٣: دراسة Dot - blot Hybridization: التعرف على مدى من الفيروسات باستعمال المنقبات المشعة من سنة ١٩٨٥ إلى سنة ١٩٩٠.

الفيروس	رقم المنقب	الاستخلص	مدى الصساسية على RNA فيروس نفى بالبيكوجرام
ASBVd	١	حمض نووي منقى جزئياً	٥
	٣	عصارة ورقة افوكادو	-
	١	حمض نووي من ورقة افوكادو	-
ASSVd	٤	RNA الكلبي، جلد ثمرة التفاح، قلف أو ورقة، بذرة.	-
CCCVd	١	حمض نووي ورقة نخيل جزر الهند.	-
CCCVd	١	حمض نووي، ورقة نخيل جزر الهند أو ورقة نخيل الزيت.	-
CEVd	١	عصارة الأبقوان أو حمض نووي من النبات.	١٠٠ - ٥٠
		<b>Gynura aurantiaca</b>	
CEVd	١ و ٤	حمض نووي، ورقة حمضيات أو قلف ورقة أبقوان.	-
CSVd	٢	عصارة أبقوان.	٥
	٢	حمض نووي ورقة أبقوان.	-
	٥	عصارة أبقوان.	أقل من ١
HSVd	٢	حمض نووي ورقة خشيشة الدينار	-
PSTVd	٢	عصارة بطاطس، نموات بطاطس.	٨٠
	١	حمض نووي، ورق بطاطس أو طماطم.	-
	٤، ٢	مخلوط متجانس من ورقة بطاطس أو طماطم.	١,٤ - ١١,٢
	٢	حمض نووي خام، ورقة بطاطس أو طماطم.	٥٠
	١	حمض نووي ورقة بطاطس أو درنه.	-
	٤، ٢، ١	مخلوط متجانس من ورقة طماطم، ورقة بطاطس، تبرعات بطاطس أو بذور حقيقية للبطاطس، درنه بطاطس.	١٠٠ - ٠,٣٣
	٢، ١	حمض نووي، ورقة بطاطس أو طماطم.	-
	٢	عصارة خلية ورقة طماطم.	٢٠
	٤	حمض نووي، ورقة طماطم.	حوالي ١
	٥	عصارة طماطم.	أقل من ١

أرقام المنقبات تضر:

١ = خيط واحد من cDNA، ٢ = إعادة إنتاج بلازم DNA نهائي الخيط

٣ = قليل من النيوكلييدات المصنعة، ٤ = Sp6 RNA Polymerase transcript.

٥ = T<sub>3</sub> or T<sub>7</sub> RNA polymerase transcript.

فيما يتعلق بطبيعة ونقاوة مستخلص الحمض النووي من النبات المنقول على نتروسيليلوز أو نايلون، فإن العينات يمكن أن تختلف بشكل كبير (جدول ١٣). ومن الجدير بالاهتمام أن الفيروسات بتركيبها الثانوي العال من RNA ترتبط مع النتروسيليلوز بدون متطلبات الخطوة الأولية من الدنترة، من المحتمل أن تحدث الدنترة خلال خطوة التحميص على درجة ٨٠م in Vacuo لمدة ساعتين وذلك لتجميد عينات ال RNA على الفلتر. يحصل على أقوى علامات التهجين عادة باستعمال عينات غير بروتينية نظراً لأن التجمد المشترك للبروتين يتنافس مع الحمض النووي على مواقع الارتباط وتنضم أيضاً إلى ال Background. لهذا السبب فإن كثيراً من إجراءات طريقة DBH في الاستعمال الحالي تستخدم درجة تنقية الفيئول. على أية حال وكما يمكن ملاحظته من جدول رقم ١٣ فإن كلاً من عصارة النبات ونسيج الورقة المتجانس نسبياً يمكن أن يضاف إلى النتروسيليلوز مؤدية إلى إكتشاف الفيروس.

لقد تم بنجاح تطوير طريقة مثالية من DBH بمنقبات cDNA - p<sup>32</sup> للاكتشاف الروتيني لكثير من فيروسات النبات. فمثلاً إن فيروس ASBVd قد تم اكتشافه عند وجوده على مستوى منخفض يقدر بحوالي ٢٠ بيكوغرام لكل وزن غرام واحد من الأوراق الطازجة، باستعمال مستخلصات حمض نووي منقى جزئياً. المنقب الذى كان يستعمل روتينياً هو خيط مفرد من cDNA معلماً بفسفور مشع ٣٢ وكان يحضر من إعادة الاتحاد لكلونة DNA محتوية على كلونة ذات طول كامل من ال monomer تدخل فى ASBVd فى الخيط المفرد من الناقل M13 phage. هذا الموضوع أُثبت بأنه ذو فائدة كبيرة فى السنوات الأخيرة عند اكتشاف عديد من الفيروسات فى مدى مختلف من مستخلصات نبات من استراليا.

لقد ذكر White & Bancroft سنة ١٩٨٢ أنه من الممكن إحداث زيادة معتبرة فى قوة إشارة الهجين بواسطة إجراء معاملة لفترة وجيزة للنسيج أو مستخلص الخلية بـ ٢٠٪ (W/V) فورمالدهيد لكل ١٠× SCC محلول لمدة ١٥ دقيقة على ٦٥م

قبل نقلها على النتروسيليز وقبل تحميتها في *in Vacuo* على درجة ٨٠م لمدة ساعتين. عندما تضاف إلى مستخلصات نبات من الأقحوان، جوز الهند أو نخيل الزيت أو من البطاطس أو الطماطم لتشخيص الفيرويد فإن زيادة مشابهة في قوة إشارة التهجين قد لوحظت. هذه الملاحظة يمكن أن تكون بسبب الدنتره الكمية للحمض RNA في الفيرويد و / أو بسبب الارتباط العال مع النتروسيليز. ولسوء الحظ فإن المستخلصات المحضرة من نسيج نبات مصاب بـ HSVd أو ASBVd ومعامل بالحرارة مشابهاً لما هو في حالة وجود الفورمالدهيد ويظهر روتينياً خفض في قوة الإشارة بعد التهجين. هذا التأثير كان متغيراً إلى حد ما، بينما معظم المستخلصات أظهرت نقصان ملحوظ في الإشارة، يعطى المستخلص العرضي نقصان غير ملموس. إن الطبيعة الحقيقية للعوامل الداخلة في ذلك لم يجرى عليها إختبارات زيادة. وعلى أية حال فإن معاملة مستخلصات النبات المصاب بفيرويد HSVd و ASBVd في غياب الحرارة قبل خطوات نقلها وتحميصها يعطى تقريباً زيادة الضعف في قوة إشارة التهجين.

ب: التعرف على الفيرويد باستعمال منقبات غير مشعة:

### Detection of Viroid by Using Non - radioactive Probes

#### ١ - منقبات معملة بالبيوتين Biotin - Labeled Probes

إن الحاجة إلى طرق تشخيصية روتينية للفيرويد مبنية على إجراءات بسيطة لا يستعمل فيها الإشعاع أصبحت الآن في متناول اليد. هناك طرق عديدة متوفرة الآن في تعليم الحمض النووي ومنقبات من نيوكليوتيدات قصيرة تسمى nonisotopically بواسطة إما تقنيات أنزيمية أو كيميائية. يحوى جدول رقم ١٤ قائمة دراسات على طريقة DBH مستعمل فيها منقبات RNA و DNA معاملة بالبيوتين Biotinylated للتعرف واكتشاف مدى من الفيرويدات أجريت من سنة ١٩٨٨ - ١٩٩٠. ومن جدول رقم ١٤ يتبين لنا أن طريقة التعليم المفضلة حالياً لتعليم منقب الفيرويد nonisotopic هي التعليم بالبيوتين.



لقد استعملت المواد Photobiotin و Photoactivatable analog of biotin لإنتاج منقبات من إعادة الاتحاد لـ DNA معاملة بالبيوتين للتشخيص الروتيني للفيرويدات في مستخلصات النبات. يتكون آل Photobiotin من بيوتين مرتبطاً مع ذراع رابط مشحون يوصل بمجموعة Photoreactive aryl azide. عندما يعرض مخلوط من حمض نووي و Photobiotin إلى ضوء قوى واضح لمدة ١٥ - ٢٠ دقيقة فإن مجموعة aryl azide تنقلب إلى aryl nitrene شديد التفاعل والذي يسمح بتكوين روابط مع الحمض النووي. مع أن الأصل الدقيق (الصحيح) ومواقع الروابط غير معروفة فإن الرابطة تكون ثابتة تحت ظروف التهجين القياسية ومن المفترض أنها تساهمية. تحت الظروف المحددة والموصى بها فإن بيوتين واحد يقترن مع كل ١٠٠ - ١٥٠ قاعدة من الحمض النووي. مثل هذا المدى من التعليم يكون من غير المحتمل لأن يتدخل في تهجين المنقب المعامل بالبيوتين مع تتابعات الهدف المتتامة (المتتامة لبعضها البعض).

إن منقبات DNA المعاد صياغتها Recombinant والمعاملة بالبيوتين المذكورة سابقاً تحتوي إما جزء من الطول أو الطول الكامل لـ monomer Viroid مغروزة في ناقلات البلازميد pSP64 أو pUCq حيث تستعمل بنجاح للتعرف على HSVd، CSVd، CCCVd، ASBVd، PSTVd في مستخلصات حمض نووي منقى جزئياً مأخوذ من أنسجة النبات. مستخلصات النبات المأخوذة من مدى واسع من عينات الحقل توضع على نتروسيليلوز وتعرض للتهجين، DNA المعلم بالبيوتين الذي ارتبط مع الحمض النووي الهدف اكتشف عن طريق إتحاده مع an avidin - alkaline phosphate. تحت طريقة التهجين المعينة وظروف الغسيل، فإن كل منقب مفرد لفيرويد كان متخصصاً وكل فيرويد كان يكتشف بحساسية مشابهة لتلك المتحصل عليها عند استعمال نفس أو شبه المنقب المعلم بالفسفور المشع .٣٢

جدول رقم ١٤: دراسات على DBH لاكتشاف مدى من الفيرويدات باستعمال منقبات غير مشعة. الدراسة من ١٩٨٨ - ١٩٩٠.

الفيروس	نوع المنقب	تعلم المنقب	المستخلص	مدى الحساسية بالنيكوغرام
١ - ASBVd	١	فوتويوتين	حمض نووي، ورقة افوكادو	٥
٢ - CCCVd	١	فوتويوتين	حمض نووي، ورقة نخيل جوز الهند	لم تحدد
٣ - CSVd	١	فوتويوتين	حمض نووي، ورقة أقحوان	لم تحدد
٤ - CSVd	٣	Bio-11-UTP	عصارة أقحوان	٥
٥ - HSVd	١	فوتويوتين	حمض نووي، ورقة حشيشة الدينار	لم تحدد
٦ - PSTVd	١	فوتويوتين	حمض نووي، ورقة طماطم أو بطاطس	لم تحدد
٧ - PSTVd	٢	Bio-11-UTP	حمض نووي، ورقة طماطم	٨٠
٨ - PSTVd	٣	Bio-11-UTP	عصارة طماطم	٥

المنقبات:

١ = DNA بلازميد نائي الخط معاد صياغته، ٢ = Sp6 RNA polymerase.

٣ = نسخة من T<sub>3</sub> or T<sub>7</sub> RNA polymerase.

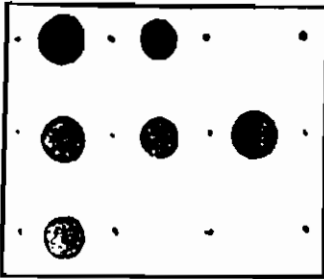
يظهر في شكل ١٩ دراسة نموذجية لطريقة DBH بدون إشعاع لاكتشاف RNA للفيروس HSVd. حضرت مستخلصات من نسيج ورقة مصابة (بقع ٢، ٤ إلى ٧) أعطت إشارات موجبة للتهجين، بينما المستخلصات المحضرة من مواد ورقة سليمة (بقع ٣، ٨، ٩) أظهرت عدم التهجين. كما هو متوقع فإن ٢٠٠ بيكوغرام RNA لفيروس HSVd نقي (بقعة ١) أعطت إشارة تهجين قوية.

هناك طريقة بديلة لاكتشاف الفيروس بواسطة وسائل غير مشعة، يكون باستعمال منقب RNA معامل بالبيوتين (Biotinylated RNA). هنا تتم معاملة RNA بالبيوتين في فاج نظامي Sp6 عن طريق نظام نسخ RNA polymerase باستعمال رايونيوكلوتوتايد معاملة بالبيوتين (Bio-11-UTP) الذي يكون فيه

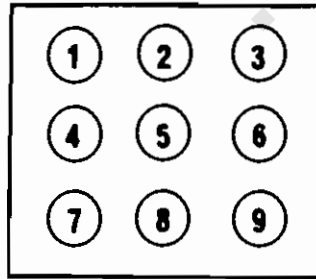
الرايوز متناظراً مع Bio - 11 - deoxyuridine triphosphate والذي يكتب باختصار (bio - 11 - dUTP). مثال على ذلك لتحضير Sp6 RNA احادى الخيط معاملة بالبيوتين لاستعماله كمنقب، فإن تتابع DNA مناسب يكون أولاً فى ناقل مناسب والذي يحوى المحفز Sp6 قبل بدء النسخ من المنطقة عديدة الوصلات (ناقلات pSP64 و pS p65). بعد جعل DNA clone بشكل مستقيم بعد بدء النسخ من الجزء الداخلى المكلون، فإن RNA المنسوخ ذو الطول المحدد ينتج بواسطة Sp6 RNA polymerase مستعملاً ATP، CTP، GTP و bio - 11 - UTP كمواد تفاعل.

بالإضافة إلى النظام المذكور سابقاً فإن فاج T<sub>3</sub> RNA polymerase و T<sub>7</sub> يمكن أن يستعمل بطريقة مشابهة. ولسوء الحظ فإن RNA Polymerase لثلاثة فاجات (SP6، T<sub>7</sub>، T<sub>3</sub>) تختلف فى مقدرتها على ادخال bio - 11 - UTP فى الحمض RNA. إن أنزيم الفاج T<sub>3</sub> يدخل bio - 11 - UTP بأعلى كفاءة وإنه يصنع تقريباً ثلاثة أمثال الحمض RNA المصنع بواسطة أنزيم الفاج SP6 وضعف ما يصنعه أنزيم الفاج T<sub>7</sub>. وعلى أية حال فإن منقبات RNA المعامل بالبيوتين وجد أن استعمالها محدد فى تشخيص الفيرويد. كما هو فى جدول ١٤ استعمل فى اكتشاف PSTVd و CSVd فى مستخلصات النبات.

A



B



شكل رقم ١٩ :

اكتشاف فيرويد تقزم حشيشة الدينار فى أوراق حشيشة الدينار الاسترالى بواسطة التحليل بطريقة Dot - blot hybridization. عينة رقم ١ تعنى ٢٠٠ ميكروغرام منقى من RNA للفيرويد HSVd، عينة ٢ تعنى نسيج مصاب من فيرويد HSVd. عينة ٣ نسيج سليم من حشيشة الدينار. العينات من ٤ - ٩ عينات مأخوذة من نباتات نامية فى الصويا الزجاجية. B مواقع العينات على غشاء نتروسيليلوز.

## ٢ - منقبات معملة بالداى جوز جنين Digoxigenin labeled Probes :

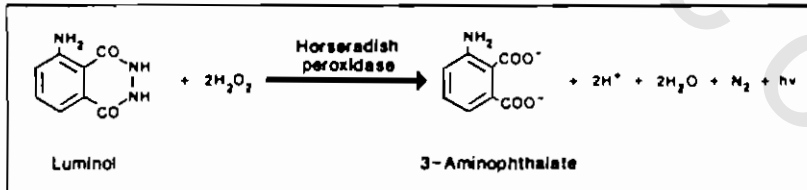
إن مادة الداى جوز جنين عبارة عن ستيرويد نباتى والذى يتكون على وجه الحصر فى نبات *Digitalis*، يمكن أن يستعمل كإشارى بديل Alternative ligand لليوتين وذلك لتحضير منقبات من RNA ومن DNA معاد صياغته. مع أن هذه الطريقة قد وجدت تطبيقاً مباشراً فى تشخيص الفيروسيدات، إلا أنه لا يوجد أى سبب يوضح لماذا لم تقابل نجاحاً كبيراً. التعليم الأنزيمى للداى جوز جنين فى منقب DNA يكون متمماً بواسطة Random - primed أو Nick translated تندمج مع Digoxigenin - 11 - deoxyuridin triphosphate والتي تكتب باختصار (dig - dUTP) مستعملاً أنزيم Klenow أو بواسطة النهاية 3` لمنقبات DNA المعلم والذى هو أقل من ٢٠٠ قاعدة زوجية مع وجود أنزيم transferase الطرفى Terminal transferase. كما وأن المنقبات من RNA المعلمة بمادة داى جوز جنين يمكن أن تصنع فى المعمل بنسخ ال DNA أو الكلونة قبل بدء النسخ فى كل من SP6، T7 أو مناطق المحفز أو تتابع الابداء Promoter فى T3 مع استعمال ال polymerase الخاص واستعمال dig - UTP كمادة تفاعل. كما وأن تعليم منقبات إما DNA أو RNA يمكن أن تتحقق بواسطة الأشعة فوق البنفسجية المحفزة catalyzed تندمج مع Photodigoxigenin أو كاشف يحتوى داى جوز جنين مرتبطاً مع ذراع مبادئ مع مجموعة azido - Phenyl (Photoactivated). إن الإشعاع بالأشعة فوق البنفسجية ( $260 \text{ nm} < \lambda < 300 \text{ nm}$ ) تؤدي إلى تفاعل غير معكوس ذو ازدواج ثابت واندماج حوالى واحد من الداى جوز جنين لكل ٢٠٠ - ٣٠٠ من المتبقى.

بعد التهجين مع الحمض النووى الهدف، فإن الهجن تعرف بواسطة ELISA باستعمال تزاوج الأجسام المضادة (هذا يعنى تزاوج Anti - digoxigenin alkaline Phosphate) وتفاعل لوني للمحفز الأنزيمى. إن اكتشاف المنقبات المعاملة بالداى جوز جنين بواسطة الكيماويات المتألقة Chemiluminescence يكون أيضاً إختيار



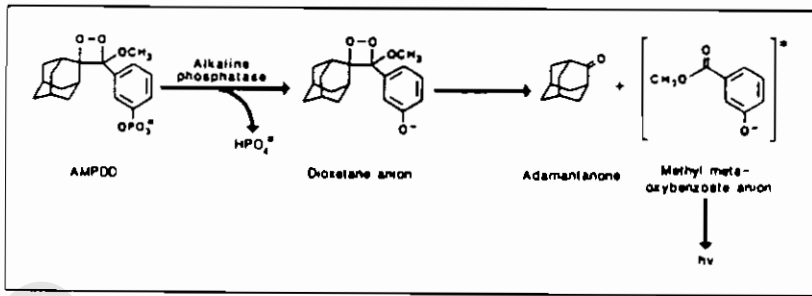
إن كلاً من منقبات الحمض النووي المعلم بالبيوتين المتحد مع-Avidin streptav- idin - alkaline phosphatase والمنقبات قصيرة النيوكليوتيدات المعلمة مباشرة بمادة alkaline phosphatase يمكن أن تكتشف بسهولة على أغشية خلال تفاعلات تهجين عادية وباستعمال فلم أشعة X. إن الميكانيكية التي تؤدي إلى AMPPD الكيماوية المتألقة في وجود alkaline phosphatase يشمل خطوتين وظاهرة في شكل ٢١. في الخطوة الأولى يحدث فصل للفوسفات بواسطة أنزيم alkaline phosphatase ويتولد مادة ثابتة نسبياً اسمها Dioxetane anion. أما الخطوة الثانية فتشمل تحطيم كبير لمادة Dioxetane anion لتكون مادة Adamantanone وتنتقل الشحنة ويتكون حالة مثارة (متهيجة) من مادة Methyl meta - oxybenzoate anion والتي ينبعث منها إضاءة. عند مقارنة حساسية كل من AMPPD ومادة الكروموجنك BCIP / NBT والتي تتكون من -5 - bromo - 4 - chloro - 3 - indo والتي تتكون من -5 - bromo - 4 - chloro - 3 - indo - yl - phosphate / nitro blue tetrazolium salt monohydrate.

في التعرف على alkaline phosphatase. قد أجريت في إختبار تهجين منقب DNA مع أنتجين DNA المركزي لفيرس التهاب الكبد B. إن حساسية الإختبار قد تحسنت بأكثر من رتبتين تكبير باستعمال موضوع الكيماويات المشعة وباستعمال مادة AMPPD أيضاً تقلل وقت الاكتشاف من ٢٤٠ دقيقة تقريباً إلى ٣٠ دقيقة.



شكل رقم ٢٠:

صيغة تفاعل الكيماويات المتألقة الداخل فيه ليمونول.



شكل رقم ٢١ :  
تفاعل الكيماويات المتألقة الداخل فيه AMPPD .

## الإنجازات المستقبلية لتكنولوجيا المنقب

### Future Directions of Probe Technology

#### مقدمة:

بينما يعتبر إختبار Dot - blot hybridization ويرمز له DBH لاكتشاف الفيرويد من الاختبارات الشائعة الاستعمال كما هو واضح من جدول ١٤، ١٣، إلا أن هناك عدة إنتقادات له. لكي نستبعد المشاكل الأساسية فيما يتعلق بالمنقيات غير المشعة، فمن الإجراءات العادية هو تحضير مستخلص نباتى منقى جزئياً لعملية ال DBH، العملية التى تشمل عادة خطوة إزالة البروتين بالفينول و / أو الكلوروفورم على أية حال بينما النسغ (عصارة النبات) المعصور وغير المنقى يمكن أن يستعمل أحياناً (جدول ١٤)، هنا يمكن أن يحدث تخفيض فى حساسية الاختبار، وكفاءة تهجين المكونات الأخرى فى العينات السليمة تزداد. إن الحساسية المنخفضة ليست ذات إعتبرات هامة عندما يكون تركيز الفيرويد فى العصارة مرتفعاً نسبياً، ولكن يكون ذو إعتبرات هامة عندما يكون التركيز منخفضاً ومن المهم كشف جميع النباتات المصابة. ومثال على الحالة الأخيرة هو اكتشاف فيرويد ASBV فى أشجار الأفوكادو مصممة على أساس استعمالها كأصل ليستعمل للبذور أو التطعيم الخشبي. هنا فإن خطوة إزالة البروتين وتركيز الحمض النووى قبل إختبار DBH يكون مطلوباً بشكل واضح.



هناك بالتأكيد حاجة إلى إجراءات إستخلاص بسيطة ويفضل تقليل الخطوات كلما أمكن ذلك واستبعاد استعمال الفينول لإزالة البروتين. وبالنسبة لأعداد كبيرة من العينات، فإن مستخلص النسيج يجب أن يكون غير معقد نظراً لأن الإجراءات المعملية العادية مثل التجانس في الخلاط أو السحق في هاون ومدقة تكون غير عملية. إلا أنه بوجود مستخلص للعصارة من ماركة Eric pollahne, Germany يكون ذو كفاءة عالية، ويمكن أن يستعمل للأنسجة الطرية مثل الطماطم، البطاطس وأوراق حشيشة الدينار وبالإضافة لذلك أوراق الأشجار الخشبية مثل الأفوكادو ونخيل الزيت. إن إختبارات ال DBH مملدة أيضاً في متطلباتها لنقل حجم صغير من كل عينة على غشاء فلتر والتسخين لتجميد الأحماض النووية قبل التهجين ثم عندئذ تهجن قبل الغسيل وقبل التصوير بالإشعاع الذاتى، يتكشف التلون الأنزيمى أو الكيماويات المتألئة.

سيكون من المفضل تطوير تكنولوجيا منقب لتشخيص الفيروس بحيث لا تكون الإشارة مثلاً منتج غير ذائب ملون على غشاء فلتر، ولكن يكون منتج ذائب ملون أو بعض المنتجات الذائبة الأخرى كلاهما يمكن أن يقاس بطرق مناسبة مثل ELISA والنتائج النهائية تطبع فى مكان معين. هذا الموضوع يكون أساسى لجعل نظام الكشف أوتوماتيكياً. وفيما يلي بعض الأبحاث المستقبلية لتشخيص الفيروس.

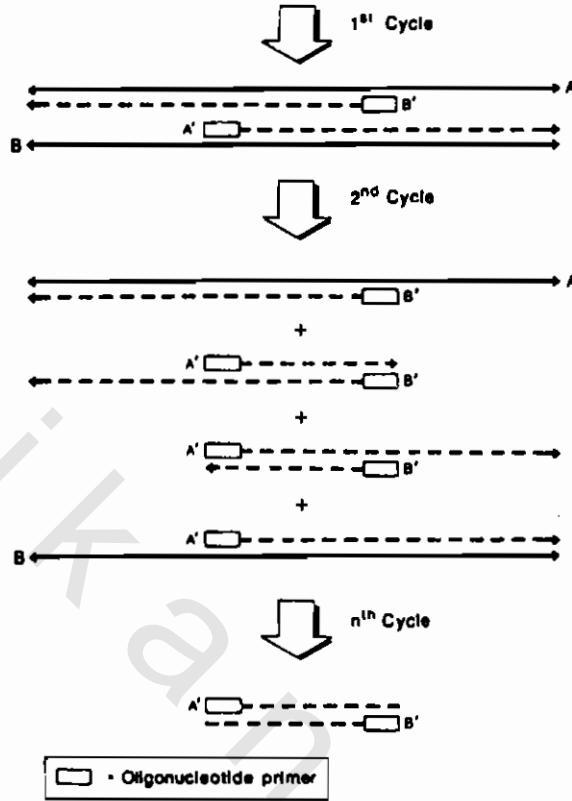
#### ١ - التزايد العددي الأنزيمى للحمض النووى الهدف:

#### Enzyme Amplification of Target Nucleic Acid

إن من المثير نوعاً ما للدهشة أنه مع جميع طرق الكشف المشعة وغير المشعة المتوفرة لتشخيص الفيروس جدول ١٤، ١٣، فإن المستوى المنخفض فى الكشف

عن الأحماض النووية الهدف، يكون دائماً في مستوى بيكوغرام منخفض. مع أن هذه الحساسية تكون دائماً ملائمة لمعظم الفيرويدات التي تكون موجودة بتركيزات مرتفعة نسبياً في مستخلصات النبات. أيضاً فإن حساسية أكبر تكون مطلوبة بالنسبة للفيرويدات الموجودة على تركيزات منخفضة أو حيث يوجد قيوداً على كمية عينة النسيج المتوفر. من ناحية نظرية فإن حساسية الكشف يمكن أن تتحسن عن طريق زيادة عدد جزيئات الحمض النووي الهدف في العينة الأصلية. مثل هذا البحث قد تطور وفقاً للزيادة العددية الأنزيمية التي تحدث في تفاعلات الحمض النووي الخاصة بالهدف في المعمل بنمط أسي ودقة عالية. إن هذا التكنيك يشار إليه باسم طريقة سلسلة تفاعل البوليميريز - Polymerase Chain reac- (PCR) tion وهو موصوف في شكل ٢٢. إن طريقة PCR مبنية على دورات متكررة من :-

- ١ - الدترة بالحرارة لقلب ثنائي الخيط.
  - ٢ - بادئ معاد إتحاده Annealing من مجموعة نيوكليوتيدات قصيرة.
  - ٣ - إطالة البوادي المعاد إتحادها بأنزيم DNA Polymerase.
- يحدد الهدف المخصص عن طريق إختيار بادئين قصيرين (مثلاً ٢٠ - ٢٥ نيوكليوتيدة) والتي تصمم لتجهن مع خيوط DNA المتقابلة مضافة إلى جانبي التابع لتزداد في العدد مع كون نهاياتها 3' تتجه إلى الداخل. تؤدي الدورات المتلاحقة من الزيادة العددية إلى استمرار التضاعف والزيادة الأسية في عدد نسخ التابع. نظراً لذلك يصبح هناك نسخاً مصنعة جديدة متوفرة لترتبط مع البادئ شكل ٢٢. وبالتالي فإن عشرين دورة من PCR تنتج نظرياً ما يزيد عن مليون ضعف من الأعداد المتزايدة.



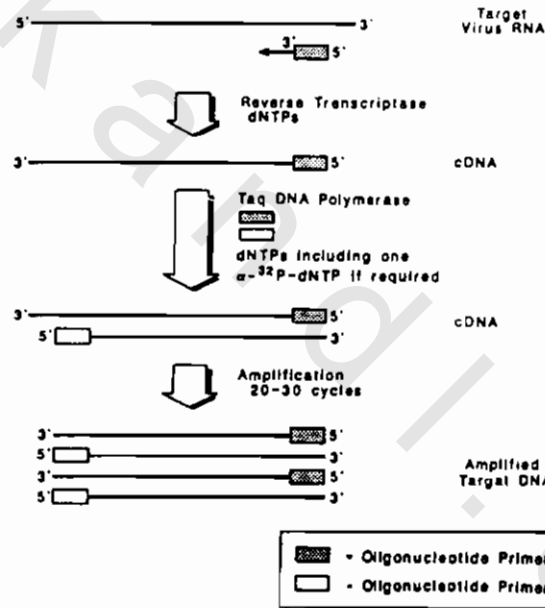
شكل رقم ٢٢ :

تضاعف DNA الهدف بواسطة سلسلة تفاعل البوليميريز (PCR). قالب DNA الأصلي A. الخيط الأول و B للخيط الآخر. بادئ النيوكليوتيدات القصيرة. الخيوط المقطعة تمثل DNA المبني في المعمل.

وبشكل أولى فإن Klenow fragment من DNA Polymerase للبكتريا *E. coli* كان قد إستعمل في PCR لإطالة البودائ المعاد إتحادها Annealed. وعلى أية حال فإن هذا الأنزيم كان قد تثبط بواسطة الحرارة العالية المطلوبة لفصل خيطي ال DNA في بداية كل دورة من PCR. وبناء على ذلك يجب إضافة أنزيم جديد خلال كل دورة. إن إدخال أنزيم Taq DNA Polymerase الثابت حرارياً المعزول من البكتريا *Thermus aquaticus* حول عملية ال PCR إلى تفاعل بسيط وقوى، هذا

بدوره سمح بجعل هذا الإجراء أوتوماتيكياً مع فوائده المهمة من سرعة، تخصصية، حساسية وملائمة.

قام العالم Rathjen سنة ١٩٨٩ بإجراء بحث يهدف إلى الزيادة العددية في طريقة PCR كطريقة روتينية ممكنة للتعرف على المستويات المنخفضة من فيروس ASBVd في نسيج الأفوكادو المصاب. نظراً لأن PCR تتطلب قالب من DNA فيجب أن يصنع نسخة معكوسة من RNA الفيرويدي قبل الزيادة العددية. وبالتالي فإن هذا الإجراء يتطلب خطوتين عمليتين كما هو مذكور في شكل ٢٣.



شكل رقم ٢٣ :

مرحلتين من إجراءات اكتشاف مستويات منخفضة من RNA الفيروسي الهدف في مستخلص نباتي باستعمال طريقة PCR. الخيط الأول هو cDNA ويصنع بواسطة النسخ العكسي لقالب RNA. كما وأن التضاعف باستعمال PCR لـ cDNA يحصل عليه باستعمال Taq DNA بوليميريز.

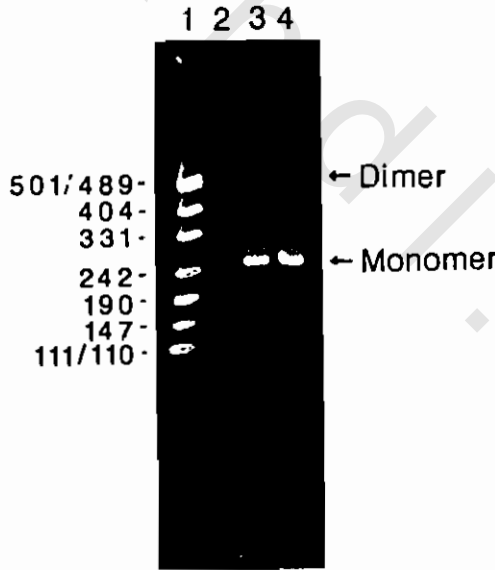
خييط أولى مكمل من DNA وهو (cdNA) يجب أن يصنع بشكل أساسي بواسطة النسخ العكسي للقالب RNA فى وجود البادئ الأول و dNTPs. عندئذ يمكن أن يستعمل الـ DNA كقالب للزيادة العددية فى PCR عن طريق إضافة البادئ الثانى وأنزيم Taq DNA polymerase. عادة ما يلزم إضافة أكثر من البادئ الأول و dNTPs. ولسوء الحظ فإن بناء الخييط الأول من cdNA الفيرويدي بواسطة أنزيم النسخ العكسى فى كثير من الأحيان يكون أقل كفاءة من نفس التفاعل المستعمل فيه mRNA كقالب بسبب المميزات العالية للتركيب الثانوى للفيروسيدات، عندما يحدث لها إعاقة بواسطة التركيبات الثانوية للحمض RNA، فإن أنزيم النسخ العكسى يميل إما إلى البناء (النسخ) الطرفى أو يتقلب عكسياً ويبنى شريط ثانوى من cdNA ثم نسخه من الخييط الأول لـ cdNA الوليد. وبالتالي فإن العالم Rathjen وضع الظروف المثلى لدنترة الفيرويد قبل خطوة النسخ العكسى.

إن شكل ٢٤ هو النتيجة للزيادة العددية فى طريقة PCR المثلى (٣٠ دورة) باستعمال مستخلص حمض نووى منقى جزئياً من أوراق أفوكادو سليمة ومصابة. إن الزيادة العددية الناتجة (مرر ٣ و ٤) من المستخلصات المصابة توطدت وثبتت على ٣٪ TAE أجاروس جيل Agarose gel ويعمل على إظهارها بواسطة Ethidium bromide fluorescence. يكون الانتاج الأساسى فى الإكثار ظاهر وبوضوح وبطول ٢٥٠ نيوكليتيده تقريباً (باستثناء مونومرك ASBVd فىكون ٢٤٧ نيوكليتيده) إن الحزمة ذات الوزن الجزيئى الأعلى ذات طول ٥٠٠ نيوكليتيده تقريباً ظهرت على الجيل (مرر ٣ و ٤)، من المحتمل أنها تتوافق مع تكاثرات ASBVd dimer والذى من المعروف أنه موجود بتركيزات منخفضة فى أوراق الأفوكادو. لم يكن هناك إنتاج واضح عند استعمال مستخلص أوراق سليمة كقالب (مرر ٢). هناك زيادة فى الحساسية على الأقل ١٠٠٠ ضعف لعملية الـ PCR، هذه عند مقارنتها مع طريقة DBH القياسية بمنقبات حمض نووى معلم بالفسفور ٣٢.

جدول ١٥ : طرق اكتشاف منتجات PCR.

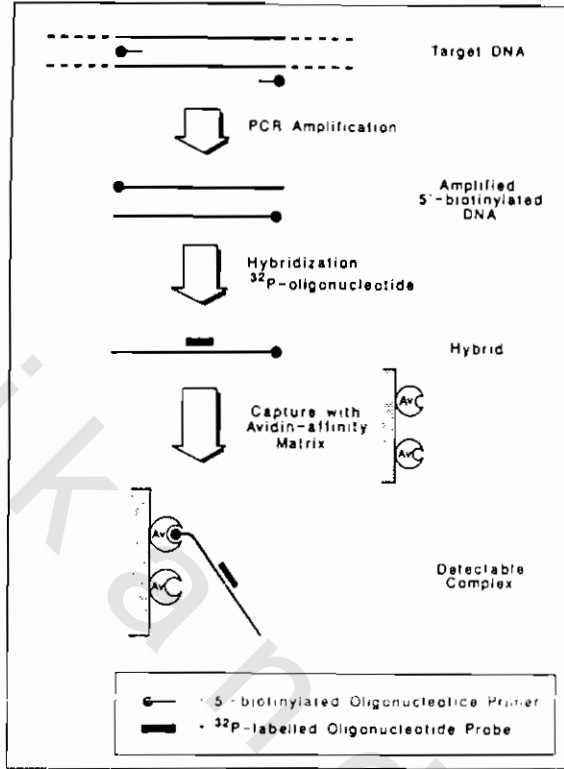
METHOD	PCR round 1 Primers: P1, P2	PCR round 2 Primers: P3, P4	Labelling of PCR product	Detection
1 - Agarose gel electrophoresis	Nonlabeled	---	Nonlabeled	Ethidium bromide fluorescence
2 - Polyacry lamide gel electrophoresis	Non labeled	---	P32	P32- autoradiography
3 - Affinity collection with avidin (or streptavidin)	Biotin - labeled	---	P32	Liquid scintillation counting
4 - Affinity collection with avidin (or streptavidin)	Biotin - labeled	---	Biotin	Hybridization with P32- labeled oligonucleotide; liquid scintillation counting
5 - Affinity collection with avidin (or streptavidin)	Biotin - labeled	---	Biotin	Hybridization with alkaline phosphatase - labeled oligonucleotide; enzymatic colorimetric assay
6 - Affinity collection with avidin	Non labeled	P3, biotin - labeled; P4, dinitrophenyl (DNP) - labeled	Biotin / DNA	Immunoenzymatic colorimetric assay
7 - Affinity collection with avidin	Non labeled	P3, biotin - labeled; P4, I125- labeled	Biotin I125	Gamma Counting
8 - Affinity collection with DNA - binding protein, GCN4	Non labeled	P3, biotin - labeled; P4 contains GCN4 binding site	Biotin / GCN4 binding site	Enzymatic colorimetric assay
9 - Affinity collection with DNA - binding protein TyrR	Non labeled	P3, biotin - labeled; P4 contains TyrR binding site	Biotin / TyrR binding site	Enzymatic colorimetric assay

هناك أنواعاً من الطرق متوفرة حالياً للتعرف على ناتج ال PCR. إن جدول رقم ١٥ يذكر بعضاً من أكثر الطرق إنتشاراً والمستعملة حالياً. إن فحص ناتج ال PCR بعد الهجرة الكهربائية في الجيل إما بـ Ethidium bromide fluorescence أو بالتصوير بالإشعاع الذاتى فسفور ٣٢ (جدول ١٥ طريقة ١، ٢). استعمال الوزن الجزيئى كتعريف منفرد. ومن سوء الحظ فإن إحدى المشاكل هنا هى الكلوونات الخاطئة التى يمكن أن تنشأ إذا ظهرت ناتجات إكثار غير حقيقية لأشياء لها نفس الحجم تقريباً كما هو متوقع لفيروس معين. يمكن التغلب على هذه المشكلة عن طريق الاكتشاف المتخصص لناتجات الإكثار بواسطة التهجين بمنقب مشع (داخلى) متبوعاً بطريقة مجموعة هجن القواعد المتجاذبة Affinity - based hybridization collection. هذا البحث (فى جدول ١٥ طريقة ٤) قد تطور أساسياً بواسطة Syva-nen et al سنة ١٩٨٨ لاكتشاف DNA فى فيروس تضخم الخلية فى الإنسان Cytomegalovirus متبوعاً بالإكثار فى PCR وطورت إلى أكثر حداثة بواسطة العالم Harju et al سنة ١٩٩٠. يبين شكل ٢٥ الخطوات العريضة لهذه الطريقة.



شكل رقم ٢٤ :

طريقة الإكثار باستعمال PCR للحمض RNA فى الفيروس ASBVd الموجود فى مستخلص ورقة أفوكادو يتبع خطوة نسخ عكسى أولية. شريحة ١ تعنى ٥٠٠ نانوغرام HpaII مهضومة فى pUC DNA 19 كدليل. شريحة ٢ = مستخلص ورقة أفوكادو سليمة. شريحة ٣ و ٤ = مستخلص أوراق مصابة إصابات مختلفة من فيروس ASBVd.



شكل رقم ٢٥ :

رسم تخطيطي يبين خطوات طريقة

Affinity - based hybrid Collection method لإكثار DNA الهدف بالبيوتين.

تستخدم هذه الطريقة منقبات معاملة بالبيوتين في 5' لإدخال بقايا البيوتين في أجزاء الـ DNA الهدف خلال عملية الإكثار العدي في PCR. إن أجزاء الـ DNA المعاملة بالبيوتين في 5' والمتكاثرة عندئذ يمكن اكتشافها بواسطة التهجين في المحلول مستعملاً منقباتاً من مجموعة نيوكليوتيدات قصيرة معلمة بالفسفور المشع ٣٢. الهجن المعلمة بالفسفور المشع إما أن تجمع على Avidin - coated polystyrene أو Streptavidin - coated microtitre wells. إن حاصلين على فوائد تفاعل البيوتين مع الأفيدين وهو ما يسمى Streptavidin. إن



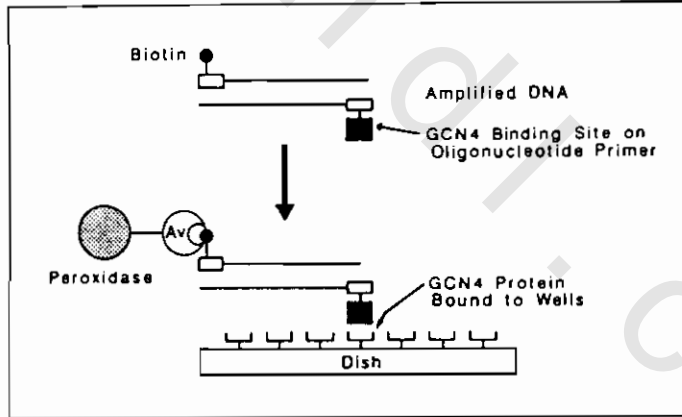
إشعاعية الهجن المرتبطة على دعامات صلبة يمكن عندئذ قياسها شكل ٢٥. إن طريقة مجموعة الهجن للقواعد المتجاذبة Affinity - based hybrid collection (ABHC) تكون فعالة وتكون مقياس لكمية ال DNA المنتج في عملية الإكثار في PCR.

هناك بديلاً للطريقة المذكورة سابقاً هو استعمال المنقب المتكون من Enzyme - linked oligonucleotide (الداخلي) لاكتشاف النواتج المتكاثرة لـ PCR المعاملة بالبيوتين على 5' متبوعاً بطريقة مجموعة هجن القواعد المتجاذبة ABHC. جدول ١٥ طريقة ٥. من هذه المنقبات Alkaline phosphatase labeled يمكن أن يحضر في المعمل حسب طريقة Li et al سنة ١٩٨٧. باستعمال مثل هذه الطريقة فقد أمكن اكتشاف الهدف في DNA المتكاثرات باختبار قياس الألوان Colorimetric لفيروس ASBV باستعمال Para - nitrophenyl phosphate كمادة تفاعل واستعمال Avidin - coated microtitre plate كمادة صلبة سائدة، إلا أن هناك بعض العيوب لمثل هذه الطريقة.

هناك أبحاثاً عديدة قد طورت هذه الطرق وأدخلت فيها بعض الاختلافات، فمثلاً Sauvaigo et al سنة ١٩٩٠ استعمل دورتين من الإكثار في PCR مستفيداً من الإجراء الثاني لـ PCR لإدخال بواقي معالجة بالبيوتين وتحمل علامات في مخلوط PCR (جدول ١٥ طريقة ٦ و٧). هذا أدى إلى إنتاج هجن من DNA تحمل جزء بيوتين على إحدى النهايات وداي تتروفينيل DNP معلم أو يود مشع ١٢٥ على النهاية الأخرى. بعدئذ فإن النواتج المتكاثرة تنتزع بواسطة جزئ البيوتين على Avidin - affinity matrix وبعد ذلك تكتشف باستعمال نظام Enzyme antibody أو عداد جاما.

أما العالم Kemp et al سنة ١٩٨٩ فقد أحدث تطوراً في إجراء الاكتشاف بقياس الألوان لنواتج ال PCR (جدول ١٥ طريقة ٨) مستعملاً DNA ثنائي

الخيط مرتبطاً مع بروتين اسمه GCN4 هذا البروتين عزل عن طريق استعمال ناقل تعبير خاص Constructed في بكتيريا *E. coli*، وهو بروتين إندماجي ويحتوى قطعاً من العامل الناسخ GCN4 من الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* مندمجاً مع Glutathione S - transferase من *Schistosoma japonicum*. وبشكل أساسي فإن هذه الطريقة تشمل ربط GCN4 إلى Wells of microtitre plates بعدئذ يضاف DNA المتكاثر بطريقة PCR والذي فيه أماكن ارتباط لـ GCN4 مرتبطة مع مجموعة نيوكليوتيدات قصيرة ومجموعة بيوتين مرتبطة مع مجموعة نيوكليوتيدات قصيرة أخرى. الجزء المعرض من البيوتين عندئذ يكتشف عن طريق إضافة Avidin Peroxidase conjugate متبوعاً بكشف البيروكسيديز بمادة تفاعل كروموجنك. هذه الطريقة مذكورة في شكل ٢٦. هناك أبحاثاً مشابهة (جدول ١٥ طريقة ٩) باستعمال أنواع مختلفة من البروتين المرتبط مع DNA مثل TyrR المأخوذ من *E. coli* قد تكلم عنه Triglia et al سنة ١٩٩٠.



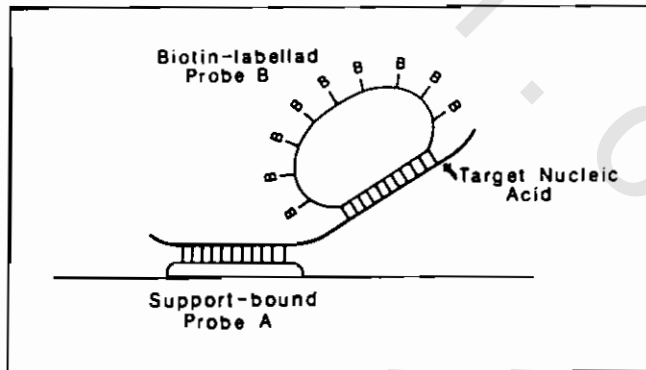
شكل رقم ٢٦:

الكشف بالدليل اللوني لمنتجات PCR باستعمال DNA ثنائي الشريط مرتبط مع البروتين، GCN4. إن DNA المكبر بواسطة PCR مبنى عن طريق ربط GCN4 بمواقع ملائمة بإحدى مجموعة النيوكليوتيدات القصيرة ومجموعة بيوتين مرتبطة مع مجموعة نيوكليوتيدات قصيرة أخرى.

## ٢ - اكتشاف الحمض النووي الهدف بطريقة ساندوتش هايبردايزيشن :

### Detection of Target Nucleic Acid by Sandwich Hybridization

بينما طرق مجموعة هجن القواعد المتجاذبة ABHC لاكتشاف نواتج PCR المتكاثرة حملت آمالاً لتطبيقها على الفيروسات، إلا أن الباحث يجب أن لا يتغاضى عن الإجراءات المبنية على طريقة Sandwich Hybridization (SH). إن العالم Ranke et al سنة ١٩٨٣ قد أدخل تطويراً أساسياً في مرحلتى هذه الطريقة وذلك للاكتشاف والتقدير الكمي للأحماض النووية في العينات المريضة الخام، باستعمال DNA لفيرس الغدة في الإنسان كنموذج. إن الأساس العام لهذه الطريقة المذكور فى شكل ٢٧. باستعمال منقبات DNA أحادى الخيط فى الفاج M13 الناقل لـ DNA كمثل. من الضروري أن يكون هناك منقبتين كل منهما يتهجن مع مناطق مختلفة غير متشابهة من الحمض النووى الهدف. يرتبط أحد المنقبتين مع المادة الصلبة الداعمة أو الساندة وهذه تكون مثل نتروسيليلوز، Receptal surfaces، Microtitre plate wells، Sephacryl، أو مع أجزاء دقيقة مغناطيسية، بينما المنقب الآخر يعلم بالبيوتين مثل الفوتوبيوتين. إن الـ DNA المرتبط بالمادة الصلبة الداعمة (المنقب الجاذب) يهجن مع عينات إختبار الحمض النووى فى وجود المنقب الثانى المعلم بالبيوتين (المنقب الكاشف) والذى يمكن أن يرتبط فقط مع المادة الصلبة الساندة عن طريق كوبرى أو جسر من الحمض النووى الهدف شكل ٢٧. بعد

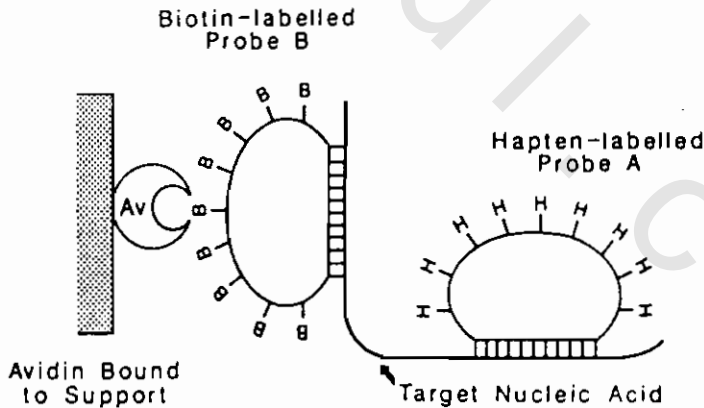


شكل رقم ٢٧ :

شكل تخطيطى يوضح المبادئ الأساسية فى مرحلتى التهجين بالسندوتش. يلاحظ المنقبتين كمثل، منقب ذو خيط وحيد من DNA فى الفاج الناقل M13. إحداهما مرتبط إلى المادة الصلبة الداعمة A والآخر معلم بالبيوتين B.

إجراءات الغسيل العادية، فإن منقب الكشف المتجمد يقاس بواسطة التفاعل مع أفيدين أو ستربتافدين وأنزيم الربط.

لغاية الآن فإن الباحثين مدركون بأن طوري طريقة SH لم يستعملوا لاكتشاف الفيروسات ولا الفيروسات النباتية، إلا أن Keller et al سنة ١٩٨٩، ١٩٩٠ ذكر إمكانية استعمال إختبار Microtiter Sandwich hybridization فى اكتشاف تتابعات التكاثرات العددية فى PCR لفيروس نقص المناعة فى الإنسان HIV وتتابعات فيروس التهاب الكبد B (HBV) من سيرم المريض. فى الحالة الأخيرة فإن المنقب الجاذب (المكولون فى الفاج DNA M13 الناقل) ارتبط مع Microtitre Wells والمنقب الكاشف (المكولون فى الفاج DNA pB322 الناقل) قد علم ببيوتين ضوئى Photobiotin. كل منقب قد تجانس مع نصف تتابعات HBV المتكاثر سامحاً بتكوين تركيبة السندوش التى تجمد منقب الكشف المعلم فى Microtitre well كان التهجين فقط لمدة ٤ ساعات وبعد الغسيل فإن منقب الكشف المتجمد يقاس باستعمال Streptavidin - Peroxidase و Tetramethyl benzidine.



شكل رقم ٢٨ :

رسم تخطيطى يبين المبادئ الأساسية للطور المفرد فى تهجين السندوش يظهر المنقبان هنا. الأول معلم بالبيوتين B والثانى معلم بالهيبتين H ويظهر باسم منقب A أما الأول فهو منقب B.

هناك طريقة بديلة للطورين فى الإجراء المتبع فى طريقة SH تكون لكل من الحمض النووى الهدف وللمنقبين المهجنين فى المحلول. مثل هذا النظام (طور وحيد فى طريقه SH) أحدث تحسناً كبيراً فى الصفات الحركية، مؤكداً تأثير تحديد معدل السرعة لنظام Solid support - based. إن الخطوة الحرجة فى هذه الطريقة هى الفصل الملائم والمريح وذو الكفاءة العالية للمنقب (الهجن المقصودة من المنقب غير المهجن قبل اكتشاف الإشارة). هذا يمكن الوصول إليه عن طريق ادمصاص معقد الهجن إلى مادة صلبة سائدة، يكون ذلك متبوعاً بالغسيل الكامل ١٠٠٪ فى المثال المذكور فى شكل ٢٨ فإن الأفدين المرتبط بالمادة الداعمة يستعمل لادمصاص منقب B المعلم بالبيوتين فى معقد الهجن. طريقة الاستخلاص هذه قد تكون بكفاءة حوالى ٣٠٪ فقط. الاكتشاف يكون خلال منقب A المعلم بالهبتين، ويمكن أن يستعمل Antibody - enzyme conjugate.

إن النظام المذكور سابقاً له إمكانية كبيرة فى التشخيص الروتينى للفيروسات وفيروسات النبات باستعمال منقبات غير مشعة. مع أن تفاعلات التهجين تكون دقيقة نسبياً فإن مستخلصات النبات وإجراءات الكشف يجب أن تكون سريعة وموثوقة أثناء إجراءها.

## مراجع خاصة بالفصل الثالث

- 1 - Allison, R., Thompson, C. and Ahlquist, P. 1990. Proc. Natl. Acad Sci. USA. 87, 1820.
- 2 - Clark, M. F. and Bar - Joseph, M. 1984. Methods in Virology. Academic Press New York.
- 3 - Cooper, J. I. and Edwards, M. L. 1986. Applied Biology, Wellesbourne U. K. 139.
- 4 - Diener, T. O. 1979. Viroids and viroid diseases, John Wiley & Sons, New York.
- 5 - Gould, A. R. and Symons, R. H. 1983. Annu Rev. Phytopathol. 21 : 179.
- 6 - Gross, H. J. et al. 1982. Eur. J. biochem. 121, 249.
- 7 - Harju, L. et al 1990. Mol. Cell. Probes 4, 223.
- 8 - Kemp, d. J. et al 1989. Proc Natl. Acad Sci USA 86, 2423.
- 9 - Keese, P. and Symons, R. H. 1985. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 82, 4582.
- 10 - Keese, P., Visvader, J. E. and Symon, R. H. 1988. Variability of RNA Genom CRC Press, Boca Baton - FL.
- 11 - Koltunow, A. M. and Rezaian, M. A. 1989. Intervirology 30 : 194.
- 12 - Keller, G. H. et al. 1989. Annal Biochemi 177 : 27.
- 13 - \_\_\_\_\_ , \_\_\_\_\_ 1990. J. Clin Microbiol. 28 : 1411.

- 14 - Li, R. et al. 1987. *Nucleic Acid Res.* 15 : 5275.
- 15 - Luria, s. E. et al. 1978. *General Virology*. 3rd edition. New York, Wiley. 578p.
- 16 - Lwoff, A. 1981. *Ann. Virol.* 132 E (2) : 121 - 134.
- 17 - Morris, T. J., Wright, N. S. 1975. *Amer. Potato J.* 52 : 57 - 63.
- 18 - Owens, R. A., Diener, T. O. 1981. *Science*. 213.
- 19 - Rathjen, J. P. 1989. B. Sc. (Honours) Thesis, University of Adelaide.
- 20 - Renz, M. and Kurz, C. 1984. *Nucleic Acid Res.* 12 : 3435.
- 21 - Rank, M. et al. 1983. *Gene.*, 21 : 77.
- 22 - Sauvaigo, S. et al. 1990. *Nucleic Acid Res.* 18, 3175.
- 23 - Shikata, E. 1990. *New Viroids From Japan. Semi. Virol.*, 1 : 107.
- 24 - Syvanen, A. C. et al. 1988. *Nucleic Acid Res.* 16 : 11327.
- 25 - Triglia, T. et al. 1990. *Nucleic Acid Res.* 18 : 1080.
- 26 - White, B. A., and Bancroft, F. C. 1982. *J. Biol. Chem.*, 279 : 8569.
- 27 - Wilbur, W. J. and Lipman, d. J. 1983. *Proc Natl, Acad. Sci. USA* 80 : 720.

## الفصل الرابع

### دراسات تطبيقية على الفيروسات

أولاً: - بناء فيروس معدى فى المعمل:

#### In Vitro Synthesis of an Infectious Viroid

مقدمة: -

الفيروسات هي ممرضات للنبات تتميز عن الفيروسات بغياب الغطاء البروتيني وبأحجامها الصغيرة وهي جزيئات من RNA أحادي الخيط دائرية تتكون من بضع مئات من النيوكليوتيدات. أصغر فيروس فيه ٢٤٠ نيوكليوتيدة وأكبر فيروس فيه ٣٧٥ نيوكليوتيدة (ذكر Steger et al سنة ١٩٩٢ أن هناك فيروس بطول ٦٠٠ نيوكليوتيدة، إلا أنه لم يذكر اسم هذا الفيروس ولا وصفه وسيأتى ذكر الخطأ الذى وقع فيه الباحث). لا يوجد أى تجارب أثبتت بأن الفيروس يستطيع أن يشفر لأى بروتين ولا لأى نواتج ترجمة. وبالتالي فإن الباحث يجب أن يفترض أن تناسخ الفيروس ومرضىته تعتمد كلية على نظم أنزيمية فى العائل. إن المعلومات الوراثية فى الفيروسات تكون فى تركيب RNA. كذلك فإن للفيروسات المقدرة لأن تخضع لتركيبات خاصة إنتقالية وتستطيع أن تتفاعل مع بعض عوامل خلية العائل.

ملاحظة وقام بهذا البحث مجموعة من العلماء فى استراليا ومجموعة أخرى فى ألمانيا والذى أمدنى بالبحوث مشكوراً الدكتور M.A. Rezaian والدكتور D. Riesner.



إن النموذج الحديث لتناسخ الفيرويد يفترض ميكانيكية الدائرة الملتفة. يمكن ذكر هذه الميكانيكية باختصار ونقول بأن الفيرويد الدائري (خيط موجب) ينسخ إلى Oligomeric خيط سالب من RNA. الخيط السالب هذا يعمل كقالب لبناء Oligomeric خيط موجب من RNA. كلتا خطوتى النسخ يحفزان بواسطة أنزيم العائل RNA Polymerase II المعتمد على DNA. أما الخيط الموجب Oligomeric RNA ينشط أنزيمياً إلى جزيئات ذات وحدة طول والذي بعد ذلك يلتحم ليكون دوائر فيرويد تامة mature. إن الانشطار الذاتى والالتحام الذاتى لا نستطيع تأكيد صحتها بالرغم من التجارب العديدة. هناك استثناء لهذه العملية موجود فى فيرويد ضربة الشمس فى الأفوكادو حيث أن جزيئات وحدة الطول تتكون بواسطة الانشطار الذاتى فى ال Oligomers، لا يوجد أنزيم يشارك خلال خطوة البناء هذه. يجب على الباحث أن يفترض بأن الدقة فى قطع ولحم وسيطات التناسخ من ال Oligomeric يكون نتيجة للتحديد الجيد للتركيب الثانوى للموقع. ويجب التأكد من أن الفيرويدات كجزيئات متطفلة لا تزود العوامل الخاصة بها فى خلية العائل بأى إجراء وأن عوامل التجهيز تلك الخاصة بخلية العائل لا تتكيف مع الفيرويد. وبالتالي فإنه على نقيض واضح مع بناء RNA العائل فإن التركيب الثانوى للفيرويدات ووسيطاتها فى التناسخ يكون لها الدور السيادة فى الخلية.

### دبابيس الشعر:

إن التركيب والتركيب الانتقالي للفيرويدات معروف بشئ من التفصيل. تحت الظروف الطبيعية فإن الفيرويدات تشكل تركيب شبه عصوى والذي يمكن وصفه بأنه تركيب متسلسل من حلزونات قصيرة مع عروات داخلية صغيرة. أثناء الدنترة بالحرارة فإن الفيرويدات تمر بعدة تركيبات إنتقالية من التركيب شبيه العصوى إلى دائرة أحادية الخيط بدون أية أزواج قواعد بين الجزئ. فى الاتحادات العالية الانتقالية الرئيسية فإن جميع ازواج القواعد للتركيب الطبيعى تتعطل وتنفصل ويتكون تركيب واضح جديد ثابت يسمى دبوس الشعر، وهى ثلاثة دبابيس،

دبوس الشعرا I، II، III. هذا التحول يمكن رؤيته كسوط ذو تركيب ممتد إلى متفرع مع فقد واضح في تزاوج القواعد. أما على درجات الحرارة الأعلى فإن دبايس العشر الثابتة تنفصل باستقلالية عن بعضها البعض حسب درجة ثباتها في الحرارة. إن دبوس الشعرا I و II تكون أكثر ثباتاً وحفظاً بين الفيرويدات المختلفة أكثر من بقية الجزئ مع الأخذ بعين الاعتبار موقع، طول ومحتوى القواعد G + C. أما دبوس الشعر رقم III فإنه يوجد فقط في الفيرويد PSTVd وبالتالي فإن أهميته جانبية.

لقد درس حديثاً العلاقة الوظيفية لدبوس الشعرا II عن طريق الموقع المباشر للطافرات وطرق ال Thermodynamic وإختبارات الحيوية بواسطة Loss et al سنة ١٩٩١. ولقد تبين أن دبوس الشعرا II يتكون ليس فقط خلال الدنترة بالحرارة للفيرويدات الدائرية ولكن يمكن أن يتكون خلال بناء وسيطات تناسخ الفيرويد، ومن المحتمل أن تكون هذه الخطوة أكثر أهمية من ناحية بيولوجية حيث أنه يكون جزء من التركيب شبه المستقر. أظهرت الدراسة المستفيضة أن الطفرات التي تحدث في القطع التي تشكل دبوس الشعرا II وإختبارات الحيوية مع cDNA للفيرويد المتحول أن المنطقة المركزية لساق دبوس الشعرا II هي المنطقة الحرجة في تناسخ الفيرويد. ولدى الأخذ بعين الاعتبار المعلومات الواردة في كثير من المراجع على مواقع الارتباط لكثير من عوامل النسخ، هذه الأبحاث تشير إلى الفرضية بأن دبوس الشعرا II يعمل كموقع ارتباط لعوامل النسخ في خلية العائل.

هناك كثير من التقارير في المراجع تدل على أن المنطقة المحتوية دبوس الشعرا I يمكن أن تكون موجودة في بناء ال Oligomeric وسيطات للتناسخ. يتكون دبوس الشعرا I في منطقة من الجزئ التي تظهر تماثل تتابع قوى بين كل الفيرويدات من مجموعة PSTVd هذه القطعة تسمى -Upper central con- (UCCR) served Region. في حالة PSTVd لقد ذكر حديثاً أن RNase T<sub>1</sub> يكون قادراً ليحفز في لمعمل كلاً من تفاعل القطع واللحم بدون الحاجة إلى أى بروتين

آخر Tsagris et al سنة ١٩٩١. وعمليات فرضية لتفاعل التجهيز، فإن دخول أنزيمات مشابهة يمكن تخيلها ضمن خلية النبات. زيادة على ذلك نظراً لأن PSTVd يمثل في كثير من الاعتبارات على أنه صف Class كبير من الفيروسات، فإن المقدرة على التجهيز بواسطة RNase T<sub>1</sub> يمكن أيضاً أن يلزم للفيروسات الأخرى. لمثل هذه الدراسة فإن العالم السابق ذكره استعمل نسخة مستقيمة أطول من وحدة الطول (٨٥ نيوكليتيده إلى ٣٥٩ لكل واحد إلى ١٠٦ بإضافة ١٢ نيوكليتيده على النهاية 5' وإضافة ١٣ نيوكليتيده على النهاية 3')، وبالتالي فإن النسخة تحتوي على الجزء المركزي من UCCR بمقدار الضعف، على النهاية 5' ونهاية 3'. إن أربعة من 5'-vector النيوكليتيدهات المجاورة للتتابع النوعي لـ PSTVd تكون متماثلة لتتابع G80 PSTVd إلى U 83، وبالتالي فقط فإن الـ C84 تكون غائبة من خمسة نيوكليتيدهات أطول في PSTVd المتخصص الممتد على النهاية 5' للنسخة. إن الموقع G80 قد تحدد كموقع للقطع وإعادة اللحام في نسخة RNA ذو الخيط الموجب بواسطة RNase T<sub>1</sub>. نظراً لأن هذه النسخة غنية بالكثير من مواقع G التي عليها apriori قطع ولحام يمكن أن يؤدي إلى دوائر مضبوطة من PSTVd، ولكن التفاعل الكامل كان ملاحظاً فقط على G80. من هذا يمكن الاستنتاج بأن التفاعل يكون موجهاً بواسطة تركيب ثانوي خاص للنسخ.

### بناء فيروس CEVd في المعمل:

لقد استعملت كلونات cDNA الفيروية المعدية على نطاق واسع لدراسة التتابع المطلوب لتضاعف ومرضية الفيروس بواسطة طريقة Site Directed mutagenesis. كما وأن حيوية كلونات DNA ونسخها الخاصة تعتمد على وجود تتابع في فيروس أطول من وحدة الطول في تركيبات الـ DNA. بعض كلونات الـ Monomeric أيضاً تكون معدية كنتيجة لتزامن وجود تتابعات الفيروس في

الجزيئات الناقلة والتي تؤدي إلى تكوين أطول من وحدة الطول لـ cDNAs. تحتوي تخضيرات الفيروس من النباتات على نسبة من الجزيئات فى شكل مستقيم والذى يكون عالى الحيوية (معدى) ويبدو أنه يحتوى على نهايات 2', 3'- cy- clic phosphate والتي ذكر بأنها ضرورية للحيوية (العدوى).

فى هذا البحث نذكر طريقة بناء فيروس اكسوكورتز الحمضيات المعدى بنفس الطول فى المعمل، لنسخ ال Monomer وفيروس دائرى CEVd موثوق به دون اللجوء إلى إجراءات الكلونة. تحتوى النسخ المعدية نهايات triphosphate 5'- و 3'- OH وفى هذا البحث أمكن إثبات أن 2, 3 - cyclic phosphate ليست خطوة أولية Prerequisite فى الحيوية.

#### ١ - إكثار وتنقية فيروس CEVd :

تجهز نباتات طماطم *Lycopersicon esculentum* Mill cv. Rutgers فى طور النمو الفلقى وتحقن ميكانيكياً بسلالة شديدة من فيروس CEVd وتحفظ على درجة حرارة ٢٧ - ٣٠ م كما فى الطريقة التى ذكرها Rezaian et al سنة ١٩٨٩. بعد ظهور الأعراض يؤخذ مستخلص الفيروس من النباتات (حسب طريقة Rezaian سنة ١٩٩٠) وينقى ويتم ذلك بواسطة الكروماتوغرافى السليلوزية ثم يتبع ذلك طريقة الهجرة الكهربائية فى الجيل ثنائية الاتجاه كما ذكرها Rezaian سنة ١٩٨٩.

#### ٢ - بناء cDNA :

يتم بناء cDNAs ثنائية الخيط بواسطة عملية النسخ العكسى الموحد Combined reverse transcription ويجرى عملية إكثار amplification باستعمال CEVd نقى كقالب وإن واحداً من الزوجين المختلفين من Oligonucleotide المصنعة تستعمل كقالب شكل ٢٩. تبنى مجموعة النيوكليوتيدات القصيرة Oligonucleotides باستعمال طريقة Applied Biosystems 391 DNA Synthesizer وتنقى على لفائف OPC حيث أنها تصمم بطريقة معينة.

يلزم في هذه العملية ستة بوادئ primers ويرمز لها  $P_1, P_2, P_3$  وتركيبها كالآتي:-



وهناك  $P_5, P_6$  سنذكرها فيما بعد.

يتكامل  $P_1$  مع  $P_3$  حيث أن مركز 38 مع 69 في  $(P_1)$  و 300 مع 330  $(P_3)$

شكل (٢٩) من CEVd - A. أما  $P_2$  و  $P_4$  تشتمل  $T_7$  RNA polymerase محفز 18 - residues وتتابعات CEVd ذات المعنى Sense متوافقة مع 70 residues  $(P_2)$  و 86 و  $P_4$  331 - 346 من هذا الفيرويد (شكل ٢٩). إن ذات الموقع 18 المكتوبة بخط أسود غامق في الشكل هي في هذه البوادئ مشتركة للقطعتين ومتوافقة مع الموقع ٧٠ في  $P_2$  أو ٣٣١ في  $P_4$  في جزئ CEVd.

يؤخذ ٥٠ نانوغرام من CEVd - A وتمزج مع ١٠٠ ضعف مولر زيادة لكل من هذه البوادئ المنتقاة وتسخن على ٨٥ م لمدة ٢ دقيقة. بعد ذلك يجرى عملية نسخ عكسي مرتبط وإكثار عددي في ٥٠ ميكولتر تشتمل القالب والبوادئ، ١٠ مللي مول Tris - Hcl (على درجة حرارة الغرفة العادية ٢٥ م ورقم حموضة ٨,٣)، ٥٠ مللي مول KCl، ٢ مللي مول  $MgCl_2$ ، ١٠ ميكو غرام / مللتر جلاتين، ٢٠٠ ميكرومول لكل dNTP، وحدتين AMV من أنزيم النسخ العكسي Promega، ووحدة واحدة من أنزيم Taq DNA Ploymerase (Promega) يحضن المخلوط على ٤٢ م لمدة ١٥ دقيقة يتبع ذلك ٣٠ دورة PCR على جدول مقسم حسب الآتي: ١ دقيقة على ٩٤ م، ٢ دقيقة على ٥٥ م، ٣ دقيقة على ٧٢ م. إن

ال DNA الذى ازداد عدده وعومل بأنزيم RNase (١٠ ميكوغرام / مل على ٣٧م لمدة ٣٠ دقيقة) وتنقى بواسطة الهجرة الكهربائية فى أجروس منخفض نقطة الذوبان.

### ٣ - النسخ فى المعمل *In Vitro* transcription :

يحضر قالب DNA (١٠٠ نانوغرام) وينسخ بأنزيم RNA Polymerase T<sub>7</sub> بشكل أساسى كما هو مذكور فى طريقة Melton et al سنة ١٩٨٤. بالإضافة إلى القالب فإن التفاعلات تشتمل ٠,٥ مللى مول لكل rNTP و ٤٠ مللى مول - Tris HCl, pH 7.6 و ٦ مللى مول كلوريد مغنيسيوم و ٠,١ ميكوغرام لكل ميكولتر أسيتيلتيد BSA (Promega)، ٥ مللى مول DTT و ٠,٢ وحدة ميكوغرام لكل ميكولتر أنزيم RNA Polymerase T<sub>7</sub> فى حجم كلى من ١٠٠ ميكولتر. يتبع ذلك التحضين على درجة ٣٧م لمدة ٣٠ دقيقة. المخاليط المنسوخة تستعمل إما مباشرة للحقن أو تعامل بـ ٠,١ وحدة لكل ميكولتر RNase - Free DNase أو مائة ميكوغرام لكل ملتر RNase - Free DNase على درجة حرارة ٣٧م لمدة عشرة دقائق قبل الحقن. تختبر مهضومات النيوكلييز بواسطة عينات Electrophoresing لكل مخلوط تفاعل على Polyacrylamide gel مدنتر ٦.٦ محتويًا ٨ مول يوريا يتبع ذلك الصبغ بالفضة. تكون النسخ المعدة للاستعمال فى نهاية تفاعلات التكيف (التعديل) قد استخلصت بالفينول وأجرى لها ترسيب بالايثانول قبل المعاملات الأخرى.

### ٤ - تحويل خمسة فتحة الطرفية وتحليق نسخ RNA :

#### Modification of 5`- termini and Circularization of RNA transcripts.

إن جزيئات RNA المنتجة بواسطة النسخ فى المعمل تحتوى نهايات -triphos- 5` OH و 3`- OH. إن النهايات 5`- triphosphate يجرى لها تحويل لتصبح 5`- OH وذلك عن طريق تحضين حوالى ١٠٠ نانوغرام من RNA مع وحدة واحدة من

أنزيم RNase Calf intestinal phosphatase يتبع ذلك الاستخلاص بالفينول ثم الترسيب بالايثانول. لقد أنتجت نهايات 5'- Monophosphate باستعمال نسخ مستقيمة مزالة عنها الفسفرة و ATP غير مشبعة وأنزيم Polynucleotide Kinase. يستعمل تفاعل متوازي مع ATP - [32P] لدمج Monitor phosphate. أما بالنسبة للتحليق فإن RNA المعامل بالكينيز يسخن على درجة 65 م لمدة 10 دقائق لتثبيط الكاينيز ثم بعد ذلك يحضن مع T<sub>4</sub> RNA ligase.

٥ - تحديد النتائج في نقط إتصال الربط في الطبيعة:

#### Determination of The Sequence of The In Vivo Ligation Junction.

تعزل الفيروسيدات الذرية (Progeny) من نسيج مصاب بنسخة مستقيمة من CEVd أنتجت باستعمال البوادئ P<sub>1</sub> و P<sub>2</sub> (CEVd - T<sub>1</sub>) كما ذكر سابقاً وأجرى لها إكثار بواسطة النسخ العكسي / PCR باستعمال P<sub>5</sub> و P<sub>6</sub> وتركيبهما كالآتي.



$[dCTGCTGGCTCCACATCCGA] = P_6$  تكون مرتبطة مع نيوكليوتيدات 175 إلى 198، ونيوكليوتيدات 199 إلى 217 من CEVd بالترتيب شكل 29. إن ال DNA الذي حصل له إكثار أجرى له عملية تنقية بالهجرة الكهربائية في أجروس ذو نقطة ذوبان منخفضة وحصل له تسلسل مباشرة بواسطة DNA T<sub>7</sub> polymerase (Bachmann et al سنة 1990).

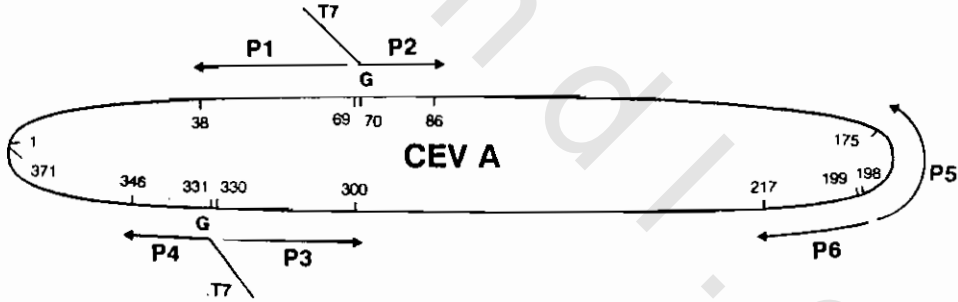
#### النتائج Results:

١ - توضيح لبناء الفيروسيدات في المعمل:

#### Scheme For The In Vitro Synthesis of Viroids

الخيط الأول البادئ Oligo deoxy ribonucleotide (شكل 30 P<sub>1</sub>) يختار من أى منطقة من الفيروسيد 5' إلى آخر قاعدة G ويعاد إتحاده إلى RNA الفيرويدي. يؤدي النسخ العكسي إلى طول كامل من cDNA يحتوي نهايات 3' في C. الخيط

البادئ الثاني (شكل ٣٠، P<sub>2</sub>) يحتوى على ال ١٨ نيوكليتيده من T<sub>7</sub> يحفز البناء فى مواقع بدء العمل وترتبط مع تتابع حوالى ١٥ نيوكليتيده مكمله لنهاية 3' من ال cDNA. النهاية G فى موقع ١٨ فى P<sub>2</sub> تشبك أو تربط القطعتين وتكون مكمله إلى C-3' من الخيط الأول من DNA. بناء الخيط الثانى وإكثار ال DNA يتحصل عليه بواسطة طريقة PCR. إن ds DNA المتحصل عليه يحتوى على محفز كامل من T<sub>7</sub> RNA polymerase وتشفر لتتابع الفيرويد بالطول المضبوط. يتم نسخ ال DNA بواسطة T<sub>7</sub> RNA polymerase وينتج فيرويد مستقيم كامل الطول. إن RNA المستقيم يمكن أن يتحلق بواسطة أنزيم الربط RNA ligase بعد أن يحدث تحورات فى 5'-triphosphate إلى Monophosphate.

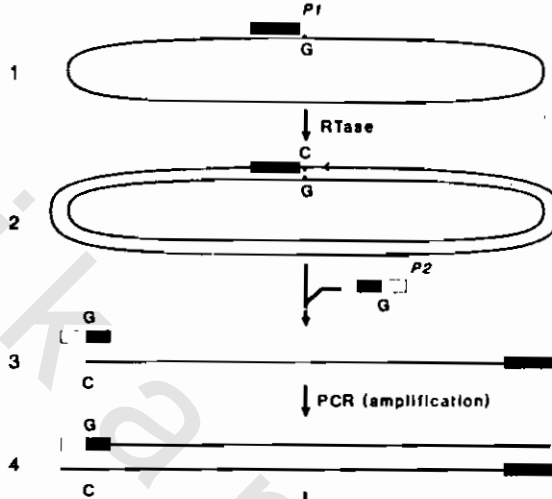


شكل رقم ٢٩ :

مواقع برايمرز متخصصة تستعمل فى تفاعل cDNA / PCR وتتابع ذرية CEVd. برايمر P<sub>1</sub> ، P<sub>3</sub> ، P<sub>5</sub> متكاملة ذات معنى أما برايمر P<sub>2</sub> ، P<sub>4</sub> و P<sub>6</sub> كانت ذات معنى مع الفيرويد. برايمر P<sub>2</sub> و P<sub>4</sub> تحتوى بروموتور بولى ميريز T<sub>7</sub> RNA . أما برايمر P<sub>5</sub> و P<sub>6</sub> كانت تستعمل للإكثار وتتابع ذرية RNA الفيرويدى. رؤوس الأسهم تشير إلى إتجاه البناء.



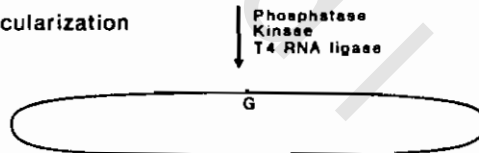
**A** cDNA synthesis and amplification



**B** transcription



**C** circularization



شكل رقم ٣٠ :

شكل تخطيطي لبناء الفيرويدات في المعمل. (A) بناء cDNA يجرى عن طريق إعادة الاتحاد مع برايمر P<sub>1</sub> بقلب الفيرويد الدائري (خطوة ١) يتبع ذلك نسخ عكسي مؤدياً إلى جزيئ منتهياً بنهاية C (خطوة ٢). أما البرايمر P<sub>2</sub>، خطوة (٣) يحتوى مشجع T<sub>7</sub> ويستعمل للإكثار في تفاعل PCR (خطوة ٤). النسخ B والتخليق C مشروحة في الكتاب.

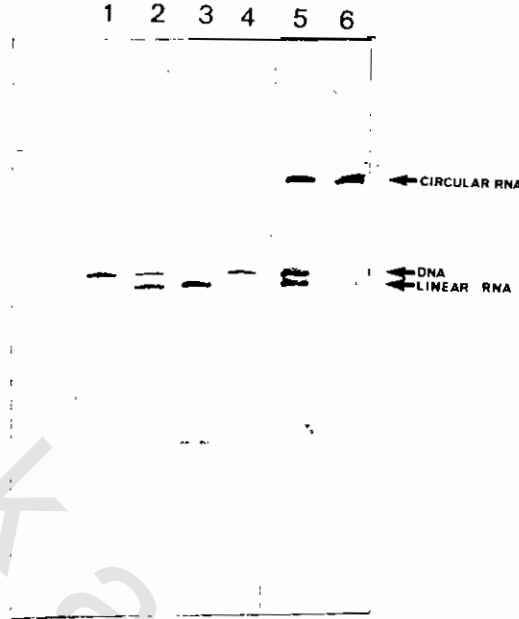
## ٢ - بناء الأشكال المستقيمة والدائرية من فيرويد اكسوكورتز الحمضيات:

## Synthesis of Linear and Circular Forms of CEVd

لقد تم بناء فيرويد اكسوكورتز الحمضيات في المعمل وظهرت بوضوح نشاطاته الحيوية في تجارب على النبات العائل. إن الفيرويد CEVd - A هو خيط مزدوج من cDNA مندمج مع المحفز  $T_7$  قد أنتج (شكل ٣١ شريحة ١) بواسطة عملية النسخ العكسي / PCR وإجراءات استعمل فيها البوداي  $P_1$  و  $P_2$  شكل ٢٩. إن ds DNA قد عومل بأنزيم Ribonuclease لاستبعاد أى بقايا. يستعمل CEVd بشكل أساسى كقالب وبعد التنقية ينسخ بواسطة  $T_7$  RNA Polymerase لانتاج منتج من RNA وحيد الخيط مساوياً لجزئ مستقيم من CEVd - A بنهايات تصل حتى رقم ٦٩ و ٧٠ (شكل ٣١ شريحة ٢،  $CEVd - T_1$ ). إن هوية نسخة من CEVd رقم  $T_1$  قد تأكدت بواسطة الهضم بأنزيمات DNase و RNase (شكل ٣١ شريحة ٣ و ٤). يتبع ذلك الهجرة الكهربائية تحت ظروف الدنترة، إن نسخة من  $CEVd - T_1$  لها نفس القابلية للتحرك والانتقال كما فى CEVd - A المستقيم ذو العدد ٣٧١ نيوكليتيده (شكل ٣١ شريحة ٣، ٦) موجود فى تخضير منقى من الفيرويد من نباتات مصابة.

النسخ الدائرية المقفولة التكافؤية قد أنتجت من  $CEVd T_1$  RNA المستقيم المتحصل عليه ثم يتبع بعد ذلك إنقلاب للنهية triphosphate - 5 إلى مونوفوسفيت عن طريق المعاملة أولاً بأنزيم الفسفاتيز ثم بعد ذلك بأنزيم Polynucleotide Kinase بعد التحضين مع  $T_4$  RNA ligase فإن نسبة من النسخ المستقيمة كانت قد تحلقت وكانت متساوية فى الحركة مع CEVd - A (شكل ٣١ شريحة ٥، ٦).

إن البوداي  $P_3$  و  $P_4$  شكل ٢٩ كانت قد استعملت فى تفاعل موازى لانتاج أنواع أخرى من CEVd المستقيم بنهايات على ٣٣٠ و ٣٣١. هذه النسخة الثانية كانت قد استعملت لإختبار إمكانية الانتاج لهذا التكنيك ولفحص النسخ المبتدأة من مواضع مختلفة على جزئ CEVd الدائرى فيما إذا كانت معدية (حيوية).



شكل رقم ٣١ :

بناء أشكال الفيروس CEVd المستقيمة والدائرية. الشريحة ١ = ناتجة عن طريقة التكبير بواسطة PCR للحمض cDNA الفيرويدي CEVd يحتوى مشجع  $T_7$ ، أما شريحة ٢ = ناتجة عن إكثار DNA و RNA المستقيم بعد النسخ. شريحة ٣ = ناتجة عن نسخ معالجة بـ DNase. أما شريحة ٤ = ناتجة عن نسخ معالجة بأنزيم RNase. شريحة ٥ = ناتجة عن إزالة الفسفات. نسخ Kinased الناتجة عن معالجة  $T_4$ ، RNA ligase، شريحة ٦ = CEVd - A مأخوذ ثانية من النباتات المصابة. النسخ الصغيرة تكون غالباً نتيجة نهايات غير ناضجة.

### ٣ - حيوية فيروس ايسوكورتز الحمضيات المصنع في المعمل:

#### Infectivity of In Vitro Synthesized CENd

بعد حقن نباتات الطماطم بحوالى ٣٠ نانوغرام / ميكولتر من كلا النوعين (نسخة مستقيمة) CEVd -  $T_1$  و CEVd -  $T_2$ ، فقد أظهرت تشوه كبير فى ساق النبات وتقرزم يدل على الإصابة بالفيروس CEVd - A خلال ثلاثة أسابيع من الحقن (جدول ١٦). لم تتأثر الحيوية بمعاملة مخلوط النسخ بأنزيم DNase ولكن تبطل الحيوية بالمعاملة بأنزيم RNase. إن نباتات الطماطم التى حقنت بكمية أكبر

من ميكوغرام / ميكولتر من قالب CEVd DNAs لم يظهر عليها أية أعراض ، هذا يدل على أن الحيوية كانت بسبب النسخة الكاملة لـ RNA .

أعيد اكتشاف ذرية الفيرويد من نباتات الطماطم المحقونة بنسخة CEVd - T<sub>1</sub> وأثبت أنها دائرية بواسطة الهجرة الكهربائية في الجيل ثنائي الاتجاه. إن تحليل التتابع لذرية الفيرويد أثبت أنها كانت مماثلة للفيرويد الأصلي في منطقة إتصال الربط في تجارب المعمل .

جدول رقم ١٦ : حيوية فيرويد اكسوكورنيز الحمضيات المبنى في المعمل :

الحيوية						الحمض النووي الأولي والتركيز		النقاج
5-10	4-10	3-10	2-10	1-10	0/10	RNA	DNA	
					0/6	—	1000	CEVd - T <sub>1</sub> PCR DNA
					0/6	—	1000	CEVd - T <sub>2</sub> PCR DNA
					6/6	30	1	Untreated - CEVd - T <sub>1</sub>
					6/6	30	0	DNase + Transcription
					0/6	0	1	RNase + Mixture
					6/6	30	1	Untreated - CEVd - T <sub>2</sub>
					6/6	30	0	DNase + Transcription
					0/6	0	1	RNase + Mixture
0/6	0/6	0/6	0/6	3/6	6/6	30	0	5'- Endmodified Triphosphate
0/6	0/6	0/6	1/6	4/6	6/6	30	0	CEVd - T <sub>1</sub> RNA Monophosphate
0/6	0/6	0/6	0/6	4/6	5/6	30	0	Transcript Hydroxyl
0/6	2/6	5/6	6/6	6/6	N.T	30	—	CEVd - A
					0/6	—	—	T <sub>E</sub> buffer

ملاحظات .:

التركيز نانوغرام / ميكولتر. N.T = لم تختبر. الحيوية = عدد النباتات التي تظهر أعراض / عدد النباتات المحقونة.

٤ - تأثير تحويل النهاية الطرفية خمسة فتحة على حيوية النسخة المستقيمة :

### Effect of 5' - terminal modification on Linear Transcript Infectivity

أن تأثير التحوير فى النهاية الطرفية 5' على حيوية نسخة CEVd - T<sub>1</sub> إختبرت بواسطة إنتاج نسخ تحتوى نهايات 3'-OH مرتبطة مع 5'- triphosphate أو monophosphate أو مجموعة OH - وأنجزت إختبارات الحيوية بواسطة سلسلة تخفيفات.

التركيز الأولى للنسخ والفيروس ١٠٠ استعملت لدراسة الحيوية كانت ٣٠ نانوغرام لكل ميكولتر وتخفيفات حضرت لغاية ١٠<sup>-٥</sup>. حقنت النباتات بتركيز ١ ميكولتر من اللقاح لكل فلقة وتركت لتنمو ثم أخذت عنها الملاحظات.

وجد أن CEVd - A الدائرى النوع الأصيل له نقطة تخفيف قصوى للاحتفاظ بحيويته وكفاءته هي ١٠<sup>-٥</sup>. وعلى أية حال فإن النسخ المستقيمة كانت فعلاً أقل حيوية حيث تبدى نقطة تخفيف ١٠<sup>-٣</sup> لـ RNA المستقيم المحتوى 5'- monophosphate و ١٠<sup>-٢</sup> لـ RNAs المستقيمة التى تحتوى 5'- triphosphate أو OH - 5' (جدول ١٦).

### مناقشة النتائج

فى البحوث المذكورة سابقاً ذكر أنه تم بناء نسخاً معدية مستقيمة مختلفة لها الطول الكامل ومتوافقة مع CEVd (الحمض RNA)، كل من هذه النسخ تسبب أعراض مرضية فى نباتات الطماطم نموذجية للعزلة الشديدة من CEVd وتؤدى إلى إنتاج ذرية CEVd دائرية تشبه الطراز الأصيل. إن الدراسات السابقة للأشكال المستقيمة من الفيروسات قد استعملت الفيروسات المستقيمة التى نتجت إما بالحدوث الطبيعى لجزئ مستقيم عزل من نسيج مصاب أو RNA فيروسى دائرى حدث له استقامة بواسطة فعل أنزيمات Nucleases أو أيونات Mg<sup>2+</sup>. إن التحضير لهذا النوع يمكن أن يحصل له تلوث بواسطة RNA الدائرى ويصبح محتويًا على

خليط غير متجانس من جزيئات غير مستقيمة أنتجت بواسطة أحداث الثغرة أو Nicking (إحداث فتحة صغيرة فى خيط الحمض النووى) على مواقع مختلفة فى الجزيء الدائرى وبالتالى يصعب تفسير نتائج الإختبارات الحيوية.

إن الطريقة المذكورة فى هذا البحث تتغلب على هذه المشاكل وتؤدى إلى إنتاج تخضيرات متجانسة من جزيئات فيرويد مستقيمة مساوية لتلك المنتجة بواسطة طريقة الثغرة المفردة على مواضع متخصصة خالية من التلوث بـ RNA الدائرى. هذه الجزيئات تكون مناسبة جداً (مثالية) لدراسة حيوية الفيرويدات المستقيمة وتأثيرات تحورات النهايات الطرفية على حيوية الفيرويد المستقيم.

إن الأشكال المستقيمة الحادثة طبيعياً للفيرويدات تتجمع فى النسيج المصاب، من المحتمل أن تكون كوسيطات تظهر فى نموذج التكاثر (النسخ) بطريقة الدائرة المتلفة. بغض النظر عن الأبحاث السابقة، فإن جميع الدراسات قد أظهرت أن هذه الجزيئات المستقيمة الحادثة طبيعياً أنها معدية. إن الأشكال المستقيمة التى تحدث طبيعياً لفيرويد تقزم الأقحوان وفيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس هى معدية مثلها مثل الأشكال الدائرية الخاصة. بينما الشكل المستقيم لفيرويد تقزم الأقحوان قد ذكر بأنه ناتجاً عن الانشطار العشوائى، وأن فيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس يبدو بأنه ناتج بواسطة الانشطار الذى يحدث فى بضع مواقع خاصة. إن هذه الجزيئات المستقيمة لفيرويد PSTVd قد وصفت وذكر لها مميزات أكثر وتبين بأنها تحتوى نهايات طرفية 5'-OH و 3'-cyclic phosphate. إن التجمعات غير المتجانسة من جزيئات فيرويد PSTVd التى أحدثت فيها ثغرة صناعية (nicked) المنتجة باستعمال Nucleases و Cl<sub>2</sub> و U<sub>2</sub> والتى أيضاً تحتوى نهايات طرفية 5'-OH و 3'-cyclic phosphate ، قد تبين أيضاً أنها تظهر حيوية كاملة، بينما الجزيئات المشابهة التى تحتوى نهاية 3'-OH و 5'-phosphate المنتجة بواسطة الثغرة مع S1 nuclease فإنها تعتبر غير معدية. هذه البيانات تقترح بأن حلقة 2', 3'-cyclic phosphate هى خطوة أولية أساسية للحيوية (العدوى). وعلى أية حال فإن نتائج

هذا البحث على فيروس ايسوكورتز الحمضيات لم تدعم هذه الفكرة (النظرية) بسبب أن النسخ المستعملة في هذه الدراسة كلها تحتوي OH<sup>-</sup> 3<sup>-</sup> وكانت معدية ولو على كميات صغيرة بالمقارنة مع الفيروس الدائري.

جزيئات فيروس PSTVd والتي أجرى لها عملية الثغرة صناعياً nicked باستعمال Mg<sup>2+</sup> لانتاج أشكال مستقيمة مع مخلوط من نهايات 2<sup>-</sup> و 3<sup>-</sup> phosphate مقترنة مع OH<sup>-</sup> 5<sup>-</sup> أظهرت بأنها ذات حيوية خاصة منخفضة بأضعاف 10<sup>3</sup> - 10<sup>4</sup> أو أقل منه في الفيروس الدائري مشابهة بذلك لحيوية الجزيئات المستقيمة المذكورة هنا. يبدو من المحتمل أن أطراف 2<sup>-</sup> 3<sup>-</sup> Cyclic Phosphate يجب أن تكون موجودة في ال RNA المستقيم ليظهر حيوية كاملة، ولأن الجزيئات تحتوي مجموعات أخرى على 3<sup>-</sup> terminus دائماً يبدو بأنها تظهر مستوى منخفض من الحيوية. إن التحوير أو التعديل في ال 5<sup>-</sup> End يظهر بأن له قليلاً أو بدون تأثير على حيوية النسخ المستقيمة عند مقارنته بالفيروس الدائري.

هناك نوع جديد ذو حيوية من RNA ligase في مستخلصات جنين القمح والذي يتطلب أطراف 2<sup>-</sup>, 3<sup>-</sup> cyclic phosphate وإيضاً إما 5<sup>-</sup> phosphate أو OH<sup>-</sup> 5<sup>-</sup> قد تم وصفه ولقد استخدم في المعمل مثل Viroid ligase. ولقد تبين أن نسخ CEVd المستقيمة والتي لا تحتوي النهاية الطرفية 2<sup>-</sup>, 3<sup>-</sup> cyclic phosphate كانت معدية وهذا يؤدي إلى الاعتقاد بأنه إما النوع الثاني من ال ligase يكون موجوداً في العائل النباتي أو أن 3<sup>-</sup> terminus تخضع لعملية الفسفرة في الطبيعة In Vivo Phosphorylation لانتاج 2<sup>-</sup>, 3<sup>-</sup> cyclic phosphate والتي يمكن فيما بعد أن تعمل كمادة تفاعل لأنزيم ال Ligase الموصوف سابقاً.

المخطط الثاني يبدو أنه أكثر احتمالاً، ولأن مستخلصات جنين القمح لم تظهر نشاطاً يمكن اكتشافه لأنزيم ال Ligase عندما يحضن مع جزيئات فيروس مستقيم

أنتجت بواسطة S1 nuclease والذي يمتلك نهاية طرفية OH<sup>-3</sup> و phosphate<sup>-5</sup> مشابهة لواحدة من النسخ التي أظهرت أنها معدية في هذه الدراسة.

إن الفيروسات لم تظهر أى تشفير للبروتينات وتبقى عملية إحداث الطفرات Mutagenesis أكبر طريقة لتحليل وظائف تركيبها. وعلى أية حال فإن دراسة إحداث الطفرات قد تبين بأنها محدودة بسبب الحاجة إلى بناء كلونات DNA معدية فى الشكل head - to - tail dimers وأيضاً بسبب الحاجة لبناء أعداداً كبيرة من الطافرات mutants من التى معظمها يكون غير قابل للحياة. إن نظام بناء ال RNA المذكور فى البحث السابق يتجنب الحاجة إلى كلونة وهو مناسب بشكل خاص لسرعة إحداث الطفرات الموجهة لمواقع معينة - di - Rapid site reated mutagenesis فى ال RNA الدائرى بسبب بادئ Oligonucleotide محتوياً طفرات يمكن أن تختار من أى منطقة فى جزئ<sup>5</sup> إلى نهاية موقع G. فمثلاً بالإضافة إلى الفيروسات فإن الفيروسات و Hepatitis delta virus RNA وخمائر<sup>20</sup> S RNA replicon يمكن أن تبنى بواسطة هذا النظام. إن أنظمة بناء RNA داخلاً فى بوايد<sup>5</sup> Oligonucleotide محتوية أنزيم RNA polymerase المعتمد على DNA محفزاً للتتابع قد استعمل قبل ذلك لتكاثر RNA من قالب DNA مكلون أو لإنتاج RNA فيروسى معدى محتوياً إضافة لذلك نيوكليوتيدات<sup>3</sup> - termind من PCR DNA مكلون. كذلك فإن النظام المذكور هنا فإنه لا يتدخل فى إجراءات كلونة ويؤهل البناء فى المعمل للحجم المضبوط ل RNAs ليس فقط من قوالب RNA الدائرى ولكن أيضاً من RNAs المستقيم المحتوى<sup>5</sup> - terminal G residue. كذلك فإن mRNAs ويمكن أيضاً RNAs الفيروسى أن تصنف فى هذا المخطط، وهذا التكنيك يرتبط مع إجراء غطاء RNA لإنتاج RNAs فيروسى نشيط بيولوجياً، بدون شك سوف يستخدم فى الدراسات على مثل هذه الجزيئات.



ثانياً: - المعالجة بالحرارة المنخفضة ومزرعة القمة المرستيمية لاستبعاد أربعة فيرويدات من النباتات المصابة:

### A Low Temperature Therapy and Meristem - Tip Culture For Eliminating Four Viroids From Infected Plants

مقدمة:

إن الجمع بين المعالجة الحرارية ومزارع القمة المرستيمية قد استعمل منذ مدة طويلة كطريقة للتخلص من الفيروسات من النباتات المصابة، ولكن ثبت بأنها غير فعالة إلى حد ما في التخلص من فيرويد الدرنة المغزلية في البطاطس والتخلص من فيرويد تقزم الأبقوان من النباتات المصابة بالفيرويد في البطاطس والأبقوان. هذا لا يثير الدهشة إذا علمنا جيداً أن الفيرويدات تخترق الخلايا المرستيمية بسهولة أكثر من الفيروسات وأن درجات الحرارة العالية تناسب تناسخ الفيرويد. عندئذ فإن المحاولات لاستبعاد الفيرويدات من النباتات المصابة عن طريق المعالجة بالحرارة المنخفضة مرتبطة مع مزارع القمة المرستيمية يبدو أنها ممكنة. وفي الحقيقة أمكن الحصول على نباتات بطاطس خالية من فيرويد الدرنة المغزلية وكذلك نباتات حشيشة الدينار (HOP) خالية من فيرويد تقزم حشيشة الدينار قد تم بناء على استعمال هذه الطريقة:

تؤخذ نباتات بطاطس الصنف المزروع Prosna من عقل ساق أو درنات ثم تحقن بسلاسل شديدة من فيرويد الدرنة المغزلية في البطاطس (s - PSTVd)، بالإضافة إلى نباتات الأبقوان الصنف المزروع Bonnie Jean المصابة بفيرويد تقزم الأبقوان CSVd والصنف المزروع Deep Ridge المصاب بفيرويد التبرقش الشاحب في الأبقوان ChCMVd والصنف المزروع Mistletoe المصاب بفيرويد الثمرة الباهتة

ملاحظة: قام بهذا البحث إثنان من العلماء في وارسو (بولندا) والذي أمدني بالبحث الدكتور - E. Paduch

.Cichal

في الخيار CPVd وتنمى في مرآقد نمو على درجة حرارة ٥م وإضاءة ١٦ ساعة يومياً مع كثافة ضوئية 5.0001X. أما نباتات الكنترول من نفس الأنواع والأصناف المزروعة والتي أصيبت بنفس الفيروسات نميت في صوبا زجاجية تحت ظروف نمو قياسية.

درنات بطاطس من الصنف Azalia والصنف Irys المصابة بالسلالة الشديدة من فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس s - PSTVd أو السلالة المعتدلة PSTVd - m تحتفظ فى ثلاجة على درجة حرارة ٦ - ٧م. أما الدرناات الكنترول من نفس الأصناف والتي أصيبت بنفس الفيروسات حفظت على درجة حرارة الغرفة العادية.

بعد ٣ و ٦ شهور تقطع القمم المرستيمية من السيقان أو نموات الدرنة من النباتات المعاملة والكنترول. تظهر سطوح المواد النباتية عن طريق غمرها فى ٩٦٪ إيثانول لمدة ٣٠ ثانية ثم تشطف بماء معقم. قطعت القمم المرستيمية (قبة المرستيم مع واحدة أو إثنين لفة إبتدائية) فى ظروف معقمة بنصل حاد معقم. نقلت القمم المقطوعة على ورق ترشيح يعمل كموصل إلى أنابيب إختبار بايركس (١ سم قطر و ٧ سم طول) وضع فيها ٤ ملتر محلول بيئة يسمى بيئة Murashinge & Skoog (هذه البيئة ذكرها كل من Mellor & Smith سنة ١٩٧٧) والتي كانت قد عقت مسبقاً لمدة ٣٠ دقيقة فى الاوتوغليف على ضغط جوى واحد. تغلق أنابيب الإختبار بغطاءات قطنية من نوع صوفى ويقطع من Parafilm وحفظت على دجة حرارة ١٦ - ٢٠م و ١٤ ساعة إضاءة يومياً وكثافة ضوئية 2.0001X.

عندما أصبح طول النباتات النامية من الدرناات بطول ٣سم وعندما تكون لها نظام جذرى جيد نقلت إلى أوعية بلاستيكية صغيرة مملوءة بمخلوط (٢:١) - Peat moss ورمل. بعد ١٠ - ١٤ يوم أخرى نقلت إلى أوعية بلاستيكية مملوءة بمواد مناسبة للنمو ثم تركت لتنمو تحت ظروف الصوبا الزجاجية المثالية.

إختبر وجود الفيرويد فى النبات بعد ٢، ٤، و٦ شهور من النمو فى الصوبا الزجاجية. النباتات المفردة إختبرت بواسطة الهجرة الكهربائية فى Polyacrylamide gel وبواسطة الإختبارات الحيوية. نباتات الطماطم صنف Rutgers استعملت ككاشف لكل من PSTVd السلالة الشديدة والمعتدلة، نباتات الأقحوان الصنف المزروع Deep Ridge كاشف لـ ChCMVd ونباتات الأقحوان الصنف المزروع Bonnie Jean كاشف لكل من CSVd و CPFVd. هذه الأصناف ثبت وأنها نباتات كاشفة جيدة للفيرويدات فى تجارب سابقة.

### النتائج :-

نباتات الأقحوان تحملت ظروف درجات الحرارة المنخفضة والكثافة الضوئية المنخفضة بصفة أحسن من نباتات البطاطس جدول ١٧. كانت أقل درجة تحمل لنباتات البطاطس هى النامية من الدرنات. فقط نبات مفرد واحد من ٢٠ نبات بقيت حية لمدة ٣ شهور تحت هذه الظروف وحتى هذا النبات المفرد مات قبل نهاية الستة شهور مدة المعالجة. أما نباتات البطاطس النامية من عقل ساق بقيت حية لمدة أطول نوعا ما وأربعة نباتات منها بقيت حية حتى نهاية الستة شهور مدة المعالجة. ومن ناحية أخرى فإن درنات البطاطس بقيت حية بصورة جيدة فى ظروف المعالجة والتي كانت غالباً مثل الظروف المثالية لتخزين البطاطس جدول ١٧.

أما بالنسبة للقمم المرستيمية، تقريباً فإن نصفها قد نمت إلى نباتات ولا يوجد مشكلة فيما إذا كانت قد قطعت من نباتات الأقحوان أو البطاطس (جدول ١٧). لم يلاحظ أى تأثير لظروف المعالجة على بقاء المرستيمات حية. إن العدد الحقيقى للقمم المرستيمية التى بقيت حية يختلف من ٢٥ - ٩٠٪ للنباتات المختلفة ولكن يبدو أنها لم تتأثر بنوع النبات ولا بظروف المعالجة جدول ١٧.

إن الأعراض النموذجية للإصابة بالفيرويدات ChMVD، CSVd و CPFVd كانت ملاحظة على نباتات الأقحوان النامية من قمم مرستيمية أخذت من نباتات

الكنترول الجاهزة فى الشهر الأول من نموها فى الصوبا الزجاجية. نباتات البطاطس النامية من قمم مرستيمية المأخوذة من مثل هذه النباتات أظهرت أعراض PSTVd بعد ٢ أو ٣ شهور من نموها فى الصوبا الزجاجية. جميع الفيرويدات الأربعة اكتشفت فى هذه النباتات بواسطة الاختبارات الحيوية أو بواسطة إختبار الهجرة الكهربائية فى Polyacrylamide gel .

ولسوء الحظ فإن الأربعة فيرويدات كلها اكتشفت أيضاً فى جميع النباتات النامية من القمم المرستيمية المأخوذة من النباتات التى قد نمت لمدة ٣ شهور فى ظروف المعالجة. الفيرويدات اكتشفت فى هذه النباتات بعد شهرين من النمو فى الصوبا الزجاجية (جدول ١٨) وبعد شهر أو شهرين جميع هذه النباتات أظهرت أعراض.

ومن ناحية أخرى ولا أى نبات من النباتات النامية من قمم مرستيمية المأخوذة من النباتات التى قد نمت لمدة ٦ شهور فى ظروف درجات حرارة منخفضة لم تظهر أعراض إطلاقاً للإصابة الفيرويدية خلال ستة شهور من النمو فى الصوبا الزجاجية. إن الإختبارات الحيوية وإختبارات الهجرة الكهربائية فى Polyacrylamide gel قد أثبتت أنه بعد شهرين من النمو فى الصوبا الزجاجية فإن أعداداً كبيرة من هذه النباتات كانت خالية من الفيرويدات. إعادة الإختبار لهذه النباتات بعد ٤ و ٦ شهور من النمو فى الصوبا الزجاجية أظهرت الوجود للفيرويدات فى بعضها ولكن لا تزال ١٨,٥ - ٨٠٪ من هذه النباتات خالية من الفيرويد جدول ١٨ .

الدرنات من نباتات البطاطس والعقل من نباتات الأقحوان التى ظهرت بأنها خالية من الفيرويد بعد ٦ شهور نمو فى الصوبا الزجاجية قد نمت إلى نباتات وهذه النباتات أختبرت ثانية لمعرفة وجود الفيرويدات فأعطت نتائج سالبة .

جدول ١٧: حصر لنباتات البطاطس والدرنات ونباتات الأقحوان في درجات الحرارة المنخفضة ثم وحصر للنباتات الناتجة من القعم المرستيمية لهذه النباتات.

الأجزاء النباتية والفيروس	المعاملة	عدد النباتات (درنات)		عدد المرستيمات المقطوعة من النباتات (درنات) بعد المعالجة		عدد النباتات النامية من المرستيمات المقطوعة بعد المعالجة	
		معاملة قاومت المعالجة لمدة ٣ شهور	معاملة قاومت المعالجة لمدة ٦ شهور	٣ شهور	٦ شهور	٣ شهور	٦ شهور
أ- بطاطس نوع Prosna - نباتات	معاملة	٢٠	١	٣	٢	٢	٢
١- نامية من درنات	معاملة	٢٠	١	٣	٢	٢	٢
٢- s - PSTVd	معاملة	٢٠	١	٣	٢	٢	٢
ب- بطاطس نوع Prosna نباتات	معاملة	٢٠	٤	١٢	٥	١١	٥
١- نامية من عقل	معاملة	٢٠	٤	١٢	٥	١١	٥
٢- s - PSTVd	معاملة	٢٠	٤	١٢	٥	١١	٥
ج- بطاطس نوع أزاليا - درنات	معاملة	٤	٤	٨	٥	٤	٥
s PSTVd	معاملة	٤	٤	٨	٥	٤	٥
د- بطاطس نوع أيرس درنات	معاملة	١٢	١٢	١٨	١٠	٧	٨
s PSTVd	معاملة	١٢	١٢	١٨	١٠	٧	٨
هـ- بطاطس نوع أزاليا درنات	معاملة	١٢	١٢	٢٠	١٢	١٠	١٢
m PSTVd	معاملة	١٢	١٢	٢٠	١٢	١٠	١٢
و- بطاطس نوع أيرس درنات	معاملة	١٢	١٢	٢٠	١٢	١٠	١٢
m PSTVd	معاملة	١٢	١٢	٢٠	١٢	١٠	١٢
ز- أقحوان نوع ديب رادج	معاملة	١٩	١٩	٥٧	٢٨	٣٧	٢٨
ChCMVd	معاملة	١٩	١٩	٥٧	٢٨	٣٧	٢٨
ح- أقحوان نوع بول جين	معاملة	٢٥	٢٥	٧٥	٣٢	٢٧	٣٢
CSVd	معاملة	٢٥	٢٥	٧٥	٣٢	٢٧	٣٢
ط- أقحوان صنف مستيليتو	معاملة	١٠	١٠	٣٠	١٠	١٠	١٠
CPFVd	معاملة	١٠	١٠	٣٠	١٠	١٠	١٠

جدول ١٨: كفاءة استبعاد أربعة فيرويدات من نباتات البطاطس والأقحوان باستعمال مزرعة القمة المرستيمية بعد المعالجة بالحرارة المنخفضة.

عدد النباتات الخالية من الفيرويد اعتماداً على الاختبار بعد فترة نمو في الصوباء الزجاجية	عدد النباتات النامية من المرستيم المقطوع			مدة المعالجة بالأشهر	المادة النباتية والفيرويد
	٢ شهر	٤ شهر	٦ شهر		
—	صفر	—	—	٢٥	بطاطس - نباتات الصنف بروستا
—	صفر	—	—	٥	نباتات بطاطس نامية من الساق
٦	٩	٨	١١	٦	نباتات بطاطس نامية من عقل المعاملة بالفيرويد s - PSTVd
—	صفر	—	١٥	كنترول	بطاطس - صنف بروستا نباتات
—	صفر	—	٥	٣	بطاطس صنف ازالا - درنات
١	٢	٢	٤	٦	s - PSTVd
—	صفر	—	٢٢	كنترول	بطاطس مزروعة صنف أيرس
—	صفر	—	١٠	٣	بطاطس درنات
٢	٥	٣	٧	٦	s PSTVd
—	صفر	—	٢٦	كنترول	بطاطس مزروعة صنف بروستا
—	صفر	—	١٢	٣	درنات صنف ازالا
٥	٧	٦	١٠	٦	m PSTVd
—	صفر	—	٢١	كنترول	بطاطس مزروعة صنف أيرس
—	صفر	—	١٠	٣	بطاطس درنات
٤	٦	٥	٨	٦	m PSTVd
—	صفر	—	٥٤	كنترول	الأقحوان
—	صفر	—	٢٨	٣	أقحوان صنف ديب راجد
٢٦	٣١	٢٩	٢٧	٦	فيرويد ChCMVd
—	صفر	—	٥٠	كنترول	أقحوان
—	صفر	—	٣٢	٣	أقحوان صنف بون جين
٥	١٥	٥	٢٧	٦	CSVd
—	صفر	—	٤٠	كنترول	أقحوان
—	صفر	—	١٠	٣	أقحوان صنف مستلوت
٨	٩	٩	١٠	٦	CPFVd

ثالثاً: - تثبيط إصابة الفيرويد بواسطة تعبيرات RNA مضاد المعنى فى النباتات المحولة وراثياً:

### Inhibition of Viroid Infection by Antisense RNA Expression in Transgenic Plants

#### مقدمة :-

تعتمد هذه الطريقة على بناء جزيئات من RNA متكاملة مع mRNA الناتج من نسخ جين معين، ويطلق على هذا الأخير اسم Sense RNA (ذو معنى) نظراً لأنه يحمل الكودونات التى تتم قراءتها أثناء عملية الترجمة لانتاج بروتين فعال يحتوى على تتابع نوعى من الأحماض الأمينية. ومن جهة أخرى يطلق على النسخة المكاملة من RNA اسم مضاد المعنى "Anti Sense" نظراً لأن تتابع النيوكليوتيدات بها يكون معكوساً بالنسبة للتتابع على النسخة الأصلية مما يترتب عليه عدم إمكان قراءة كودونات شفرية صحيحة وذات معنى بل تقرأ على أنها كودونات إنهاء الترجمة فى أى إطار قراءة من الإطارات الثلاثة.

يؤدى توافر RNA مضاد المعنى مع mRNA المرسل الطبيعى لنفس الجين فى سيتوسول الخلية إلى حدوث تجاذب نوعى بينهما بحيث ينتج جزئ مزدوج هجين من RNA، وبديهي أنه لا يمكن ترجمة مثل هذا الجزئ المزدوج مما يعنى عدم الحصول على الناتج النهائى لتعبير هذا الجين (البروتين) وبالتالي يكون بمقدورنا تحديد وظيفة هذا الجين.

وتتلخص طريقة إنتاج RNA مضاد المعنى لجين ما فى الخلية فى الآتى :-

ملاحظة: قام بهذا البحث أحد عشر عالماً فى مركز أبحاث البيولوجيا الجزيئية فى ألمانيا والذى أمدنى بهذه المعلومات مشكوراً هو الدكتور Detldv Riesner وأنا أعرضه بشكل مختصر.

١ - كلونة الجين المطلوب دراسته.

٢ - فصل التتابع الشفري للجين عن منطقة البروموتور الخاص به باستخدام أنزيمات القطع المحددة المناسبة.

٣ - إعادة إتحاد التتابع الشفري للجين مع نفس البروموتور ولكن فى اتجاه معكوس التتابع.

٤ - إعادة إدخال هذا التتابع المعكوس المتحد بالبروموتور. أى الجين المضاد المعنى إلى الخلية المضيفة بإحدى طرق التحول الوراثى.

تكون المحصلة النهائية لهذه العملية هى أن الجين المعكوس التتابع سيتم نسخه إلى نسخ RNA مضاد المعنى، وهذه بدورها عند اصطدامها بالنسخ الطبيعية لـ m RNA لنفس الجين (ذو المعنى) تتزاوج معها مكونة جزئ RNA مزدوج لا يمكن ترجمته مما يؤدي إلى توقف إنتاج البروتين الذى يشفر له هذا الجين.

لقد تم استخدام RNA مضاد المعنى فى إيقاف تعبير عدد كبير من الجينات فى كل من غير مميزة النواة ومميزة النواة. بالإضافة إلى استخدامه فى إيقاف تعبير الجينات معروفة الوظيفة فإنه يمكن استخدامه أيضاً فى التعرف على وظيفة الجينات المجهولة الوظيفة. إذ يمكن استخدام RNA مضاد المعنى فى إنتاج طفرات وظيفية بحيث يعطى الشكل المظهري الطافر للكائن الذى حدثت به هذه العملية ومعلومات هامة عن وظيفة الجين فى الخلية المتأثرة.

ولكى نضمن الحصول على إيقاف تام للتعبير الجينى فإنه إما أن يستخدم بروموتور قوى جداً لدفع عملية نسخ التتابع الشفري المعكوس أو أن يتم ادخال عدد كبير من نسخ RNA مضاد المعنى إلى الخلية المضيفة.

(هذه المقدمة أخذت من كتاب البيولوجيا الجزيئية للدكتور محمد فتحى عبد الوهاب سنة ١٩٩٣).



## استعمال RNA مضاد المعنى مع الفيروسيدات:

معظم التطبيقات التي أجريت باستعمال RNA مضاد المعنى والموجهة مباشرة ضد الجينوم الفيروسي أظهرت نجاحاً محدوداً. هناك تعبيرات أكثر فعالية للإصابة الفيروسية حصل عليها في حالة الفيروس ذو أَل DNA، الفيروسات المتجمعة (فيروسات الجوزاء Geminivirus). هذا من المحتمل أن يكون بسبب موقع التناسخ والتجمع للفيروس، فإن الفيروسات المتجمعة تكون في الأنوية بينما مع الفيروسات ذات RNA النباتية تكون موجودة في السيتوبلازم، وبالتالي فإن تضاعف الفيروسات المتجمعة وتناسخ RNA مضاد المعنى Antisense تحدث في نفس الموضع والذي يكون أكثر ملائمة لتكوين معقدات من مضاد المعنى وتتابعات الهدف، عند مقارنتها مع مواقع الفيروسات ذات RNA ومتطلباتها لنقل نسخ مضاد المعنى من النواة إلى السيتوبلازم وما يتبع ذلك من وقف للتناسخ.

هذه الحقائق تدعم فكرة أن الإصابة الفيروسية أيضاً يمكن تثبيطها بكفاءة بواسطة RNA مضاد المعنى antisense بسبب موقعها في النواة. إن عدم وجود دليل لأي ناخب مترجم للفيروسيدات وعدم وجود غطاء بروتيني، فإن جميع النشاطات الأنزيمية والوقاية ضد التحطيم وتجهيز وتخزين الفيرويد يجب أن تتم بواسطة العائل وأن المعلومات الوراثية لـ RNA الفيرويدي لا يمكن أن تكون التابع للبروتين ولكن يجب أن تكون لتركيبه الخاص.

من المفترض أن معظم الفيروسيدات تناسخ بسلوك غير متماثل شاملة ميكانيكية الدائرة الملتفة لانتاج أشكال minus - Sense RNA Oligomeric والتي تعمل كقوالب لـ Oligomers of plus - sense polarity والأخيرة تجهز فيروسيدات جديدة (خلفه) ذات وحدة طول وبالتحديد plus - polarity. وبالتالي فإن RNA مضاد المعنى يستطيع، في الأصل أن يتوجه إما ضد ذرية الفيرويد monomeric أو الوسيطات الموجبة ذات المعنى Plus - Sense intermediates بالإضافة إلى أنه يوجه ضد تناسخ الوسيطات Minus - Sense Oligomeric. إنه من غير

الممكن استعمال نسخاً Complete monomeric Copies من cDNA الفيرويدي لـ RNA مضاد المعنى الهدف في الطبيعة بسبب الطول الكامل لمكلمات RNAs التي توجد كوسيطات تناسخ في النواة بأية طريقة كانت ولا تشكل بسهولة ds RNA في المعمل. زيادة على ذلك فإن التحول مع مثل cDNA الفيرويدي يمكن أن تحفز الإصابة في النباتات المحولة.

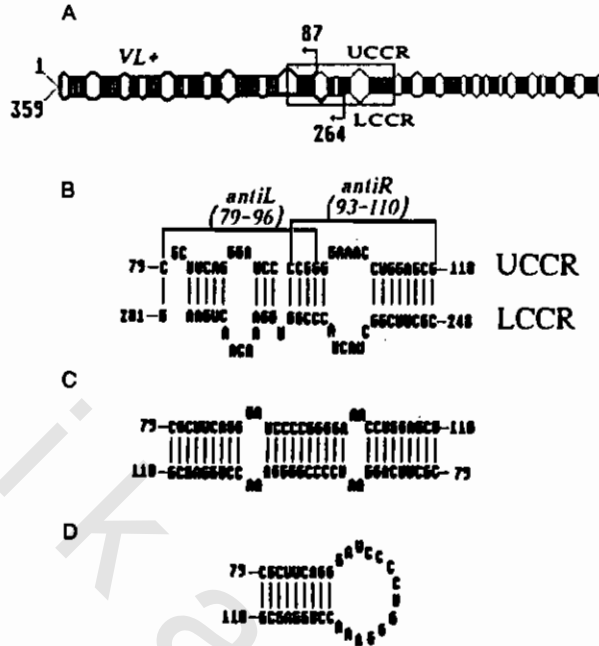
نظراً لأن التركيب والمقاطع التركيبية لـ RNA الفيرويدي كلها معروفة جيداً وهناك نماذج مفصلة موجودة وتوضح شمولها على حوافز تركيبية Structural motifs وخطوات وظيفية مثل التناسخ، التجهيز وغيرها.

في الجزء الأول من هذه الدراسة كان هناك محاولة لتوجيه RNA مضاد المعنى ضد حافز تركيبى خاص Special Structural motif. إن المنطقة المركزية المحفوظة (CCR) Central conserved Region الذى حددت تنابعها أولاً في فيرويد الدرة المغزلية في البطاطس PSTVd تكون ذات اهتمام خاص بسبب أن تنابعها يكون مميزاً لجميع صف Class الفيرويدات. إن ما يسمى صف PSTVd من المفروض أن يكون هو الأساس في نشوء الفيرويدات. إن CCR تتكون من منطقة عليا UCCR ومنطقة سفلى LCCR (شكل ٣٢) واللذان معاً تشكلان قطعة من التركيب شبه العصى الأصلي للفيرويد. وحسب معلوماتنا الحالية (١٩٩٤) عن تجهيز الفيرويد، هذا يعنى الانشطار للخيط الموجب - strand in Plus - oligomeric intermediate من وحدة الطول واللحام لتكوين الدائرة كل ذلك يحدث في الـ UCCR. إن وسيط التناسخ يجب أن يخضع لتحولات تركيبية معينة ليعمل كقالب لتجهيز أنزيمات العائل وإن منع مثل هذا التحول بسبب تداخل RNA مضاد المعنى يمكن أن يثبط تجهيز الفيرويد وبالتالي تناسخ الفيرويد في الطبيعة.

في الجزء الثانى من هذه الدراسة فقد أختير cDNA ليغطي النصف الأيسر فقط من التركيب الثانوى شبه العصى للفيرويد كتركيب RNA مضاد المعنى ضد تناسخ الخيط السالب الوسيط. هناك مستوى منخفض جداً من الخيوط السالبة

الوسيط في خلايا النبات المصابة بالمقارنة مع ذرية الفيرويد الدائرية. إن تركيز الخيوط السالبة يصل إلى مستوى أكثر تبكيراً خلال الإصابة منه في-Plus mono mers مبيناً أن الوسيطات السالبة تكون إما قد بنيت على معدل منخفض أو تحلل بسرعة أكثر عند مقارنتها مع Plus monomers. وبالتالي فإن توجيه RNA مضاد المعنى ضد minus - sense oligomers يمكن أن يكون ذو استراتيجية أكثر كفاءة من التوجيه ضد ذرية الفيرويد Plus - Sense Viroid Progeny .

ولقد تبين قبل ذلك أن القطع القصيرة من ال DNA وال RNA المكاملة تستطيع أن تثبط الإصابة بالفيرويد، هذا ما وجدته Matousek سنة ١٩٩٤. هذه القطع كانت تحضن في المعمل مع PSTVd والمعقد المتكون سابقاً كان يحقن في النبات كان التثبيط أكثر فعالية عندما كان التحضين يجري على درجات حرارة عالية حيث التركيب الثانوي للفيرويد كان يندثر. وكنتيجة لهذه المعطيات فإن مركبات RNA مضاد المعنى الفيرويدي من الممكن أن لا يتكون تحت الظروف الفسيولوجية، التجهيز الخلوي لكل من بناء الفيرويد وال RNA مضاد المعنى ذو الفائدة وتكوين المركب يجب أن يقلد ويدرس في المعمل تحت الظروف الفسيولوجية. بناء وسيطات تناسخ الفيرويد وال RNA مضاد المعنى يمكن أن تجرى في المعمل عن طريق النسخ من قوالب DNA باستعمال أنزيم-T7 RNA Polyme rase وتكوين مركبات بين RNA الهدف ومضاد المعنى، يمكن أن يتبع ذلك تقدير كمي بواسطة المدرج الحراري للهجرة الكهربية في الجيل- Temperature gradient gel electrophoresis والذي يرمز له TGGE وبواسطة الأجسام المضادة anti dsRNA antibodies. لقد ظهر أن ال RNAs مضادات المعنى المختارة ضد الخيط الموجب وأيضاً ضد وسيطات تناسخ الخيط السالب تشكل مركبات ثنائية الخيط متخصصة مع أهدافها تحت الظروف الفسيولوجية، وهذا وسيط ل RNA مضاد المعنى ذو أهمية في تأثيرات التثبيط على إصابة الفيرويد قد لوحظت في الطبيعة باستعمال نباتات بطاطس تجهز RNA مضاد المعنى.



شكل رقم ٣٢ :

RNAs مضاد المعنى والهدف. A = تركيب ثانوى للفيرويد PSTVd مع المنطقة المحفوظة المركزية (UCCR / LCCR) وموقع VL<sub>+</sub> مضاد المعنى (الخط السميك) والذي يوجه ضد نسخ سالبة الخيط. B = توضح UCCR و Anti L.L CCR تمثل مضاد المعنى مع التابع التكميلى لتتابع الفيرويد (79 - 96) و anti R تمثل RNA التكميلى مضاد المعنى لتتابع الفيرويد (93 - 110). أما C = التركيب الثلاثى الحلزوني المتكون بواسطة وحدتين من UCCR. أما D = تركيب دبوس الشعرا المتكون ضمن الجزئ فى القواعد الزوجية للتركيب UCCR.

## النتائج Results

### ١ - تحليل المركب المتكون من RNA مضاد المعنى و RNA الهدف فى المعمل:

إن RNA مضاد المعنى أختير ضد المنطقة المركزية العليا المحفوظة (UCCR) شكل ٣٢ فى نسخ الشريط الموجب بسبب دوره الأساسى فى تجهيز الفيرويد. هناك فى وسيطات تناسخ ال Oligomeric إثنين من UCCR من الممكن أن تشكل منطقة حلزونية (لولبية) ثلاثية ثابتة مكونة من ٢٨ زوج قواعد معترضة بواسطة إثنين فقط

من العروات الصغيرة الداخلية (شكل ٣٢، C). هذا التركيب يكون نتيجة نوع التتابع المتعاكس Palindromic لمنطقة UCCR. كذلك أيضاً فإن RNA مضاد المعنى إذا تكامل مع الطول الكامل لمنطقة UCCR يستطيع أن يشكل تركيبات لجزئ داخلي ثابت حلزوني ثلاثي أو تركيب دبوس الشعر I (شكل ٣٢، D). هذه التركيبات بإمكانها أن تتنافس مع المركبات المتكونة من RNA الفيرويدي ومضاد المعنى. من أجل ذلك الغرض أيضاً فإن إنئين من RNAs مضاد المعنى أقصر اختياراً مكملان للجزء اليسار anti L أو للجزء اليمين من UCCR anti R (شكل ٣٢، B). الذي يمكن ملاحظته في الهجرة الكهربائية في أل-Polyacrylamide gel أن ال RNA مضاد المعنى ذو الطول الكامل فإنه فعلاً يشكل أساساً (إلى حد بعيد) Dimers أو جزئ بيني لدبابيس الشعر. هذا أدى إلى الاستعمال الكبير لتتابعات مضاد المعنى الأقصر anti R و anti L بالنسبة للإختبارات المعملية بالإضافة إلى تحولات النبات. إن نسخ الخيط الموجب Dimeric من الفيرويد PSTVd تعمل كالنموذج الأصغر لوسيطات نسخ أكبر. إنها تمتلك موضعين للانشطار وموضع واحد للاتحام رغم أن التجهيز ممكن أن يحدث على موضع واحد في الفيرويد.

إن تحليل المركب المتكون بواسطة الطريقة TGGE لها من الفوائد أكثر من الطرق الأخرى حيث أنها تسمح للباحث ليس فقط بفصل RNA المعقد من غير المعقد ولكن أيضاً للتفريق بين أشكال ال RNA المختلفة. لقد طبقت أول مرة سنة ١٩٨٨ بواسطة Hecker et al لتحليل المركب المتكون من خيوط سالبة وموجبة مع تتابع PSTVd. في هذه التجربة إقتصر التحليل على ما يسمى تجربة ما قبل النسخ Pre - transcription والتي فيها كان RNA مضاد المعنى موجوداً مسبقاً في المخلوط عندما بدأ نسخ نسخة من ال Dimeric.

إن التحليل بطريقة TGGE أجرى مباشرة بعد توقف النسخ بواسطة إضافة ٥ مللى مول EDTA. يظهر على الجيل في شكل ٣٢، A الذي فيه المركب المتكون مع anti L كان قد تحلل، عديداً من المنحنيات للتحويل واضحة، هذه يشار إليها

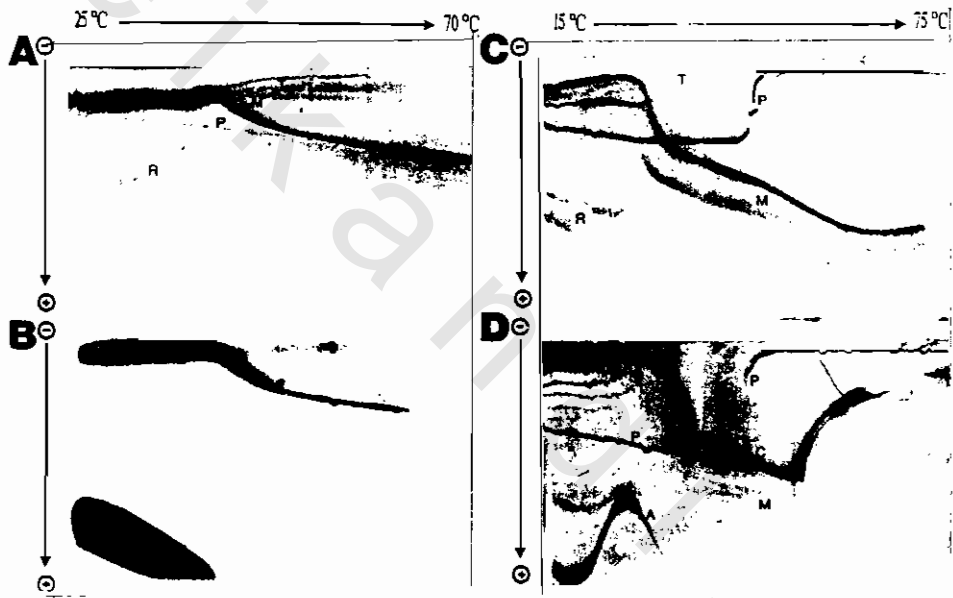
بواسطة R، M، T حيث حصل عليها مشابهة جداً لما ظهر عندما حللت نسخة من ال Dimeric فقط. يجب أن نذكر هنا بأن منحنى التحول M (عديد دبابيس الشعر) يكون مميز لموقع اليمين بعد النسخ، هذا التركيب لا يكون في توازن ثيرمو ديناميكي ولكن يخضع لتغيرات بطيئة في تركيبات مثلث بواسطة منحنيات T (حلزون ثلاثي، شكل ٣٢) و R (شبه عصوي في شكل ٣٢) بالإضافة إلى الثلاثة منحنيات R، M، T فإن الشرائح بين T و M تظهر بوضوح والتي يمكن أن تكون نشأت من مركبات نسخة RNA مضاد المعنى. أما الشريحة P تتبع إلى ناقلات نسخ البلازمد التي لم تزال من المحلول. يمكن أن يعرف المركب تعريفاً لا لبس فيه من الصورة الإشعاعية الذاتية (شكل ٣٣، B) من التجربة المثالية. ويبدو واضحاً أن RNA مضاد المعنى المعلم إشعاعياً يهاجر ضمن منحنى التحول لتركيب M وضمن الشرائح الإضافية الأضعف. في دراسات أخرى معملية متضمنة المعاملة بالحرارة للمركبات لنقل التركيب M إلى تركيب T أظهر أن حوالي ١٠٠٪ من تركيب M كانت متراكبة بواسطة RNA مضاد المعنى. من التحليل في شكل ٣٣، B، يبدو واضحاً أن معقدات نسخة RNA مضاد المعنى تكون ثابتة لدرجة حرارة ٦٥ م. أما التحليل لـ anti R RNA أعطى نتائج مشابهة جداً.

المعقد المتكون من RNA VL<sub>+</sub> (شكل ٣٣، A) ونسخاً سالبة الخيط Oligomeric درست باستعمال TGGE وطرق dot-ELISA. إن الخيط السالب دايمرك قد نسخ من pRH718 بدون وجود RNA مضاد المعنى وحلل بالطريقة TGGE (شكل ٣٣، C) وبالمثل كما في النتائج على نسخ الخيط الموجب، هناك ثلاثة تركيبات مختلفة يمكن اكتشافها. إن التركيب السائد الذي يميز للموقع المباشر بعد النسخ يمثل بالمنحنى M والتركيبات الثابتة R و T تكون موجودة بتركيزات منخفضة فقط. إن الشريحة ذات الكثافة الأكثر إنخفاضاً ولكنها في موضع موازي لـ M من الممكن أن تمثل نهاية مبكرة. بعد النسخ المبكر للحمض RNA مضاد المعنى فإن

تأثير ربط RNA مضاد المعنى يكون واضحاً في شكل (D، ٣٣). إن التركيب غير المعقد لـ M قد تلاشى، بينما معظم الجزيئات (أكثر من ٩٥٪) هاجرت كمعقد C مع مضاد المعنى. إن RNA مضاد المعنى غير الداخل في المعقد يشار إليه بـ A. هذا الاتجاه يكون واضحاً من الهجرة الأكثر إنخفاضاً بالمقارنة مع الحالة غير المعقدة، من نفس موقع الجزئ الأحادي في المدى من ٣٠ - ٣٥ م ومن المواقع النموذجية للخيوط المزدوجة المتجانسة بين ٥٥ - ٦٥ م. إن الأخيرة هذه تتكون من مناطق ثنائية الخيط مدنته جزيئاً مظهرة بوضوح كتأخير عنيف ومواقع غير مستمرة إلى حالة أسرع حركة على نفس الدرجة المرتفعة التي تكون مرئية فقط كشرائح مختلطة من RNA مضاد المعنى المفكك ونسخة دايمرك. الارتباط مع التركيبات الأخرى يمكن أن يحدث أيضاً ولكن لا يشارك بصفة معنوية. نظراً لأن التركيب المعقد يغير المنحنيات معنوياً فإن التعليم الإشعاعي كما في حالة الشكل ٣٣ B ليس ضرورياً، كما في النتيجة الهامة من التحليل بطريقة TGGE. يمكن القول بأن التركيب المعقد من RNA VL<sub>+</sub> مضاد المعنى والوسيطات من الخيط السالب دايمرك تحدث مع إنتاج يقارب ١٠٠٪ تحت الظروف التي تشبه الظروف الطبيعية (في الطبيعة). بعد تحضين RNA مضاد المعنى الذي نسخ كلية ونسخة خيط سالبة دايمرك على ٣٧ م وجد أن هناك ٣٠٪ من النسخ فقط من المعقد.

إن النتائج المتحصل عليها بواسطة TGGE قد تأكدت بواسطة طريقة Dot-ELISA وذلك باستعمال جسم مضاد monoclonal متخصص لـ ds RNA. في الخطوة الأولى من التجربة فإن خمسة أضعاف مولر زيادة من RNA مضاد المعنى فوق RNA الهدف كانت حضنت على حرارة مرتفعة ثم بردت إلى درجة حرارة التحليل. كما في جدول ١٩ فإن ds RNA قد تشكل بإنتاج أعلى عندما حضن على درجات حرارة مرتفعة ولكن ١٠ - ٢٠٪ فقط من VL<sub>+</sub> قد لوحظت وكأنها في المعقد مع RNA الهدف على درجات حرارة مقاربة للحرارة الفسيولوجية. وعلى أية حال إذا كان النسخ للخيوط السالبة ترايمرك قد حدث في المعمل في وجود RNA ثنائي الخيط مضاد المعنى موجب قبل النسخ، فإن التكوين يتجه تقريباً لتكملة المكونات التي يبدو وأنها في تركيز مولر منخفض. لم يكتشف معقدات

ds RNA وعلى أية حال بالنسبة لنسخ المائة وتسعون نيوكليتيدها لها نفس القطبية كما في RNA الهدف. حتى بعد النسخ فإن الهضم بأنزيم DNase والاستخلاص بالفينول فقط في الكمية الكلية من الحمض الأميني، هذا يعني أنه يمكن تحديد كمية الخيوط السالبة Trimeric والنسخ مضادة المعنى والنسبة المثوية للخيوط الثنائية لأي من الجزئيات يمكن تقديرها بصعوبة. يلاحظ أن إجراءات الهضم بأنزيم DNase، الاستخلاص بالفينول والترسيب التي تتبع النسخ لا تغير المدى لتكوين الخيط الثنائي.



شكل رقم ٣٣:

TGGE لمعدت متكون بين RNA مضاد المعنى و RNA الهدف. الشريحة A و B تظهر تحليل معقدات من RNA قصير مضاد المعنى (anti L) ونسخ دايمرك موجبة الخيط من الفيروس PSTVd بعد Pre-transcription للحمض RNA مضاد المعنى. شريحة A تمثل جيل مصبوغ بالفضة، شريحة B تمثل autoradiogram من RNA مضاد المعنى معلم إشعاعياً. إن أسرع شريحة في الهجرة في ال autoradiogram تكون أكثر احتمالاً من معقدات RNA مضاد المعنى مع النسخ المنتهية مبكراً. أما شريحة C فتمثل نسخة دايمرك سالبة الخيط. أما شريحة D فتمثل نسخة دايمرك سالبة الخيط بعد Pre-transcription مع VL<sup>+</sup> ل RNA مضاد المعنى. إن الشرائح معلمه لثلاثة تركيبات مختلفة (R, T, M) = التركيب الثلاثي الحلزوني، M = تركيب متعدد دبابيس الشعر، R = التركيب المتطاوول شبه المعصوي مشابهة للفيروس الموجود في الطبيعة. أما P فهي ناقل النسخ.



جدول ١٩ : اكتشاف ds RNA بواسطة dot ELISA .

٣٠	٤٠	٥٠	٦٠	٧٠	٨٠	٩٠	درجة الحرارة الأولية للتهجين م°
١٥	٣٠	٥٠	٦٥	٦٥	٦٥	٦٥	كمية المواقع المستهدفة %

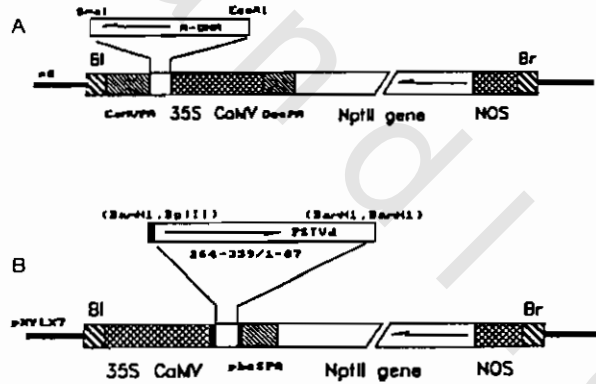
## ٢ - تعبيرات RNA مضاد المعنى فى نباتات البطاطس المحولة وراثياً:

إن ناقلات التعبير تحمل تتابعات مضاد المعنى بعد بدء النسخ، إن 35S CaMV المحفز ملاحظة فى شكل ٣٤. أما فى شكل ٣٤، A، فإن التركيبات من anti R و anti L مع مواقع CaMV Polyadenylation تكون موصوفة. هناك تركيبان آخران مشار إليهما anti Lvt و anti Rvt، موقع ال Polyadenylation قد شطبت. إن ناقل التعبير لتتابع مضاد المعنى VL<sub>+</sub> يحمل إشارة rbsC ل Polyadenylation (شكل ٣٤، B). علييات التعبير نقلت إلى جينوم البطاطس بواسطة الناقل A. tumefaciens والدورة الأولى من الاختبار أجريت على أساس مقاومة التجذير فى الخلفة ل Kanamycin. إختبرت نباتات البطاطس المحولة وراثياً واختبرت لتعبير RNA بواسطة طريقة تحليل Northern.

فى النباتات التى حولت لتعبيرات RNA مضاد المعنى ضد UCCR، فقط فى المتحولات فقدت جزء من مواقع ال Polyadenylation (anti Lvt, anti Rvt) تعبير RNA مضاد المعنى أمكن اكتشافه. فى ١١ من ١٢ من المتحولات فإن RNA مضاد المعنى قد اكتشفت. كما هو ملاحظ فى شكل ٣٥، A، فإن الحجم كانت حوالى ٥٠٠ - ٦٠٠ نيوكليتيده بدلاً من الحجم المتوقع ٢٥٠ نيوكليتيده. من الممكن أن يكون ذلك فى الشطب فى مواقع ال Polyadenylation النهاية الصحيحة ل RNA مضاد المعنى يكون مشوهاً ومنتجات أطول قد بنيت. التعبير لمنتجات مختلفة (٥٠٠ - ٦٠٠ نيوكليتيده) يمكن أن تكون نتيجة مراحل غير ناضجة مختلفة من النسخ. ومن المحتمل أيضاً أن تركيبات ال anti Rvt و anti Lvt فقط مع مواقع النهايات الطرفية disorted تنتج RNAs مضاد المعنى ذو ثبات كاف والتي يمكن اكتشافها بطريقة Northern analysis. لكى نتأكد من أن الإشارات المكتشفة فى شكل ٣٥، A الجزء العلوى ليست النتائج للإصابة الفيرويدية ولكن

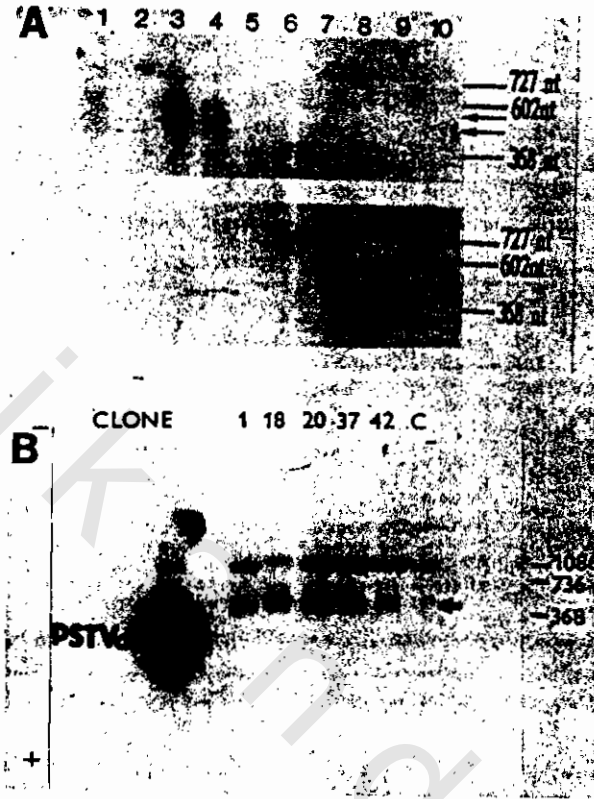
من تعبيرات RNA مضاد المعنى، إن التهجين المنظم مع نسخ خيط سالبة معلمة إشعاعياً من PSTVd كانت منجزة. إن الشكل ٣٥، A الجزء السفلى يبين عدم وجود إشارات من PSTVd الدائري يمكن اكتشافه في النباتات المحولة وراثياً.

هناك ٦ كلونات محولة مع التركيبات VL<sub>+</sub> أظهرت تعبيرات لـ RNA خاص والتي لم تكن ملاحظة في نباتات الكنترول (الشكل ٣٥، B). إن طول الـ RNA كان حوالي ٦٠٠ قاعدة. وعلى هذا الأساس فإن القطعة مضادة المعنى الخاصة بـ PSTVd (١٨٣ قاعدة) مساوية ٣٠٪ من مجموع ما عبر عنه RNA. لم تستعمل ظروف غسيل شديدة بعد التهجين وبالتالي فإن بعض الشرائح غير المتخصصة في الـ radiogram - auto لم يمكن استبعادها. وحسب التقدير الأولي فإن كمية RNA مضاد المعنى الكاملة تختلف من ٠,٥ - ٢,٥ ميكوغرام لكل ٣٠ ميكوغرام من مجموع RNA معتمداً على Clone analysed. إن الإشارة الملاحظة لكلون ٦ قورنت مع الإشارة التي تلاحظ عادة لكلون ١.



شكل رقم ٣٤ :

عوامل تحول النبات للتعبير عن RNA مضاد المعنى. شكل A: ناقل مكوكي للتعبير عن RNA مضاد المعنى ضد الـ UCCR. إن DNA - A يحتوي ١٨ قاعدة زوجية من النيوكليوتيدات القصيرة المهجنة (Anti L / Anti L') أو (Anti R / Anti R') مع أربعة نيوكليوتيدات إضافية كبولي لنكروز لانتاج موقع محدود EcoRI و Smal. أما شكل B فهو ناقل مكوكي للتعبير عن RNA - VL<sub>+</sub> مضاد المعنى ضد نسخ سالبة الخيط. توجيه تناوبات RNA الفيرويدي مشار إليه بأرقام. المواقع المحدودة المستعملة للكلمة موضوعة في أقواس. أما العلب السوداء فهي مواقع التابع المنسوخ الموجه من الناقل 35 SCaMV هو فيروس موزايك القرنيط أما 35S فهو البروموتور و rbcSPA و CaMVPA فهي التابع للبولي ادنيليشن. NOS، NptII جين و OcsPA هي مشجع nopaline synthase، النيومايسن فسفوترانسفيريز II جين وتتابع البولوي ادنيليشن كالجين OCS. وكذلك فإن B<sub>1</sub>، B<sub>2</sub> الحافة اليسرى والحافة اليمينية.



شكل رقم ٣٥ :

تعبير RNA مضاد المعنى فى نباتات البطاطس المحولة وراثياً. شكل A. تحليل RNA مضاد المعنى قصير ضد UCCR. أما الشكل (A) العلوى فهو تحليل بالنورثيرن بلوت لنسيج ورقة (RNA) محول وراثياً. (١، ٢، ٣، ٤، ٥، ٩) و ١٠ كـنـتـرول بعد دنترة الاجاروز والهجرة الكهربائية فى الجيل. شريحة ٦ = ١٠ نانوغرام خيط دايمرك موجب من نسخ PSTVd (٧٢٧) نيوكليتيده و ١٠ نانوغرام من نسخ PSTVd خيط مونوميرك سالب (٣٦٨) نيوكليتيده. شريحة ٧ = ١٠ نانوغرام من نسخ PSTVd خيط موجب (٦٠٢) نيوكليتيده. شريحة ٨ = ١٠ نانوغرام مستخلص خام من PSTVd. الجزء السفلى A نفس بقعة RNA كما فى الجزء العلوى ولكنها غسلت وأعيد تهجينها مع نسخ PSTVd سالبة الخيط معلمه للكشف عن PSTVd تابعات موجبة. أما شريحة B تحليل لـ RNA VL<sub>+</sub> مضاد المعنى ضد نسخ سالبة الخيط. حوالى ٥٠ بيكوغرام من الفيروسيد PSTVd الطبيعى أضيفت إلى الموقع المعلم فى اليسار. C. = RNA من نباتات بطاطس غير محولة وراثياً. تدل الأسهم على RNAs مضاد المعنى معبراً فى النباتات المحولة وراثياً.

## ٣ . تثبيط الإصابة الفيرويدية في النباتات المحولة وراثياً:

للدراست الحيوية فإن النباتات المحولة وراثياً تكون قد تكاثرت خضرياً وتضاعفت. بالنسبة للـ anti R و anti L فإن مجموعات محولة من ١٢ نبات من نفس النبات الواحد المتحول حققت بمستخلص خام من PSTVd. بعد ٤ و ٨ أسابيع حللت كمية أل PSTVd وقورنت مع تلك الموجودة في نباتات الكنترول. بسبب المهاجمة الفطرية فإن جميع النباتات من أنواع الـ anti RvT و anti LvT ماتت قبل الكشف عن محتوياتها من الفيرويد. هذا كان من سوء الحظ نظراً لأن تعبيرات RNA مضاد المعنى قد اكتشفت فقط في هذه النباتات.

مع أنه لم يكن من المحتمل اكتشاف RNA مضاد المعنى في النباتات المحولة ذات النوع anti R و anti L، فإن هناك ثلاثة متحولات أظهرت خفضاً في القابلية للإصابة بالفيرويد PSTVd بعد أربعة أسابيع شكل ٣٦؛ الجزء العلوى. فمثلاً في الحالة ذات ١٢ متحول فقط ٢ من ١٠ عقل أظهرت محتويات من PSTVd يمكن اكتشافها وحتى في هذين الإثنين فإن كمية أل PSTVd كانت أقل منها في نباتات الكنترول A. وعلى أية حال فإنه بعد ٨ أسابيع من الحقن فإن محتوى جميع النباتات المحولة من الفيرويد كان متقارباً مع الكنترول (شكل ٣٦ الجزء السفلى). وبالتالي فإن الإصابة الفيرويدية لم تكبح بثبات في النباتات المحولة وراثياً ولكنها تأخرت بشكل معنوى. عندما إختبرت هذه النباتات بعد التكاثر الخضرى المتتابع لمعرفة حيوية الفيرويد فإن تأخر تضاعف الفيرويد لم يمكن تأكيده كتأثير معنوى.

إن الستة VL<sub>+</sub> المختارة من كلونات البطاطس إختبرت عن طريق التقدير بمقياسين، فهرس الحيوية بالإضافة إلى كمية الفيرويد في النباتات المصابة. بالنسبة للطريقة الأخيرة فإن الإصابة صنفتم إلى أربعة درجات. نتائج إختبارات مثل هذه الإصابة موجودة في جدول ٢٠. إن إحدى وعشرون يوماً بعد الحقن (P.i) فإننا عادة ما نلاحظ إصابة ضعيفة جداً للفيرويد PSTVd ومعظم النباتات المصابة تقع

فى رتبة ثلاثة وأربعة، نموذجياً مع ٠,٠٣ - ٣ بيكوغرام من الفيرويد لكل ملغرام من المادة الطازجة. مقارنة فهارس الحيوية لكلونات مختلفة ومجموعة الكنترول فى هذا الوقت تدل على خفض معنى احصائياً للإصابة فى كلونات ١، ٦، ٢٠ و ٣٧ عند مقارنتها مع الكنترول غير المحول. فمثلاً فإن قيمة G كانت ٢٣، ٢٦، ٢٤ و ١٨ لكلونات ١، ٦، ٢٠ و ٣٧ بالترتيب. إن التساوى فى النسبة المئوية للنباتات المصابة يجب أن يطرح على مستوى ٠,٠٠١ من المعنوية الإحصائية. بالنسبة لكلون ١٨ فإن الاختلافات كانت معنوية على مستوى ٠,٠١ ولم يكن هناك إختلافات معنوية ملاحظة بين كلون ٤٢ ومجموعة الكنترول. كذلك فإن النتيجة قد أوضحت فرق كبير بين مختلف الكلونات المتحولة. فى بداية الإصابة (٢١ يوم بعد الحقن) فإن جميع النباتات المحولة وراثياً والمحقونة كانت (باستثناء واحد من كلون ٢٠) هذه فقط ضعيفة الإصابة (مرتبة ٣ و ٤)، بينما أكثر من ٤٠٪ من نباتات الكنترول المحقونة تقع فى مرتبة ٢، هذا يعنى نباتات متوسطة الإصابة. أخيراً فإن ٣٥ يوم بعد الحقن فإن جميع فهارس الحيوية قد إزداد لكن لا يزال معظم الكلونات تختلف معنوياً عن الكنترول. مع أن مستوى PSTVd قد إزداد بشكل مثير، فإن متوسط كمية آل PSTVd فى الكلونات المصابة كان بشكل واضح أقل منه فى نباتات الكنترول. وعلى أية حال فإن كلون ٤٢ لم يختلف عن مستوى الكنترول (جدول ٢٠) هذه تؤكد بشكل عام الملاحظات التى شوهدت من قبل. هناك إصابات أقوى شاملة إلى حد ما قد حصل عليها بعد ٣٥ يوم من الحقن بالمقارنة فى التجربة فى جدول (٢٠، b) ومعظم النباتات المحقونة كانت مصنفة فى مراتب الإصابة ١ - ٣. فى سلسلة إختبارات الحيوية الثانية لقد تم إختيار تجمعات الفيرويد فى أنابيب. بالنسبة لكلونات ١، ٢٠ و ٣٧ فإن نسبة الأنابيب المصابة قدرت بعد ٩٠ يوم من الحقن (جدول ٢١)، هذه النتائج أوضحت فى الأنابيب نفس النزعة كما فى نسيج الورقة الأخضر.

## جدول ٢٠: إختبار الإصابة في نباتات البطاطس المحولة وراثياً.

فهرس الإصابة عدد النباتات المصابة على عدد النباتات المحقونة	عدد النباتات المصابة رتب الإصابة				عدد النباتات المحقونة	
	١	٢	٣	٤	كلونات محولة	غير محولة
A: إختبارات الإصابة، ٢١ يوم بعد الحقن.						
٠,١٢	١	١	صفر	صفر	١٧	١
٠,٠٤	١	صفر	صفر	صفر	٢٤	٦
٠,٣٣	٢	٤	صفر	صفر	١٥	١٨
٠,١١	صفر	١	١	صفر	١٨	٢٠
٠,١٩	٣	١	صفر	صفر	١٦	٣٧
٠,٥٧	٣	٤	صفر	صفر	٢١	٤٢
٠,٨٦	٢	٨	٨	صفر	٢١	غير محولة
B: إختبارات الإصابة، ٣٦ يوم بعد الحقن.						
٠,٤٧	٦	١	صفر	١	١٧	١
٠,٥٠	٣	٤	١	٤	٢٤	٦
٠,٤٧	٣	٤	١	٤	١٥	١٨
٠,٤٧	١	صفر	٢	١	١٨	٢٠
٠,٤٤	٢	صفر	٥	صفر	١٦	٣٧
٠,٧٥	٢	صفر	١	٦	٢١	٤٢
٠,٩٥	صفر	٢	٣	١٥	٢١	غير محولة
C: إختبارات الإصابة بعد نصف سنة من التكاثر الخضرى، ٣٥ يوم بعد الحقن.						
٠,٤٩	صفر	٣	٥	٣	٢٣	١
٠,٦٢	صفر	٢	٤	٤	١٦	١٨
٠,٢٨	١	٢	١	١	١٨	٢٠
٠,٥٩	صفر	٦	١٠	٣	٣٢	٣٧
٠,٦٧	صفر	٢	٢	٨	١٨	٤٢
٠,٩٦	صفر	١٠	٤	١٤	٢٩	غير محولة

١ - رتب الإصابة حسب كمية الفيرويد PSTVd فى الأوراق المصابة: ١ = قوى: ٣٥ - ١٠ بيكوغرام

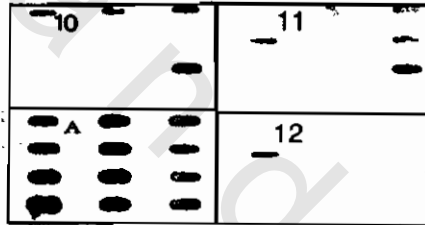
/ ملغ مادة طازجة. ٢ = متوسطة: ١٠ - ٣ بيكوغرام / ملغ. ٣ = ضعيفة = ٣ - ٠,٣

بيكوغرام / ملغ، ٤ = آثار = ٠,٣ - ٠,٠٣ بيكوغرام / ملغ

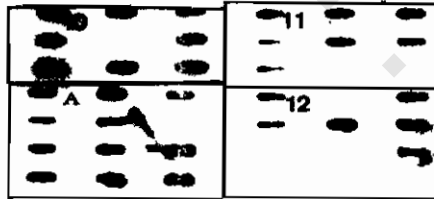
جدول ٢١: تحليل الإصابة بفيروس PSTVd في درنات البطاطس. لحقن النباتات المتكاثرة خضرياً يكون مشابهاً لتلك التي في الجدول السابق رقم C.

الكلون المحول	عدد الدرنات المختبرة على عدد النباتات التي هي حاملة الدرنات	% الدرنات المصابة
١	٢٧/١٠	٤٤
٢٠	٢٦/١٠	١٩
٣٧	٣١/١٠	٧٧
٩٥	٣٨/١٥	٩٥

4 weeks after PSTVd inoculation



8 weeks after PSTVd inoculation

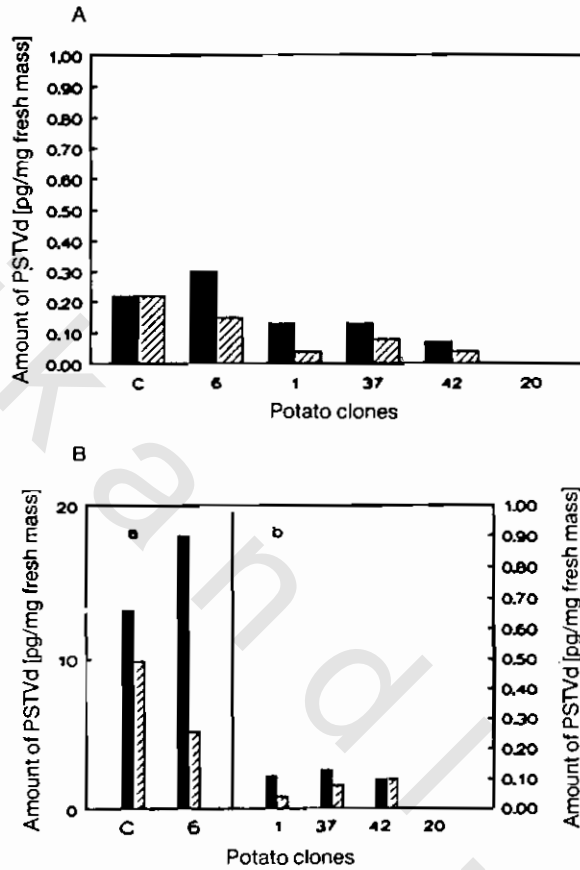


شكل رقم ٣٦:

تثبيت الإصابة الفيروسية في نباتات البطاطس المحولة وراثياً. تحليل حقن PSTVd في الطرز المحولة وراثياً (١٠، ١١، ١٢) وفي الطراز غير المحول وراثياً الكنترول. A الطرز المحولة وراثياً ١٠ و ١١ تحولت مع RNA anti R مضاد المعنى، الطراز ١٢ مع RNA anti L مضاد المعنى. عقل البطاطس حققت بمستخلص خام من النباتات المحقونة، وعزل الحمض النووي بعد ٤، ٨ أسابيع. نقلت مضاعفات من المستخلص على غشاء نايلون وهجنت مع نسخة PSTVd سالبة الخيط. إختبرت عشرة أفراد من كل طراز بحول وراثياً أما في الشريحة السفلى فإن تسعة نباتات من طراز ١٠ و ١١ وعشرة نباتات من طراز ١٢ بالترتيب.

يمكن تلخيص النتائج المتحصل عليها سابقاً بأن هناك إختلافات كبيرة ليس فقط بين الجينوتايب المختلفة ولكن أيضاً بين مختلف النباتات من نفس الكلون ضمن التجربة الواحدة. عند مقارنة التجارب المختلفة بعد التكاثر الخضرى لـ VL<sub>+</sub> المتحول جدول ٢٠ أدى إلى وجود على الأقل جينوتايب واحد كلون ٢٠، أظهرت مستوى ثابت منخفض من الإصابة بالفيروس PSTVd وبالتالي أظهرت أعلى الدرجات من التثبيط للإصابة بالفيروس. من ناحية أخرى حتى ضمن هذا الكلون فإن النباتات المصابة بشدة (مرتبة ١) قد لوحظت، هذا أدى إلى الاقتراح بأن المقاومة المحتملة يمكن أن تتحقق عن طريق التوسط بواسطة RNA مضاد المعنى لم تعمل، إذا كان من الممكن أن بعض المستوى البسيط من الفيروس وصل في نسيج النبات. إن الاختلافات العالية في تجمع الفيروس حتى ضمن الجينوتايب الواحد يمكن أن تنتج من إختلاف تعبير RNA مضاد المعنى في النسيج المختلف من الممكن أن يتسبب عن DNA methylation وخفض التعبير في علب DNA - T. لكي نجعل التجربة في ظروف مثالية يؤخذ عديد من ال Subclonings من الجينوتايب VL<sub>+</sub> المحول وتوضع على بيئة محتوية 5'azacytidine وأجرى إختبار The leaf disc agroinoculation تحت ظروف إضاءة وحرارة قياسية في Clima - boxes (شكل ٣٧). إن فحص معدل تجمع الفيروس أظهر مستوى منخفض جداً من التجمع بعد عشرة أيام من ال agroinoculation. بعد ٢٠ يوم ظهرت تجمعات قوية للفيروس في أقراص الورقة الكنترول وفي أقراص ورقة كلون رقم ٦. كان هناك إنخفاضاً شديداً في مستوى التجمع لوحظ في كلونات ١، ٣٧ و ٤٢ ولم يمكن اكتشاف فيروس لكلون ٢٠. يجب أن نذكر هنا أنه لم يكن هناك إختلافات معنوية في مستوى PSTVd في الحلقة الخارجية ومركز القرص في تنوع الكنترول بينما المستوى من PSTVd قد إنخفض معنوياً في أنسجة مركز القرص من الجينوتايبات المحولة. هذا الميل أو التزعة لوحظت حتى في أقراص من الجينوتايب المصابة بشدة رقم ٦ شكل ٣٧، A.





شكل رقم ٣٧ :

مستويات من PSTVd في Agroinfected أقراص ورقة. A = التحليل بعد عشرة أيام من الحقن. B = التحليل بعد عشرين يوم من الحقن. الأرقام تدل على الكتلونات المحولة وراثياً. إن حرف C يدل على النباتات غير المحولة وراثياً. في شكل B الأعمدة في (a) تدل على التوجيه اليسارى، في (b) التوجيه اليمنى.

## مناقشة النتائج :-

لقد سبق وبيننا أن RNA المتخصص لـ PSTVd متمائل الازدواجيات وأن ازدواج من نسخ مضادة المعنى طويلة غير كاملة مع PSTVd كانت فعلاً غير معدية في نباتات الطماطم. هذه النتيجة أدت إلى الاقتراح بأن تداخل RNA - RNA يمكن أن يشكل حقيقة أساس وسيط لـ RNA مضاد المعنى يثبط إصابة الفيرويد. في هذه الدراسة ثم إختيار RNA مضاد المعنى غير كامل ضد ال UCCR من الخيط الموجب وضد النصف اليسارى من وسيط التكاثر السالب لـ PSTVd لتحليل التأثير المثبط على إصابة الفيرويد في النباتات المحولة وراثياً. كما ذكر سابقاً فإن التأثير المثبطة تصبح متوسطة بواسطة تعبيرات RNA مضاد المعنى الخلوى وقد ذكرت لبعض RNA الفيروسي للنبات و DNA الفيروسي، ولكن النتائج لا يمكن أن تنطبق على الفيرويدات خاصة بسبب الصفات التركيبية الخاصة للفيرويدات والتي تشكل ازواج مضاعفة. هذه الصفة يجب إعتبارها خاصة بالنسبة لوسيطات التكاثر الأطول، والتي بطريقة أخرى يمكن أن تكون هدفاً مناسباً بسبب تركيزها المنخفض في الخلايا المصابة. مجرد التحضين لـ RNA مضاد المعنى أو الهدف قد أظهر أن التحضين يجب أن يجرى على درجات حرارة عالية غير فسيولوجية لكي نحصل على إنتاج عال من المركب المعقد. لكي نوجه هذه المشكلة في مصطلحات ثيرموديناميكية إختبر التداخل بين RNA مضاد المعنى و RNA الهدف عندما بنى RNA الهدف تحت ظروف فسيولوجية بواسطة أنزيم T<sub>7</sub> Polymerase في وجود RNA مضاد المعنى قبل النسخ والمعقد المتكون أجرى له تحليل بواسطة TGGE والاكتشاف بواسطة Immunochemical لـ ds RNA. هناك طرق مشابهة يكون من المحتمل أن تحدث في الخلايا المحولة وراثياً بعد دخول الكائن الممرض النواة وتكون طريقة التناسخ قد ابتدأت. من التحليل بواسطة TGGE يمكن القول بأن إنتاج المعقد المتكون كان تقريباً ١٠٠٪. هذه النتيجة كان من السهل الحصول عليها من المعقدات مع النصف اليسارى من RNA مضاد المعنى، بسبب الانتقال الواضح في الشرائح. المعقد المتكون من RNA مضاد المعنى القصير ضد

ال UCCR لم يقود إلى إنتقال معنوى ولكن يمنع التغير التركيبى فى RNA الهدف وعلى أساس هذا التأثير فإن ١٠٠٪ معقد متكون يمكن أن يستنتج. زيادة على ذلك فإن التحليل المعملى للمعقد المتكون بعد Pre - transcription ل RNA مضاد المعنى أظهر بشكل جلى واضح أن التركيب لوسيطات تناسخ الفيرويد التى توجد فى اليمين بعد عملية النسخ تكون أساسية لتكوين المعقد بينما الانتظار للتركيب المتوازن يمكن أن يمنع تكوين المعقد.

النباتات المحولة وراثياً حضرت معبرة عن RNA مضاد المعنى ضد الجزء اليمين واليسار من ال UCCR (مع تتابع كامل وشطب ال Polyadenylation) و VL<sub>+</sub> حمض RNA مضاد المعنى (الجزء اليسار من الفيرويد شبه العصى) ضد الخيط السالب. وجد أن تعبيرات RNA مضاد المعنى اكتشفت فى تحولات anti LvT و anti RvT (مع تأخير إشارة ال Polyadenylation) ولكن ليس فى متغيرات anti P و anti L هذا يمكن أن يوضح بعدم الثبات الكاف لهذه ال RNAs فى الطبيعة وعلى هذا الأساس يكون هناك تركيز منخفض جداً للكشف بواسطة Northern analysis. هناك سبب واحد لهذا الافتراض يكون بأنه يمكن اكتشاف T - DNA مضاد المعنى موحد لمتحولات anti LvT و anti RvT بالإضافة إلى متحولات anti R و anti L بواسطة التحليل بطريقة Southern. من الممكن اكتشاف تعبير RNA مضاد المعنى المنخفض فى متحولات anti LvT و anti RvT فقط بسبب RNA مضاد المعنى المعبر كان حوالى ٢٥٠ - ٣٥٠ نيوكليتيده أكبر من المتوقع وبالتالي ثبات أعلى منه فى ذلك الذى من متحولات anti R و anti L. إن RNA VL<sub>+</sub> المضاد المعنى المعبر فى الطبيعة أظهر تقريباً ٦٠٠ قاعدة فى الطول بحوالى ٣٠٪ من التتابع الخاص بمضاد المعنى، لا يمكن أن يحصل عليه بدون شك فى التجارب المعملية سواء RNA المعبر قد كون معقدات مع ال RNA الهدف بكفاءة مثل التى لوحظت فى النسخ المعملية. ولكن يبدو محتمل جداً نظراً لأن المعقد المتكون ذو معنى أو مضاد المعنى يفسد بواسطة تركيب الفيرويد

الجزء البيني وليس بواسطة ازواج قواعد متطابقة من تتابعات خاصة للفيرويد مع تتابعات الناقل المتصلة أو ال Poly A tail .

درس تأثير RNA مضاد المعنى على كلونات بطاطس وحللت النتائج لمعرفة مدى التثبيط للإصابة بالفيرويد PSTVd . أظهرت النتائج أن ظاهرة التثبيط وجدت فعلاً بسبب: أولاً، بعض الطرز المحولة وراثياً تظهر ثبات وخفض معنوي في الإصابة الفيرويدية في النباتات والدرنات بالمقارنة مع الكنترول، ثانياً، إنخفاض التركيز للفيرويد اكتشف في بعض النباتات المحولة وراثياً إذا قورنت مع النباتات غير المحولة وراثياً وأجريت المقارنة خلال ثلاثة أسابيع بعد الحقن (جدول ٢٠، A) وحتى ٨ أسابيع بعد الحقن (شكل ٣٦). إن تثبيط الإصابة أو على الأقل التأخير في تضاعف الفيرويد لوحظ في النباتات المحقونة بالإضافة إلى بعد Agroinfection .

مع أن تأثيرات التثبيط كانت معنوية، إلا أن إختلافات وراثية عالية قد لوحظت بين الطرز المختلفة، والأكثر أهمية الإختلاف العال الذي لوحظ ضمن كلون واحد متكاثر خضرياً. حتى من بين أكثر الكلونات مقاومة فإن بعض النباتات المصابة بشدة قد لوحظت. إن مظهر النسيج المصاب بشدة دل أيضاً في هذه الحالة على أن التثبيط بمضاد المعنى يمكن أن يتغلب عليه كلية إذا حصل على مستويات بداية من ال PSTVd في خلايا النبات عالية وإن سرعة تناسخ الفيرويد لا تثبط لمدة طويلة. إن الاختلافات غير العادية الملاحظة هنا تختلف بوضوح عن DNA مضاد المعنى و RNA الوسيط في التثبيط الذي لوحظ في الدراسة السابقة، بينما المعقد RNA الفيرويدي مضاد المعنى كان قد تشكل في المعمل قبل الحقن. في تلك الحالة فإن التأثير المثبط كان أكثر قوة، أقل إختلافاً ومعتمد أساساً على زيادة المولر لـ RNA مضاد المعنى زيادة عن PSTVd. إن التأثيرات الموصوفة هنا تختلف أيضاً عن معظم النتائج المتحصل عليها باستعمال RNA مضاد المعنى ضد Endogenous genes. في هذه التجارب كان هناك متغيرات كبيرة بين الكلونات المختلفة، أيضاً، لوحظت ولكن الكلونات الفردية عادة تسلك معدل منخفض ثابت من m RNA وبالتالي فإن ال فينوتايب الطافرة يمكن إختبارها.

لقد تبين من الدراسات الحديثة Wassenegger et al سنة ١٩٩٤ أن-Genome integrated viroid cDNA يصبح متخصص methylated فوق تجمعات الفيرويد في نباتات الدخان المتحولة وراثياً. إن الباحث فسر هذه الظاهرة بواسطة إمكانية أن RNA الموجه ينتج من جديد ميثيليشن لتتابعات الجينوم. إن التغيرات العالية في وسيطات RNA مضاد المعنى في تثبيط الإصابة الفيرويدية في هذه التجارب (تجارب البحث الحالي) يمكن أن تفسر غالباً بهذه الظاهرة. إذا ما حدث وأن بعض حدود مستوى RNA الفيرويدى قد إمتد فإن عملية الميثيليشن ل-Viroid specific anti-sense gene يشجع (يرتفع). إن التناسخ غير المثبط من PSTVd يكون النتيجة المنطقية. إن ما وجد بأن تأثير مضاد المعنى كان أقوى عندما عوملت أقراص ورقة البطاطس خلال الحقن أيضاً بمادة azacytidine (مشطة للميثيليشن) والتفسير بأن الاختلافات المعنوية بين كلونات البطاطس المختلفة يمكن أن تتسبب عن أو بواسطة تأثير الموقع على DNA methylation وتكون متفقة مع الافتراضات المذكورة سابقاً.

إن ال Physiological mosaic المعروف جيداً في خلايا النبات من الممكن أن يقود أيضاً إلى تركيز RNA مضاد المعنى باختلاف من خلية إلى خلية حتى إذا نظم بواسطة محفز تأسيسى. إن المستوى الحدى الأولى من RNA الفيرويدى يمكن أن يصل إليه بسهولة أكثر في هذه الخلايا بدون تعبيرات RNA مضاد المعنى أو بكمية بسيطة جداً منه، هذه الفيروسيدات يمكن أن تنتشر في الأنسجة المحيطة. من المعروف أن الفيروسيدات تتراكم بسرعة أكثر في النسيج المرستيمى ومن هناك يمكن أن تنتقل ضمن النبات خلال خلايا اللحاء هذا ما وجده Palukaitis سنة ١٩٨٧.

في هذا النسيج فإن التناسخ يمكن أن يحدث بمعدل أعلى، بينما مستوى RNA مضاد المعنى يمكن أن يكون غير كاف تماماً لأن يتداخل مع مسار التناسخ وبالتالي يقود إلى تنافس مختلف تماماً. من هذا الاتجاه فإن نتائج البحث تكون أكثر تشابهاً للتأثيرات الملاحظة ل-RNA الفيروسي للنبات. بالنسبة للفيروسات المتجمعة

(فيروسات الجوزاء) مثل فيروس الموزايك الذهبى فى الطماطم TGMV والذى فيه ال DNA والفيروس يتكاثر داخل النواة، فإن تأثير مضاد المعنى كان أقوى جداً إذا كان إختبار التناسخ فى قرص الورقة قد تم (أنجز) ولكن غير كامل فى بعض الطرز عند حقن النباتات المحولة السليمة. يمكن القول بأنه إذا كانت جينات RNA مضاد المعنى ناشئة مع محفزات غير حساسة لـ DNA methylation فإنها تكون أكثر فعالية.

رابعاً: الوقاية بالتضاد بين أربعة فيرويدات:

### Cross Protection Among Four Viroids

تعرف الوقاية بالتضاد على أنها التداخل فى التعبير العرضى عن طريق حقن متحدى (فيروس أو فيرويد) فى النبات المصاب سابقاً. هذه الظاهرة قد أثارت اهتمام أخصائى الفيروس من علماء أمراض النبات وذلك منذ اكتشافها بواسطة Mckinney سنة ١٩٢٩. إن ميكانيكية الوقاية بالتضاد لا تزال محل دراسة وأجرى عليها أبحاث كثيرة خاصة فيما يتعلق بالأمراض الفيروسية خاصة فيروس موزايك الدخان وترستيزا الحمضيات فى البرازيل.

أما عن الوقاية بالتضاد بالنسبة للفيرويدات كان أول وصف لها سنة ١٩٦٧ بواسطة العالم Fernow. لقد وجد أن نباتات الطماطم *Lycopersicon esculentum* الصنف المزروع Rutgers يمكن أن يحفظ من الأعراض التى ستتكشف نتيجة الإصابة بالسلالة الشديدة لفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس PSTVd وذلك عن طريق الحقن المبكر بالسلالة المعتدلة لنفس الفيرويد. زيادة على ذلك فإن العالم Fernow قد أظهر بأن السلالة الشديدة يمكن إعادة اكتشافها من نباتات الطماطم التى لم تظهر عليها الأعراض نتيجة الوقاية بالتضاد.

ملاحظة: هذا البحث قام به مجموعتين من العلماء. الأولى فى جامعة روكفلر فى أمريكا وعلى رأسهم C.L. Niblett، والمجموعة الثانية فى وارسو بولندا وعلى رأسهم E. Paduch. Cichal وهى التى أمدتنى مشكورة بهذه البحوث.

إن الدراسة التي أجريت على RNA بطريقة بصمة الأصبع Finger printing في كل من السلالة الشديدة والمعتدلة قد أظهرت أن هاتين السلالتين للفيرويد PSTVd فيهما اختلافات بسيطة فقط في تتابع نيوكليوتيداتهما. لقد أجرى عدة أبحاث لتحديد فيما إذا كانت الوقاية بالتضاد التي بين الفيرويدات هي مقصورة فقط على تلك الفيرويدات التي تظهر درجة عالية من تماثل التتابع في أحماضها RNAs.

لكي نجري إختبارات الوقاية بالتضاد بين أى فيرويين فمن الضروري أن نلاحظ :-

- ١ - توفر العائل المشترك بين الفيرويين موضوع الداسة.
  - ٢ - دراسة سابقة لهذين الفيرويين تثبت بأنهما يتناسخان في العائل المشترك.
- أجريت دراسة الوقاية بالتضاد على نباتات الطماطم و / أو نباتات الأقحوان وذلك باستعمال الفيرويدات الآتية :-

- ١ - السلالة الشديدة من فيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس s - PSTVd .
- ٢ - السلالة المعتدلة من فيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس m - PSTVd .
- ٣ - فيرويد اكسوكورتز الحمضيات CEVd .
- ٤ - فيرويد تقزم الأقحوان CSVd .
- ٥ - فيرويد الشحوب المتبرقش فى الأقحوان ChMVd .

أظهرت الدراسات السابقة أن السلالة الشديدة والسلالة المعتدلة وفيرويد اكسوكورتز الحمضيات تتناسخ فى نباتات الطماطم، بينما الدراسات التي ذكرت عن بصمة الاصبع المذكورة سابقاً قررت أن السلالة الشديدة والمعتدلة لفيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس ذات علاقة متقاربة جداً. أما عند المقارنة بين PSTVd وفيرويد CEVd لم يظهر مناطق واسعة ذات تماثل متقارب فى RNAs التابعة لها.

## نبات الأقحوان:

إن نبات الأقحوان *Chrysanthemum morifolium* عائل هام ومفيد فى دراسة الفيرويد. إن فيرويد تقزم الأقحوان CSVd وفيرويد الشحوب المتبرقش فى الأقحوان ChCMVd قد اكتشفت اصلاً فى هذا العائل وازدادت بشكل واسع فى الأصناف المزروعة مثل Bonnie Jean بالنسبة للفيرويد الأول، والصنف Velvet Ridge للفيرويد الثانى. إن دراسات التهجين التى أجريت بين CSVd و PSTVd أدت إلى القول بأن حوالى ٢٠٪ من RNA فى الفيرويد CSVd يكون متماثل مع ذلك الذى فى RNA لفيرويد PSTVd. وبوضوح فإن إختلافات التابع بين PSTVd و CSVd تكون كافية لانتاج RNA مختلف كلية فى بصمة الأصبع، ولكن يوجد تشابهات كافية تسمح بعملية Cross - hybridization محدودة. إن التطبيقات البيولوجية لهذا التماثل يمكن أن تختبر إذا أصابت هذه الفيرويدات عائل مشترك.

لإجراء التجارب، فى البداية يجب تحديد فيما إذا كان CSVd و ChCMVd يحدث لهما تناسخ فى الطماطم وفيما إذا كنت السلالة الشديدة والسلالة المعتدلة لفيرويد PSTVd وفيرويد CEVd تتناسخ فى نبات الأقحوان ثم بعد ذلك يختبر كل فيرويد لوحده لمعرفة قدرته على الوقاية ضد الفيرويدات الأخرى.

## تحضير اللقاح:

إن كلا السلالتين من PSTVd وفيرويد CEVd حصل لهما أكتار وزيادة فى نباتات الطماطم صنف Rutgers. إن اللقاحات من هذه الفيرويدات حضرت عن طريق طحن الأوراق المصابة بالفيرويد والمتجمدة (١ : ١، W / V) فى هاون ومدقة مع ٠,٠٤ مول فوسفات البوتاسيوم منظم، pH ٨,٣ محتوياً ٠,٣٪ من-mercaptoe- 2 - thanol. أما الفيرويدان CSVd و ChCMVd قد حفظا فى نبات الأقحوان. اللقاحات تتكون من مستخلصات كاملة من الحمض النووى من نسيج مصاب



مركزاً بعشرة وعشرين ضعف بالترتيب على أساس وزن النسيج عن طريق الترسيب بالايثانول.

### الإختبارات على نباتات الطماطم:

تُحقن نباتات الطماطم عن طريق تعفير فلقات البادرات (٢ - ٤ مراحل ورقية) بالكرابوراندوم ثم تحك الفلقات بماسحة قطنية مغمورة باللقاح (بالمحلول المنظم في حالة الكنترول). تلاحظ التعبيرات المرضية وتكتب بعد ٦٠ - ٧٥ يوم من الحقن. تنقى الفيرويدات من النباتات المصابة وتعلم في المعمل باليود المشع ١٢٥. يجرى التحليل بواسطة طريقة بصمة الأصبع ذات الاتجاهين لـ RNA قبل وبعد التكاثر في نباتات الطماطم. إن كلاً من السلالة الشديدة والمعتدلة في فيرويد الدرنة المغزلية في البطاطس وكل من CEVd و CSVd كل منهما أظهر صفات الـ RNA المميزة في بصمة الأصبع، هذا يدل على عدم وجود أى تداخل أو تلوث بين هذه الفيرويدات وأن هذه الفيرويدات تكاثرت بشكل نقى في النبات، إلا أن الاختبارات الحيوية فشلت في إثبات تناسخ الـ ChCMVd في نباتات الطماطم.

أما إختبارات الوقاية بالتضاد على الطماطم فقد أجريت كما ذكر Fernow سنة ١٩٦٧. كانت الحقنة الأولى في طور الفلقة، أما الحقنة بالفيرويد المتحدى فقد أجريت بعد ١٤ يوم، عندما كانت النباتات تحمل ٣ - ٤ مراحل ورقية وإن جميع الأوراق باستثناء أصغرها قد حقنت.

### الإختبارات على نباتات الأقحوان:

في الإختبارات على نبات الأقحوان فإن ٦ - ١٠ عقل مجذرة (لها جذور) ذات طول ١٠ - ١٥ سم قد حقنت عن طريق وضع قطرة من اللقاح متوسطة الحجم على الساق ويعمل ٢٥ ثقب عميق خلال القطرة في الساق باستعمال نصل مشروط نمرة ١١، تحفظ النباتات في الصوبا الزجاجية على درجة ٢٢ - ٢٨ م أو في إطارات التنضد على درجة ٢٨ م وإضاءة ٢١٦٠٠ شمعة مع ١٦ ساعة إضاءة يومياً. كانت تحقن النباتات بالفيرويدات الخمسة المذكورة سابقاً.

الأعراض التي تظهر تدل على أن كل من الفيروسات الخمسة قد تكاثرت. إن طريقة بصمة الأصبع لـ RNA لكل من العزلة الشديدة والعزلة المعتدلة و CEVd و CSVd أثبتت أنها قد عزلت من نباتات الأبقوان وقد أثبتت تطابق كل من هذه الفيروسات. لم يكن باستطاعة بصمة الأصبع اكتشاف ChCMVd نظراً لانخفاض الناتج منها.

عند إجراء إختبارات الوقاية بالتضاد على الأبقوان فقد أجريت باستعمال ضعف التركيز من الحمض النووي من السلالة الشديدة والمعتدلة و CEVd و CSVd وعشرين ضعفاً من تركيز ChCMVd. أجريت الحقنات بالفيروس المتحدى بعد ٤٠ - ٥٠ يوم على ساق غير محقون مظهراً أعراض واضحة للفيروس الأول. النباتات المختبرة قدرت على أساس نوع الأعراض المنتجة، شدة الأعراض و / أو تاريخ ظهور العرض (جدول ٢٢). الأوزان والأطوال لنباتات الطماطم أيضاً سجلت في الملاحظات في نهاية التجربة.

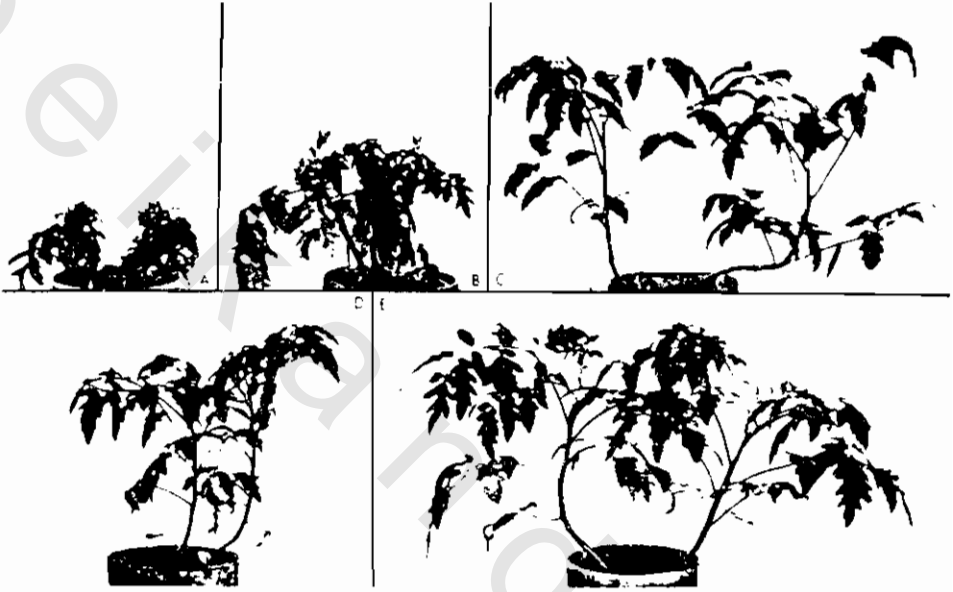
### نتائج الإختبارات:

يمكن دراسة كل فيروس بمفرده لمعرفة مقدرته على أن يبقى محافظاً على نفسه ضد الفيروس الثاني إذا كانت الأعراض التي ينتجها تختلف بوضوح من و / أو أقل شدة من الأعراض المتسببة في ذلك النبات بواسطة الفيروس المختار (جدول ٢٢). يذكر وصف الأعراض لكل فيروس على نباتات الطماطم والأبقوان مجتمعة مع ذكر الوقت المطلوب لظهور التعبير العرضي بواسطة إختبار نصف الورقة في نباتات الطماطم.

### ١ - نتائج الإختبارات على الطماطم:

إن حقن نباتات الطماطم بالسلالة المعتدلة لوحدها سبب أعراضاً بسيطة جداً ولكنها خفضت الوزن وطول النبات بنسبة ٣٠٪ (شكل ٣٨ C، جدول ٢٣). أما نباتات الطماطم المحقونة بالسلالة الشديدة أو CEVd لوحدها تكشف عليها أعراض

شديدة مثل تقزم القمة الشديد، الالتفاف والتدلى والنكروزز، هذه الأعراض نموذجية للسلاسل الشديدة من PSTVd والفيروس CEVd وقد خفضت في الوزن بنسبة ٧٠ - ٨٠٪ وخفضت الطول بنسبة ٥٠٪ (شكل ٣٨ وجدول ٢٣).



شكل رقم ٣٨ :

الوقاية بالتضاد في نباتات الطماطم صنف Rutgers عن طريق الحقن بالتتابع بالسلاسل المعتدلة من فيروس PSTVd وفيروس CEVd. الحقن الأول كان في طور الفلقات والحقن الثاني بعد ١٤ يوم من الحقن الأول. المعاملة A = حقنت CEVd مع منظم، B = حقنت بالمنظم أولاً ثم بالفيروس CEVd، المعاملة C = سلالة معتدلة ثم منظم. D = سلالة معتدلة ثم CEVd أما E = حقنت أولاً وثانياً بالمنظم. النباتات صورت بعد ٥٢ يوم من الحقن الأول.

جدول ٢٢: وصف الأعراض الفيرويدية والوقاية بالتضاد الناتجة في نباتات الطماطم والأقحوان.

اختبارات الوقاية بالتضاد				الأيام	الأعراض الوصف	الفيروسات
ChCMVd	CSVd	CEVd	PS			
—	—	غير مؤكد	غير مؤكد		لا شيء	الطماطم CSVd
—	غير مؤكد	+	+	٥٢	تحت المعدل في الطول والوزن	PM
—	—	—	—	١٨	تقرم شديد، تلى أوراق، تكثف في القمة	PS
—	—	—	—	١٨	تقرم شديد، تلى أوراق، تكثف في القمة	CEVd
—	—	+	—		بقع شاحبة متوسطة	PM الأقحوان
—	لا يوجد وقاية	لا يوجد وقاية	لا يوجد وقاية		نظام التبرقش والشحوب	ChCMVd
لا يوجد وقاية	—	+	—		بقع شاحبة، تقرم متوسط	PS
غير مؤكد	—	+	+		تقرم، بقع شاحبة، تلى الورقة	CSVd
—	—	—	—		تقرم شديد وتشوه الورقة وشحوب	CEVd

ملاحظات على الجدول: -

١ - رتب الفيروسات تصاعدياً حسب ازدياد شدة الأعراض. PM = السلالة المعتدلة من فيروس الدرة المغزلية في البطاطس، PS السلالة الشديدة من فيروس الدرة المغزلية في البطاطس.

٢ - اليوم = يدل متى (على الأقل) نصف النباتات المختبرة أعطت تعبيرات أعراض.

٣ - الوقاية بالتضاد أجريت كما هو مشروح في الموضوع. حقت النباتات أولاً بالفيروس المذكور في الجهة اليمنى من الجدول ثم بعد ذلك حقت بالمتحدى (١٤ يوم في الطماطم، ٤٠ - ٥٠ يوم في الأقحوان) بالفيروسات المذكورة في أعلى الجدول.  
+ تعنى حصلت وقاية. أما (-) تعنى لم تسجل النتائج.

جدول ٢٣: تأثير الحقن بالفيريويد على تكشف الأعراض وشدتها وعلى الوزن والطول في نباتات الطماطم صنف Rogers.

المعاملات	الأعراض		التأثير على	
	الحقن الثاني	الشدّة	الأيام اللازمة للظهور % متوسط الوزن بالنسبة للكتنترول	متوسط الطول بالنسبة للكتنترول %
منظم	منظم	—	—	١٠٠
PS	منظم	+++	١٨	٤٨
PS	CEVd	+++	١٨	٥٣
PS	PM	+++	١٨	٥٥
PS	CSVd	+++	١٨	٥٦
CEVd	منظم	+++	١٨	٤٧
CEVd	PM	+++	١٨	٤٤
CEVd	PS	+++	١٨	٤٦
CEVd	CSVd	+++	١٨	٤٧
PM	منظم	+	٥٢	٧١
PM	CEVd	+	٥٢	٦٨
PM	PS	+	٥٢	٦٥
PM	CSVd	+	٥٢	٧٠
CSVd	منظم	—	—	٩٨
CSVd	CEVd	++	٥٢	٦٧
CSVd	PM	+	٥٢	٨٥
CSVd	PS	++	٥٢	٦٨
منظم	PM	+	٥٢	٨٢
منظم	CEVd	++	٣٦	٦٠
منظم	PS	++	٣٦	٦٠
منظم	CSVd	—	—	٩٠

ملاحظات على الجدول: -

- ١ - الحقن الأول كان في طور الفلقات. الحقن الثاني كان بعد الحقن الأول بمدة ١٤ يوم وفي طور أربعة أو ثلاثة ورقات. كان هناك ١٤ نبات لكل معاملة. متوسط الوزن للنباتات الكنتول ٥٥ غرام أما متوسط الطول كان ٤٨ سم.
- ٢ - فهرس الشدة كان (-) لا يوجد أعراض، (+) = أعراض معتدلة، (++) أعراض متوسطة، (+++) أعراض شديدة يمكن ملاحظة ذلك في شكل ٣٨.
- ٣ - استمرت التجربة ٦٥ يوم. بحسب اليوم عندما يظهر نصف أو أكثر من نباتات التجربة الأعراض المذكورة.

حقنت نباتات الطماطم أولاً بمنظم ثم بعد ذلك بالمتحدى مثل السلالة الشديدة أو CEVd، فكانت النتيجة أن تكشفت أعراض فيروسية واضحة وخفضت حوالى ٥٠٪ من الوزن و٤٠٪ من الطول (شكل ٣٨، B جدول ٢٣). مع أن الأعراض المميزة للفيروس قد أنتجت فى هذه النباتات، إلا أن الأعراض كانت أقل شدة من تلك الواضحة فى شكل ٣٨، A، نظراً لأن النباتات كانت أكبر بمدة ٢ أسبوع عندما حقنت. على كل حال فإن تعبيرات الأعراض فى هذه المجموعة من النباتات معنوياً وأكثر شدة من تلك الملاحظة فى النباتات المحقونة فى اليوم الأول بالسلالة المعتدلة. النباتات التى حقنت فى اليوم الأول بالسلالة المعتدلة وبالمتحدى ثم بعد ١٤ يوم من ذلك بالسلالة الشديدة أو CEVd كانت غير متميزة عن تلك المحقونة بالسلالة المعتدلة لوحدها (شكل ٣٨، D و جدول ٢٣). وبالتالى فإن الحقن السابق بالسلالة المعتدلة حفظ هذه النباتات من تكشف أعراض فيروسية شديدة تتسبب عن السلالة الشديدة أو عن CEVd. النباتات الموجودة فى شكل (D، ٣٨) كانت قد اختبرت لإظهار القوة القليلة من الأربعة عشر نبات فى تلك المعاملة، علاوة على ذلك فإنها لم تظهر أعراض فيروسية. التجارب الأخرى المستعمل فيها خمسة عزلات إضافية أظهرت نفس الوقاية.

نباتات الطماطم المحقونة بالفيروس CSVd لوحده لم يتكشف عليها أعراض مرئية ولم تكن مختلفة معنوياً عن النباتات غير المحقونة فى الطول أو الوزن (جدول ٢٢، ٢٣). وبنفس الطريقة فإن تلك النباتات المحقونة بالفيروس CSVd والمتحدى مع سلالة معتدلة من PSTVd لم تختلف معنوياً فى الوزن والطول عن نباتات الكنترول المحقونة بعد ١٤ يوم بالسلالة المعتدلة. من ناحية أخرى بينما النباتات المحقونة بالفيروس CSVd ثم حقنت بالمتحدى السلالة الشديدة أو الفيروس CEVd، لحسن الحظ تكشفت أعراض فيروسية وكان الخفض فى الوزن والطول مشابهاً للنباتات فى الكنترول (النباتات التى حقنت فى اليوم الأول بالمنظم وفى اليوم الرابع عشر حقنت بالسلالة الشديدة أو CEVd). إن إبتداء هذه الأعراض كان قد تأخر حوالى ١٦ يوم (جدول ٢٣). هذه النتائج تؤدى إلى القول بأن CSVd يتدخل مع نشوء

المرضية في نباتات الطماطم بواسطة السلالة الشديدة والفيروس CEVd. لقد حصل على مثل هذه النتائج المقنعة باختبارات مماثلة على نباتات الأقحوان.

## ٢ - نتائج الإختبارات على الأقحوان:

إن الأعراض الناتجة من السلالة الشديدة والسلالة المعتدلة والفيروس CEVd والفيروس CSVd والفيروس ChCMVd يمكن تمييزها بسهولة في نباتات الأقحوان صنف Bonnie Jean (جدول ٢٢). إن الحقن بالسلالة المعتدلة، السلالة الشديدة أو الفيروس CSVd تحفظ نبات الأقحوان من إظهار تعبيرات عرضية للفيروس CEVd. وعلى أية حال فإن ChCMVd لم يكن حافظاً ضد الأعراض من السلالة الشديدة (شكل ٣٨). أما في التجارب التي فيها حقنت النباتات أولاً بالفيروس CSVd أو CEVd ثم بعد ذلك حقنت بالمتحدى ChCMVd كانت غير حاسمة بسبب أن الأعراض الناتجة عن ChCMVd لم يمكن تمييزها إيجابياً عن تلك المتوطدة مسبقاً والأعراض الأكثر شدة من الفيروس CSVd والفيروس CEVd. وبالتالي كما هو ملخص في جدول ٢٢ فإن أفراد المجموعة من الفيروسات التي تشمل السلالة الشديدة والسلالة المعتدلة من PSTVd والفيروس CEVd والفيروس CSVd، ولكن باستثناء ChCMVd تظهر وقاية بالتضاد في نوع من الأقحوان. هذا يدل على أن السلالة الشديدة والمعتدلة والفيروس CEVd والفيروس CSVd تؤثر على عمليات بيولوجية مشتركة، مع أنها تختلف معنوياً من واحد إلى الآخر في التركيب الأولى للأحماض RNAs.

أما الفيروس ChCMVd يبدو أنه لا يؤثر في نفس هذه العملية. ولتحديد فيما إذا كان المتحدى (الفيروس المحقون ثانياً) له تأثير في الوقاية بالتضاد أو يمكن أن يحمى النباتات عن طريق حقنة في النباتات أولاً، فقد تم إجراء إختبارات حيوية في تجربتين حفظت النباتات عن طريق الحقن المزدوج. في كل حالة فإن كلا الفيروسين حصل له تناسخ. فمثلاً الأعراض النموذجية لكل السلالة الشديدة والفيروس CEVd (أو السلالة المعتدلة والفيروس CEVd) لوحظت بعد الإختبار

الحيوى لمستخلصات الحمض النووى من النباتات المحفوظة والمحقونة مسبقاً بأى من إتحادات الفيرويدات. إن مستوى التناسخ بواسطة الفيرويدات المفردة فى النباتات المحفوظة بالتضاد والمحقونة مرتين تبقى لتحديدتها.

خلال التجارب التى استمرت ٦٥ يوم لم يلاحظ اطلاقاً أعراض للفيرويد المتحدى المحقون فى نباتات الطماطم المحفوظة. وعلى أية حال، فى الأقحوان، فإن أعراض CEVd المتحدى المحقون لم تكبح بشكل غير محدود عن طريق الحقن المسبق بالسلالة الشديدة أو المعتدلة أو الفيرويد CEVd، وإنما بدأت فى الظهور فى هذه النباتات المحفوظة حوالى ٥٠ - ٦٠ يوم بعد الحقن بالمتحدى. هذه النتائج تشبه تلك التى حصل عليها Herrick & Cassells سنة ١٩٧٧ الذى درس الوقاية بالتضاد لسلالات فيروس موزايك الدخان.

لقد تم تفسير ظاهرة الوقاية بالتضاد فى الفيرويدات عن طريق تثبيت الإصابة بواسطة المحقون الأول سواء كان فيروس أو فيرويد والذى إلى حد ما يؤخر أو يمنع تعبيرات الأعراض عن طريق المتحدى المحقون فيروس أو فيرويد، ولا يمكن أن نلغى إمكانية أن مقدار التركيز للفيرويد المتحدى مطلوب لتعبيرات الأعراض وأن هذا التركيز لا يصل إليه فى حالة وجود السلالة الواقية كنتيجة للتثبيط الجزئى للتناسخ.

#### إدخال فيرويد ثمرة الخيار الباهتة فى التجربة:

أجريت التجربة السابقة مع إضافة فيرويد ثمرة الخيار الباهتة CPFVd فى التجارب على الأقحوان. فتبين أن الأقحوان صنف Bonnie Jean تفاعل مع الإصابة بالفيرويد CPFVd بظهور بقع صفراء صغيرة عديدة على حواف الأوراق وقممها.

وقد أظهرت نتائج دراسات الوقاية بالتضاد أنه فقط ChCMV لم يحفظ نباتات الصنف Bonnie Jean ضد الإصابة بأى من الفيرويدات الثلاثة الأخرى، ولا أى من هذه الثلاثة فيرويدات حفظ هذه النباتات ضد الإصابة بالفيرويد ChCMV.



ومن ناحية أخرى فإن النتائج المذكورة في جدول ٢٥ تدل على أن العزلتين من PSTVd بالإضافة إلى الفيرويد CSVd و CPFVd حفظت النباتات كل ضد الآخر. الحقن الرجعي للنباتات السليمة Bonnie Jean أكدت النتائج كما هو واضح في الأعراض.

لم يكن بالإمكان رؤية RNA الخاص بالفيرويد ChCMVd على شكل حزمة على الـ Polyacrylamide gels المحمل بمستخلصات من نباتات مصابة بالفيرويد ChCMVd حضرت بواسطة أى من الإجراءات المتبعة فى الاستخلاص، مع أن RNAs الخاصة بالنبات اكتشفت فى هذه المستخلصات عن طريق الصبغ بمادة Toluidine الزرقاء. إن حزم RNA لثلاثة فيرويدات الأخرى كانت دائماً موجودة فى وسط الجيل بالضبط فوق حزمة RNA - 9S. مهما كان فإن إجراءات المستخلص كانت تستعمل، أما حزمة RNA - PSTVd - m كانت دائماً الأكثر وضوحاً وكانت حزمة RNA للفيرويد CSVd كانت الأضعف. أما المستخلصات من نبات الأقحوان الصنف المزروع Mistletoe المحقونة بالفيرويد CPFVd لم تكن نقية بدرجة كافية نظراً لأن الجيل المحمل بهذه المستخلصات كانت تصبغ بشكل شامل بالتولويدن الأزرق.

جميع حزم RNA للفيرويدات كانت واقعة على نفس المسافة من قمة الجيل، هذا يدل على أنها لا تختلف فى حركتها فى الهجرة الكهربائية-Electrophoretic mobility فى ٥٪ بولى اكريلاميد جيل. يظهر فى جدول ٢٤ أن الفيرويد ChCMVd أصاب نبات الأقحوان فقط من الثلاثة أصناف المزروعة وحدث أعراض تبرقش الورقة النموذجية على الصنف Deep Ridge وعلى الصنف Bonnie Jean. أما الفيرويدات الثلاثة الأخرى أصابت جميع أنواع النبات المحقونة والمزروعة باستثناء نباتات الخيار صنف Sporu والتي كانت أصيبت فقط بالفيرويد CPFVd. نباتات الخيار المصابة نمت أبطأ من الأفراد السليمة، أوراقها كانت أصغر وشاحبة بأطراف مجمعة لأسفل، ازهارها كانت صغيرة ذات بتلات خشنة مثلثة وكانت ثمارها صغيرة شكل الكمثرى وذات لون أصفر باهت.

جدول ٢٤: تفاعل عدة نباتات إختبار اللحن بأربعة فيرويدات.

التفاعل مع اللحن بالفيرويدات					النبات المختبر
ChCMV	CPFVd	CSVd	m-PSTVd	s-PSTVd	
					١ - نبات الأقحوان
ss	ss	ss	ss	ss	صنف Bonnie Jean
ss	ss	ss	ss	ss	صنف Mistleto
ss	si	si	si	si	صنف Deep Ridge
o	si	ss	si	ss	٢ - <i>Gynura aurantiaca</i>
o	ss	o	o	o	٣ - نبات الخيار صنف Sporu
o	ss	ss	ss	ss	٤ - الطماطم صنف Najwczesniejszy
o	ss	ss	ss	ss	الطماطم صنف New York
o	ss	ss	ss	ss	الطماطم صنف Rutgers
o	ss	ss	ss	ss	٥ - البطاطس صنف Line PW 22/70
o	si	lsss	lsss	lsss	البطاطس صنف <i>Scopolia sinensis</i>

ملاحظات على الجدول: -

1s = أعراض موضعية

ss = أعراض جهازية

si = إصابة جهازية بدون أعراض

o = بدون إصابة

جدول ٢٥ : نتائج إختبارات الوقاية بالتضاد مع أربعة فيروسات على الأقحوان  
صنف Bonnie Jean .

الفيروسات الموجودة في اللقاح المضاف إلى النبات خلال الأعراض الملاحظة على النباتات بعد ستة أسابيع من الحقن بالمتحدى	اللقن الثاني	اللقن الأول
m - PSTVd	—	m - PSTVd
m - PSTVd	s - PSTVd	m - PSTVd
m - PSTVd	CSVd	m - PSTVd
m - PSTVd	CPFVd	m - PSTVd
m - PSTVd + ChCMVd	ChCMVd	m - PSTVd
s - PSTVd	—	s - PSTVd
s - PSTVd	m - PSTVd	s - PSTVd
s - PSTVd	CSVd	s - PSTVd
s - PSTVd	CPFVd	s - PSTVd
s - PSTVd + ChCMVd	ChCMVd	s - PSTVd
CSVd	—	CSVd
CSVd	m - PSTVd	CSVd
CSVd	s - PSTVd	CSVd
CSVd	CPFVd	CSVd
CSVd + ChCMVd	ChCMVd	CSVd
CPFVd	—	CPFVd
CPFVd	m - PSTVd	CPFVd
CPFVd	s - PSTVd	CPFVd
CPFVd	CSVd	CPFVd
CPFVd + ChCMVd	ChCMVd	CPFVd
ChCMVd	—	ChCMVd
ChCMVd + m - PSTVd	m - PSTVd	ChCMVd
ChCMVd + s - PSTVd	s - PSTVd	ChCMVd
ChCMVd + CSVd	CSVd	ChCMVd
ChCMVd + CPFVd	CPFVd	ChCMVd
m - PSTVd	m - PSTVd	none
s - PSTVd	s - PSTVd	none
CSVd	CSVd	none
CPFVd	CPFVd	none
ChCMVd	ChCMVd	none

### خامساً: التداخل بين الفيرويدات المحقونة معاً:

#### Interference Between Coinoculated Viroids

أظهرت الدراسات المتأخرة أن الوقاية بالتضاد Cross - Protection تحدث في الفيرويدات ليس فقط بين سلالتين لفيرويد معين (التي لا تختلف في تتابعها الأساسي بأكثر من ١٠٪) ولكنها تحدث أيضاً بين الفيرويدات المختلفة وهذا أدى إلى إجراء تجارب كثيرة في هذا المجال.

في إختبارات الوقاية بالتضاد الكلاسيكية يكون هناك مدة أسبوعين بين الحقن بالفيرويد الأول والحقن بالفيرويد المتحدى. وحيث أن ظاهرة الوقاية بالتضاد تقترح بأن وجود فيرويد واحد يمكن أن يتدخل مباشرة مع عملية تناسخ الفيرويد الثاني، وبالتالي فإن هذا يصعب تقديره بعد فترة طويلة لأن فترة أسبوعين بين الحقن بالفيرويد الأول والفيرويد الثاني تسمح بحدوث تأثيرات ثانوية أخرى. وبالتالي فإن هناك مجموعتين من التجارب لتحديد فيما إذا كان التداخل يمكن أن يلاحظ بين الفيرويدات الداخلة في النبات وكأنه لقاح واحد مخلوط من الفيرويديين.

عند البحث عن التداخل بين سلالة معتدلة من فيرويد الدرنة المغزلية في البطاطس m - PSTVd وسلالة شديدة s - PSTVd. حقنت بادرات طماطم ذات عمر ١٤ يوم بكل من السلالتين على حدة ومرة ثانية بالسلالتين معاً. بعد ١٠ أسابيع أخذت ملاحظات وصور عن هذه النباتات. خلال فترة العشرة أسابيع هذه استعملت طريقتان لتقدير تعبيرات الأعراض للفيرويد PSTVd. حدد طول كل نبات أسبوعياً بواسطة قياس طول الساق حتى القمة المرستيمية. بالإضافة إلى ذلك استعمل نظام تدرج عددي واستعمل ثلاثة مرات في الأسبوع ليسجل التغيرات غير العادية في الشكل الظاهري، مثل تشوه الأوراق، النموات الزائدة للسيقان

ملاحظة هذه التجربة قام بها إثنى عشر باحثاً في جامعة روكفلر في أمريكا سنة ١٩٨٨ وكان على رأس هذا الفريق من الباحثين العالم ANDREA D.Branch. وهي تعرض هنا باختصار كبير.

المحورية، الشحوب، التبقع والموت والتقرم، هذا يعنى خفض المسافة بين السلاميات. التقديرات الممكنة على هذا المدرج تتراوح من صفر إلى خمسة. إن مقدار ٢ أو أكثر يدل على أعراض شديدة تدل على مرض فيروسى شديد. هذه التجربة أجريت مرتين، باستعمال مجموعات معاملة تحتوى أربعة نباتات فى كل الأوقات. حصل على نتائج عالية التناسق ودرست المعلومات المتحصل عليها.

النباتات التى أعطيت لقاح مخلوط يحتوى ٠,٢ ميكوغرام لكل ملتر من السلالة المعتدلة من فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس و ٠,٢ ميكوغرام لكل ملتر من السلالة الشديدة من نفس الفيروس كانت نتائجها من حيث منحنى النمو والأعراض الجانبية مطابقة لتلك النباتات المحقونة بكمية ٠,٢ ميكوغرام لكل ملتر من السلالة الشديدة لنفس الفيروس لوحدها. هذا يدل على إخفاق للسلالة المعتدلة فى أن تقلل التعبيرات المرضية للأعراض المتسببة عن السلالة الشديدة أما النباتات المحقونة بكمية ٠,٢ ميكوغرام لكل ملتر من السلالة المعتدلة نمت بسرعة أكثر ووصلت إلى طور نهائى أكبر من النباتات المحقونة إما بمخلوط من السلالة المعتدلة والشديدة معاً أو السلالة الشديدة لوحدها. وعلى كل حال فإن النباتات المحقونة بالسلالة المعتدلة يمكن أن تميز عن النباتات المحقونة بالكنترول على أساس الارتفاع وعلامات الشكل الظاهرى. النباتات المحقونة بعشرة أضعاف زيادة من السلالة المعتدلة فوق السلالة الشديدة (٠,٢ ميكوغرام لكل ملتر من السلالة المعتدلة و ٠,٠٢ ميكوغرام لكل ملتر من السلالة الشديدة) كانت غير مميزة عن النباتات المحقونة بالسلالة الشديدة بتركيز ٠,٠٢ ميكوغرام لكل ملتر. وبالتالي حتى عندما يكون اللقاح محتوياً عشرة أضعاف زيادة من السلالة المعتدلة فإن العزلة الشديدة كانت سائدة سيادة كاملة على مستوى التعبير العرضى للمرض.

وعلى النقيض من ذلك فإن النباتات المحقونة بمائة ضعف زيادة من السلالة المعتدلة نمت إلى معدل ارتفاع أكثر قليلاً من المجموعة المشابهة المحقونة بالسلالة الشديدة لوحدها، هذه الزيادة لوحظت فقط فى فردين من المجموعة. نفس هذين

النباتين أظهرتا أعراض معتدلة فقط خلال العشرة أسابيع في فترة بعد الحقن. وعلى أية حال في ٧٥٪ من النباتات فإن أعراضاً غير مخفضة من المرض الشديد قد نتجت على الرغم من زيادة مائة ضعف من اللقاح من RNA من العزلة المعتدلة لا يوجد أى دليل على أن السلالة الشديدة والمعتدلة تسبب تأثيرات إضافية عند حقنهما معاً في النباتات.

### الجرعة المطلوبة لتعبيرات الأعراض:

هل من الممكن أن تلك الأعراض سوف تختلف ليس فقط مع السلالة ولكن أيضاً مع جرعة اللقاح؟؟ للإجابة على هذا السؤال فإن مجموعات من النباتات الكنترول حقنت إما بالسلالة المعتدلة من فيرويد الدرنه المغزلية في البطاطس لوحدها (بتركيز ٤،٠،٢،٠،٢،٠،٢ و ٢،٠٠٢ ميكوغرام / مللتر) أو بالسلالة الشديدة لوحدها (فوق نفس المستوى المستوى من التركيز) ثم وضعت تحت المراقبة لمدة عشرة أسابيع. وجد أن الوقت اللازم لبداية ظهور الأعراض الفيرويدية النموذجية يتناسب عكسياً مع تركيز اللقاح. وعلى أية حال فإن هذا التأثير الذى كان أكثر وضوحاً خلال أول أسبوعين بعد الحقن لم يستمر. بمضى عشرة أسابيع بعد الحقن فإن جميع المجموعات النباتية المحقونة بالسلالة المعتدلة مطابقة تماماً لبعضها البعض بغض النظر عن التركيزات التى استعمل فيها اللقاح، سواء حقنت بتركيز ٤،٠ ميكوغرام لكل مللتر أو ٢،٠٠٢ ميكوغرام لكل مللتر فهى تعبر عن نفس المستوى من أعراض السلالة المعتدلة وكانت كلها أقصر قليلاً من نباتات الكنترول المحقونة بالمنظم. وبالمثل فإن النباتات المحقونة بتركيز ٢،٠٠٢ ميكوغرام لكل مللتر من السلالة الشديدة أظهرت نفس الخفض العنيف فى الدرجة وحصلت على نفس الأعراض مقدره مثل تلك المحقونة بتركيز ٤،٠ ميكوغرام. فى كل حالة فإن الأعراض الخاصة المميزة للسلالة وجد أنها تتكشف فى النباتات المحقونة بمدى جرعات من الفيرويد متفاوتة وإن إختلاف التركيز فى الحقن يظهر تأثير فى أول ٧٠ يوم ثم بعد ذلك لا يعود لاختلاف التركيز أى أثر على الأعراض.

## تثبيط تناسخ فيروس تقزم حشيشة الدينار بعد الحقن المشترك بفيروس PSTVd :

نظراً لأن عزلات الفيروس تحدث طبيعياً، مثل العزلة المعتدلة والشديدة لفيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس، فإنها يمكن أن تحتوى خليطاً من تنوعات التتابع. إن هذه الدراسة إمتداداً للدراسة السابقة وذلك لمقارنة كفاءة التناسخ فى النباتات المحقونة بنسخ من تتابع فيروس مكلون. هذه النسخ ممكن أن تزود بلقاح يحتوى تتابعات نقيه مفردة.

لقد إختير فيروس تقزم حشيشة الدينار HSVd وفيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس PSTVd لهذه التجربة لعدة أسباب منها: -

- ١ - هذان الفيروسان يحدثان أعراضاً مختلفة جداً فى نباتات الطماطم.
- ٢ - الإصابة بفيروس تقزم حشيشة الدينار تسبب أعراضاً غير ظاهرة فى البطاطس بينما فيروس الدرنه المغزلية الهولندية يسبب أعراضاً شديدة جداً تحت ظروف النمو المستعملة فى التجربة.
- ٣ - نظراً لأن الفيروسين يمتلكين تماثل تتابع محدود فقط فمن الممكن تمييزهما بطريقة تهجين الحمض النووى.
- ٤ - إن نسخ ال Dimeric من HSVd و PSTVd قد تبين أنها معدية فى نباتات الخيار والطماطم بالترتيب.

لإختبار نسخ ال HSVd dimeric على نباتات الطماطم، فإن cDNA inserts كانت قد تحركت أولاً فى ناقلات التعبير pSP6. إثنان من البلازميد مختلفان كل من تكرار ترادفى رأس مع ذيل من HSVd cDNA ركبت فى pSP6 واحداً يستعمل موقع Eco R1 الموجود فى HSVd DNA والآخر مستعملاً مواقع Bam H1. النسخ من هذه البلازميدات يشار إليها HSD3 و BH2 بالترتيب

تحتوى HSVd dimers من القطبية الموجبة محاطة جانبياً بمناطق قصيرة من تتابعات الناقل.

إن تهجين الحمض النووي قد بين أن تناسخ HSVd يحدث في نباتات الطماطم المحقونة بكل من النسختين HSVd dimeric. وعلى أية حال كما هو متوقع فإن هذه النباتات لم يتكشف عليها أية أعراض يتعرف عليها. إن نسخة الـ PSTVd 8A قد أظهرت في تجارب سابقة أنها معدية لنباتات الطماطم، هذا يكون باعثاً على نضج الـ PSTVd RNA الدائري لتتابع الهولندي. إن الحقن بـ 8A أنتج أعراضاً مميزة لمرض فيروسى شديد. المقارنة بـ dot intensities بين أن نباتات الطماطم المصابة بفيروس PSTVd يتجمع فيها على الأقل ٥٠ ضعف من RNA الفيروسي أكثر منه في نباتات الطماطم المحقونة بفيروس HSVd.

هناك إجراءات مختلفان إستعملا للحقن المشترك للنباتات بفيروس HSVd وفيروس PSTVd. في تصميم مشابه لذلك المستعمل في دراسة السلالة المعتدلة والشديدة في فيروس الدرنه المغزلية في البطاطس فإن نسخاً من الـ Dimeric من HSVd و PSTVd خلطت مع بعضها بمعدلات مختلفة وحقنت في بادرات الطماطم. في التجربة الثانية، فإن نسخاً مزدوجة حضرت والتي تحتوى صورتين (نسختين) من الـ PSTVd إرتبطت مع صورتين من HSVd. هذه النسخة BPH 21 ضمنت إضافة التتابعات من HSVd و PSTVd بتركيزات متساوية. كانت النتائج من كلا التجريبتين متشابهة بغض النظر عن التصميم. إن وجود الـ PSTVd كان مقترناً بخفض ملحوظ في تناسخ الـ HSVd.

في تجارب أولية للتنافس بين HSVd و PSTVd فإن نسخاً من HSD<sub>3</sub> و 8A خلطت بمعدلات بنسبة تتراوح من ١ : ١ إلى ١ : ١٠٠. النباتات التي تحصل على نفس اللقاح كانت تعامل كمجموعة. بالمقارنة مع عينات من النباتات حقنت بنسخاً من HSVd لوحده، فإن التركيز من HSVd كان يخفض بالتدرج في الأحماض النووية من النباتات المحقونة بـ HSVd و PSTVd بنسبة ١ : ١. لوحظ بعض الخفض في HSVd في مستخلصات من النباتات حقنت بعشرة



أضعاف زيادة من نسخ HSVd، بينما نسخ ال PSTVd لم يكن لها تأثير مكتشف على التجمع في النباتات المحقونة بمائة ضعف زيادة من نسخ HSVd.

لتحديد فيما إذا كان المستوى المنخفض من HSVd عاكساً عدم المقدة النسبية على نسخ ال HSVd لتدخل خلايا الطماطم في الوقت الذي عنده يضاف اللقاح، النباتات كانت أيضاً محقونة بنسخة مزدوجة (BPH 21) محتوية صوراً مرتبطة من ال Dimeric لكل من HSVd و PSTVd. وعلى أية حال فإن تناسخ HSVd لم يثبت في النباتات التي أخذت هذه النسخة. في الحقيقة، فإن سبعة أسابيع بعد الحقن خلالها لم يمكن اكتشاف HSVd في الساق ومستخلصات الورقة في هذه النباتات. في التجارب اللاحقة فإن محتويات الفيرويد في النباتات المفردة كانت قد تحددت.

إن طريقة Dot hybridization أظهرت أن واحداً فقط من ثمانية نباتات يتجمع فيها مستويات ممكن التعرف عليها من HSVd RNA عندما حقنت بمخلوط محتويماً ٢٠ ميكوغرام لكل ملتر من HSD<sub>3</sub> و ٢,٠ ميكوغرام لكل ملتر من نسخ Dimeric PSTVd. ومن ناحية أخرى فإن ثلاثة من أربعة نباتات تنسخ HSVd عندما حقنت بـ HSD<sub>3</sub>.

إن كفاءة ال PSTVd في وقف تناسخ ال HSVd كان أيضاً مؤكداً في النباتات المحقونة بمقدار ٤٠ ميكوغرام لكل ملتر من النسخة المزدوجة، BPH 21. هذه النباتات أظهرت أعراض مرض شديدة يتعذر تمييزها عن تلك الناتجة بواسطة الحقن بنسخة ال PSTVd لوحدها. إن الفيرويد PSTVd يتجمع في الخمسة نباتات كلها، بينما HSVd لم يمكن اكتشافه في أى منها. إن النسخة من HSVd dimer- أكثر تشابهاً للنسخة المزدوجة التي تسمى BH<sub>2</sub>. هذه النسخة تصيب ثلاثة من خمسة نباتات عندما حقنت بمقدار ٢٠ ميكوغرام لكل ملتر. كذلك فإن BH<sub>2</sub> تصيب ثلاثة من خمسة نباتات عندما حقنت بمقدار ٥٠ ميكوغرام لكل ملتر. إن إصابة ٦ من ١٠ نباتات طماطم محقونة بمقدار ٢٠ - ٥٠ ميكوغرام لكل ملتر من BH<sub>2</sub> أدى إلى الاقتراح بشدة بأن HSVd فشل في التناسخ في النباتات المحقونة بنسخة مزدوجة من BPH 21 بسبب التداخل من PSTVd.

يمكن القول باختصار بأن هذه التجربة قد أظهرت أن نسخاً من PSTVd قد خفضت بشكل كبير جداً حيوية نسخ HSVd. إن طريقة Dot hybridization قد أظهرت أن الفيرويد PSTVd فقط هو الذى يتضاعف وينسخ إلى مستويات يمكن اكتشافها فى النباتات المحقونة بنسخ مزدوجة تحتوى نسختين من PSTVd متبوعة بنسختين من HSVd. بينما النسخ المزدوجة التى فيها HSVd تتابعه يسبق تلك التى فى PSTVd التى تحتاج إلى الإختبار. لقد تبين أن نسخ HSVd تكون معدية عندما تحاط بمدى واسع من التتابعات المختلفة. ويبدو أن HSVd يفشل فى التضاعف عندما يحقن مشتركاً مع PSTVd فى النباتات بسبب التداخل الواضح من PSTVd.

هناك سؤالاً نحتاج إلى الإجابة عليه مستقبلاً وهو هل الفيروسات الشديدة المرضية تستطيع أن توقف تناسخ الفيروسات الأقل شدة مرضية؟؟

إن تجارب الحقن المشترك تختلف عن تجارب الوقاية بالتضاد Cross - Protec-tion التى فيها إحدى الفيروسات يدخل النبات قبل الآخر بمدة معينة. إذا كان تناسخ الفيرويد يؤدي إلى تكوين تركيب معقد دائم فإن هذا التركيب يكون منافساً للفيرويد الثانى الذى يدخل متأخراً. أما فى تجارب الحقن المشترك فإن الفيرويدين يدخلان معاً مما يسمح لهما بفرصة متساوية، هذه الأوضاع تجعل الفيرويد الشديد يكون عنده فرصة كبيرة لتكوين معقد بغض النظر عن وجود الفيرويد الضعيف.

لقد وجد أن تناسخ PSTVd فى النباتات الحساسة جداً للبرد والتى تنمو على درجة أقل من ٢٤م يكون قليل جداً مما يؤدي إلى تثبيط واضح فى الأعراض المرضية وفى تراكم الفيرويد فى النبات. كذلك فإن مستويات HSVd فى نباتات الطماطم النامية فى نفس درجات الحرارة كان أقل منه فى PSTVd. وأن طرق التحاليل المختلفة أثبتت أن مستويات HSVd لا تزيد عن ٢٪ من مستوى PSTVd. إن الاختلاف فى هذا المستوى يؤدي إلى الاختلاف فى إظهار الأعراض المرضية على نباتات الطماطم.

## مراجع خاصة بالفصل الرابع

- 1 - Bachmann, B., Luke, W. and Hunsmann, G. 1990. Nucleic Acid Res. 18 : 1309.
- 2 - Cassells, A. C. and Herrick, C.C. 1977. Virology 78 : 253 - 260.
- 3 - Fernow, K. H. 1967. Phytopathology 57 : 1347 - 1352.
- 4 - Heckcr, R. et al. 1988. Gene 72. 59 - 74.
- 5 - Loss, P., Schmitz, M., Steger, G. and Riesner, D. 1991. EMBO J. 10 : 719 - 727.
- 6 - Matousek, J, Trnena, L. Rakousky, S. ad Riesner, D. 1994. J. Phytopa., 140 : 10 - 24.
- 7 - Mellor, F. C. and R. Stace - Smith. 1977. Applied and Fundemental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer Verlag, Berlin.
- 8 - Melton, D. A. et al 1984. Nucl. Acids. Res. 12 : 7045 - 7056.
- 9 - McKinney, H. H. 1929. I. Agric. Res. 39 : 557 - 578.
- 10 - Palukaitis, P. 1987. Virology, 158 : 239 - 241.
- 11 - Riesner, D. et al. 1989. Electrophoresis 10, 377 - 389.
- 12 - \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_.1990. New Series in biophysics. Nucleic Acids Vol IV PP. 194 - 243.
- 13 - Steger, G. et al. 1992. J. Mol. Biol. 227 : 719 - 737.
- 14 - Tsagris, M., Tabler, M. ad Sanger, H. L. 1991. Nucleic Acid Res. 19 : 1605 - 1612.
- 15 - Wassengger, W. J. et al. 1994. Cell. 76 : 267 - 276.

## الفصل الخامس

### الأمراض الفيرويدية المتسببة عن مجموعة PSTVd فيرويدات من تحت مجموعة PSTVd B<sub>1</sub>

#### ١ - فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس - مرض الدرنه المغزلية فى البطاطس

##### Potato spindle tuber viroid

ينتشر مرض الدرنه المغزلية فى البطاطس فى كل من الولايات المتحدة الأمريكية، كندا، روسيا، جنوب أفريقيا، الهند وأستراليا. يسبب المرض خسائر كبيرة فى بعض المناطق ويعتبر أحد أكثر الأمراض المهلكة للبطاطس. يهاجم المرض معظم الأصناف وينتشر بسرعة وفى كثير من الحالات يكون مترافقا مع بعض الأمراض الفيروسية. يهاجم المرض الطماطم ولكن يبدو (إقتصادياً) أنه ذو أهمية قليلة على محصول الطماطم.

##### الأعراض:

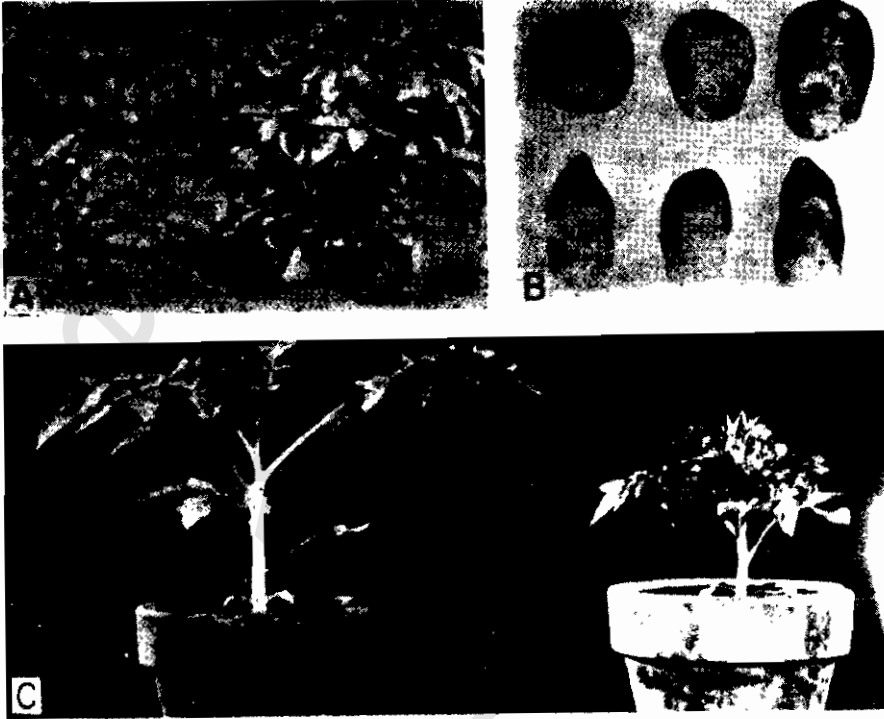
تظهر نباتات البطاطس قائمة ومتقرمة، الأوراق والفروع الجانبية تنمو على زاوية حادة، قواعد الأوراق تكون منحنية كالمنجل ويلاحظ تكور على حواف ونصل الورقة. تكون الأوراق صغيرة وقائمة والوريقات تكون ذات لون أخضر غامق وأحياناً يظهر عليها إلتفاف والتواء (شكل ٣٩).

تكون الدرناات متطاولة ذات شكل مغزلى نموذجى أو تأخذ شكل المضرب doll - Shaped ، أحياناً تكون الدرناات ذات منتصف أسطوانى ونهايات وتدبة وتكون الدرناات أكثر نعومة وذات جلد أكثر ضعفاً وتشقق أحياناً وتكون ذات لحم رهيف طرى. تكون عيون الدرنة أكثر عدداً وأكثر وضوحاً إلا أنها تكون منخفضة قليلاً، تكون الدرناات مشوهة. ينخفض الانتاج إلى حد كبير يصل ٢٥ ٪ فأكثر، ينخفض عدد وحجم الدرناات الناتجة كثيراً، بعض النباتاات لا تعطى درناات أبداً.

أما نباتاات الطماطم القابلة للإصابة فتكون متقزمة وتندلى الأوراق وتكون ذات عروق غائرة أكثر منه فى الحالة الطبيعية مع وجود نكرورز (موت وتحلل الأنسجة) فى الأعناق والعروق ونصل الورقة. تكون نباتاات الطماطم المصابة ذات قمة متوردة.

تكون الأعراض أكثر وضوحاً وشدة عندما تنتج عن السلالة الشديدة. كذلك تكون الأعراض أكثر وضوحاً فى طور الإصابة الثانى (الإصابة الثانوية) حيث تلتحم الأوراق السفلى أحياناً. فى بعض الظروف الجوية وفى بعض الأصناف تكون الأعراض الناتجة عن الإصابة بالسلالة الشديدة شبيهة لتلك المتسببة عن السلالة المعتدلة، ولكن أعراض السلالة الشديدة تتميز بوضوحها وشدة إنتشارها.

إختبر نشاط أنزيمات الببتايدز فى نباتاات الطماطم السليمة والمصابة بالفيروس PSTVd فوجد أن Leu - P - nitroanilide كانت حوالى ثلاثة أضعاف نشاطها وسبعة أضعاف كميتها فى النباتاات المصابة عنها فى النباتاات السليمة وإن كمية الأملاح، الكبريت، الكلور، الكالسيوم، الزنك والمنغنيز أعلى فى النباتاات المصابة عنها فى السليمة أما المغنيسيوم والنحاس والفسفور والمانيوم والسلكون فلم تتأثر بالإصابة.



شكل رقم ٣٩ :

أعراض متسببة بواسطة فيروس الدرة المغزلية في البطاطس. (A) نباتات بطاطس مريضة على الشمال متقزمة ونموها قائم. (B) درنات مريضة، في الأسفل مغزلية الشكل وصغيرة مقارنة بالدرنات السليمة العلوية. (C) نباتات طماطم على الشمال سليمة وعلى اليمين مريضة بعد عشرون يوم من الحقن بفيروس الدرة المغزلية في البطاطس.

### الكائن الممرض :

يتسبب هذا المرض عن فيروس الدرة المغزلية في البطاطس - Potato Spindle Tu-ber Viroid ويكتب باختصار (PSTVd) وقبل سنة ١٩٩٣ كان يكتب (PSTV)، إلا أن علماء الفيروسات إتفقوا على إضافة حرف (d) وذلك لتمييزه عن الفيروسات حيث أن الفيروسات المكتشفة أصبحت كثيرة. تصنيف الفيروس مذکور في الجزء الأول من الكتاب.

هذا الفيروس هو أول فيروس عرف وحددت نيوكليتيده و قد درس دراسة وافية جداً وإن جميع دراسات الفيروسات كانت تطبق على هذا الفيروس. إبتدأت الأبحاث على هذا الفيروس من قبل العالم Diener سنة ١٩٧١ حيث أن العالم Diener هو الأب الروحي لعلماء الفيروس و إن فيروس PSTVd هو الأب الروحي في دراسات الفيروسات كلها.

الفيروس هو RNA معدى وهو ذو وزن جزيئى منخفض حوالى ١٠٠٠٠٠٠ دالتون. إن RNA لهذا الفيروس يتكون من ٣٥٩ نيوكليتيده (ذكر بعض العلماء أن سلالات من هذا الفيروس تكون ٣٥٦ وسلالات أخرى ٣٦١) به عديد من القواعد المزدوجة. يتكون الفيروس من خيط مفرد من RNA مستقيم أو دائرى. يظهر الفيروس النقى بتصوير الميكروسكوب الالكترونى على شكل خيط قصير طوله ٥٠ نانوميتر وله سمك يماثل سمك DNA مزدوج الخيط (شكل رقم ١ فى الجزء الأول من الكتاب).

تبقى العصارة المأخوذة من النباتات المصابة قادرة على إحداث العدوى بعد تخفيف ١ : ١٠٠ و ١ : ١٠٠٠. وكذلك يحتفظ بحيويته عند تسخين المستخلص النباتى لمدة عشرة دقائق على ٧٥ - ٨٠م. إن الفيروس سريع التثبيط فى العصارة المستخلصة من النباتات المصابة، ولكن يمكن إبقاء قدرته على إحداث العدوى عن طريق معاملة العصارة بالفينول حيث أن الفينول يثبط نشاط أنزيم Ribonuclease الذى يحطم RNA الفيروى.

#### الانتقال:

ينتقل الفيروس ميكانيكياً وينتشر بشكل أساسى بواسطة السكاكين المستعملة فى تقطيع التقاوى للبطاطس السليمة والمصابة، وأثناء العمليات الزراعية وطرق الجمع. كذلك ينتقل الفيروس عن طريق حبوب اللقاح والبذور الحقيقية وعن طريق عديد من الحشرات من ضمنها المن، نطاطات الأعشاب. يبدو أن النقل بالحشرات غير أساسى لهذا الفيروس.

## أشكال الفيرويد PSTVd :

كما هو معروف فإن الفيرويدات هي مخلوقات ممرضة ذات وزن جزيئي منخفض تتكون من جزيء RNA دائري مغلق احادى الخيط. إن لفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس شكلان الأول مستقيم والثانى دائرى. أفادت كثير من الأبحاث بأن الشكل المستقيم من RNA الفيرويدى له نفس العدوى التى تسبب عن الشكل الدائرى من RNA الفيرويدى. ووجد أيضاً أن الشكل المستقيم له ثبات أقل منه فى الجزيئات الدائرية. كذلك فإن الأشكال المستقيمة تحتوى 5'- Phos- phosphate وبالتالي فإن كثيراً منها لم تكن منتجة بواسطة أيونات معدنية كعامل مساعد للهيدروكساز من الجزيئات الدائرية. والشكل المستقيم يتكون من تجمع يحتوى أى واحدة من أربعة نيوكليوتيدات على نهايتها 5'. مثل هذه المعلومات تدل على أن الجزيئات المستقيمة الطبيعية لم تنتج بواسطة إنشطار الجزيئات الدائرية عند موقع نيوكليوتيدة محدد، ولكن يمكن أن تنتج إما بواسطة الإنشطار العشوائى أو بواسطة الإنشطار ضمن مناطق خاصة فى الجزيء الدائرى مختلف القابلية لأنزيم Nuclease.

لقد عزلت الأشكال الدائرية والمستقيمة من هذا الفيرويد ونقيت من نسيج نبات طماطم مصاب بالفيرويد PSTVd وإن كلا الشكلين فى حد ذاتهما لم يمكن تمييزهما بالميكروسكوب الألكترونى ولكن إلى حد ما يمكن تمييزهما عن طريق electrophoretic mobilities على Denaturing Polyacrylamide gels وعن طريق مقدرة الشكل المستقيم وليس الدائرى بأن يحدث له فسفرة على موقع نهاية 5' بواسطة (P<sup>32</sup> - ATP) و T<sub>4</sub> - Polynucleotide Kinase. ولقد أمكن إثبات أن الفيرويد PSTVd يمتلك هذين الشكلين أيضاً عن طريق تحليلات التهجين والحيوية. ويبين جدول رقم ٢٦ أن كلا الشكلين من الفيرويد لهما نفس الحيوية والكفاءة فى إصابة نباتات الطماطم وكذلك لهما أيضاً نفس الحيوية فى إصابة *Gynura aurantiaca*.



جدول ٢٦: يبين حيوية الشكل المستقيم والدائري لفيروس PSTVd على نباتات الطماطم.

شكل الفيروس المختبر	عدد النباتات التي يظهر عليها أعراض على عدد النباتات المحقونة بتركيز من RNA نانوغرام / مللتر							
	٠,٠٠١	٠,٠١	٠,١	٠,٥	١	٥	١٠	٥٠
فيروس دائري	-	1/5	1/5	2/5	3/5	5/5	4/4	5/5
فيروس مستقيم	-	٥/5	1/5	3/5	2/5	3/5	2/3	5/5
فيروس دائري	0/6	0/5	0/5	-	3/6	-	6/6	-
فيروس مستقيم	0/6	0/5	0/5	-	3/6	-	6/6	-

من الأبحاث المتلاحقة والمتكررة في هذا الموضوع تبين أن الشكل المستقيم للفيروس من المحتمل أن يكون مرتبطاً في الطبيعة مع الشكل الدائري وأن عملية الربط هذه تكون فعالة نسبياً. أجريت دراسات كثيرة لمعرفة تأثير الطرق المختلفة في تحضير الفيروس واستخلاصه على تكوين الشكل المستقيم للفيروس. ونظراً لأن كلا الشكلين الدائري والمستقيم قد وجدا في الأنسجة المستخلصة بأى طريقة من طرق الاستخلاص الأربعة، فإن هذا يدل على أن الأشكال المستقيمة توجد بذاتها وأن وجودها لم يكن صناعياً نتج من تأثير أى واحد من تلك الإجراءات. زيادة على ذلك فإن وجود الأشكال المستقيمة لم يكن معتمداً على نوع العائل الذى يتناسخ فيه الفيروس ولا على طول المدة التى يبقى فيها النسيج مصاب ولا على استعمال سلالة معينة من PSTVd فى اللقاح. ولقد تبين أن الشكل المستقيم يزداد تجمعاً فى الأنسجة بزيادة وقت التحضين ويصبح مساوياً لمستويات الشكل الدائري من الفيروس بعد ٢٤ ساعة من التحضين. يلاحظ ذلك فى جدول ٢٧.

جدول ٢٧: تأثير طول مدة التحضين على تجمع الشكل الدائري والمستقيم من فيروس PSTVd في خلايا نسيج نبات البطاطس.

طول فترة التحضين بالفسفور المشع	% شكل دائري	% شكل مستقيم
٤ ساعة	٧٧	٢٣
١٢ ساعة	٦٥	٣٥
٢٤ ساعة	٤٦	٥٤

وهناك تجارب تدل نتائجها على أن جزيئات الشكل الدائري والمستقيم كل منها يبقى منفرداً أو أن جزيئات الشكل الدائري تبنى أولاً ثم بعد ذلك تتجمع جزيئات الشكل المستقيم كنتيجة لإنشطار الجزيئات الدائرية، ولكن على أية حال فإن المستوى الكلى للشكل المستقيم نادراً ما يساوى مستوى الشكل الدائري ولا يكون أعلى منه. عند استعمال أنزيم RNA ligase يمكن أن يحدث توازن بين المستويين.

ولقد ثبت أيضاً بأن معظم الجزيئات المكونة لتجمعات الشكل المستقيم ليست هي الفيرويد المستقيم طبيعياً ولكنها ناتجة من الإنشطار الذاتى من أشكال الـ multimeric على مواقع محددة وتتجمع قبل أن يتم اللحام إلى أشكال دائرية. هناك مستوى منخفض من النسبة المثوية لـ G ومستوى على من U فى الشكل المستقيم.

هناك عدة ملاحظات تدل على أنه ليست عروة اليد اليمنى هي الموقع الفريد للإنشطار ذلك للأسباب الآتية:-

١ - هناك ٧٪ من جزيئات الشكل المستقيم تحتوى 5'- terminal G residue.

هذه النيوكليتيده ليست موجودة فى عروة اليد اليمنى من الشكل الدائرى.

٢ - إن عدداً من ال minor spot موجودة فى طريقة تحليل بصمة الإصبع فى الشكل المستقيم وغير موجودة فى الشكل الدائرى.

٣ - الخمسة بقع التى تمثل عروة اليد اليمنى من الفيرويد (بصمة الإصبع) تظهر معلمة بدرجة عالية أكثر مما يتوقعه الباحث أن توجد فى الجزئيات المتشكلة بواسطة الإنشطار العشوائى.

٤ - عند التحليل فإن البقع المتعلقة بمجموعة النيوكليتيديات القصيرة أو الطويلة والتى من المتوقع أن تكون ضمن عروة اليد اليمنى التى فى أجزاء من RNase T<sub>1</sub> تكون غير واضحة فى التحليل.

٥ - إن الأجزاء المحتوية RNase T<sub>1</sub> فى ذراع اليد اليمنى والعروة تكون موجودة فى بصمة الإصبع للشكل المستقيم.

يمكن القول بأن نهاية ساق اليد اليمنى وعروة الشكل الدائرى تحتوى تتابع يشبه تتابع بروموترجين rDNA. وبالتالي يمكن القول بأن RNA Polymerase I المعتمد على DNA يمكن أن يتدخل فى بناء الفيرويد.

هناك مواقع أخرى للإنشطار فى PSTVd حددت بتفاعلات كثيرة وتبين أن مواقع الإنشطار هى ١٧٧ - ١٨٢، ١١٣ - ١١٤، ٨٠ - ٨١، ٣٣٤ - ٣٤٠، ٣٠٠ - ٣١٢، ٢٧١ - ٢٧٥.

#### حركة المسبب فى النبات:

إن ظاهرة إنتقال الفيروسات مسافة طويلة خلال اللحاء فى النباتات المصابة قد درست بتعمق ولقد تأكد بأنها عملية موجبة تقع فعلاً. أما ظاهرة إنتقال

الفيرويدات لمسافة طويلة في النباتات المصابة هي أيضاً تكون خلال اللحاء، مع أن هذا الموضوع قد حصل على قليل من الاهتمام.

كما نعرف فإن الفيرويدات هي جزيئات من RNA معدية ذات وزن جزيئي منخفض أحادية الخيط مكونة دوائر مغلقة ذات درجة عالية من تزاوج القواعد الداخلية. ولقد وجد أن هذه الفيرويدات تتحرك من الساق المحقون أو الورقة المحقونة إلى المناطق المرستيمية في النبات، عندئذ تكون الخلايا في جميع الأوراق الحديثة أصبحت مصابة خلال تكشفها.

في هذا المجال أجريت تجارب على إنتقال الفيرويد PSTVd لتحديد سيره في نباتات الطماطم وتبين أن الفيرويد يتحرك لمسافة طويلة عن طريق اللحاء وبالتالي فإنه يشابه في هذا المجال حركة الفيروس.

عند الحصول على مستخلص حمض نووي منقى جزئياً من نباتات طماطم مصابة بالفيرويد PSTVd ثم يخفف في ١,٠ مول  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ثم يحقن (في أعلى وريقة من الساق) لأول ورقة حقيقية من أوراق بادرات الطماطم ثم تحضن النباتات على درجة ٣٠م ثم يكشف عن وجود الفيرويد على فترات متباعدة في أجزاء مختلفة من النبات بطريقة Dot - blot - hybridization.

ولقد تبين أن الفيرويد PSTVd يمكن أن يكتشف أولاً في قمم الأفرع وفي ورقة فوق الورقتين اللتين تقعان فوق الورقة المحقونة وذلك بعد سبعة أيام من الحقن. وفي تجربة أخرى حيث الأوراق إختبرت للكشف عن الفيرويد بعد ٣، ٦، ٩ و ١٢ يوم من الحقن، فقد أمكن اكتشاف الفيرويد في القمم بعد ستة أيام من الحقن. ومن المهم أن نذكر هنا أن الورقة الواقعة فوق الورقتين اللتين تقعان فوق الورقة المحقونة أصبحت جزء من قمة الفرع في النبات بعد ١ - ٤ أيام من الحقن. وبالتالي فإن الفيرويد PSTVd يتضاعف إلى مستوى يمكن اكتشافه في القمة أكثر منه في الأوراق الأخرى. بعد ١١ يوم من الحقن يمكن اكتشاف الفيرويد في

الورقة الموجودة فوق الورقة المحقونة. وبعد ٢ - ٤ أسابيع يمكن أن يكتشف في الورقة المحقونة نفسها. لقد سبب الفيرويد ظهور أعراض في نباتات الطماطم بعد أسبوعين من الحقن. إن الوريقات المحقونة لم تختبر روتينياً لأن اللقاح المتبقى في الوريقات يمكن أن يكتشف بعد خمسة أيام من الحقن. وبعد ثلاثة أسابيع من الحقن أمكن اكتشاف الفيرويد في جميع الوريقات في الورقة المحقونة.

إن إنتشار الفيرويد PSTVd في أوراق بادرات الطماطم المحقونة (ثلاثة إلى أربعة طور ورقى) قد تحدد بعد شهر من الحقن. النباتات التي فيها الورقة الثالثة فوق الفلقات كانت قد حقنت أظهرت وجود الفيرويد في الجذور، في الورقة المحقونة وفي جميع الأوراق الواقعة فوق الورقة التي حقنت، ولكن ليس في الوريقتين الموجودتين تحت الورقة المحقونة. ومن ناحية أخرى فإن النباتات التي فيها الورقة الأولى فوق الفلقات كانت قد حقنت، أظهرت وجود الفيرويد في جميع الأوراق بالإضافة إلى الجذور. من الدراسات السابقة يمكن القول بأن:-

١ - إن الفيرويد PSTVd عنده المقدرة على أن يتحرك من الورقة المحقونة واصلأ إلى قمة الفرع في النبات ويتضاعف إلى مستويات يمكن اكتشافه في حدود ستة أيام بعد الحقن.

٢ - إن الفيرويد PSTVd يكتشف أولاً في قمة الفرع وفي الأوراق المجاورة للقمة، ثم بعد ذلك في الأوراق الأخرى بين الورقة المحقونة وقمة الفرع وفي الأوراق الملاصقة له وأخيراً في الورقة المحقونة نفسها.

٣ - الفيرويد PSTVd غير قابل للاكتشاف في الأوراق تحت الورقة المحقونة.

### هل الفيرويد يسير خلال اللحاء؟؟

نظراً لأن نواتج عملية التمثيل الضوئي تسير في اللحاء وتنتقل من الأوراق الكاملة للإنفراد إلى أعلى حيث تصل الأوراق الحديثة التكشف وإلى قمة الفرع ثم إلى أسفل إلى الجذر، ونظراً لأن هذه الأنسجة هي التي يمكن أن يكتشف فيها

فيرويد PSTVd فى الأوقات المبكرة، فقد أجريت تجربة لتنظيم حركة الفيرويد عن طريق إعادة توجيه سير نواتج عملية التمثيل الضوئى وهذه التجربة كالآتى:-

ظللت ورقة تحت الورقة المحقونة فى وقت الحقن فى ستة نباتات وذلك لتوجيه سير نواتج عملية التمثيل الضوئى فى هذه الورقة. بعد ٢٠ و ٢٣ يوم من الحقن إختيرت أوراق من كل من الثلاثة نباتات وجمعت وإختبرت بإختبار Dot - blot hybridization. وعلى النقيض من نتائج التجارب التى أجريت على الأوراق غير المظللة، فإن الأوراق المظللة تحتوى PSTVd ولكن الأوراق التى تحت الأوراق المظللة لا تحتوى فيرويد. وبالتالي فإن تظليل الأوراق التى تحت الأوراق المحقونة لم يمنع الفيرويد من إختراق إما قمة الفرع أو الأوراق التى فوق تلك الأوراق المحقونة وهذا يؤدى إلى حركة الفيرويد فى الاتجاه السفلى مع نواتج التمثيل الضوئى.

عندما ظللت الأوراق المحقونة لم يكن هناك فيرويد يمكن اكتشاف حركته إلى أسفل، بينما على فترات زمنية من الإختبار فإن حركة الفيرويد فى الأوراق بين القمم والأوراق المحقونة قد تأخر عندما كانت الأوراق المحقونة مظللة. كذلك فإن تغطية الأوراق المحقونة والتى تؤدى إلى وقف حركة نواتج التمثيل الضوئى فى هذه الأوراق أيضاً أدت إلى تأخير دخول الفيرويد فى الجهاز الوعائى فى النبات بالإضافة إلى تأخير تكاثر الفيرويد فى الأوراق المحقونة. هذا الأخير يمكن أن يعزى إلى المستوى المنخفض فى النشاط التمثيلى فى مثل هذه الأوراق.

مع أن الفيرويد ينتقل إلى أسفل ويصل الجذور بالإضافة إلى إنتقاله إلى أعلى ويصل القمة النامية، فإن تأثير تظليل أوراق مختلفة فى النباتات المحقونة على حركة الفيرويد فى نسيج الجذر لم تختبر، بينما حركة الفيرويد إلى الجذور تكون متعارضة مع قلة الحركة فى الأوراق التى تحت الورقة المحقونة. هذا يتفق مع نظام حركة نواتج التمثيل الضوئى فى اللحاء من الأوراق كاملة الانفراد إلى الأوراق المتكشفة فى الجزء العلوى من النبات وإلى الجذور. عندما عكس اتجاه الحركة فى اللحاء عن طريق منع البناء الضوئى فى ورقة معينة فإن التأثير على حركة كل من الفيروس

والفيرويد يمكن ملاحظتها. هذه النتائج كلها تتفق مع الحركة السريعة الجهازية للفيرويد من الورقة المحقونة إلى النسيج ذو الكفاءة العالية في النمو عبر اللحاء وهذا نفس طريق الفيروسات.

إما عن توزيع السلالتين المعتدلة والشديدة في أجزاء النبات، فإن جدول رقم ٢٨ يبين مدى تجمع الفيرويدات في أجزاء النبات المختلفة، ويوضح الجدول أن تجمع السلالة الشديدة يكون في الأوراق أكبر قليلاً منه في السلالة المعتدلة وكذلك في عيون الدرنات أما في نموات العيون فإن السلالة المعتدلة كانت متجمعة بشكل أكبر. جدول ٢٨: اكتشاف السلالة المعتدلة والشديدة في أجزاء النبات المختلفة في سبعة أصناف من البطاطس في طور الإصابة الثاني:

السلالة المعتدلة	السلالة المعتدلة			السلالة المعتدلة	السلالة المعتدلة			الصف
	أوراق	درنات	عيون نموات عيون		أوراق	درنات	عيون نموات عيون	
-	6/6	+	5/8	-	1/5	+	5/8	Azalia
-	6/6	غير موجود	6/8	-	4/4	+	5/6	Dryf
-	0/6	غير موجود	0/8	-	6/6	+	6/8	Pola
3/8	14/14	+	6/8	12/12	6/7	+	8/8	San
20/20	1/8	+	4/7	27/30	9/9	+	7/7	Sokola
25/25	8/8	+	8/8	10/10	6/6	+	6/8	Tarpan
2/6	4/4	+	5/8	15/15	5/5	+	8/8	Uran

يمثل الكسر عدد النباتات الموجود فيها الفيرويد على عدد النباتات المختبرة + تعني الفيرويد موجود. (-) لم تختبر.

تأثير المسبب على التكاثر الجنسي والانتقال خلال البذور الحقيقية في البطاطس:

لقد تبين أن إصابة نباتات البطاطس بالفيرويد PSTVd يؤثر على التكاثر الجنسي في النباتات. إن الزيادة المطلقة أو النقصان المطلق في هذه العملية يعتمد على

الجينوتايب وعلى وضع الإصابة في الأبوين المستعملين في الزراعة. وبشكل عام فإن أصناف البطاطس المستعملة والمصابة بالفيرويد عند عمل تلقيح بينهما وهما مصابان هذا يؤدي إلى زيادة معنوية في عقد الثمار، زيادة وزن البذور وزيادة في إنبات البذور. عندما يكون الأب (الملقح) مصاب فإن عدد الثمار العاقدة يشابة الكنترول أو أقل وكان هناك زيادة في عدد البذور في كل ثمرة. إن هذه الحقيقة التي ذكرت بزيادة عقد الثمار وإنبات البذور التي تحدث، تفسر بأن هناك ميكانيكية للفيرويد PSTVd في البقاء الدائم في الطبيعة والذي يتناقض مع إصابات الفيروس للنبات حيث أن هذ العمليات تنخفض بشكل واضح في نباتات العائل.

يبدو أن فيرويد الدرنة المغزلية في البطاطس يتكيف بشكل كبير جداً للبقاء الدائم والإنتشار خلال البذور الحقيقية في البطاطس، زيادة على ذلك فإن العلاقة الضعيفة بين ظهور الأعراض على البادرات والمقدرة على الكشف عن الفيرويد جعل اكتشاف البذور الملوثة من الصعوبة بمكان. إن إختبارات البذور الحقيقية في البطاطس أظهرت أن إنتقال الفيرويد خلال البذور يكون نسبة ١٠٠٪ بعد أن تكون هذه البذور قد حفظت على درجة حرارة ٤م لمدة ١٢ سنة. أما تأثير الفيرويد على عدد البذور فقد وجد أنه إذا كانت الأم سليمة والأب مصاب يكون هناك خفض في عدد البذور بنسبة ٤٦٪ أما إذا كانت الأم مصابة والأب سليم فيحدث زيادة في عدد البذور بنسبة ٦٦٪. أما إذا كانت الأم مصابة والأب مصاب يحدث خفض في عدد البذور بنسبة ٦٢٪.

أما بالنسبة لوزن البذور فإذا كانت الأم سليمة والأب مصاب ينخفض وزن البذور بنسبة ٥٠٪ أما إذا كانت الأم مصابة والأب سليم يزيد وزن البذور بنسبة ٢٦٪. وعندما تكون الأم مصابة والأب مصاب ينخفض وزن البذور بنسبة ٢٥,٠٪.

لقد تم اكتشاف فيرويد PSTVd في حبوب اللقاح في كثير من أصناف البطاطس المزروعة وذلك باستعمال طريقة PAGE - R. إن تلقيح ازهار النباتات السليمة بحبوب لقاح حاملة للفيرويد أدى إلى إصابة الأوراق الموجودة في قاعدة



النورة، الأوراق القمية والدرنات. وإجراء التحليل في ثمار البطاطس (الثمار الحقيقية) تبين أن هناك إصابات متفرقة في كل من السبلات، جلد الثمرة ولب الدرنة. أما البذور المأخوذة من كل ثمرة كانت ٣٥ - ٦٦٪ مصابة بالفيرويد وإن نسبة الإصابة في البذور لم تختلف باختلاف الصنف ولم تتأثر بموقع النورة أو بعدد الثمار المتكونة في نفس النورة.

### سلالات الفيرويد:

إن لفيرويد الدرنة المغزلية في البطاطس سلالتين، إحداهما شديدة Severe والأخرى معتدلة Mild. تختلف السلالة المعتدلة عن السلالة الشديدة في ثلاثة نيوكليوتيدات متغيرة فقط. توجد السلالة المعتدلة في الطبيعة عشرة أضعاف وجود السلالة الشديدة. إن تحديد وجود السلالة المعتدلة يتطلب حقن أولى في نباتات الطماطم بالسلالة المجهولة، يتبع ذلك الحقن بالسلالة الشديدة. إن غياب تكشف الأعراض في النباتات المحقونة يعتبر دليلاً على وجود السلالة المعتدلة. هذا الإجراء بطيء ويحتاج حوالي ٥ - ٧ أسابيع ويتطلب تنمية نباتات الطماطم على درجات حرارة عالية وتوفر سلالة شديدة لاستعمالها في الحقن.

إن طريقة Polyacrylamide gel electrophoresis استعملت على نطاق واسع لتعريف وتحديد وجود جزيئات الفيرويد في مستخلص الحمض النووي من النبات، إلا أن طريقة R - PAGE وهي Return polyacrylamide gel electrophoresis استحدثت لوصف الفيروسات والفيرويدات ذات RNA الدائري. إن هذه الطريقة تستطيع أن تكشف عن فيرويد PSTVd في عينة تحتوي ٨٠٠ بيكوغرام (البيكوغرام يساوي واحد من مليون مليون غرام) من الفيرويد.

لقد أمكن عزل السلالتين عن بعضهما البعض بطريقة R - PAGE، حيث أن الحمض RNA الفيريويدي يهاجر أو ينتقل أكثر ببطءاً من الأحماض النووية الأخرى في المستخلص. إن حركة حزم الفيرويد من العينات المحتوية السلالة الشديدة تكون

٣ - ٤ ملم أبطء فى الاتجاه المنعكس Return direction من تلك المحتوية على سلالات معتدلة. إن التحضيرات الممزوجة من السلالة الشديدة والسلالة المعتدلة المختلفة تنفصل إلى حزمتين محدودتين جيداً والتي توضح الهجرة المختلفة بين السلالة الشديدة والسلالة المعتدلة. إن الأصل المأخوذ منه المستخلص من الأعضاء المختلفة (درنات، براعم، مدادات وأوراق) أو أنواع النباتات المختلفة (طماطم، بطاطس) *Scopolia sinensis* لا يؤثر على سلوك الهجرة فى سلالات الفيرويد. إن هذه الطريقة مؤكدة تماماً مع أكثر من عزلة شديدة وتكون قادرة على عزل وتحديد العزلة المعتدلة من العزلات الشديدة للفيرويد خلال بضع ساعات إذا ما قورنت مع الطرق الأخرى التى تحتاج إلى أسابيع. فى هذه الطريقة تعرض جزيئات الفيرويد إلى ظروف دنتره وهذا يؤدي إلى الحصول على فصل عن طريق بطء الحركة لجزيئات الفيرويد.

#### اكتشاف السلالة المعتدلة فى بذرة حقيقية واحدة للبطاطس:

إن البذور الحقيقية للبطاطس قد استعملت على نطاق واسع وأصبح عليها طلب كبير فى زراعات البطاطس فى البلاد النامية وذلك بسبب سهولة إنتقالها وتخزينها وخلوها من الكائنات الممرضة التى تصيب البطاطس مع استثناء بعض الفيروسات وفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس. إن البذور الحقيقية للبطاطس قد إستعملت فى الصين منذ سنة ١٩٧٢.

ينتقل فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس بكفاءة عالية عن طريق البذور فى كثير من العوائل النباتية من ضمنها *Solanum tuberosum*. إذا ما تصادف وجود هذا الفيرويد فى بذرة حقيقية واحدة للبطاطس أو فى إنبوبة اللقاح أو الأجزاء النباتية أثناء عمليات التربية، عندئذ فإن تبادل البذور الحقيقية للبطاطس بين منتجى وزراع البطاطس فى الأقطار المختلفة يتطلب سرعة الكشف عن وجود هذا الفيرويد فى البذرة. إن بادرات البطاطس الناتجة من زراعة بذور حقيقية للبطاطس والمعروف أنها مصابة ١٠٠٪ بالفيرويد لا يظهر عليها كلها أعراض الإصابة بالفيرويد. فى بعض

الحالات فإن هذا الفيرويد يمكن أن يكتشف فقط في النباتات ذات عمر ٢ - ٣ أسابيع والنامية من بذور حقيقية مصابة وإذا كانت النباتات ذات عمر أكبر من ذلك فإنه يصعب اكتشاف الفيرويد فيها وبالتالي فإن تشخيص الفيرويد المبني على الأعراض لوحدها يكون صعب.

إن كشف الفيرويد في بذرة حقيقية مفردة للبطاطس كان في السابق يتطلب الحصول على مستخلص الفيرويد من البذرة ثم يحقن هذا المستخلص في نباتات طماطم *L. esculentum*. يتبع ذلك استعمال طريقة PAGE. إن هذه الطريقة تستعمل عدد محدود من العينات وتحتاج إلى وقت طويل. أما طريقة تهجين الحمض النووي تستطيع أن تكشف الفيرويد في بذرة مفردة من بين ١٦ بذرة أو تستطيع أن تكتشف الفيرويد من عينة تحتوي بذرة مصابة من بين ٨٠ بذرة سليمة.

أما طريقة R - PAGE فقد أجرى عليها بعض التحويرات للتمييز بين السلالة الشديدة والمعتدلة الموجودة في بذرة حقيقية في البطاطس. ونظراً لأن كمية البذور المتحصل عليها من الحقول المزروعة بالبطاطس والمصابة بالفيرويد تختلف في نسبة الإصابة فقد أمكن اكتشاف الفيرويد في بذرة مفردة ساكنة أو بذرة مفردة قد نمت. وتبين أن البذرة المفردة الساكنة تحتوي ٠,٨ - ١٠ نانوغرام من RNA الفيرويدي في البذرة الواحدة. وقد أمكن بطريقة R - PAGE اكتشاف الفيرويد في مستخلص بذرة مفردة مخفف ١ : ١٦ يعني حوالي ٥٠٠ بيكوغرام.

إن البذور المنتبة والبذور الحقيقية للبطاطس النامية في المعمل على درجة ١٩م أظهرت معدلات متشابهة في نقل الفيرويد عن طريق البذور. لم يكن هناك تغير في اكتشاف الفيرويد في البادرات النامية من بذرة حقيقية مفردة نامية لمدة ٤ - ١٠ أسابيع. في العينات المختلطة من بذور حقيقية سليمة وأخرى مصابة بالفيرويد فقد أمكن اكتشاف الفيرويد في بذرة واحدة من بين ٩٠ - ١٠٠ بذرة سليمة. إن استعمال طريقة R - PAGE هي قريبة الشبه في النتائج المتحصل عليها من طريقة تهجين الحمض النووي.

## المدى العائلي:

إن أمراض النبات المتسببة عن فيروسات من الممكن أن تقاوم عن طريق ادخال أصناف مقاومة للمرض، هذه الفكرة أدت إلى إجراء أبحاث كثيرة عن مدى قابلية أو مقاومة الأصناف المختلفة من البطاطس للإصابة بالمرض. لقد أجريت إختبارات على ٨١ نوع من البطاطس لمعرفة تفاعلها مع الفيرويد فوجد أن الخمسة أنواع المذكورة فيما يلي هي مقاومة للمرض:-

1 - *Solanum guerreroense*

2 - *S. hjertingii*

3 - *S. multidissectum*

4 - *S. acaule*

بعض الطرز فقط

5 - *S. berthaultii*

كذلك فإنه لم يوجد أي صنف منيع Immune ضد الإصابة بفيرويد الدرنة المغزلية في البطاطس وباستثناء الأنواع المذكورة فإن جميع الأصناف تظهر أعراض الإصابة بالمرض. هناك ٣٨ نوع من البطاطس تصاب بالفيرويد ولكنها تكون Symptomless. كذلك يوجد بعض الطرز تكون مقاومة للفيرويد عندما يجرى لها حقن بواسطة العصارة ولكنها تصبح قابلة للإصابة إذا حقنت بالتطعيم. لا يوجد أي صنف تابع للنوع *Solanum tuberosum* ذو مقاومة عالية للمرض. يصيب الفيرويد معظم أنواع العائلية الباذنجانية، أما العائل المشخص له فهو نبات الطماطم *Lycopersicon esculantum* Rutgers.

## تنشيط الفيرويد:

عند أخذ أجزاء النبات المصابة بفيرويد الدرنة المغزلية في البطاطس PSTVd وكذلك أنسجة الدرنة المصابة وتعريضها مرات متكررة للتجميد والإذابة تحت

ظروف متحكم بها (-١٨م إلى -٢٠م) ثم ٥م فإن الفيرويد يفقد من هذه الأنسجة ووجد أنه يختفى بسرعة أكثر في نسيج الدرنة منه في العروش. إن درنات ١٧ صنف بطاطس أظهرت نفس النتيجة ولكن بشئ من الاختلاف. في ٧ أصناف من بين ١٧ صنف فإن الفيرويد إنخفض وجوده بشكل معنوى بعد المعاملة بالتجميد والإذابة مرة واحدة. في ٦ أصناف من بين ١٧ صنف فإن الفيرويد يمكن أن يسترجع حيويته ويسبب أمراض ثانية بالرغم من تعرضه للتجميد والإذابة. أما عند تعريض درنات البطاطس المصابة بالفيرويد إلى درجة حرارة من ١٣,١م إلى -١٥,١م هذا يؤدي إلى التخلص التام من الفيرويد في الدرناات.

إن فيرويد PSTVd مقاوم لدرجات الحرارة المرتفعة والمنخفضة وتغيرات pH البيئة. درجة الحرارة المثبتة للفيرويد في العصارة تقع ما بين ٧٥ - ٨٠م أما في تخضيرات الفيرويد تكون ٩٩ - ١٠٠م. درجة التخفيف القصى ٥ × ١٠<sup>-٤</sup> ملغ / ملتر. إن حيوية العصارة في نباتات الطماطم المصابة بالفيرويد يمكن أن يحتفظ بها لمدة أربعة أيام على درجة ٢٠م و ١٠ أيام على درجة حرارة ٤م. أما عصارة نباتات البطاطس تدوم لمدة ٣، ١٠ أيام بالترتيب بالنسبة للطماطم. أما الفيرويد نفسه RNA فيبقى محتفظ بحيويته لمدة ٤٠ - ٤٥ يوم على ٢٠م ولمدة ٥٠ - ٦٠ يوم على ٤م. عند تخزين الأجزاء النباتية المصابة بالفيرويد وكذلك تخضيرات RNA لمدة طويلة على (-٢٠م) فلا يبقى الفيرويد حياً في النبات.

وجد أن أفضل تركيز للفيرويد في نباتات الطماطم يكون عند نموها على درجة حرارة ٣١م ويكون التركيز أقل عند نموها على درجة حرارة ٢٣م وعلى شدة إضاءة مختلفة. إن تقصير فترة الإضاءة لمدة ١٧ - ١٨ ساعة يومياً لا تؤثر على بناء الفيرويدات في النبات، أما على ٣١م فإن الأعراض التي تكون شديدة إذا تعرضت لإضاءة منخفضة تنخفض شدة الأعراض هذه وتتأخر في الظهور ثانية. أما على درجة ٢٣م فإن الأعراض تتأخر أسبوعين إذا كانت الإضاءة منخفضة أو مرتفعة. لاتظهر الأعراض إذا وصلت درجة الحرارة ١٥م في الليل. إن الأعراض التي تكون

على شكل نكروز في الأوراق تظهر بشكل واضح في درجات الحرارة المتوسطة أكثر منه عندما تكون درجات الحرارة عالية هذا يشابه الإصابة الفيروسية.

يمكن تثبيط الإصابة بالفيرويد PSTVd عن طريق استعمال-DNA Oligonu cleotide. لقد أمكن إجراء تهجين بين مجموعة نيوكليوتيدات قصيرة وفيرويد PSTVd في مخلوط معدى. عندئذ تثبتت إصابة الفيرويد بنسبة ٧٥٪. عندما تكون مجموعة النيوكليوتيدات القصيرة مكاملة للنيوكليوتيدات ٧٩ - ١١٠ من الفيرويد. وإن التثبيط الكلى للإصابة الفيرويدية لوحظت عند استعمال مجموعة نيوكليوتيدات قصيرة مكاملة للنيوكليوتيدات ٤٢ - ٢٨ في نفس المولر زيادة من DNA فوق PSTVd، مع أن ٢٠٠ ضعف مولر زيادة كانت كافية للتثبيط الكامل للإصابة بالفيرويد PSTVd.

إن مجموعة النيوكليوتيدات القصيرة هذه تخفض الإصابة بالفيرويدات بنسبة ٨٣٪ عندما يتم التهجين على درجة حرارة ٣٠م. أما مجموعة النيوكليوتيدات القصيرة المحتوية ٢٢ و ١٥ قاعدة متوافقة مع مراكز ٤٢ - ٦٢ و ٦٣ - ٧٨ تظهر تأثير معنوى في خفض الإصابة على درجات الحرارة المرتفعة جداً.

كما وأن DNA مضاد المعنى المكمل للنطاق الخاص بالمرضية (نيوكليوتيدات ٤٢ - ٧٨) في الخيط العلوى من الفيرويد PSTVd يثبط حيوية الفيرويد عندما يحصل لها تهجين في المعمل لعمل معقد DNA / RNA هذا التثبيط لوحظ في النباتات السليمة وفي بروتوبلاست النبات.

## ٢ - فيروسات الحمضيات

### Citrus Viroids

#### أ - وصف وتصنيف (تقسيم) فيروسات الحمضيات

##### مقدمة:

إن أهمية حدوث الأمراض الفيروية في الحمضيات قد تم تحديدها منذ تعريف فيروس إكسوكورتز الحمضيات كنوع ممثل لهذه المجموعة التي هي عبارة عن حمض نووي RNA ممرض. وحتى سنة ١٩٨٥ بقى فيروس إكسوكورتز الحمضيات CEVd هو الفيرويد الوحيد المعروف جيداً والمعروف أنه يؤثر على الحمضيات. كذلك فإن أبحاثاً كثيرة قد ذكرت بأن هناك مرض يصيب الحمضيات اسمه مرض ككسيا Cachexia وذلك سنة ١٩٨٣، إلا أن هذا المرض كان معروفاً منذ سنة ١٩٢٥ واعتبر أنه مرض فيروسي ثم أثبتت الأبحاث بعد ذلك بأنه مرض فيرويدي. وكان يسمى في السابق مرض زيلوبوروسس Xyloporosis وينتشر في منطقة حوض البحر الأبيض المتوسط.

ظهرت بعد ذلك تقارير حديثة تفيد بأن هناك فيروس مميز عن كلا الفيرويين السابقين ولكنه يحدث أعراض مرض إكسوكورتز متوسطة إلى شديدة على الأترج أو السترون *Citrus medica* وبالتالي سمي *Citron Variable viroid* ويرمز له (CVaVd) وذلك منذ سنة ١٩٨٥. ثم بعد ذلك تم تعريف أعداداً أخرى من الفيرويدات التي تصيب الحمضيات، بعضها وصف على أنه سلالة بسيطة من CEVd والبعض الآخر حدد على أنه فيروس منفصل.

بعد الدراسات المستمرة على فيرويدات الحمضيات ثبت بأنها مجموعة كبيرة من الفيرويدات أكثر منها في أى مجموعة نباتية أخرى. ولقد قدر عدد هذه الفيرويدات حوالي ١٢ فيرويد وهي مقسمة إلى خمسة مجموعات وذلك اعتماداً على حجم الجزيء، تماثل تتابع النيوكليوتيدات وتفاعل العائل. إن التقدم في تعريف هذا العدد الكبير من فيرويدات الحمضيات قد تم نتيجة معرفة عائل مشخص جديد وهو الاترج *Citron medica* حيث أن هذا العائل عنده المقدرة بأن يكون عائل عام لجميع فيرويدات الحمضيات. إن البادرات الحساسة لطراز من السترون (الاترج) وهو نوع Arizona 861 - S1 قد عمل كحاوية أولية لفهرسة مرض الاكسوكورتز وذلك لمدة عشرة سنوات منذ سنة ١٩٧٧. هذا الطراز من الاترج يكون أيضاً عائل بدون أعراض Symptomless لفيرويد ككسيا في الحمضيات.

إن الأبحاث القديمة التي كانت تجرى على مرض اكسوكورتز الحمضيات كانت تذكر أعراض المرض بأنها تشوهات في قلف الشجرة وإنفصاله عن الساق وتشققه، هذه الأعراض تظهر على الأصل، ويظهر تقزم ملحوظ في الأشجار النامية على برتقال ثلاثى الأوراق *Poncirus trifoliata* وأصول ليمون (*Citrus limo-* *Rangpru*) . وهكذا فإن الاختلافات في درجة التقزم وتكون القشور ووقت ظهور هذه الأعراض التي كانت تذكرها الأبحاث القديمة أدت إلى القول بأن هناك سلالات مختلفة من مسبب مرض اكسوكورتز الحمضيات.

إن تطور ظهور الإختبارات الحيوية باستعمال الاترج *Citrus medica* وحساسيته العالية وسرعة تكشف الأعراض عليه أدى إلى التنازل الفعلى عن البرتقال ثلاثى الأوراق ذو النظام الكلاسيكى في فهرسة المرض كما وأن ظهور تنوعات من الأعراض على الاترج تتراوح من تقزم شديد تدلى الأوراق وتجدها ونكروزز والتفاف عنق الورقة بالإضافة إلى نكروزز العرق الوسطى والتلون البنى لقمه نصل الورقة، كلها إعتبرت أدلة مشخصة للإصابة بمرض اكسوكورتز الحمضيات.



الأعراض الحقلية كانت دائماً تصنف على أساس أعراض بسيطة، متوسطة أو شديدة فقط وذلك على أساس تفاعل الاترج. فى معظم الحالات فإن هذا التصنيف لم يتأكد عن طريق حقن البرتقال ثلاثى الأوراق لتثبيت الأعراض الكلاسيكية لمرض اكسوكورتز الحمضيات.

بعد نقل العزلات الشديدة لمسبب المرض إلى عوائل عشبية مثل *Gynura auran-tiaca* فإن العامل المسبب أمكن عزله ووصفه بأنه يتكون من حمض نووى RNA به ٣٧١ نيوكليتيده وسمى فيروس اكسوكورتز الحمضيات-The citrus exo-cortis viroid (CEVd). عند حقن الاترج بتحضيرات نقية من فيروس CEVd المأخوذ من نبات *Gynura* دائماً يظهر عليه أعراض التقزم الشديدة، تدلى الأوراق وتجمدها، هذه الأعراض توصف بها العزلات الشديدة. أما مصادر العدوى التى تسبب تفاعل بسيط أو معتدل مع الاترج لا يمكن أن تنقل إلى نبات *Gynura*.

واعتماداً على نتيجة الأبحاث التى أجراها Schlemmer et al سنة ١٩٨٥ والعالم Duran - Vila et al سنة ١٩٨٦ فإنهم قد ضموا على الأقل ثلاثة فيروسات مميزة تسبب أعراض بسيطة ومتوسطة على الاترج، إلا أنهم قد ذكروا بأن تحليل الأعراض الحقلية كلها بواسطة تتابع طريقة PAGE قد أظهرت بأنها تحتوى من واحد إلى خمسة فيروسات.

أما باستعمال طرق الكشف الأكثر تقدماً فى أبحاث الفيروسات وباستعمال طرق تحليل الكروماتوغرافى السليلوزية CF - II والتهجين الجزيئى لمنقب خاص بفيروس الحمضيات أمكن وصف عدداً من فيروسات الحمضيات من مصادر حقلية ومن مجموعات فيروسية أخرى فى أسبانيا وكاليفورنيا وكانت هذه الفيروسات الموصوفة تحدد اعتماداً على الصفات الفيزيائية والحيوية وقد ذكرت بأنها خمسة مجموعات محددة.

## تطابق فيروسات الحمضيات فى عزلات الاكسوكورتز:

### Identification of Citrus Viroids In Exocortis Isolates

إن نتائج الأبحاث التى قام بها Duran - Vila et al سنة ١٩٨٦ تدل على أن العوامل القابلة للانتقال المرافقة مع مرض اكسوكورتز الحمضيات يمكن أن تضم عائلة من الفيرويدات عدا عن CEVd وأن حجوم هذه الفيرويدات تتراوح من ٢٧٥ - ٣٧١ نيوكليتيده. عندما حضر خليط صناعى من تخضيرات حمض نووى من أترج (سترون) بعزلات منتقاه ثم عرضت للتحليل بطريقة تتابع PAGE، ظهر أن هناك ثمانية فيرويدات على الأقل عدا عن فيرويد CEVd وفيرويد الأترج المتقلب Citron Variable Viroid (CVaVd). ولكى تختبر صفات هذه الفيرويدات، تؤخذ مزارع نقيه من هذه العزلات حيث توجد طبيعياً ويمكن أن تتناسخ فى عوائل عشبية خاصة أو عن طريق electron - elution لشريحة فيرويد مفردة بعد عملية PAGE d. هذه الأحماض النووية للفيرويدات وصفت وحددت باستعمال الطرق الآتية:-

- ١ - يمكن اكتشاف الأشكال الدائرية والمستقيمة بواسطة طريقة PAGE d.
  - ٢ - مقارنة معدلات الهجرة للأشكال الدائرية.
  - ٣ - تحديد إنجذابها فى طريقة CF - 11 سليلوز.
  - ٤ - تقدير تماثل تتابع نيوكليتيدها باستعمال التهجين الجزيئى عن طريق المنقب cDNA للفيرويدات الخاصة.
- بعد إجراء هذه الطرق على الفيرويدات تبين أنها تتكون من خمسة مجموعات. المجموعة الأولى هى مجموعة CEVd أما المجموعة الثانية فهى مجموعة فيرويدات الحمضيات رقم I وتسمى I - CVd وهذه المجموعة تشمل فيرودين الأول 1a والثانى 1b. أما المجموعة الثالثة فهى مجموعة فيرويدات الحمضيات رقم II

وتسمى II - CVd وهي تشمل أيضاً II a ، II b وإن هذا الأخير كان يسمى فيرويد ككسيا للحمضيات Citrus Cachexia Viroid ويرمز له (CCaVd). أما المجموعة الرابعة فهي تشمل أربعة فيرويدات CVd - IIIa ، IIIb ، IIIc ، IIId. أما المجموعة الخامسة فهي تسمى مجموعة الحمضيات رقم IV وتضم فيرويد واحد فقط. وبالتالي يكون هناك عشرة فيرويدات تصيب الحمضيات كما هو ظاهر في جدول رقم ٢٩.

جدول ٢٩: مقارنة بين الصفات الفيزيائية للفيرويدات الحمضيات.

تفاعل التهجين مع متب cDNA				النسبة المئوية للابتائول التي فيها تبدأ الفيرويدات في الضياع		عدد النيوكليوتيدات	الفيرويد	المجموعة
ASBVd	CCaVd	CVd - Ib	CEVd	% ٢٠	% ٢٥			
—	—	-/+	+++	+	—	٣٧١	CEVd	CEVd
—	—	+++	—	+	—	٢٤٠	CVd - Ia	CVd - I
—	—	+++	—	+	—	٣١٨ ، ٣٣٠	CVd - Ib	
—	++++	—	—	—	+	٣٠٢ ، ٣٠٥	CVd - IIa	CVd - II
—	+++	—	—	—	+	٢٩٩ ، ٣٠٠	CVd - IIb	
—	—	—	—	—	+	—	CVd - IIIa	CVd - III
—	—	—	—	+	—	٢٩٠	CVd - IIIb	
—	—	—	—	+	—	٢٨٥	CVd - IIIc	
—	—	—	—	+	—	٢٨٠	CVd - IIId	
—	—	—	+	—	+	٢٧٥	CVd - IV	CVd - IV

ملاحظات على الجدول :-

- ١ - الفيرويد الذي أمامه رقمين عن عدد النيوكليوتيدات بدل الرقم الأول على الأبحاث القديمة والرقم الثاني مأخوذ من الأبحاث الحديثة.
- ٢ - يتم تحديد القواعد اعتماداً على حركة الفيرويدات في ال PAGE .
- ٣ - التفاعل النسي مع cDNA حلد بواسطة Electrolbot hybridization. تبدأ بمعدل (+) إلى أعلى مستوى (++++). معنى على التقدير المنظور لكثافة الشرائح Autoradiograph عند مقارنتها مع تركيز الفيرويد، كما يلاحظ بعد الصبغ بمادة برومايد الإيديم قبل ال electrotransfer.

## تعريف مجموعات فيروسات الحمضيات:

### Definition of Citrus Viroid Groups

#### ١ - مجموعة CEVd:

هذه المجموعة تمثل مجموع الفيرويدات (العزلات، التنوعات، الأشكال) التي تتبع فيروس اكسوكورتز الحمضيات. إن فيروس اكسوكورتز الحمضيات CEVd هو العامل المسبب لمرض اكسوكورتز الحمضيات وهو أكبر فيروسات الحمضيات إنتشاراً وأكثرها دراسة وتحديداً وله تنوعات تتابع ذات نيوكليتيديات تتراوح من ٣٧١ إلى ٣٧٥. وهو أكثر فيروسات الحمضيات سهولة ودراسة وله مدى عوائل واسع أكبر من بقية فيروسات الحمضيات كما هو في جدول ٣٠ وهو يسبب تقزم شديد، تدلى الأوراق ونكروزرز على أشجار الاترج المحقونة به وسوف نتكلم عن المرض بالتفصيل فيما بعد إن شاء الله.

#### حالة شاذة لفيروس CEVd:

هناك تنوع غير عادي لفيروس اكسوكورتز الحمضيات اكتشف سنة ١٩٩٣ من قبل العالم J.S. Semancik ورفقائه وذلك أثناء عملهم على *G. aurantiaca*. وجد هذا الفيروس عندما استعمل مصدر لقاح من *G. aurantiaca* واستعمل لحقن هجين طماطم ناتج من تلقيح الطماطم-*Lycopersicon esculentum X L. peruvia*. وجد أن هذا التنوع يحتوي ٩٢ نيوكليتيديداً إضافية على النيوكليتيديات الأصلية في CEVd. وحيث أن الوضع الطبيعي لفيروس CEVd يحوى ٣٧١ نيوكليتيديداً فيصبح التنوع الجديد به ٤٦٣ نيوكليتيديداً وسمى هذا النوع-CEVd D92 والذي يظهر صفات الشكل المستقيم والدائري للفيروس ويحوى تتابع مكرر مرتين للمسافة بين نطاق V و T<sub>2</sub> وهذا التكرار يساوى ٩٢ نيوكليتيديداً. هذا الفيروس يعطى أعراض بسيطة جداً أقل من الأعراض المعتدلة تظهر على *Gynura*. عند مقارنة هذا الفيروس (مقارنة تتابع وتركيب CEVd - D92) مع فيروس

كادانج - كادانج ظهرت تشابهات في المناطق المولدة للتكرار الطرفي الذي يحدث طبيعياً، مما يؤدي إلى الاقتراح إلى إمكانية تحديد الموقع المفضل لإعادة الاتحاد في RNA بين الفيروسات.

إن الطريقة الصحيحة لتولد CEVd - D92 غير معروفة، وعلى أية حال فإن اللقاح الأصلي هو CEVd تنوع t ويكتب (CEVd t) إختبر بواسطة هجين طماطم. إنه من غير الممكن تقليد أو الحث على إنتاج هذه المجموعة ٩٢ الزيادة في تنوع CEVd. هناك عاملان يبدو أنهما أساسيان في تخليق وإحداث CEVd - D92 هما: ١ - هجين الطماطم الناتج من تلقيح *L. esculentum* مع *L. peruvianum*. ٢ - وجود عزلة CEVd مختارة بواسطة ذلك العائل من بين تجمعات CEVd المنتجة في نبات *Gynura*. إن الطماطم الهجين ليست هي النقطة الأساسية فقط في إشتقاق CEVd - D92 ولكنها ثلاثم تكاثر وتجمع تنوع ال ٤٦٣ نيوكليتيده أكثر منه في آل CEVd.

إن السلالة CEVd - D92 لم تعرف أبداً منذ ما يزيد عن ٢٠ سنة من الأبحاث المستمرة على فيروس CEVd في الجينورا، زيادة على ذلك لم يكن هناك دليل على تناسخ هذه السلالة عندما كان يخلط CEVd و CEVd - D92 كمصدر لقاح في الجينورا. مع ذلك فإنه من الممكن القول بالنقل المنفصل لهذه السلالة في الجينورا عندما يستعمل اللقاح الأولى كمصدر نقى من هذه السلالة. هذا يمكن أن يدل على أن تخليق الزيادة الطرفية في CEVd لا يكون محدوداً أو أنه حادث غير عادي ولكن إلى حد ما فإن هذا التناسخ والتجمع لهذا التنوع يكون معرضاً إلى منافسة غير ملائمة مع CEVd في بعض العوائل.

في عملية إصابة الجينورا بالسلالة CEVd - D92 يظهر تغيرات مرضية بسيطة جداً وتكون على شكل نكروزز يتقاطع مع العرق الوسطى في الورقة، وهذا يمثل أبسط أنواع التفاعل المذكورة لأي عزلة من الفيروس CEVd في الجينورا. إن وجود نفس تتابع النيوكليتيديات كما في CEVd والذي يحدث تفاعل شديد من

الأعراض مع زيادة في العدد الكلى للنيوكليتيديتات يؤكد مرة ثانية أهمية التكوين في تعبيرات النشاط الحيوى فى الفيرويدات. ولكن يبقى السؤال المحير وهو لماذا تحدث أعراض بسيطة من هذه العزلة؟؟.

إن تتابع النيوكليتيديتات فى السلالة CEVd - C تختلف عن السلالة CEVd - A فى أربعة قواعد فقط هى رقم ٢٦٤، ٢٧٨، ٣٠١، ٣١٣. لقد استعملت السلالة C كمرجع لدراسة تتابع العزلة الجديدة CEVd - D92 وذلك نظراً لأن كلا العزلتين مأخوذة من نفس أصل المصدر وتكاثرت فى الجينورا *Gynura*. كما وأن تتابع السلالة الجديدة تشارك سلالة A على مواقع تركيبية متساوية فى ثلاثة نيوكليتيديتات هى أرقام ٢٦٤، ٢٧٨ و ٣٠١ وهى من الأربعة مواقع المميزة للسلالة A عن السلالة C. وبالتالي فإن الاختلافات بين عزلات الفيرويد CEVd تكون أقل حد ممكن.

يجب أن نعطي أهمية لحقيقة أن كلا التتابعين فى سلالة A وسلالة C قد حدد من قبل عشرة سنوات (١٩٨٣) وذلك عن طريق التتابع المباشر للحمض RNA وأن هذه الطريقة وهذا الوقت قد يكون له بعض الأخطاء. وعلى أية حال فإن تتابعات ثلاثة أرباع الطول الكامل لكلونات العزلة الجديدة كانت مثالية وبالتالي تدل على درجة عالية من التماثل فى تجمعات العزلة الجديدة مقوية العلاقة القريبة مع التتابعات المذكورة للسلالة A مع تلك التى فى السلالة C.

بمعاينة المناطق ذات التتابع المتكرر فى العزلة CEVd - D92 يلاحظ أن أربعة نيوكليتيديتات متسلسلة هى AGCU تسبق مباشرة بداية ونهاية التكرار العلوى على نهايات ١٣٢ إلى ١٣٥ و ١٧٩ إلى ١٨٢ بالترتيب، هذه المواقع تدعم النموذج المتوقع حين حدوث تأثيرات فجائية لـ RNA Polymerase فى عمل نسخ متقطع، كما قد إقترح عند حدوث التكرار الطرفى الموجود فى فيرويد CCCVd. إن أهمية هذه النيوكليتيديتات الأربعة فى العروة النهائية من نطاق T<sub>2</sub> قد ظهرت عند فقد الحيوية للفيرويد بعد إزالتها من التتابع، وبالتالي فإن التعبيرات البيولوجية

لفيروسيد CEVd يمكن أن تستبدل بشدة بواسطة إما غياب أو تكرار هذه الأربعة قواعد وهذا يبنى إقتراحاً عن أهمية القواعد في تجهيز الحمض RNA.

إن التابع المتكرر في CEVd - D92 يبدأ تقريباً على حد اليد اليمنى بالضبط من منطقة Pr ضمن نطاق V وهو موقع هام يتدخل في إعادة تنظيم RNA بين الفيروسيدات، وبالتالي فإن المرضية يمكن أن تتغير بشكل مثير في غياب التتابعات الأساسية في نطاق P أو التغيير العال في منطقة Pr من نطاق V.

إن تحريك أو تعبئة نطاق T تفهم ضمناً من دراسة تماثل التابع الفيرويد وصفات الفيرويد المتوقع. إن إتحاف تكرار T<sub>2</sub> في فيرويد CCCVd وكذلك كما حدث في CEVd من تضاعف يمكن أن يهدف إلى مواقع التجهيز المشجع في تغييرات RNA في نطاقات T بين الفيروسيدات وبالتالي يمكن أن تكون مهمة في إعادة الاتحاد والتطور في جزئ الفيرويد.

قياساً على ظهور السلالة الجديدة D92 لفيرويد اكسوكورنز الحمضيات فإن التابع المتكرر المشابه في نطاقات V و T<sub>2</sub> في الفيرويد CCCVd يجب أن لا ينظر إليه الآن وكأنه ظاهرة غريبة. إن التطابق الموجود بين التركيبين يؤدي إلى القول بأن حوادث مماثلة في تجهيز الفيرويد يمكن أن تحدث في المستقبل في التنوعات الكبيرة. كذلك فإنه عند مقارنة CCCVd والسلالة الجديدة CEVd - D92 يظهر أن هناك مواقع خاصة ظاهرة ذات أهمية والتي يمكن أن تكون هامة جداً في تجهيز RNA أو تعكس بسهولة أية مناطق يمكن أن يظهر فيها ارتباك في التركيب.

## ٢ - مجموعة 1 - CVd :

وجد أنه بعد تحليل عزلات الاكسوكورنز في كل من إسبانيا وكاليفورنيا تبين وجود فيرويد CVd - 1a بنفس electrophoretic mobility (كما في

الفيرويد RNA - 1 الذى ذكر فى أبحاث سابقة وأنه مسبب مرض للحمضيات) فى سبعة عزلات من بين ٣٧ عزلة مختبرة. عندما عرضت العزلات المختارة إلى Co electrophoresis - كمخلوط صناعى تحت ظروف دنتره، لم يلاحظ إختلافات فى معدل الهجرة فى عزلة CVd - 1a المأخوذة من مصادر مختلفة. وعلى النقيض من التفاعل الشديد المحدث بواسطة CEVd فى الأترج (السترون) وحيث أن أشجار السترون المحقونة بالفيرويد CVd - 1a نقى قد أظهرت التواء ملحوظ فى نصل الورقة وذلك كاستجابة للمواقع التى فيها نكروزز فى العرق الوسطى للورقة على السطح السفلى، على ١ - ٣ رقات فقط من النباتات المحقونة.

إن التركيب الأساسى لمكونات عزلة فيرويد CVaVd (فيرويد السترون المتقلب وهو Citron Variable Viroid) عند إجراء تحليل لها وجد أنها تهاجر بسرعة أكثر قليلاً من CVd - 1a وبالتالي عرفت على أنها CVd - 1b. هذه العلاقة المفهومة ضمناً مبنية على الحجم الذى حصل عليه بالاعتماد على معدلات متشابهة من الازالة لـ CVd - 1a و CVd - 1b من سيليلوز CG 11 وإن كلا الفيرويديين له مدى عائلى مقتصر على الأترج (السترون) كما فى جدول ٣٠.

إن تماثل تتابع النيوكليوتيدات بين CVd - 1a و CVd - 1b يقدر بواسطة التهجين الجزيئى بمنقب cDNA CVd - 1b. عند مقارنة عينات من الحمض النووى مأخوذ من الأترج المحقون بعزلتين من CVd - 1a وعينة نقية من CVd - 1b (استعملت العزلة CVaVd لتنقية CVd - 1b) أجرى لهما electrotransferred مباشرة من الجيل محتوياً ٨ مول يوريا وهجنت مع Randomly Primed P<sup>32</sup> la- فتبين أن العزلتين هما فيرويديين منفصلين CVd - 1a و CVd - 1b.



جدول ٣٠: إنتقال وكثافة الأعراض لفيرويدات الحمضيات في كواشف خاصة بالفيرويد.

الأعراض في النباتات الكاشفة				الفيرويد	المجموعة
الانترج	الخيار	الاقحوان	جانيورا		
++++	++++	+	++++	CEVd	CEVd
-	-	-	++	CVd - 1a	CVd - I
--	-	-	++	CVd - 1b	
-	++	+++	+	CVd - IIa	CVd - II
-	++	+++	+	CVd - 1Ib	
-	-	-	+++	CVd - 1IIa	CVd - III
-	-	-	+++	CVd - 1IIb	
-	-	-	+++	CVd - 1IIc	
-	-	-	+++	CVd - 1IIId	
-	-	+	+++	CVd - 1V	CVd - IV

ملاحظات:

++++ = شديد، +++ = متوسط، ++ = بسيط، + = حامل بدون أعراض  
 (بتكاثر الفيرويد) - = بدون أعراض ولكن لا يتكاثر الفيرويد في النبات.

في دراسة اجراها Lilach Ashulin وزملائه في مركز أبحاث بيت دجن في اسرائيل سنة ١٩٩١ ذكر فيها أن الفيرويد CVd - 1b هو فيرويد منفصل عن مجموعة فيرويدات الحمضيات. ولقد وجدوا أن هذا الفيرويد يسبب تقزم أشجار الكريب فروت Grapefruit في اسرائيل ويسبب إنحناء أوراق الحمضيات وسمى Citrus bent leaf Viroid ويرمز له (CBLVd) ولقد عزل ونقى من اوراق

الافوكادو وبعد إتباع جميع طرق العزل والتتابع لهذا الفيرويد وجد أنه يتكون من ٣١٨ نيوكليتيده (كان قد ذكر سابقاً أنه يتكون من ٣٣٠ نيوكليتيده) وقد ذكروا أن هذه النيوكليتيديات فى خط مستقيم كما فى شكل ٤٠ ووجد أن به 7.٦٦ أزواج قواعد وقد صنفوا هذا الفيرويد مع تحت مجموعة ASSVd وذلك إعتماًداً على مميزات المنطقة المركزية المحفوظة. فى حين أن جزء من منطقة النطاق P ومنطقة النهاية اليسرى تشبه فيرويد CEVd، وبالتالي ذكروا أن هذا الفيرويد هو أول فيرويد من تحت مجموعة ASSVd يصيب نباتات الحمضيات.

### نقل فيرويد Cvd - 1b إلى الأفوكادو:

لقد تم نقل الفيرويد Cvd - 1b إلى الافوكادو بواسطة التطعيم غير المتوافق، حيث نقل هذا الفيرويد من *Citrus macrophlla* بالتطعيم إلى بادرات الافوكادو *Persea americana*. ولقد وجد أن النقل المستمر لهذا الفيرويد بالتطعيم غير المتوافق له مدى عائلى محدود فى بضعة طرز من الافوكادو. إن المستخلص المأخوذ من افوكادو مصاب بالفيرويد Cvd - 1b كان فعال على السترون (الأترج) وأحداث إلتواء فى الأوراق وتشوه الثمرة. كان أول تقرير عن إنتقال هذا الفيرويد إلى عائل غير الحمضيات بواسطة Rivka et al سنة ١٩٩٢ فى اسرائيل. إن مستخلصات الحمض النوى والنسيج المطعوم من أفوكادو نوع WI المصاب بالفيرويد Cvd - 1b كانت فعالة على الأترج. إن هذا الفيرويد أمكن اكتشافه فقط بواسطة طريقة تحليل sPAGE فى نباتات الأترج والتي حققت ميكانيكياً أو طعمت بنسيج مأخوذ من أفوكادو مصاب بالفيرويد Cvd - 1b. هذا يؤدى إلى القول بأن نباتات الأفوكادو لم تصبح شاذة أو أقل من أن تصاب بالفيرويدات الأخرى (عدا عن الفيرويد الخاص بها) الموجودة فى *C. macrophylla*. إن نباتات الأفوكادو المحقونة بعزلة تسمى GTD 225 - S (عزلة تحمل عوامل التقزم القابلة للانتقال بالتطعيم) وهى تابعة للفيرويد Cvd - 1b فوجد أن تركيز الفيرويد فى أوراق الأفوكادو خمسة إلى عشرة أضعافه فى الأترج، هذا يجعل الأفوكادو مصدر جيد لدراسة الصفات الأخرى لهذا الفيرويد. ولقد وجد أن تشوه ثمار الأترج يمكن أيضاً أن يفسر كنتيجة للإصابة بهذا الفيرويد Cvd - 1b.

شكل رقم ٤٠ :

يبين تتابع النيوكليوتيدات في الفيرويد CVD-1b وكذلك ترتيب النيوكليوتيدات من ١-٣١٨

1 CGGAGACUUC UUGUGGUUCC UGUGUGACA CCCCUCAGC CCUACCUGCC 50  
 51 AAAGAAAAA GUGUAGAAG GGGCAGAGG AGCUGACUGG UCGUGUCGGA 100  
 101 CGAAGGCUGG UCACGUCGG AGGUUGGGU CGACUGGCUU CCGUGGCGAA 150  
 151 GUUGAGCUCU GCUCUCUAA GCUGAACGG ACCGGUCCC UUCACCCGAG 200  
 201 CGCUGCUHCC GCGUAGUCGA GGGAGUICC AAGUCUCCU CCGAGCCGC 250  
 251 UUUUCUUUC UACCUAAUU CCGUAGCAGC GGGGAGGGG UGAAGCCCCU 300  
 301 GAACCCCUCA GGGCUCCU 318

CCR



إن التطعيم غير المتوافق بين عوائل غير متوافقة قد ذكر سابقاً بأنه يستعمل لنقل الفيرويدات لنباتات كاشفة. واعتماداً على ذلك يمكن أن تمتد عوائل الفيرويد إلى محاصيل نباتية مهمة إقتصادياً، ويمكن أن تزداد أهميته الاقتصادية ونحصل على فوائد علمية من حيث استعمال إختبارات النقل بالتطعيم غير المتوافق للبحث عن المدى العائلي للفيرويدات المعروفة على الأشجار المثمرة والمهمة إقتصادياً.

### ٣ - مجموعة II - CVd :

كما ذكرنا سابقاً فإن العالم Duran - Vila et al سنة ١٩٨٦ قد ذكروا بأن هناك مجموعة فيرويدية سموها RNA - II تكون مرافقة مع مصادر مختلفة من الفيرويدات. لقد وجد أن هذه المجموعة يمكن اكتشافها بتركيزات منخفضة جداً في جميع مصادر الفيرويدات التي درست بالإضافة إلى حاملي الفيرويد بدون أعراض والتي من المحتمل أن تكون أشجار أترج سليمة.

عند تحليل أوراق نبات الأترج الذي يظهر عليه أعراض بسيطة تتمثل في ظهور لون بني خفيف في قمة نصل الورقة وتتكشف فقط في النباتات النامية تحت ظروف تغذية وحرارة مثلى، توحى بوجود فيرويد حمضيات CVd - Iia وهذا اكتشف بنفس الحركة في أل electrophoretic كما في RNA - II المذكور سابقاً. إن عمليات الاستبعاد باستعمال ٢ مول كلوريد الليثيوم واستبعاد الأحماض النووية باستعمال CF - 11 سيليلوز أظهرت أن CVd - Iia قد غسل على ٢٥٪ إيثانول STE. وبالتالي فإن الغسيل المستمر بمادة 30% ethanol - STE والاستبعاد بـ ٢٥٪ إيثانول STE سمح باكتشاف تخضيرات غنية بالفيرويد. بتحليل العينات التي أجري لها electro - eluted بواسطة طريقة Sequential gel electrophoresis أظهرت وجود فيرويدات تتصف بالشكل الدائري والمستقيم.

عندما حقن أترج إريزونا نوع S1 - 861 بفيرويد نقي من CVd - Iia حتى في أنواع الأترج التي تكون غالباً غير مظهرة للأعراض، فقد أمكن إسترجاع الفيرويد

ثانية من النباتات المحقونة بعد ٣ شهور. كذلك أمكن ملاحظة تلون بنى بسيط جداً على قمة نصل الورقة عندما حضنت النباتات تحت ظروف مثلى من الحرارة وطول النهار. هذا العرض كان قد صنّف على أنه أبسط أشكال مرض الاكسوكورتز عندما يتفاعل في الأترج. عندما حقن CVd - Iia فى نباتات الخيار فإنه أظهر تقزم شديد وتدلى الورقة والتفافها ولون أخضر داكن مغطى الورقة غير ظاهر فى النباتات غير المحقونة. أمكن استرجاع الفيروس ثانية من نباتات الخيار المصابة بعد ثلاثة أسابيع من الحقن.

فى التقرير الأصلى الذى ذكره Duran - Vila et al سنة ١٩٨٦ أنه حسب طبيعة الفيروس المذكور فى RNA II لا يمكن أن يظهر بوضوح وأن إمكانية إحتواء العائل للفيروس قدرت مبدئياً. وعلى أية حال عندما أخذت تحضيرات حمض نووى من بادرات أترج إريزونا 861، كانت متشابهة تحليلياً ولم يلاحظ أية شرائح لـ RNA فيروسى. كذلك لم يمكن اكتشاف أحماض نووية RNAs فيروسية بواسطة التحليل بطريقة PAGE فى تحضيرات من كلونات مختلفة تكاثرية لأترج أريزونا SI - 861.

إن المعلومات المتوفرة عن صفات الربط المختلفة للفيروسيدات إلى السيليلوز والنتائج الملاحظة فى تجارب Duran - Vila et al سنة ١٩٨٨ توضح التقارير التى تذكر غياب RNA II فى تحضيرات الفيروس نظراً لأن السيليلوز قد غسل بشدة بمادة 25% ethanol - STE وبالتالي ازالة CVd - Iia من تحضيرات الفيروس، وبذلك فإن إفتراض أن RNA II هو فيروس للعائل يجب أن يلغى وأن الاسم CVd - Iia يجب أن يستعمل لما كان يسمى سابقاً RNA II.

إن إعادة التحليل لعزلة CVaVd الذى قد وصف أصلاً بواسطة Schlemmer et al سنة ١٩٨٥ قد أظهر وجود فيروس آخر هو (CVd - Iib) وهو ذو حركة electrophoretic مشابهة جداً إلى (لكن يختلف عن) CVd - Iia. باستمرار الأبحاث وجد أن CVd - Iib الذى هو فيروس ككسيا (CCaVd) هو العامل المسبب

مرض ككسيا Cachexia فى الحمضيات هذا ما أكد عليه Semanik et al سنة ١٩٨٨ وكذلك Duran - Vila سنة ١٩٨٨ ، وبالتالى أمكن القول بأن هناك فيرويديين الأول Iia وآخر مشابه جداً له هو Iib .

عند حقن نباتات الأترج بعينات من فيرويد CCaVd = CVd - Iib ويحضر تحت مدى متطرف من الظروف لا تظهر أى أعراض ولكن الفيرويد يمكن استرجاعه دائماً من النباتات المحقونة وغير مظهرة للأعراض خلال ٣ شهور بعد الحقن . كان أول استبعاد للفيرويد CCaVd الذى هو CVd - Iib من ايثانول-CF 25% cellu lose 11 جدول ٢٩ وأظهر أعراض نموذجية لتلك المتسببة عن CVd Iia - على نباتات الخيار المحقونة . نتائج التهجين الجزيئى باستعمال منقب cDNA إلى CVd - Iib أكد بأن CVd - Iia و CVd - Iib فيرويدان منفصلان وبينهما تشارك بدرجة عالية من تماثل التتابع .

### علاقة فيرويدات CVd - II مع فيرويد HSVd :

من الدراسات الحديثة التى أجريت على فيرويدات المجموعة الثانية من فيرويدات الحمضيات وعلاقتها مع فيرويد تقزم حشيشة الدينار (Hop Stunt Viroid) (HSVd) تبين أن هناك تسعة تنوعات تنابع لفيرويد HSVd ، من هذه التسعة هناك ثلاثة تنوعات تصيب الحمضيات . إن تنوعات HSVd التى تصيب الحمضيات لها صفات فيزيائية وحيوية تشابه مجموعة II من فيرويدات الحمضيات CVd - II . وهذه المجموعة كما سبق وذكرنا تتكون من Iia العامل المسبب لمرض الاكسوكورنز البسيط فى الحمضيات و Iib العامل المسبب لمرض ككسيا Cachexia فى الحمضيات . تحت ظروف الحقل فإن فيرويدات Iia تحدث تشقق بسيط فى القلف فى البرتقال ثلاثى الأواق ولا تظهر أى تفاعل مع الماندلين ولا مع التانجالو . إن Iia تحدث تلون بنى فى قمة الورقة ، تجعد عنق الورقة ونكروزز فى العرق الوسطى فى نباتات الأترج تحت ظروف الصوبا المتحكم بها .

أما Iib فهو يسبب مرض ككسيا في الحمضيات. تحت ظروف الحقل فإن هذا الفيروس لا يسبب ظهور أعراض على البرتقال الثلاثي الأوراق ولكنه يسبب تصمغ، تنقر في الخشب وتكتلات في الماندرين والتانجالو أما في الأترج وتحت ظروف الصوبا الزجاجية فإن Iib تتميز بإصابات مستترة (كامنة).

إن Iia و Iib تختلف في الحجم عن بعضهما البعض ببضعة نيوكليوتيدات، علاوة على ذلك فإنهما يسببان مرضين مميزين مختلفين على الحمضيات. التابع في كل من Iia و Iib - CVd يمكن أن يثبت علاقة كل منها بالآخر وعلاقتهما مع تنوعات HSVd الخاصة بالحمضيات والمذكورة في اليابان، وتنوعات HSVd المترافقة مع العامل المسبب لتقرم الكريب فروت (HGda).

بإجراء عمليات التحليل المختلفة والحديثة تبين أن Iia قد تحدد بـ ٣٠٢ نيوكليوتيدة مشابهة لاثنتين من تنوعات HSVd الخاصة بالحمضيات من اليابان وتشارك أكثر من ٩٩٪ من تماثل التابع مع الفيروسات اليابانية. هذه المجموعة من تنوعات HSVd ذكر أيضاً بأنها تسبب مرض اكسوكورتز بسيط على بعض أنواع الحمضيات. كما وأن Iia تختلف عن Iib عن طرق إلغاء ثلاثة نيوكليوتيدات وتغيير مواقع إثنين من النيوكليوتيدات. هذه التغيرات يمكن أن تستعمل كعلامة لسرعة تشخيص Iib ولتمييزها عن Iia على مستوى النيوكليوتيدات عن طريق تكبير جزء صغير فقط من جينوم الفيروس. على موقع معين ضمن Iib تكون المنطقة المحتوية خمسة G ممتدة من نيوكليوتيدة رقم ١٠٦ إلى رقم ١١٠ مزودة هذا التغيير بتناسق في العزلات الأخرى للفيروس Iib. أربعة من النيوكليوتيدات المتغيرة تحدث في الفيروس في النطاق المتغير وواحدة في موقع ٥٨ في نطاق المرضية في الفيروس. هذه التغيرات يمكن أن تغير التركيب الثانوي في الفيروس Iib وتؤثر على المرضية للفيروس. هناك عزلات عديدة من Iib يجب أن يحدد تتابعها وتقران لتحديد تأثير تغير التابع على المرضية في أنواع الحمضيات المتشابهة. إن دراسة التابع يمكن أن

تؤدي إلى توضيح الصفات الحيوية المختلفة في Iia و Iib في عوائل الحمضيات المتشابهة. إن Iib و HGda على الرغم من حجمهما المتشابه فإنهما يمتلكان صفات بيولوجية مختلفة وأن هذين الفيرويديين تتشارك في ٩٦٪ من تماثل التتابع. بسبب الحجم وتشابه التتابع بين HGda و Iib فمن الممكن الآن التمييز بينهما على مستوى النيوكليتيده.

أما فيروس Iib والذي هو فيروس ككسيا للحمضيات فإنه يتكون من ٢٩٩ نيوكليتيده (شكل ٤١)، والذي هو نفس طول تنوعات HSVd الخاصة بالحمضيات والمرافقة تقزم الكريب فروت الذي ذكر في إسرائيل. (في دراسة Duran - Vila سنة ١٩٨٨ ذكر بأن Iia فيه ٣٠٥ نيوكليتيده وإن Iib فيه ٣٠٠ نيوكليتيده). إلا أن تتابع النيوكليتيدهات في Iia و Iib تختلف عن تنوعات HSVd الخاصة بالحمضيات المعروفة في اليابان والتي تسمى CV<sub>1</sub> و CV<sub>2</sub> وذلك باختلاف مواقع ثلاثة قواعد C - G في موقع ٢٣، A - G في موقع ٢٦ و A - G في الموقع ٢٥١. أما Iib تختلف عن Iia عن طريق إختفاء G من الموقع ٥٨ و A من الموقع ١٠٩ و ١٢٢. كذلك فإن Iib تختلف أيضاً عن Iia في مواقع قواعد مستبدلة A - G في موقع ١٠٧ و U - C في موقع ١٩٣. أما تنوعات HSVd المترافقة مع عامل تقزم الكريب فروت (HGda) ذكر أن بها ٢٩٩ نيوكليتيده في الطول وتشارك أيضاً نفس القواعد المستبدلة من A - G على موقع ٢٦ في Iia و Iib. أما HGda فيختلف عن Iia و Iib عن ولكنه مشابه لتنوعات HSVd من اليابان عن طريق بقاء C على موقع ٢٣ و A على موقع ٢٥١. إن HGda مشابهاً لـ Iib عن طريق بقاء القاعدة المحذوفة G على موقع ٥٨ ولكن يختلف عن طريق بقاء A في موقع ١٠٧، ١٠٩ و ١٢٢ و بقاء U في موقع ١٩٣. إن HGda يختلف عن جميع ما ذكر سابقاً من فيروسات الحمضيات عن طريق إختفاء C من موقع ٢٤٦، U من موقع ٢٤٧ واستبدال A - G في موقع ٢٧١.



Cv1	CUGGGGAUUCUCGAGUUGCCGCAUGGGCAAGCAAGAAAAACAAGGCA	50
Cv2	.....C..G.....	
IIa	.....G..A.....	
IIb	.....G..A.....	
HGda	.....C..CA.....	
	* * ↑ ^	
Cv1	GGGAGGAGACUUAACCGAGAAAGGAGCCCGGGGCAACUCUUCUCAGAAU	100 <sup>f</sup>
Cv2	.....AG.....	
IIa	.....AG.....	
IIb	.....A.....	
HGda	.....U.....	
	↓	
Cv1	CCAGCGAGAGGGCGUAGGAGAGAGGGCCGCGGUCUCUGGAGUAGAGGCUU	150
Cv2	.....A..A.....A.....	
IIa	.....A..A.....A.....	
IIb	.....G..A.....	
HGda	.....A..A.....A.....	
	+ ↓      ↓	
Cv1	CUUGCUUCGAAACACCAUCGAUCGUCUUCUUCUUUACCUUCUCCUGG	200
Cv2	.....U.....	
IIa	.....U.....	
IIb	.....C.....	
HGda	.....U.....	
	+ ↑	
Cv1	CUCUUC GAGUGAGAGCGGACCGGUGGCAUACCUCUCGGUUCGUCUUC	250
Cv2	.....C..C.....CU..C	
IIa	.....C..C.....CU..C	
IIb	.....C..C.....CU..C	
HGda	.....C..C.....CU..C	
	↑ ↓      ^ ^	
Cv1	AACCGCUUUUUGUCUAUCUAAGCCUCUGCGCGGAUCCUCUUGAGCC	300
Cv2	A.....	
IIa	G.....	
IIb	G.....	
HGda	A.....G.....	
	* ↑	
Cv1	CCU	302
Cv2	...	302
IIa	...	302
IIb	...	299
HGda	...	299

شكل رقم ٤١ :

التتابع الكامل لنيوكليوتيدات فيروسات الحمضيات IIa و ككسيا، IIb. تنوع فيروس تقزم حشيشة الدينار للحمضيات CV<sub>1</sub> و CV<sub>2</sub>. إن تنوع فيروس تقزم حشيشة الدينار من الكريب فروت مرافق مع عامل تقزم الكريب فروت HGda من اسرائيل. العلامات تدل على:

↑↓ الاختلافات بين CV<sub>1</sub> و CV<sub>2</sub>. أما (^) = الاختلافات في تتابع HGda الذى لا يوجد فى الفيروسات الأخرى.

\* = إختلافات CVd - IIa و CVd - IIb مع CV<sub>1</sub> و CV<sub>2</sub>.

↓ = ازالة من تتابع CVd - IIb عند مقارنته مع CVd - IIa.

+ = استبدال فى تتابع CVd - IIb عند مقارنتها مع CVd - IIa.

↑ = إختلاف بين HGda عند مقارنتها مع CVd - IIb.

### مجموعة III - CVd :

إن تحليل عزلات الاكسوكورتز في كاليفورنيا واسبانيا أظهر أن ٣٣ من أل ٣٧ عزلة مختبرة تحتوى فيرويدات ذات حركة فى الهجرة الكهربائية مشابهة لـ III - RNA. بتحليل عزلتين كل منهما لفيرويد مفرد من كاليفورنيا أظهر أن هذين الفيرويديين هما CVd - IIIa و CVd - IIIb وهما ذاتا حجم نموذجي ومماثل لـ ٢٩٠ نيوكليتيده. الاستبعاد المستمر من CF - 11 cellulose، أدى إلى التعرف بأن CVd - IIIa هو أول فيرويد إستبعد بمادة إيثانول ٢٥٪، فى حين أن الفيرويد CVd - IIIb إستبعد باستعمال ٢٠٪ إيثانول. كان هناك فيرويديين آخرين هما CVd - IIIc و CVd - IIId حيث عزلا ونقيا من معقد عزلات من إسبانيا كان لهما معدل هجرة أسرع من CVd - IIIa و CVd - IIIb وتم إستبعادهما من CF - 11 cellulose باستعمال ٢٠٪ إيثانول كما فى جدول رقم ٢٩.

عند حقن الأترج بعينات نقية من CVd - IIIa، IIIb، IIIc أو IIId أظهرت تقزم معتدل ودرجات متعددة من تدلى الأوراق، نكروز فى العرق الوسطى ونكروز فى عنق الورقة. هناك فيرويدات مفردة أمكن استرجاعها ثانية من الأترج بعد الحقن بثلاثة شهور. لا يوجد عوائل أخرى غير أنواع الحمضيات يمكن أن تصيبها فيرويدات مجموعة III - CVd.

### مجموعة IV - CVd :

هناك عزلة واحدة مفردة تسبب أعراض بسيطة إلى متوسطة مصدرها كاليفورنيا (E 80) تحتوى فيرويد CVd - IV وهى ذات هجرة كهربائية أكثر سرعة من أى عزلة فيرويدية من أى مصدر من الحمضيات لوحظت حتى سنة ١٩٨٨. إن الهجرة الكهربائية Co - electrophoresis لهذه العزلة مع عينات من CVd - III بها عزلات، أدت إلى القول بأن CVd - IV لها معدل هجرة أعلى من مجموعة III - CVd. قدر حجم الجزئ فى هذه المجموعة بحوالى ٢٧٥ نيوكليتيده. إن مجموعة IV - CVd أظهرت عدم التجانس مع منقبات مجموعة I - CVd و II و III وأظهرت تجانس ضعيف مع CEVd cDNA.

عند حقن الأترج بتحضيرات نقيه من CVd - IV أظهرت أعراض تقزم بسيط، نكروزز في العرق الوسطى وتدلى الورقة. أما عند حقن نباتات الخيار فلم يظهر أية أعراض عليها، ولكن يمكن استرجاع الفيروس ثانية خلال ٣ أسابيع بعد الحقن. يمكن أن تصنف مجموعة CVd - IV مع تلك الفيروسات التي تتراح أو تستبعد من السليلوز في ٢٥ % ethanol STE.

## العلاقة بين فيروسات الحمضيات

### Relationship Among Citrus Viroids

عند حقن أشجار الأترج (السترون) بمزارع فيروس نقي أو مخلوط فيروس صناعي من فيروسات الحمضيات، فإن جميع الفيروسات تتناسخ مستقلة بذاتها، ولقد تأكد ذلك بواسطة التحليل بطريقة PAGE للنباتات المحقونة.

إن دراسة الأعراض المحدثة بواسطة خليط من المعديات الفيرويدية ومقارنتها مع الأعراض المحدثة بواسطة فيروسات مفردة أدى إلى القول بحدوث تفاعلات حيوية أو تعاون Synergism بين هذه الفيروسات. فمثلاً الأترج المحقون بالفيروس CVd - I، IIa، III و IIIId تظهر تقزم بسيط إلى متوسط وتجدد شديد في الأوراق عادة ما يكون مترافق مع الإصابة بفيروس CEVd، بالإضافة إلى تدلى الورقة وتجدد عنقها وظهور نكروزز على نصل وعنق الأوراق وهذا ما توصف به مجموعة CVd - III و CVd - I، وتختلف عن الإصابة بفيروس CEVd في كون الأعراض تتمثل في صغر حجم الورقة، بينما أنصال الأوراق في النباتات المصابة بكل من CVd - I و II و III كل على إنفراد كانت مشابهة لنباتات الكنترول غير المحقونة.

إن اللقاح الفيرويدي (المصدر الأصلي من كاليفورنيا E 821) والذي يحتوي على CVd - I، IIa، IIb و IIIb تحدث أعراض شديدة نوعاً ما مشابهة لتلك المحدثة بواسطة السلالات الشديدة المحتوية CEVd. هذه الأعراض كانت أيضاً أكثر شدة مما يمكن توقعه من إتحاد الأعراض المحدثة بواسطة كل واحد من هذه الفيروسات

المشتركة، زيادة على ذلك حتى تحت ظروف الصوبيا الزجاجية فإن الأعراض تزداد بشدة كبيرة خلال ظروف الصيف أو درجات الحرارة الأعلى وذات النهار الطويل، بينما النموات الحديثة النامية تحت ظروف الشتاء أو درجات حرارة أبرد ونهار قصير، يمكن أن تكون حاملة للفيرويد ولكن بدون أعراض، وبالمثل فإن الأعراض المرافقة لكل من CVd - IIIa و CVd - IV عند حقنها في الأترج كل على إنفراد أدت إلى تفاعل بسيط غير مشابه أبداً للأعراض المتوسطة المحدثه بواسطة عزلات كاليفورنيا 804 E التي تحوى كلا الفيرودين.

#### مقالة العالمين Semancik و Vila - Duran عن فيروسات الحمضيات\* :

إن التحليلات المقارنة بين عينات من الحمض النووي المأخوذ من الأترج المحقون بمصادر حقلية عديدة مصابة بالفيرويدات قد أظهرت وجود الإنتشار الواسع لعديد من فيروسات الحمضيات المميزة. إن فيروس CEVd قد عرف ووصف وصفاً تاماً وذكر بأنه يتكون من 371 قاعدة نيوكليتيده وقد اكتشف اصلاً من أشجار الحمضيات التي تظهر أعراضاً شديدة من التقزم وتقشر القلف. إن العوامل المسببة للأعراض المتوسطة والبسيطة على الأترج قد اكتشفت وعرفت حديثاً.

كذلك فإن ظهور الأعراض المتوسطة والبسيطة على نباتات الأترج المحقونة قد ثبت بأنها مترافقة مع واحد أو أكثر من الفيرويدات الأصغر من فيروس CEVd. إن التحليل بطريقة PAGE والانجذاب على الكروماتوغرافى السليلوزية CF - 11، والمدى العائلى والتهجين الجزيئى قد دعم فكرة تقسيم فيروسات الحمضيات إلى خمسة مجموعات. كذلك فإن ظهور الأعراض التي يحدثها كل فيروس أو مجموعة فيروسات عند حقنها في نباتات الأترج، أيضاً قد دعمت هذه الفكرة.

\* ملاحظة وهناك علماء كثيرون درسوا فيروسات الحمضيات هم ١ - N. Duran - Vila

٢ - C.N. Roistacher ٣ - R. River - Bustamant ٤ - J.S. Semancik ٥ - R. Flores ٦ -

J.M. Belles . ٤

إن الاصطلاح المستعمل والذي يذكر فيه اسم فيروس الحمضيات فقط، فإن هذا لا يدل على فيروس معين، لذا يجب أن يكون اسم فيروس الحمضيات CVd متبوعاً برقم المجموعة التي ينسب إليها وحجمه النسبي داخل المجموعة، حيث أن المجموعات أعطيت أرقاماً I، II، III، و IV وضمن هذه المجموعات أعطيت نسباً لحجم الفيرويد مثل a، b، c، d. هذه التعبيرات، الأرقام والحروف يجب أن تقترن باسم كل فيروس للحمضيات ويستمر ذلك حتى يثبت له اسم غير هذا الاسم، كما حاول بعض العلماء في إسرائيل أن يثبتوا ذلك بالنسبة لفيروس CVd - Ib. لذلك عند ذكر اسم فيروس معين بأنه العامل المسبب لمرض مميز فيجب أن يضاف إليه اصطلاح وصفى أكثر إيضاحاً. وبالتالي فإنه لغاية سنة ١٩٩١ فإن فيروس إكسوكورتز الحمضيات وفيروس ككسيا Cachexia فقط يمكن أن يشار إليهما كمسببات أمراض منفصلة.

إن فيروس إكسوكورتز الحمضيات CEVd والتنوعات القريبة جداً له ذات ٣٧١ - ٣٥٧ نيوكليتيده والتي وصفت من قبل Visavader و Symon سنة ١٩٨٣، ١٩٨٥ تشكل مجموعة مستقلة من فيروسات الحمضيات. هذه المجموعة تشمل العوامل المسببة المرضية لمرض إكسوكورتز الحمضيات وكذلك الأمراض المشابهة جداً له ولا تميز عنه إلا بشئ بسيط، وتشمل العوامل التي تظهر صفات مشتركة وتشابه في حجم الجزيء والمدى العائلي والتماثل المتقارب في التتابع. وبالتالي فإن مجموعة فيروس إكسوكورتز الحمضيات يصعب التمييز بين عزلاتها أو سلالاتها إلا بالاختبارات الحيوية وإتباع طرق العزل المختلفة وسنذكرها في آخر المقال.

أما مجموعة CVd - I فإنها تشمل فيروسين من فيروسات الحمضيات أصغر من فيروس إكسوكورتز بمقدار ٣٠ - ٤٠ نيوكليتيده، وهما CVd - Ia و CVd - Ib. هذين الفيرويين لهما حجم جزيئي يقارب ٣٣٠ - ٣٤٠ نيوكليتيده ودرجة عالية من تماثل التتابع وتحدث نكروزز على العرق الوسطى للورقة يكون بسيط جداً

وذلك عند حقنها فى نباتات الأترج. ومن المحتمل أن الفيروس الأصغر وهو- CVd Ib والذى وجد لغاية الآن فى عزلة من CVaVd فى كاليفورنيا يمكن أن يمثل تنوع غير معتبر من الفيروس Ia - CVd.

إن التقرير الأولى عن فيروس يرمز له (CVaVd) كفيروس متميز بسبب إحداثه تفاعل متوسط شبيه بالاكسوكورتز على الأترج كان قد بنى على الاكتشاف الذى حدث لفيروس جديد يتكون من ٣٣٠ نيوكليتيده عن طريق الصبغ بمادة برومايد الايثيديوم. الاسم المذكور Citron Variable Viroid كان قد ابتكر لوصف الطبيعة المتغيرة لتعبيرات الأعراض التى تنتج تحت ظروف بيئية مختلفة. وفى إعادة التحليل لعزلة CVaVd فقد تبين أنه بالإضافة إلى الفيروس ذو ال ٣٣٠ نيوكليتيده الأكثر انتشاراً فإن هناك ثلاثة فيروسات أخرى أمكن اكتشافها فى عزلة CVaVd. ونظراً لأن الاسم المعطى للفيروس Citron Variable Viroid كان قد بنى على تعبيرات حيوية معينة للعزلة التى تحتوى تركيب يتكون من أربعة فيروسات مميزة، فيبدو الآن أنه من غير الملائم إظهار أى من هذه الفيروسات الأربعة كعامل مسبب للتعبيرات المرضية بدون إختبار جميع احتمالات الاتحادات لمكونات CVaVd. زيادة على ذلك فإن الحقن بتحضيرات نقيه من فيروس يتكون من ٣٣٠ نيوكليتيده يحدث تفاعل أعراض توصف بأنها إنحاء فى الأوراق هذا يشبه Ia - CVd. مع هذه المعلومات الجديدة عن عزلات CVaVd فنحن نقترح أن الاصطلاح الخاص وهو CVaVd يجب التخلي عنه وأن الفيروس الذى يتكون من ٣٣٠ نيوكليتيده لعزلة CVaVd يجب أن يعرف على أنه Ib - CVd.

إن الفيروسات الأصغر التى تهجر بسرعة أكثر من مجموعة I - CVd الموجودة والتى تظهر دائماً وكأنها سلسلة متصلة لحدوث الفيروسات طبيعياً، هذه الهجرة الكهربائية المتقاربة جداً جعلت تمييز مجموعات CVd - II، CVd - III، و CVd - IV من الصعوبة بمكان. مع ذلك فإن مجموعة CVd - II يمكن تمييزها

ببعض الصفات مثل خصائص الانجذاب للسيليلوز 11 - CF، الأعراض المحددة جيداً على الخيار والدرجة العالية من تماثل التتابع في النيوكليوتيدات. إن العلاقة بين مكونات هذه المجموعة وأمراض الاكسوكورتز والككسيا في الحمضيات قد ذكرناها بالتفصيل في مقال آخر. زيادة على ذلك فإن العلاقة القوية مع فيروس تقزم حشيشة الدينار (Hop stunt Viroid) (HSVd) وفيروس الثمرة الباهتة في الخيار والفيروس الجديد الذى عزل من الأترج وعلاقته مع HSVd كل ذلك له تأثير كبير في تحديد فيروسات الحمضيات.

هناك فيروسات عديدة تهاجر في PAGE d في المنطقة الضيقة المحددة بواسطة CVd - II (حوالي ٢٩٠ - ٣٠٠ نيوكليوتيدة) ومجموعة CVd - IV (حوالي ٢٧٥ نيوكليوتيدة). إن الأعراض المميزة لتجمع عنق الورقة متبوعاً بحدوث نكروزز والتي تظهر بوضوح على نبات الأترج المحقون بمجموعة CVd - III يمكن أن تستعمل كمميزات أولية للمجموعة CVd - III. إن جميع أفراد هذه المجموعة تحدث درجات مختلفة من تجمع عنق الورقة ونكروزز حيث أن هذا النكروزز بعد ذلك يمتد ويصل إلى العرق الوسطى ويصبح واضح بدرجة كبيرة وأحياناً يؤثر على العروق الثانوية. كذلك فإنها تسبب تدلى الورقة ويظهر على الورقة بشكل عام مظهر الورقة الساقطة وذلك نتيجة لانحناء عنق الورقة، كل هذه الأعراض تظهر في نباتات الأترج. إن المدى العائلى لهذه الفيروسات يمثل بشكل محدود في الحمضيات، وهي لا تظهر تماثل تتابع مع مجموعات CEVd، CVd - I، أو CVd - II.

إن النتائج الأولية لإختبارات تماثل التتابع لمجموعة CVd - III يدل على أنها مجموعة متماثلة خاصة مميزة. ولكي نحصل على صفات أخرى كثيرة متوقعة لهذه المجموعة يجب إجراء إختبارات تهجين أخرى. نظراً لأن هذه الفيروسات تدخل أو تتواجد بعبارة منخفضة في الأترج المصاب فإن إختبارات التماثل لا يمكن إجراؤها ما لم يتوفر كميات كافية من هذه الفيروسات.

أما فيروسات المجموعة IV فهي ذات هجرة كهربائية أسرع من كل المجموعات السابقة، وبالتالي فإنها تكون ذات فيروسات أصغر ويمكن القول بأنها أصغر الفيرويدات التي تصيب الحمضيات وهذه المجموعة تحتوى فرد وحيد (لغاية ١٩٩٠) هو الذى يمثل هذه المجموعة. إنه يشارك فى بعض صفات CEVd أكبر فيروسات الحمضيات. إن نبات الخيار هو العائل الشائع الذى يحمل الفيرويد IV ويتكاثر فيه بدون إحداث أعراض ظاهرية (أيضاً يشبه تفاعل CEVd مع الخيار). إن المعلومات المتحصل عليها من عمليات التهجين تدل على قليل من تماثل التتابع. وعلى أية حال فإن الأترج المحقون بتحضيرات نقية من CVd - IV تظهر أعراض تدلى الورقة العشوائى ونكروزر فى العرق الوسطى ولكن لا تظهر التقزم الشديد ولا تجعد الورقة التي تميز الإصابة بالفيرويد CEVd.

نعود الآن لمجموعة CEVd والتي وعدنا أن نتكلم عنها فى بداية هذا المقال. لقد تأكد أن أفراد مجموعة فيرويد اكسوكورتز الحمضيات CEVd تكون مترافقة مع مرض الاكسوكورتز كما ذكر لأول مرة سنة ١٩٤٨ من قبل العالم Fawcett & Klotz. إن الفيرويد المعروف جيداً والذي يتكون من ٣٧١ إلى ٣٧٥ نيوكليتيده يمكن أن يعزل من أشجار الحقل المظهرة أعراض الاكسوكورتز المميزة. ونظراً لأن معظم مصادر الحقل تحتوى واحداً أو أكثر من الفيرويدات بالإضافة إلى CEVd، فإن السؤال الذى يبرز الآن هو هل CEVd بنفسه هو المسئول عن مجموعة الأعراض المرضية الكلية؟؟ لا يمكن تحديد ذلك بشكل كامل.

إن الأشكال البسيطة من المرض التي تتميز عن طريق تقشر القلف وبدون تقزم أو يكون هناك تقزم بدون تقشر للقلف، هل هذه الأعراض راجعة بسبب الإصابة بالفيرويد CEVd لوحده أو أنه غير مسئول لوحده فى الحقل عن هذه الأعراض أو هل هناك فيروسات من مجموعات الحمضيات الأخرى تشارك فى ذلك؟؟ هذا السؤال يحتاج إلى دراسات كثيرة تطبيقية فى الحقل.



هناك تجارب على عوامل التقزم القابلة للانتقال بالتطعيم -transmissi- Graft -ble dwarfing agents قد حصلنا على نتائج منها، هذه النتائج أظهرت أنه لا يوجد عزلات محددة مسببة للتقزم البسيط أو المتوسط موجودة ضمن CEVd ولكن ضمن فيروسات أخرى، هناك فيروس آخر من الممكن أن ينتقل إلى الأقحوان وبالتالي من المحتمل أن يكون له علاقة مع مجموعة CVd - II. على أية حال فإن وجود التفاعلات الكاملة بين فيروسات الحمضيات لا تسمح، ما لم يحدد محتوى الفيروس، باستنتاجات مبنية على مميزات جزيئية لعزلات حقلية. وبالتالي فإنه فقط في كفاءة الأشجار المحقونة بفيروسات منفصلة وفيروسات متجمعة سوف تتحدد علاقة تأثير المسبب وتحديدته من بين الفيروسات المختلفة للحمضيات وأخذ الأعراض بعين الاعتبار في ذلك التحديد.

وبشكل مختصر يمكن القول بأن المعلومات المتوفرة لدينا تزودنا بالقواعد الكافية لفهم جيد وتحديد مرض الاكسوكورتز. الأعراض البسيطة لا يمكن اعتبارها دليل تشخيصي لمرض الاكسوكورتز. مع أن الإختبار الحيوي للأترج يمكن أن لا يستخدم لوقت طويل لايجاد إثبات إيجابي لوجود فيروس اكسوكورتز الحمضيات، إلا أنه يبقى أكثر قيمة لفهرسة العائل لهذا الفيروس. كما وأن العلاقة بين فيروسات الحمضيات والتعبيرات الكلاسيكية لمرض الاكسوكورتز الذي يظهر تفاعل على شكل تقشر القلف على الأصول الحساسة يجب أن تكون مقنعة في الاختبارات الحقلية للفيروسات المختلفة التي تستعمل كمزارع نقية بالإضافة لاستعمال مخلوط من الفيروسات في الحقن.

بعد أن إنتهى هذا المقال العلمي المقدم من أكبر عالمين من علماء فيروسات الحمضيات فإن المؤلف لا يستطيع أن يقول سوى أن التقدم العلمي السريع وإنتشار أبحاث الفيروسات في كل مكان هو الذى يحدد مدى دقة هذه المعلومات ومدى إستمرار صحتها في المستقبل ودعنا ننتظر.

## فوائد الفيرويد «ترافق الفيرويدات مع أعراض التقزم القابل للانتقال بالتطعيم»

### Association of Viroids With Graft - Transmissible Dwarfing Symptoms

من المعروف أن الفيرويدات والفيروسات تسبب أضراراً كبيرة في النباتات الاقتصادية تؤدي إلى خسائر كبيرة فلا يوجد أية فائدة منها. هناك استثناءان لهذه القاعدة، الاستثناء الأول هو احتمال التوصل إلى تطبيقات عملية ناجحة في المقاومة بالتضاد Cross - Protection في المستقبل القريب أو البعيد، وأما الاستثناء الثاني فهو خاص بالفيرويدات فقط وهو استعمالها في الحصول على أشجار متقزمة في الحقل وهذه الأشجار المتقزمة لها فوائد زراعية كثيرة، هذه الفكرة هي موضوع هذا العنوان.

هناك بعض الفيرويدات تسبب تقزم في الأشجار بدون أن يكون هذا التقزم مترافقاً مع أضرار أخرى، هذا التقزم يكون ذو فائدة عملية للمزارعين، هذه الفيرويدات قابلة للانتقال بالتطعيم وتسمى عوامل التقزم القابلة للانتقال بالتطعيم ومنها سلالات عديدة.

هناك في منطقة New South Wales في إستراليا أجريت تجارب على بعض العزلات المأخوذة من عزلات عوامل التقزم القابلة للانتقال بالتطعيم Graft - trans (GTD agents) missble dwarfing agents والتي تقلل حجوم الأشجار الناجمة من بعض طرز البرتقال الناجمة من برعم *Citrus sinensis* مطعوم على برتقال ثلاثي الأوراق *Poncirus trifoliata* وبدون أن يكون لها تأثيرات ضارة. مثل هذه الأشجار المتقزمة تكون ذات فائدة اقتصادية حيث أن تكاليف العمليات الزراعية مثل الرش والجمع تكون أقل من تكاليف الأشجار الكبيرة الضخمة، وكذلك فإن الأشجار المتقزمة يمكن أن تزرع بكثافة أكثر وبالتالي تعطى إنتاج أكثر في السنوات الأولى

من الإنبات، زيادة على ذلك يكون هناك كفاءة أكثر في الاستفادة من الماء في الري والأسمدة. وبالتالي يمكن القول بأن التقزم القابل للانتقال بالتطعيم (GTD) هو عبارة عن تفاعل بين العائل والكائن الممرض تكون النتيجة فيه لصالح المزارعين.

إن التطبيقات التجارية لهذه العملية GTD قد بدأت في استراليا ولكن يجب أن لا نأخذها مباشرة بل يجب أن نتأكد من تعريف هذه العوامل الممرضة بالضبط والعوامل التي تؤثر على تفاعلها مع العائل وهل هذه العوامل الممرضة تحدث هذا التفاعل باستمرار دون أن يكون عرضياً وهل الظروف البيئية السائدة لها تأثير في هذه العوامل أم لا. إذن نحن نتكلم عن هذا الموضوع من ناحية علمية أما من ناحية تطبيقية في بلادنا أو أى بلاد أخرى فهذا يحتاج إلى أبحاث تقرر ذلك.

إن أعراض التقزم في أشجار الحمضيات المطعومة على أصول البرتقال ثلاثى الأوراق قد عزيت إلى فيروس اكسوكورتز الحمضيات CEVd في الولايات المتحدة واستراليا وذلك بسبب أن الاكسوكورتز يسبب تقشر قلف الأصل بالإضافة إلى التقزم وكذلك فإنه ينتقل بالتطعيم. وعلى أية حال فإن الأشجار المتقزمة بدون أن يحدث لها تقشير نتيجة الإصابة بالفيروس قد لوحظت في استراليا وايطاليا وأمكن نقل هذه الأعراض بالبرعم من الأشجار الاسترالية إلى غيرها بدون أن يحدث أعراض تقشر. إن معظم عزلات GTD المستعملة في بساتين الفاكهة في استراليا من النوع الذى يحدث تقزم بدون تقشير.

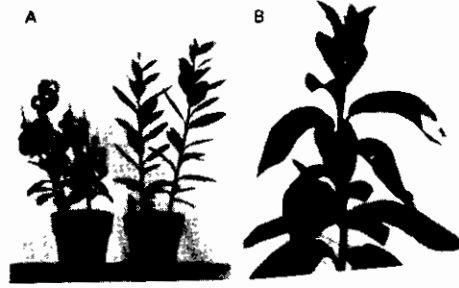
هناك دليل أولى مادي تفصيلي يدل على أن CEVd يكون مترافقاً مع التقزم في حالة العزلات GTD غير المقشرة. إن خمسة من ستة عزلات أعطت تفاعل تجعد الورقة في السترون C. medica الكاشف لفيروس CEVd. كما أمكن عزل ستة عزلات من التي تحدث تقزم بدون تقشير للقلق من أشجار البرتقال وتبين بعد النقل المتكرر أنها دائماً مرافقة لأعراض التقزم بدون تقشير. يلاحظ أعراض هذه العزلات في شكل ٤٢. ولغاية الآن لم يحدد تتابع هذه العزلات أو عدد

نيوكليوتيداتها وهل هي مقتصرة على فيروس CEVd لوحده فقط أم أنها مشتركة مع فيروسات أخرى من المجموعات المختلفة لفيروسات الحمضيات. هناك عزله واحدة تسبب التقزم والتقشير معاً.

إن نتائج هذه الأبحاث تدل على أن الفيروسات تكون دائماً مترافقة مع التقزم في أشجار البرتقال. وقد وجد أن بعضاً منها يسبب أعراض تجعد الأوراق في السترون (الأترج). أحياناً فإنه يمكن أن تطعم الأشجار بالبرعم إلا أنها لا تعطى أعراض التقزم المميزة للعزلة، يعود ذلك إما إلى عدم وجود الفيروس في جزء البرعم المأخوذ كطعم للأصل أو عدم ملائمة الظروف سواء جوية أو حيوية لتناسخ الفيروس.

ذكرنا سابقاً أن هناك عزلة تعطى أعراض تقزم مع تقشر على البرتقال ثلاثي الأوراق هذه العزلة أعطيت رقم ٣٣. أما العزلتين ٣٥٣٥ و ٣٥٣٦ فهي تعطى تقزم بدون تقشر ولكن عند حقنها في السترون تعطى أعراض نموذجية لفيروس CEVd على السترون و Gynura والطماطم (هذه العزلات الثلاثة تسمى S - isolates) ولكن أعراضها تكون أبسط من أعراض السلالة CEVd - A.

أما الأربعة عزلات الأخرى تسمى M - isolates وهي ٣٥٣١، ٣٥٣٢، ٣٥٣٨، ٣٥٣٩ عند حقنها في السترون تعطى أعراض تجعد الأوراق البسيطة ويتأخر كثيراً هذا التكشف (تكشف الأعراض) بالمقارنة مع تفاعلات CEVd. هذه العزلات لا تعطى أية أعراض على ال Gynura أو الطماطم. لقد وجد أنه من الصعوبة بمكان تمييز عزلات M - isolates عن بعضها البعض إلا أنها متميزة عن S - isolates هذا يؤدي إلى القول بأنها إما أن تكون أشكال معتدلة من CEVd والتي من الصعب تمييزها عن بعضها البعض أو أنها تتبع فيروس منفصل عن فيروس CEVd.



شكل رقم ٤٢ السفلى:

تفاعل عزلات S - isolates على الطماطم والجنينورا.

A: نباتات طماطم محقونة بالعزلة 033. أعراض تقزم متوسطة على الشمال أما اليمين غير معاملة.

B: نبات جايبيورا محقونة بالسلالة 033 مسببة أعراض تجعد معتدلة.

النباتات الموجودة داخل المستطيل تظهر أعراض الإصابة بسلالة CEVd - A تحت نفس الظروف.

شكل رقم ٤٢ العلوى:

A: نباتات سترون مظهرة أعراض شديدة للإصابة بعزلة GTD على اليسار

مقارنة مع نباتات غير مظهرة للأعراض على اليمين.

B: أعراض معتدلة منتجة بالعزلة 3532.

## ب - أمراض الحمضيات الفيروسية

### ا - مرض اكسوكورتز الحمضيات (تشقق الحمضيات)

#### Citrus Exocortis Disease

يعتبر مرض تشقق القلف في أشجار الحمضيات عالمي الانتشار ويهاجم البرتقال ثلاثي الأوراق و Citrango ، Rangur وأنواع أخرى من اليوسفي والليمون الحلو، بعض أنواع ليمون الاضاليا والترنج. إن كلاً من البرتقال وليمون الاضاليا والكريب فروت وأشجار الحمضيات الأخرى المطعومة على أصول حساسة لمرض تشقق القلف تظهر إنخفاضاً في النمو يتراوح من نسبة بسيطة إلى نسبة تصل ٥٠٪ ويخفض الإنتاج بنسبة تصل ٤٠٪.

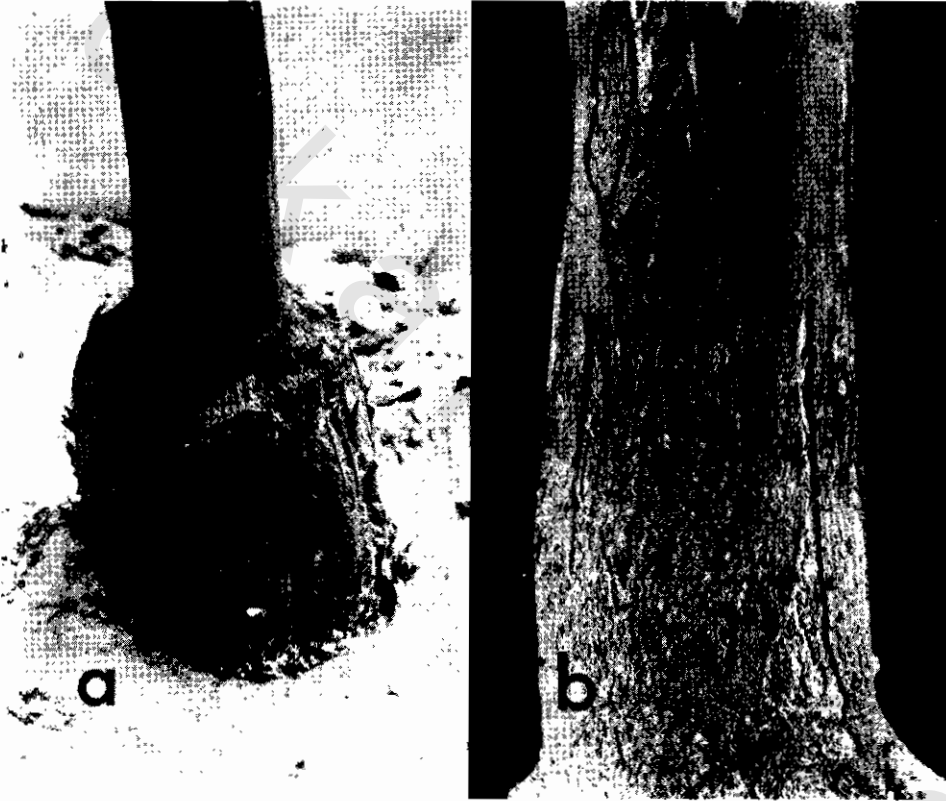
#### الأعراض:

يظهر على النباتات المصابة الحساسية للمرض تشققات عمودية في القلف وتكون ضيقة، وتخطيطات رفيعة عمودية على القلف الخارجى المفكك جزئياً والتي تعطى القلف مظهر التقرح أو المظهر الحرشوفى (شكل ٤٣). نظراً لأن كثيراً من النباتات القابلة للإصابة بالمرض مثل البرتقال ثلاثي الأوراق، تستعمل أساساً أصول لتطعم عليها أشجار حمضيات أخرى، وبسبب أن الطعوم تعطى نمو ضعيف على مثل هذه الأصول وبسبب الأصول الحرشوفية واسعة الاستعمال، فإن المرض أعطى اسم القورمة الحرشوفية Scaly butt. إن النباتات المصابة الحساسية للمرض يمكن أيضاً أن يظهر عليها تلطخات صفراء على السيقان الحديثة المصابة، بعض أنواع الترنج يظهر عليها التفاف الأوراق والسيقان إلى الداخل وتشقق واسوداد أعناق وعروق الورقة. تظهر جميع النباتات المصابة، بشكل عام، متقرمة هذا التقزم يتراوح من نسبة بسيطة إلى مدى كبير وتعطى إنتاج منخفض. شكل ٤٤.

## الكائن الممرض :

يتسبب هذا المرض عن فيروس تشقق قلف الحمضيات-Citrus Exocortis Vir- oid ويكتسب باختصار CEVd (وقبل سنة ١٩٩٢ كان يكتب بدون إضافة حرف d). يبدو أن الفيروس يشابه ظاهرياً فيروس الدرنة المغزلية في البطاطس وهو يتكون من حمض نووي RNA ذو خيط واحد يتألف من ٣٧١ نيوكليتيده أما سلالاته فتتكون من ٣٧٠ - ٣٧٥ نيوكليتيده ويكون ذو وضع (شكل) دائري أو مستقيم، وهو لا يشابه فيروس الدرنة المغزلية في كثير من الصفات.

ينتقل الفيروس بسهولة من الأشجار المريضة إلى الأشجار السليمة عن طريق سكاكين التطعيم، مقصات التقليم أو أدوات القطع الأخرى. ينتقل بواسطة الأيدي ويمكن أن ينتقل بواسطة الحيوانات القارضة والحافرة. ينتقل الفيروس أيضاً بواسطة الحامول وينتقل بواسطة العصارة إلى كل من الجنسين *Gynrua* و *Petunia* وإلى نباتات عشبية أخرى. يحتفظ الفيروس بمقدرته على الإصابة وهو على صفائح السكاكين الملوثة لمدة لا تقل عن ثمانية أيام. عندما ينقى الفيروس جزئياً فإنه يبقى قادراً على إحداث الإصابة على درجة حرارة الغرفة العادية لعدة شهور. إن درجة الحرارة المميتة لهذا الفيروس في العصارة المستخرجة حوالي ٨٠م لمدة عشرة دقائق، ولكن الفيروس المنقى جزئياً يبقى قادراً على إحداث العدوى حتى بعد أن يغلى لمدة ٢٠ دقيقة. يبقى أيضاً الفيروس حياً بتسخين السكاكين الملوثة فترة قصيرة في اللهب في مشعل البروبان (درجة حرارة النصل حوالي ٢٦٠م) وفي السكاكين المغمورة في الكحول والمسخنة في اللهب. يبقى الفيروس أيضاً حياً على السكاكين الملوثة المعاملة بمعظم المطهرات الكيماوية الشائعة باستثناء محلول صوديوم هايوكلورايت.



شكل رقم ٤٣ :

تقشر القلف والتشقق المتسبب عن فيروس الاكسوكورتز في الحمضيات.  
A: نمو محدود للبرتقال الحلو وتقشر القلف على أصول البرتقال ثلاثي الأوراق.  
B: تشقق ساق الليمون الحلو.





شكل رقم ٤٤ :

أعراض فيروس الاكسوكورتز على السترون - الشمال، سترون غير محقون. أما اليمين، أشجار سترون مصابة بفيروس اكسوكورتز الحمضيات، يلاحظ التفاف الأوراق ومراحل مبكرة من تشقق القلف.

### تكشف المرض :

يبقى الفيروس حياً في معظم أشجار الحمضيات وفي كثير من العوائل العشبية وينتقل إلى نباتات الحمضيات عن طريق التطعيم بالبرعم أو أنواع التطعيم الأخرى (التطعيم بالقلم) وينتقل أيضاً بواسطة أدوات القطع الملوثة أو الآلات الزراعية الأخرى. يبدو أن الفيروس يدخل بوضوح في عناصر اللحاء وينتشر فيها في جميع أجزاء النبات. يبدو أن الفيروس يكون مترافقاً مع الأنوية والأغشية الداخلية من خلايا العائل، وهذا يؤدي إلى اضطرابات في الأغشية البلازمية. مع أن الفيروس يبدو وأنه

فأفد القدره على أن يعمل جزيئات ناقلة messenger molecules أو أن يعمل كحمض نووى مستقل، إلا أنه يسبب تغيرات عديدة فى ميتابولزم النباتات المصابة هذه التغيرات تشمل زيادة فى الأكسجين الممتص وفى التنفس وأيضاً فى محتوى السكريات، وفى بعض الأنزيمات تحدث تغيرات ملحوظة وكذلك أيضاً فى عديد من الأحماض الأمينية.

### المقاومة:

يمكن مقاومة مرض تشقق قلف الحمضيات فقط عن طريق إكثار أشجار المشتل الخالية من هذا المرض من أصول مؤسسة مشهود بصحتها وخلوها من المرض واستعمال التطعيم بالبرعم التنظيف الخال من المرض. وكذلك المشاتل يجب أن تكون خالية من المرض وإتباع عمليات زراعية نظيفة. يجب أن تطهر الأدوات بين كل قطعتين فى نباتات مختلفة وذلك بغمر الأدوات فى محلول ١٠ - ٢٠ ٪ صوديومهايوكلورايت.

### المدى العائلى (الكواشف):

يصيب الفيرويد بالإضافة إلى مدى واسع من أصناف الحمضيات، النباتات الآتية:-

- 1 - *Tagetes patula*.    2 - *Lycopersicon esculantum*    3 - *Gynura aurantica*  
4 - *Chrysanthemum morifolium*    5 - *Persea americana*    6 - *citron medica*.

تأثير فيرويد اكسوكورتز الحمضيات على تركيب الأزهار والثمار فى الأترج:

يستعمل نبات السترون (الأترج) *Citrus medica* كنبات كاشف لفيرويد اكسوكورتز الحمضيات. تجرى عملية تكاثر الأترج عن طريق تنمية بادرات

الصنف Arizona 861 وعقل أو نباتات صغيرة مطعومة بالبرعم من طراز S-1 كلاهما يستعمل باستمرار كاف لتكنيك الفهرسة ولكن في الوقت الحاضر يفضل استعمال عقل من S-1.

إن أعراض الإصابة بفيروس اكسوكورتز الحمضيات على سترون أريزونا 861 أو S-1 تشمل الإصفرار ثم تدلى الأوراق الحديثة والمتكشفة الجديدة، تفلن العرق الوسطى (يظهر بقع فلينية) والعروق الجانبية الكبيرة على السطح البطني للورقة ويظهر بقع عمودية مستقيمة على الساق.

في ربيع سنة ١٩٨٥ أخذت عقل من السترون S-1 مصابة بعزلة شديدة من فيروس اكسوكورتز الحمضيات إحتفظ بها في الصوبا الزجاجية لأكثر من سنة. هذا الاحتفاظ أعطى فرصة للعقل المصابة بأن تزهر وتعد الثمار هذه الحالات لم تلاحظ قبل ذلك. عند فحص وملاحظة تركيبات الأزهار والثمار في النباتات المصابة تبين ظهور أوضاع غير طبيعية في هذه الأعضاء لم تكن ملاحظة من قبل ولم تذكر المراجع بأنها ترافق الإصابة بفيروس اكسوكورتز الحمضيات.

لقد وصف الشكل الخارجى لازهار الحمضيات السليمة وهو ظاهر في شكل ٤٥. في الازهار السليمة الطبيعية يفتح التويج بنظام التفتح القاعدى وتبقى قواعد البتلات ملتصقة مع قاعدة الكأس حتى بعد التلقيح. أما في النباتات المصابة فإن معظم الأزهار تتميز عن طريق بقاء التويج سليماً قبل أو أثناء أو بعد التلقيح ولا تتفتح البتلات طبيعياً، وبدلاً من التفتح الطبيعى تبقى ملتصقة في قمة التويج وينطلق التويج بأكمله من القرص الزهرى كلما تكشف وكبر المبيض. تنفصل البتلات عند قاعدة التويج وأحياناً تتسع تدريجياً إلى حد ما بحيث تأخذ شكل النجمة، ويسبب جفاف النصف العلوى من التويج فإنه يشكل غطاء على شكل

فنجان يغطي النهاية القلمية في الثمار غير الناضجة بحيث يبقى عدة شهور (شكل ٤٥، B).

مع أنه لا يوجد دراسات تشريحية على هذه الأوضاع، إلا أنه يحدث اضطرابات في تركيب الزهرة وفي تكشف المبيض ويظهر ثمار ناضجة وأخرى غير ناضجة ولكن كليهما بنضج غير طبيعي. مع أن الكأس في الأزهار المصابة يظهر وكأنه طبيعي التركيب، إلا أنه يكون أضيق من الوضع الطبيعي وهذا يؤدي إلى الافتراض بأن الكأس يكون أكثر التصاقاً مع الجزء العلوي من القرص الزهري شكل (٤٥، c) أكثر مما هو موجود في الأزهار العادية السليمة. وفي الحقيقة فإن هذا الالتصاق قد يكون محكم جداً ومقيداً للتكشف الطبيعي للبويضات والمبيض. كلما تكاثرت الخلايا وتوسعت تأخذ مكان في عملية تكوين الهسبريديم الناضج شكل ٤٦. يبدو أن هذا الانطباق يكون مركزاً على قمة السبلات وبالتالي يحدث تقريباً في منتصف البويضات أو المبيض إنقباض يكون هذا الانقباض شديد أحياناً وبسيط أحياناً أخرى (شكل ٤٧) ويكون دائماً مساوياً لتأثير تخليق شديد في الحالات الشديدة. الاستجابة النهائية لتأثير هذا التخليق تكون بحيث تأخذ الثمرة الشكل المشوه بدرجات مختلفة ويكون ذلك على شكل الساعة الرملية (شكل ٤٧) وهو أكثر الأعراض شيوعاً. يكون النصف القلمي للثمرة أصغر من المنتصف الساقى للثمرة وفي بعض الحالات يكون أكثر كثيراً. أيضاً فإن بعض الثمار يكون موجهاً بشكل قائم على المحور، البعض الآخر من الثمار ينحرف عن هذا الوضع القائم عن النصف القلمي ثم تنحني الثمرة عن المستوى المتعامد. تكون الثمار المصابة بشكل عام أصغر من الثمار السليمة وتميل لأن تأخذ اللون الأصفر قبل النضج. أما الثمار المصابة بشدة يمكن أن تأخذ ربع حجم الثمار العادية. إذا عمل مقطع طولي أو عرضي في الثمار المصابة يبدو واضحاً أن البويضات تكون قد أصيبت (شكل ٤٨). وعلى أية حال فإن الثمار المصابة تكون صغيرة ومشوهة ويمكن أن تحتوي

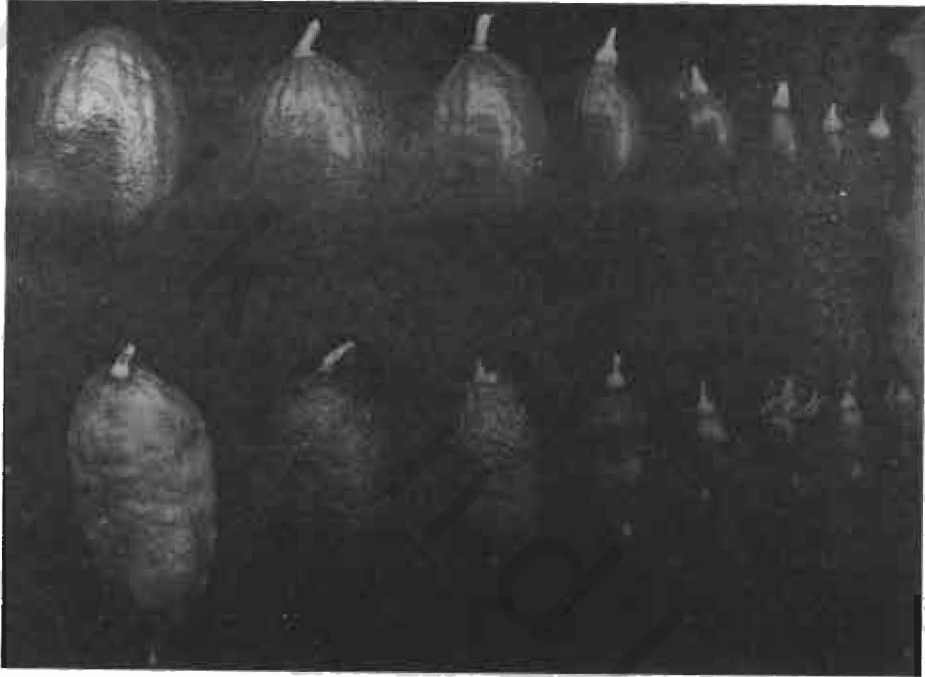
أكثر من ١٠٠ بذرة صغيرة بدائية والتي لن تتكشف إلى بذور طبيعية مهما طال بها الزمن. وعلى النقيض من ذلك فإن الثمار المصابة بشكل معتدل عندما تصل إلى طور النضج تصل إلى طول حوالى ١٠ سم ويكون فيها ٢٠٪ من البذور سليمة، هذه البذور تكون جاهزة للإنبات وتنتج نباتات سليمة بدون ظهور أعراض. أما البقية الباقية من البذور والتي هي ٨٠٪ لن تنمو أكثر من ٢ ملم وهذه البذور البدائية لن تتكشف إلى بذور عادية كما سبق وذكرنا. جميع المحاولات التي تبذل لتسهيل إنبات البذور المأخوذة من نباتات مصابة بشدة بفيروس اكسوكورتر الحمضيات أو بعزلات معتدلة منه فشلت فى إنتاج نبات سواء فى التجارب المعملية أو فى الطبيعة. الثمار السليمة S-1 يكون فيها عديداً من البذور الحوية والتي تنمو فعلياً بنسبة ١٠٠٪. وبالتالي فإن توقف نمو البذور فى سترون S-1 يبدو وأنه مظهر مهم فى تفهم أوضاع البذور الشاذة لأن هذه البذور يجب أن تكون مصابة بدرجة كبيرة وبالتالي فإنها على الأقل تشارك ولو جزئياً فى غياب أو الانخفاض الكبير فى حدوث الانتقال بالبذور للفيروس CEVd.

إن هذه الأعراض المذكورة سابقاً لم تؤثر على أى نوع تجارى يزرع من الحمضيات ويصاب بالفيروس CEVd. وفى الحقيقة فإن قوة الشجرة بالإضافة إلى حجم الثمار ونوعيتها لا يبدو بأنها تتأثر عندما يكون الفيروس موجوداً فى أصول متحملة للمرض. كذلك لم يلاحظ أى من هذه الأعراض المذكورة سواء على أشجار سترون S-1 السليمة النامية من عقل أو الأشجار المحقونة بفيروس Citron Variable Viriod والذي تتميز الإصابة به على شكل أعراض على المجموع الخضرى تكون بسيطة، مع ذلك تكون مشابهة للأعراض المنتجة بواسطة CEVd، وبالتالي فإن التعبيرات بالأعراض المرضية المذكورة فى الأزهار والثمار يمكن أن يعتقد بأنها متخصصة بالإصابة بالفيروس CEVd.



شكل رقم ٤٥ :

- A : زهرة سترون سليمة طبيعية.  
B : زهرة غير طبيعية للسترون من نباتات مصابة بفيروس CEVd.  
C : المدقة (اليسار) مرتبطة مع الكأس وقاعدة قرص الزهرة غير الطبيعي من زهرة سترون مصابة بالفيروس وغير طبيعية. (أما اليمين) فإنه نفس التركيب لزهرة سليمة. الأسهم تشير إلى شفة الكأس.



شكل رقم ٤٦ :

الملوى: تطور نمو ثمار السترون السليمة من اليمين إلى اليسار.  
السفلى: نفس تطور الثمار ولكن مصابة بفيروس أكسوكورتز الحمضيات.



شكل رقم ٤٧ :

أمثلة من التشوهات والاضطرابات التي تحدث في ثمار السترون في مراحل إصابة مختلفة.  
تسبب مرضية للفيروس أكسوكورتز الحمضيات.



شكل رقم ٤٨ :

A : مقاطع طولية في ثمار الحمضيات مصابة بالفيرويد CEVd مظهرة مراحل مختلفة من درجات التشوه ونقص في عدد البذور وحيويتها مع زيادة شدة التشوه.  
B : مقطع طولى في ثمار سليمة .

### التغيرات في جدار الخلية نتيجة الإصابة المرضية:

تتميز الخلايا البرانشيمية الحديثة في قمم الأوراق من النباتات السليمة *Gynura aurantiaca* بجدر خلوية ذات مقطع جانبي منتظم وسماكة منتظمة (شكل ٤٩، b) كما ينعكس ذلك بواسطة المقارنة في (شكل ٥٠). إن جدر الخلية في مناطق المقارنة في الأوراق المصابة بالفيرويد CEVd تشوه بشكل كبير منتجة شكل غير منتظم في الخلايا في هذه المناطق من النسيج المصاب. المقاطع الجانبية لجدر الخلية المتناظرة تظهر متجمدة وذات سمك غير منتظم (٤٩، a، c). على المقابل من هذه الجدر الخلوية الشاذة يظهر أحياناً حزم عريضة متوجهة في منطقة الصفیحة المتوسطة حتى في الحالات التي يكون فيها جدار الخلية نفسه غير مشوه، هذه التغيرات في جدار الخلية عادة ما تؤدي إلى تشوه في التركيب وقساوة في الخلايا نفسها. كذلك فإن الإصابة الفيرويدية يمكن أن تغير شكل البلاستيدات الخضراء والأنوية.

### التغيرات المرضية في الأغشية الخارجية للبلازمودسيمات:

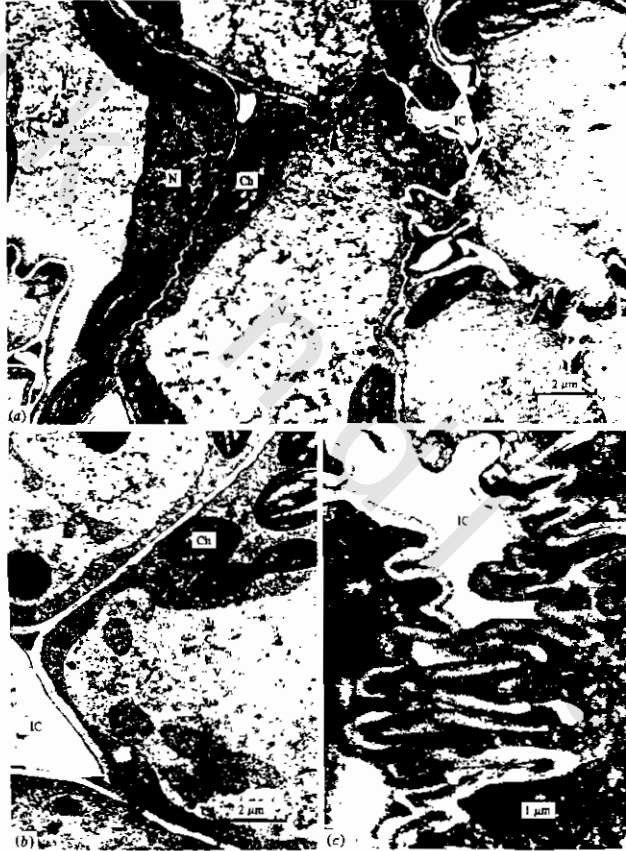
#### Pathological Changes of Plasmalemmasomes

إن ال Plasmalemmasomes سوف نرسم لها بحروف (PMS) هي عبارة عن بروزات من ال Plasmalemma في السيتوبلازم وتسمى أيضاً الغشاء الخارجى للبلازماليمما. وهي تظهر بحيث تكون طبقة من الأغشية مضاعفة وتتكون من



البلازما ليما Plasmalemma وتونوبلاست وهذه التركيبات PMS توجد بشكل عام في جميع أنواع الخلايا الحديثة المتكشفة شاملة عناصر الأنايب الغربالية - القصبيات - الخلايا المرافقة والخلايا البرانشيمية في اللحاء والخشب والخلايا الكولنشيمية في الميزوفيل والايديرمز.

قبل أن نتكلم عن تأثير الفيرويد على ال PMS نذكر الوضع السليم لهذه المناطق ثم نقارن ذلك مع الوضع في حالة الإصابة بالفيرويد.



شكل رقم ٤٩ :

صورة الكترونية للخلايا البرانشيمية من نسيج ورقة سليمة (b) ومصابة بالفيرويد CEVd

شكل (a, c) على نباتات *G. aurantiaca*. Ch = كلوروبلاست. IC = فجوات بين

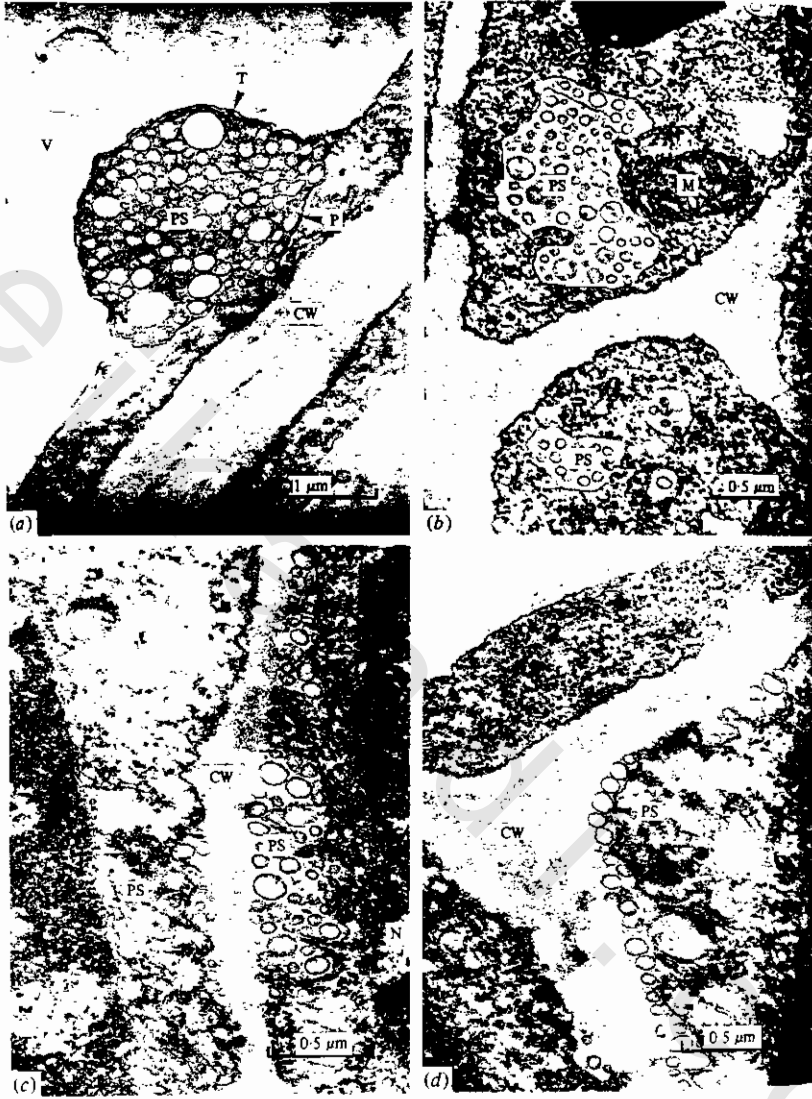
خلوية. N = نواة. V = فجوة في خلية النبات.

## ١ - ال PMS فى النسيج السليم:

يمكن تقسيم ال PMS بالاعتماد على التركيب الداخلى إلى نوعين مميزين، الأول يسمى حوصلى والثانى أنبويى، كلاهما موجود فى نبات *G. aurantiaca* السليم. يتميز النوع الحوصلى بوجود حوصلات داخلية مصفوفة بانتظام، متوسط قطرها ٩٠ نانومتر وتكون مملوءة بمواد متغايرة بشكل بسيط. تتشكل هذه التراكيب بحيث تكون وسيطات ذات أشكال مختلفة من الشكل الكروى المنضغط أو تتكون بشكل تركيبات منبسطة بين البلازمليما وجدار الخلية وهذه تكون سهلة الاكتشاف. ويمكن أن تكون موجودة بشكل آخر بحيث تكون على شكل طبقات مضاعفة أو مفردة من الحوصلات توجد فى الخلايا الحديثة حيث يلاحظ زيادة فى سماكة الجدار فى الخلية. يمكن أن يظهر فى المقاطع المتسلسلة فى الخلايا أن ال PMS يمكن أيضاً أن تتواجد بشكل منفصل عن جدار الخلية وحررة فى السيتوبلازم.

أما ال PMS الأنبوية فهى تتصف بأنها مجموعة مفككة من تركيب الأنابيب الداخلية. هذه الأنابيب تكون بشكل عام مصفوفة بطريقة مكثفة ومتوسط قطرها ٥٠ نانومتر. فى كثير من ال PMS الأنبوية فإن جزءاً من التركيب الداخلى يصبح مقلوباً إلى كثافة الكترونية وحييات Paramural. هذا يعنى أن ال PMS تكون محببة. هذه المادة ذات الكثافة الالكترونية يمكن أيضاً أن تصبح موزعة فوق مساحة كبيرة من البلازماليمما وجدار الخلية وهذا يؤدى إلى القول أن ال PMS تكون فارغة وذات تركيب منتكس ببطء. كثيراً من ال PMS تظهر ذات أغشية داخلية عديدة الطبقات.

هناك ملاحظتين يجب الاهتمام بهما فى هذا الموضوع، الأول: - إن ال PMS الحوصلية والأنبوية لا يتواجدان فى وقت واحد فى نفس العينة النباتية. الثانية: - ضمن العينة النباتية الواحدة فإن المناطق المختلفة يمكن أن يكون بها اختلافات واضحة فى عدد وتوزيع هذه ال PMS وبالتالى فإن سلسلة من المقاطع الرقيقة يمكن أن تجرى فى المكان وغالباً يصعب اكتشاف ال PMS، إلا أنه بعد



شكل رقم ٥٠ :

صورة الكترونية دقيقة للبلاسماليماسومز الوعائية في أنسجة سليمة من نباتات *G. aurantiaca*. تكون الأوعية مغلقة في شكل دائري (a) الذي يمكن أيضاً أن توجد ضمن السيتوبلازم (b). في المناطق التي زاد فيها سمك جدار الخلية تكون الأوعية مرتبة بتضاعف (c) أو طبقات مفردة (d).  
 CW = جدار الخلية. M = ميتوكوندريا، P = بلازماليماء، PS = بلاسماليماسوما، T = تونوبلاست،  
 V = فجوة.

إجراء عدة مقاطع فإن هذه التركيبات يمكن أن تظهر ثانية ولكن ليس أكثر من ستة منها يمكن أن تلاحظ في المقطع الواحد. ولكي نحصل على معلومات كثيرة عن هذه الـ PMS يكون ذلك فقط إذا أجرى عدد كبير من المقاطع الرقيقة من نباتات مختلفة تحت الاختبار.

### أل PMS فى نسيج الورقة المصابة بالفيروس CEVd :

إن الـ PMS فى نسيج الورقة المصابة بالفيروس CEVd تختلف بشكل كبير فى شكلها وتركيبها الداخلى عن تلك الموصوفة فى الأوراق السليمة. فى جميع الحالات حيث أن التركيب الداخلى الحوصلى يمكن أن يتحقق ويرى بالتجربة فتظهر هذه التركيبات فى الخلايا المصابة بعدم إنتظام واضح فى حجمها - شكلها وعددها. بسبب هذه الانحرافات فإن الشكل الكلى لـ PMS يصبح أيضاً غير منتظم.

أما الـ PMS الأنوبية فى الأوراق المصابة يظهر فيها اضطرابات كثيرة فى الأنابيب الداخلية التى يبدو وكأنها مطحونة مع بعضها. العناصر التركيبية يكون لها كثافة الكترونية ثقيلة، وبالتالى فإن الـ PMS الأنوبية المشوهة يكون بسهولة أن ترى قريبة من أكثر جدر الخلية نفاذية وقريبة من السيتوبلازم.

يلاحظ فى كثير من الأحيان نوع واحد من الـ PMS مشوهاً فى النباتات المصابة بالفيروس ويصعب اكتشاف إنتشار التركيبات الداخلية من الـ PMS بين البلازمالما وجدار الخلية كما هو فى النسيج السليم. يجب التأكد أنه فى الإصابة الفيروية فإن الأوراق الحاملة أعراض يظهر فوق جدار الخلية فيها مناطق تبدو سليمة وكذلك فوق الـ PMS، هذا يدل على أنه فى الأوراق ذات مظهر الإصابة العام فإن مناطق من النسيج السليم يمكن أن تتواجد على سطح الورقة.

لا تظهر تغيرات محدثة بواسطة الإصابة الفيروية فى تركيب كل من الأنوية، الميتوكوندريا، الرايوسومات، المكروسومات وجهاز الغشاء السيتوبلازمى. أحياناً فإن

بلاستيدات خضراء مع أجسام غير منتظمة ذات كثافة الكترونية تتواجد في الأوراق المريضة. ومن المهم أن نذكر هنا أن هذه الانحرافات تمثل أيضاً أكبر الأعراض الخلوية في نباتات *G. aurantiaca* المصابة بفيروس الثمرة الباهتة في الخيار.

تأثير الإصابة بفيروس اكسوكورتز الحمضيات على إنتاج الأثيلين:

إن فيروس اكسوكورتز الحمضيات يمكن أن ينتقل إلى نباتات الطماطم و *Gynura*. كلما تقدم المرض فإن الأعراض تتميز بالتقزم وتدلى الورقة وتشوهاها. أعراض الإصابة الفيروسية في الطماطم تفترض حدوث اضطرابات في عمليات تنظيم الأثيلين لنمو وتكشف الأوراق. لقد افترض بأن الأثيلين يدخل في تكشف استجابة النبات العائل للفيروسات. لقد وجد أيضاً أن الإصابة بفيروس CEVd تحدث زيادة في إنتاج الأثيلين في نبات *G. aurantiaca* وكذلك يكون هناك زيادة إنطلاق الأثيلين في نباتات الطماطم وهذا يتسبب عن زيادة الحث على إنتاج-1) aminocyclopropane - 1 - carboxylic acid ويرمز له ACC وحيث أن ACC وسيط في إنتاج الإثيلين كما في:



إن مركب SAM هو S - adenosylmethionine .

كذلك فإن ACC يمكن أن يمثل إلى شكل متحول غير طيار Non - Volatil يعرف في عديد من الأنسجة على أنه N - malonyl ACC. إن أعراض الإصابة والتعبيرات التي تظهرها النباتات المصابة تبدأ من قمة الأوراق المتدلية في الأوراق القمية والتي لا تلبث أن تتجدد وتشوه بشدة كلما تدخلت الإصابة الفيروسية مع عملية الكشف الطبيعية. يمكن تلخيص تأثير الفيروس على إنتاج الأثيلين في الآتي:-

١ - إن التفاعل الجهازي لنباتات الطماطم ونباتات *Gynura* مع فيروس CEVd يكون متبوعاً بزيادة ليس فقط في إنتاج الأثيلين ومستويات ACC ولكن

أيضاً يكون متبوعاً بزيادة تجمع أل ACC المتحول كما يحدث فى بناء الاثيلين فى أوراق الدخان المصابة بفيرس موزايك الدخان، الذى يحدث تفاعل الحساسية الفائقة .

٢ - إن تشجيع بناء ال ACC يمكن أن يعتبر نتيجة للزيادة الثابتة فى إنتاج الاثيلين، هذا الثبات يكون فى المستوى المضطرب من ACC الحر ومن زيادة تجمع ACC المتحول .

٣ - إن زيادة تجمع ACC المتحول يؤدى إلى القول بأن هذا يكون أقل هجرة من الزيادة الكبيرة فى كمية ACC المنتجة بواسطة الإصابة الفيرويدية .

٤ - خلال الأعراض المبكرة يزداد بناء ال ACC ويبقى ثابتاً خلال تشكف الأعراض ولكن لا يكون هناك إختلافاً فى كفاءة الانقلاب فى ال ACC إلى أثيلين بين الأنسجة السليمة والمصابة بالفيرويد .

٥ - فى أوراق نباتات الطماطم المظهرة أعراض جهازية للإصابة بالفيرويد يكون هناك تشجيع على إنتاج مستويات عالية من ACC وتشجيع على إنتاج الاثيلين فى نسيج ورقة الطماطم .

٦ - الفيرويد CEVd يسبب زيادة فى إنتاج ACC فى أوراق الطماطم ويسبب تشوهات فى جدار الخلية وتغير فى تركيب هذا الجدار ويمكن أيضاً أن يحدث تغير فى الغشاء البلازمى وهذا يكون له دور فى إنتاج ACC حيث ذكر Anderson et al سنة ١٩٨٢ أن أل Cellulysin وبقايا الجدار المهضوم للخلية تستطيع أن تشجع زيادة إنتاج الاثيلين .

**علاقة البولى أمين مع الإصابة بفيرويد CEVd وهل يمكن استعمال ال Putrescine فى مقاومة CEVd ؟؟**

أجريت تجارب على مستويات البيوترسين Putrescine ، سبيرميدين Spermidine والسبيرماين Spermine (وهى أكثر مركبات البولى أمين إنتشاراً فى أنسجة النبات)

فى أنسجة النبات المصابة بالفيرويد CEVd أو المعاملة بنترات الفضة أو مركب الايتافون (2-chloroethyl phosphonic acid) مقارنة مع النباتات غير المصابة. وكذلك درس تأثير مثبطات بناء الاثيلين أو فعله على مستويات البولى أمين وكذلك تأثير الإضافات الخارجية من البولى أمينز على مجموعة الأعراض المرضية المتسببة عن الفيرويد CEVd ونشاط ال Protease المحدث بواسطة المعاملة بأيونات الفضة فوجد ما يلى :-

١ - تسبب الإصابة الفيرويدية زيادة فى إنتاج الاثيلين فى نباتات العائل وتشجع تجمع ما يسمى PR proteins (Pathogenesis related) وإن الزيادة فى إنتاج الاثيلين تفوق نقص محتويات ال Putrescine فى النباتات.

٢ - معاملة نباتات Gynura بمادة  $AgNO_3$  أو الايتافون تنتج تأثيرات مشابهة لتلك المحدثه بواسطة الإصابة بالفيرويد CEVd متضمنة زيادة فى إنتاج الاثيلين. إن التأثيرات المشابهة لتأثيرات الفيرويد المتسببة عن أيونات الفضة تعزى لمقدرتها على اطلاق الاثيلين المصنع فى نباتات Gynura. إن زيادة إطلاق الاثيلين يقلل كمية ال Putrescine.

٣ - هناك تأثيرات مشابهة تنتج بواسطة الايتافون والمركبات المطلقة للاثيلين.

٤ - إن مجموعة الأعراض الشبيهة بأعراض الفيرويد والمتسببة عن نترات الفضة فى نباتات Gynura قد أوقفت بواسطة مثبطات بناء الاثيلين AVG (amino ethoxyvinyl glycine) ومثل amino oxy acetic acid أو  $Co^{2+}$  أو بواسطة مثبطات فعل الاثيلين Norbornadiene حيث تمنع استنزاف ال Putrescine بدون أن تؤثر على بناء الاثيلين، هذا يدل على أن العلاقة بين زيادة بناء الاثيلين ونقص البتروسين ليس بسبب المنافسة البنائية لمادة S-adenosylmethionine. وقد وجد أن الاثيلين والبولى أمين تشترك فى بناء ال S-adenosylmethionine بىادئ مشترك فى طريقة بناء الاثيلين والبولى أمين.

٥ - يحدث نقص في مستوى الـ Putrescine في أنسجة الورقة المصابة بالفيرويد أو المعاملة بنترات الفضة أو الايتافول ولم يكن هناك تأثير معنوي على مستويات كل من Spermidine أو Spermine وهذا يؤدي إلى القول بدخول البولى أمين في تفاعل العائل مع الفيرويد. إن هذا الخفض في محتوى الـ Putrescine هو خطوة إشارية في تحويل سلسلة تفاعل تؤدي إلى استجابة النبات للإصابة. هذا يمكن أن يستنتج مما وجد بأن تعويق النقص في مستوى الـ Putrescine خلال الإضافات الخارجية من بعض المركبات تمنع التعبيرات المنتجة بواسطة الفضة والتي تشبه أعراض الفيرويد (مثل تشوه الورقة، تثبيط نمو الجذر، تجمع PR proteins وتشجيع تحليل البروتينات المرافقة مع استجابة النبات).

إن زيادة إنتاج الاثيلين تكون مسؤولة عن النقص في مستوى الـ Putrescine وهذا قد تأكد مع نتائج الأبحاث التي ذكرت بأن أنزيم-Arginine decarboxylase، الأنزيم الرئيسى المسئول عن بناء الـ Putrescine في النباتات قد تثبط بواسطة الاثيلين بتركيزات فسيولوجية.

٦ - إن تكشف الأعراض الشبيهة بأعراض الفيرويد وإنتاج بروتينات متعلقة بالمرضية والزيادة في نشاط الـ Protease المحدث بواسطة أيونات الفضة كلها اوقفت بواسطة الإضافة الخارجية من الـ Putrescine.

في النهاية نستطيع أن نجاب على هذا السؤال الذى هو عنوان هذه المقالة وهو هل يمكن استعمال الـ Putrescine في مقاومة الفيرويد؟؟ نستطيع أن نقول نعم ولكن الأبحاث المستقبلية هي التى نتائجها ستوافق معنا أم لا.

**إحداث بروتينات لها علاقة بالمرضية بواسطة CEVd :**

لقد وجد أن البولى بيتايد Polypeptide المرافقة للإصابة الفيرويدية ليست متخصصة بالفيرويد ولكنها تنتج من التغيرات التى يحدثها المرض فى ميتابولزم العائل. هذه الحقيقة شجعت الباحثين على البحث عن بروتينات من الممكن أن يكون لها دور فى الاستجابة المرضية.



لقد أمكن اكتشاف عشرة PR Proteins في نباتات الطماطم المصابة بفيروس CEVd واحد منها ذو تأثير حامضي والتسعة الآخرين ذات تفاعل قاعدي. إن هذه البروتينات يمكن إنتاجها بواسطة (باستثناء رقم عشرة C 10) معاملة أوراق الطماطم بنترات الفضة أو بمحلول الايتافون. وهي كذلك تنتج مترافقة مع أعراض التحلل الموضعي والأعراض الجهازية والإصابة الفيرويدية. ولقد ثبت بأن تجمع هذه البروتينات لا علاقة له بتحلل الخلية النباتية أو موتها. كما وأن حقيقة أنه لا يوجد PR Proteins في أنسجة الورقة الملاصقة لتلك المعاملة بالاييتافون يدل على أنه لا البروتينات نفسها ولا أية أنواع كيميائية أخرى تشجع تكوين PR Proteins حيث أنها تهاجر من مكان الجرح إلى الأنسجة السليمة بكميات يمكن تقديرها. وبالتالي فإن تأثير الايتافون في الطماطم موضعي جداً في حين أنه في الدخان يكون جهازياً، لذلك فإن المعاملة بالاييتافون تحدث أعراض شبيهة بأعراض الفيروس وتتشجع تراكم PR Proteins. هذا يؤدي إلى القول بأن الايثيلين داخل في تكشف تفاعل النبات وتكوين PR - Proteins بعد الإصابة بالفيروس CEVd واستجابة للمعاملة بأيونات الفضة.

ولقد ثبت بأنه لا يوجد علاقة خاصة بين إنتاج PR Proteins وتفاعل الفيروس مع العائل، زيادة على ذلك فإن هذه البروتينات كلها تتكون في النباتات التي وصلت طور الشيخوخة وأنها وسيطات في إنتاج الايثيلين. بعض هذه البروتينات مقاوم للهضم بأنزيمات Trypsin و chymotrypsin - 8.

#### تأثيرات مضاد الفيروس Ribavirin :

بالرغم من الأهمية الاقتصادية والأضرار التي تحدثها الأمراض الفيرويدية والتقدم الكبير في علم الفيروسات إلا أنه لا يوجد طرق علاجية فعالة لمقاومة الإصابة الفيرويدية لغاية ١٩٩٤ (حسب معرفة المؤلف). ظهرت بعض التقارير أهمها إثنان فقط تبحث المقاومة الكيميائية للأمراض الفيرويدية. الأول بحث في استعمال بعض المواد الكيميائية في مقاومة مرض الدرنة المغزلية هذه المادة اسمها Piperonyl butoxide ويرمز لها (C<sub>19</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>). وكذلك اقترح استعمال مادة putrescine في

مقاومة فيرويد اكسوكورتز الحمضيات. ولقد ذكر العالم Conejero سنة ١٩٨٢ طريقة في مقاومة مرض اكسوكورتز الحمضيات تعتمد على استعمال نترات الفضة والاثيلين ولكن لم يكتب لها النجاح لعدة إعتبارات.

أما التقرير الثانى عن المقاومة الكيماوية للفيرويدات تكلم عن استعمال مادة الريبافارين Ribavirin واسمه الكامل (1 - B - D - ribofuranosyl - 1, 2, 4 - triazol - 3 - carboxamide) هذا المركب ذو تأثير واسع ضد الفيروسات وقد تبين أن له تأثيراً مشبهاً لتناسخ أعداد ال DNA فى النبات والحيوان وكذلك RNA الفيروسى سواء فى المعمل أو فى الطبيعة. ولقد أجريت دراسة لتحديد مدى قدرة هذه المادة فى حفظ أو التأثير على الإصابة بفيرويد CEVd فى نباتات *G. aurantiaca*.

لقد وجد أن استعمال ال Ribavirin على النباتات المظهرة أعراض إبتداءً من يوم ٢٥ بعد الحقن أدى إلى خفض تدريجى فى شدة الأعراض فى كثير من الأوراق المتكونة حتى تلك المتكونة بحوالى ٣ أسابيع بعد إبتداء المعاملة، أظهرت قليل وأحياناً لم تظهر أعراض. جميع التركيزات المستعملة من ال Ribavirin بين ٣٠ - ١٤٠ ملغ / لتر كانت ذات فعالية متساوية على الفيرويد. أما عند الرش بمادة Tween (كنترول) لم يظهر لها تأثير على تكشف أو نمو النبات (شكل ٥١).

إن الشفاء من المرض وقلة التأثيرات السامة عند المعاملة بال Ribavirin يعود ذلك إلى غياب مكونات بعض البروتينات التى عادة ما تكون مترافقة مع المرض مثل P<sub>2</sub> و P<sub>1</sub> وكذلك غياب أى تغيرات فى سلوك البروتين التى يمكن أن تعزى إلى شدة المرض وإجهاد النبات.

فى تجارب أخرى استعمل فيها ال Ribavirin على النباتات بثلاثة أيام قبل الحقن ففى هذه الحالة فإن هذه المادة أوقفت تكشف أو حدوث المرض وظهرت النباتات سليمة ولم يمكن استرجاع الفيرويد ثانية ولم تثبت له أية حيوية. يمكن أن يفسر ذلك عن طريق عدم وجود زيادة فى ال P<sub>2</sub> و P<sub>1</sub> عديدات الببتايد.

أما المعاملة بتركيزات أقل من ٣٠ ملغ / لتر فإنها لم تكن فعالة، بينما

السمية Phytotoxicity وتقزم وتدلى الورقة تحدث مع المعاملات على تركيزات ١٦٠، ١٨٠ و ٢٠٠ ملغ / لتر.

يمكن تلخيص ما سبق بأن المعاملة بمادة Ribavirin تسبب خفض شديد في محتوى الفيروس في أنسجة العائل. ونظراً لأن الحيوية والمرضية لجزيئات الفيروس خارج النبات لم تتأثر بواسطة التعريض المباشر لمادة Ribavirin وبالتالي فإن التأثير يكون بسبب تأثير هذه المادة على عملية تناسخ الفيروس.

مع أن الميكازم الدقيق لفعل مادة Ribavirin غير معروف بالضبط، إلا أنه يمكن القول بأن فعل هذه المادة يمنع بناء الحمض النووي الفيرويدي عن طريق تثبيط بناء نيوكليوتيدات الجوانين Guanine. ونظراً لأن CEVd غنياً نسبياً بهذه النيوكليوتيدات Guanosine فمن الممكن تخيل أن الـ Ribavirin يؤثر على تناسخ الفيروس بأكثر شدة من تأثيره على إنتاج الحمض النووي في العائل. هذا يمكن تأكيده بالاعتماد على حقيقة أن المادة المذكورة تخفض بشدة مستويات الفيروس بدون إحداث تأثيرات سامة.



شكل رقم ٥١ :

استعمال الـ Ribavirin في مقاومة فيروس اكسكورتز الحمضيات الذي يهاجم نباتات *G. aurantiaca*. a = نباتات مصابة غير معاملة، b = نباتات مصابة بالفيروس ومعاملة بالرايبافارين. c = نباتات غير مصابة بالفيروس ومعاملة بالرايبافارين. كان يستعمل الرايبافارين رشاً على الأوراق بنسبة ٥٠ ملغ / لتر ابتداءً من ظهور أعلى كثافة من الأعراض على النبات (٢٥ - ٣٠ يوم بعد الحقن) ويكرر الرش كل ٤ أيام لمدة ٢٠ يوم.

## الوقاية بالتضاد في فيروس اكسوكورتز الحمضيات

### ١ - الوقاية بالتضاد بين سلالتين من فيروس CEVd :

في عمليات حصر أجريت لتعريف الصفات البيولوجية لعدد من عزلات فيروس CEVd أخذت من مصادر حقليّة، فتبين أن هناك عزلات تحدث تفاعل شديد من أعراض الاكسوكورتز في نبات السترون وهو الأترج *Citron medica* مأخوذة من الحمضيات. في حين أن هناك عزلة من الفيروس تحدث أعراض معتدلة على نبات *G. aurantiaca* وقد اكتشفت هذه العزلة في نبات السترون ووصفت بأنها سلالة معتدلة من الفيروس CEVd على نبات السترون وذلك اعتماداً على حجمها وتمائل قواعدها واعطيت اسم CEVd - 129 .

أجرى إختبار الوقاية بالتضاد بين العزلة CEVd - 129 كعزلة واقية (حافضة) ضد السلالة المتحدية وهي السلالة الشديدة من CEVd على نباتات *Gynura* . وجد أن السلالة المعتدلة من الفيروس CEVd - 129 يمكن أن تكسب النبات وقاية مظهرية ضد السلالة المتحدية الشديدة. هذا التأثير الوقائي يكون على درجات والتي يتراوح بين تأثير بسيط في إظهار الأعراض من قبل السلالة الشديدة إلى وقف تام لظهور هذه الأعراض. إن مستوى هذه الوقاية يعتمد على طول الفترة بين الحقن بالسلالة المعتدلة والسلالة الشديدة. في جميع الحالات فإن تأثير حفظ النبات بواسطة السلالة المعتدلة ضد السلالة الشديدة كان مؤقتاً وذلك نظراً لأن الأعراض وتركيز الفيروس يزداد بشكل كبير بالنسبة للسلالة الشديدة كلما قلت الفترة بين الحقنتين والذي يعكس سيطرة هذه السلالة عند إجراء حقن مختلط من السلالتين في وقت واحد، لذلك حتى تتم الاستفادة من هذه الظاهرة يجب إطالة الفترة بين الحقنة بالسلالة المعتدلة والسلالة الشديدة، حتى يكون هناك فرصة كافية لتناسخ السلالة المعتدلة.

### ٢ - الوقاية بالتضاد بين فيروس CEVd وفيروس PSTVd :

هناك دراسة لمعرفة تأثير الوقاية بالتضاد بين فيروس اكسوكورتز الحمضيات CEVd وفيروس الدرنة المغزلية في البطاطس PSTVd. أجريت عدة تجارب

على نبات *G. aurantiaca* ونباتات طماطم *L. esculentum* حيث حقن النباتين بسلاطات شديدة من فيروس CEVd وسلاطات شديدة أيضاً من فيروس PSTVd ثم لوحظت النباتات واكتشفت الفيروسات بطريقة PAGE فوجد أنه عندما تحقن نباتات *G. aurantiaca* بالفيروسين كل لوحده فإن هذه النباتات المحقونة يظهر عليها أعراض شديدة بواسطة CEVd وأعراض بسيطة بواسطة PSTVd وكذلك فإن CEVd يتجمع بمستوى أعلى منه في حالة PSTVd، بينما عندما حقنت نباتات الطماطم بالفيروسين كل على حدة فإن كل فيروس أعطى أعراض شديدة (إلا أن التفاعل كان أكثر شدة وكفاءة بواسطة PSTVd منه في حالة CEVd) وكذلك فإن مستوى تجمع PSTVd كان أعلى بكثير منه في حالة CEVd.

عند حقن نباتات *G. aurantiaca* بالفيروسين معاً فإن الأعراض التي تظهر تكون مميزة للفيروس CEVd وهو الفيروس الوحيد الذي يمكن اكتشافه في النبات. أما عند حقن نباتات الطماطم بالفيروسين معاً فإن الأعراض الملاحظة على نباتات الطماطم تأخذ الأعراض النموذجية للإصابة بالفيروس PSTVd وهو الفيروس الوحيد الذي يمكن إسترجاعه ثانية من النبات.

ومن ناحية أخرى عندما حقنت نباتات *G. aurantiaca* بفيروس PSTVd أولاً ثم حقنت بعد ذلك بمدة أسبوع بفيروس CEVd، فإن أعداداً من النباتات أظهرت أعراض مميزة للإصابة الشديدة بالفيروس CEVd وكلا الفيروسين كان موجوداً في المستخلص النباتي وهناك أعداداً أخرى من النباتات أظهرت أعراض السلالة المعتدلة للإصابة بفيروس PSTVd وهو الفيروس الوحيد الذي يمكن عزله منها. وعلى أية حال عندما قطعت قمم النباتات المحفوظة بالتضاد فإن الأفرع الجديدة أظهرت أعراض شديدة للإصابة بالفيروس CEVd فقط وهو الفيروس الوحيد الذي يمكن اكتشافه في النبات. هذا يدل على أن كل من PSTVd و CEVd يتنافسان على عوامل محددة في العائل تلزمهما في التناسخ والحركة والتجمع وإن CEVd له قدرة تنافس أعلى في *G. aurantiaca* من الفيروس PSTVd والعكس صحيح بالنسبة لنباتات الطماطم عند حقنها بالفيروس CEVd ثم بعد أسبوع تحقن بالفيروس PSTVd.

## ٢ - مرض ككسيا فى الحمضيات Citrus Cachexia Disease

### مقدمة :-

كان أول ظهور لهذا المرض سنة ١٩٢٨ وكان أول وصف علمى له سنة ١٩٣٤ فى فلسطين وذلك من قبل كل من Reichert و Perlberger على الليمون الحلو *Citrus limettiodes* وكان يطلق على المرض اسم Xyloporosis . يحدث هذا المرض بشكل أساسى على أصول الليمون الحلو وأشجار الشموطى للبرتقال الحلو. الأشجار المصابة تتدهور نوعاً ما وبالتدرج وتصبح غير منتجة خلال بضع سنين. قد يلاحظ أعراض بسيطة على بادرات الليمون الحلو. كذلك فإن المرض يصيب الماندرين Mandarin ولكن لا يصيب الليمون الحامض والكريب فروت. لوحظ المرض سنة ١٩٥٢ على أشجار *C. reticulata* المطعمومة على *C. paradisi* .

يوجد مسبب المرض فى جميع مناطق زراعة الحمضيات فى العالم وهو أكثر أهمية فى مناطق البحر الأبيض المتوسط وفى بعض مناطق البرازيل والأرجنتين حيث يزرع الليمون الحلو وهو الأصل القابل للإصابة بالمسبب. أجريت دراسات عديدة على هذا المرض فى البرازيل والأرجنتين منذ سنة ١٩٥٧. ذكر وجود المرض فى جنوب افريقيا سنة ١٩٥٨. أما فى فلوريدا فكان أول ذكر له سنة ١٩٥٧ .

المرض واسع الإنتشار فى أصناف الحمضيات مثل الليمون الحلو، الماندرين، ليمون الماندرين، التانجالو وليمون *C. macrophylla* . ولقد ذكر أن قليل من بعض

أنواع الليمون الحامض والتانجور وأنواع أخرى من الحمضيات يتكشف عليها أعراض المرض إذا أصيبت بالمسبب المرضي. ظل المرض خطيراً في كثير من بلدان حوض البحر الأبيض المتوسط حتى تم تغيير أصل الليمون الحلو واستعملت أنواع أخرى من الأصول. يكون تأثير المرض على أصول الليمون الحلو أقل على الأشجار النامية في الأراضي الخفيفة ولكن بعض الباحثين ذكر في إسرائيل أن لا علاقة للأصل النامية عليه الشجرة بشدة ظهور الأعراض.

مع أنه لا يوجد معلومات كثيرة عن الأهمية الاقتصادية لأضرار هذا المرض، إلا أنه بشكل عام يسبب تدهور كبير للشجرة وضعف عام وإن الحقل الذي يظهر فيه المرض يتلف بنسبة ١٠٠٪ بعد خمسة سنوات من الإنتشار.

#### الأعراض:

إن تفاعل الحمضيات مع مرض ككسيا يؤدي إلى ظهور مجموعة من الأعراض تتراوح من التنقر البسيط أو المعتدل في الخشب إلى مرحلة متقدمة من تقشر القلف واضطرابات في تكوين الخشب، وتشرب الأنسجة المصابة بالتصمغ. من الصعب التمييز بين أعراض هذا المرض وأعراض الإصابة ببعض الفيروسات الأخرى وهذا يؤدي في كثير من الأحيان إلى أخطاء في التشخيص واختلاف في نتائج بعض الأبحاث. يجب عدم الاعتماد على تنقر الخشب لوحده كعلامة مشخصة للمرض، إلا أن كثير من الباحثين ذكروا بأن أولى الأعراض تظهر على شكل تنقرات في الوجه الخارجي للخشب مع وجود نتوءات متبادلة على الوجه الكامبيومي في القلف. يكون لون قاعدة النقرة وقمة النتوء مائل للبنى. هذه الأعراض تلاحظ على الأشجار من صنف الليمون الحلو بعد تطعيمها بالبرعم بمدة سنة. وفي المراحل المبكرة من الإصابة يمكن أن تظهر الأعراض على الأنسجة القريبة من إتحاد البرعم بالأصل. أخيراً تصبح الثقوب ملاحظة بوضوح وينخفض سطح القلف على شكل بقع أو شرائح، وكلما نمت الأشجار، كثيراً ما يظهر نمو غير منتظم (متفاوت) بين الطعم والأصل حيث تأخذ هذه المنطقة شكل

يشبه الركبة، وإن الخشب والقلف القريبان من الكامبيوم، يأخذان اللون البنى خاصة نقر الخشب والتنوعات المتبادلة فى القلف. ولقد فسرت هذه الظاهرة على أن النقر فى الخشب تكون كثيرة جداً وتقع قريبة جداً من بعضها البعض بحيث يبدو الخشب مثقّباً على شكل غربال. فى هذا الطور من المرض غالباً ما تصبح الأشجار مصفرة وذات أوراق صغيرة الحجم وتزهّر الأشجار بشدة وتعطى محصول ثمار أكثر من الوضع الطبيعى.

يبدأ الطور الثالث من المرض بظهور تلون بنى على بعض المناطق فى القلف، هذه الأجزاء المتلونة تمتد بشكل عام إلى ما يقارب نصف الساق. تلون القلف يكون متبوعاً بالتشقق والأجزاء الملونة من القلف تصبح مائلة للون الأسود تشقق وتتقشر فى قطع صغيرة. يجف الخشب بالقرب من هذه المناطق ويتحلل ويصبح أسود اللون، عندما يصل المرض إلى هذه المرحلة، أعداداً كثيرة من الأفرع تدوى تدريجياً وببطء حتى تصبح الشجرة كلها قد هلكت. إذا عمل مقطع عرضى فى جذع شجرة ليمون حلو فى هذه المرحلة الأخيرة من المرض يلاحظ بطشاً أو شرائح ملونة وأنسجة غير متعضية فى الأجزاء الخارجية من الخشب شكل ٥٢. يلاحظ أحياناً ترسبات صمغية وتلون فى اللحاء والذى يظهر قبل تشقق القلف أو تسلخه. يمكن ملاحظة بقع صمغية بعد إزالة قطع القلف بشكل خاص فى أشجار Tangelos و Mandarins لا يلاحظ تلون فى اللحاء ولا وجود تصمغات على أشجار الليمون الحلو ولذلك لا يلاحظ تلون اللحاء فى أشجار Tangalos وهذا يعتمد على الصنف.

من بين ٤٥ صنف من الحمضيات حساسة للمرض فإن هناك نوعان فقط يتفاعلان مع المرض بدرجاته المختلفة كما فى شكل ٥٣. كما ذكر سابقاً فإن نقر الخشب لا يستعمل لوحده كعامل مشخص للمرض ولكن تشرب الصمغ فى القلف فى بعض أنواع الحمضيات يمكن أن يتسبب عن الفيرويد وفى حالات قليلة عن بعض الفيروسات.



### إنتقال المرض:

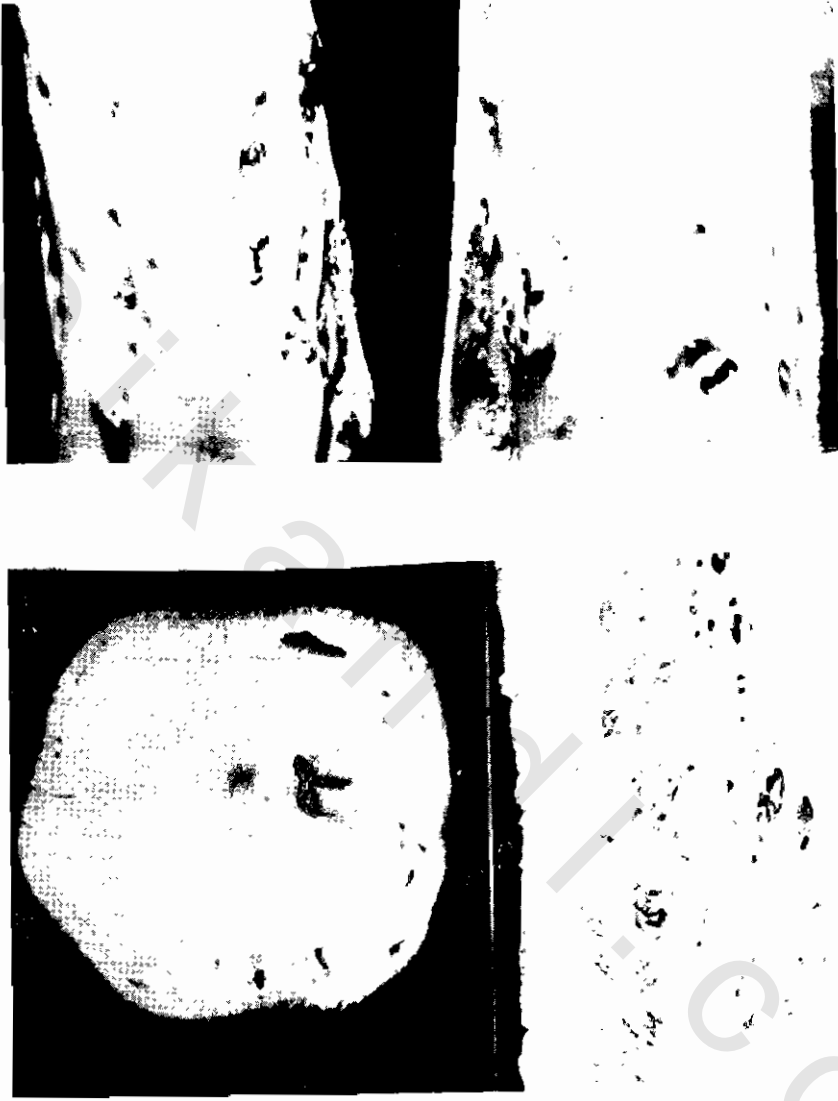
إن هذا المرض واسع الإنتشار في معظم أنحاء العالم. يمكن أن ينتقل عن طريق التطعيم. يمكن أن ينتقل عن طريق البذور وعن طريق الحشرات القشرية.



شكل رقم ٥٢:

أعراض مرض ككسيا في الحمضيات

- A : تنقر بسيط في الخشب.
- b : بداية تقشر خارجي للقلف مظهر تجمع الصمغ.
- c : مراحل متقدمة من المرض.
- d : تأثير شديد في منطقة إتحاد الطعم مع الأصل.



شكل رقم ٥٣ :

العلوى: الوجه الكامبيومي من جهة الخشب على الشمال والوجه الكامبيومي من جهة القلف في اليمين كلاهما مصاب بفيروس ككسيا.  
السفلى: مقاطع عرضية وطولية لنبات التانجالو المصاب بفيروس ككسيا مظهراً الأنسجة غير الطبيعية وترسبات الصمغ في الخشب.

## سبب المرض :

يتسبب هذا المرض عن فيروس Citrus Cachexia Viroid ويكتب باختصار (CCaVd) وقبل سنة ١٩٩٢ كان يكتب بدون إضافة حرف d. يتبع هذا الفيروس مجموعة فيروسات الحمضيات الثانية CVd - II b ويتكون من ٢٩٩ نيوكليوتيدة ويستعمل له نباتات الأقحوان، الخيار والأترج نباتات كاشفة. وقد تكلمنا عنه بالتفصيل في موضوع فيروسات الحمضيات.

## تأثير درجات الحرارة على فيروس ككسيا :

لقد تبين من أبحاث كثيرة أن الحرارة تؤثر تأثيراً كبيراً على حدوث الإصابة الفيروسية، بالإضافة إلى الظروف المثلى لنمو الخلايا التي تحتوى الفيروس في المزرعة. إن تركيب الفيروس ليس مقاوم للتشيط بالحرارة فقط ولكنه أيضاً بشكل عام يتحمل درجات الحرارة المرتفعة الملائمة لتناسخ الفيروس. هذه الصفات أصبحت تقريباً عوامل تشخيصية لإصابة النباتات بالفيروس.

إن ملاحظة تأثير الحرارة على تجمع الفيروس قد أجريت لمعظم الأجزاء فى أنواع النبات والتي تظهر استجابة مرضية للإصابة الفيروسية. نظراً لأن الأترج يبقى بدون إظهار أعراض خلال الإصابة بفيروس ككسيا بالمقارنة مع تجمع CEVd، الفيروس الذى يحدث أعراض تقزم شديدة كاستجابة فى الأترج. عند تنمية نباتات الأترج المحقونة بفيروس ككسيا والاكسوكورنز فى درجات حرارة من ٢٢ - ٣٨ م ثم تنقل إلى حرارة ١٧ - ٢٩ م (أقل درجة حرارة وأعلى درجة حرارة تنمو عليها الأشجار)، كان نمو الأترج غير المحقون معوقاً بنسبة ٥٠٪ تقريباً باستعمال نظام درجات الحرارة المنخفضة. كما وأن تحضيرات الحمض النووى من النباتات النامية تحت درجات حرارة منخفضة تظهر DNA Polydispersity فى الجيل أقل من تلك المأخوذة من النباتات النامية تحت درجات حرارة مرتفعة. كان هناك تركيزات أعلى من CEVd فى النباتات النامية تحت درجات حرارة عالية أكثر منه تحت درجات

الحرارة المنخفضة. هذا التفاعل يكون واضحاً بشكل خاص في الجيل المصبوغ بالايثيديوم برومايد. إن تركيزات فيرويد ككسيا تحت كلا الطرفين تبدو أساسياً متكافئة أو أكثر قليلاً في النباتات النامية تحت الظروف الباردة. هذه الاستجابة غير شائعة في كثير من الفيرويدات.

### المقاومة:

يمكن إتباع طرق المقاومة المذكورة مع مرض اكسوكورتز الحمضيات في الصفحات السابقة.

## ٢ - فيروسات نخيل جوز الهند

### أ - مرض كادانج - كادانج في نخيل جوز الهند

#### Cadang - Cadang Disease of Coconut Palm

##### مقدمة:

كانت أول ملاحظة للمرض سنة ١٩٢٧ منذ الوقت الذي دمر فيه مرض كادانج - كادانج زراعات جوز الهند في جزيرة San Migual وفي Albay. إعتبر المرض أكثر الأخطار تهديداً لجميع مصانع جوز الهند في الفلبين. بدأ إنتشار المرض بشكل وبائي سنة ١٩٣٠، ومن بين ٢٥٠ ألف شجرة نخيل جوز الهند، بقيت عدة مئات فقط والباقي كله دمر تحت وطأة المرض. ظهرت أوبئة مشابهة في مناطق أخرى من Bicol وبحلول عام ١٩٥٦ فإن نصف الأشجار المثمرة في المنطقة كانت مصابة، وبالإجمال يمكن القول بأن مرض كادانج كادانج قد قتل حوالي ٣٠ مليون نخلة جوز الهند خلال الأربعين سنة الأخيرة في الفلبين.

كلما ازداد تهديد المرض للمزارعين كلما إرتبطت به أبحاث الباحثين والعلماء للبحث عن مسببه وعن طريقة لحفظ الأشجار السليمة. لغاية سنة ١٩٨٠ نشر عن هذا الموضوع ٢٣٤ بحثاً وذلك بواسطة ١٢٣ باحث. وقد ثبت بأن المرض غامض وصعب الاكتشاف كما أنه مدمر. وبالرغم من الآراء العديدة والنظريات التي ظهرت عن هذا المرض، إلا أنه لم يظهر أى بحث مقنع يؤدي إلى توضيح سليم عن هذا المرض وذلك حتى منتصف السبعينات. وفي أواخر السبعينات ثبت بأن

مرض كادانج - كادانج هو مرض فيرويدي وتحدد مسببه وهذا أدى إلى حل مشكلة كبيرة نشأت مع نشوء المرض.

هناك مشاكل عديدة قابلت الباحثين فى هذا المرض حيث استمرت الأبحاث من سنة ١٩٣٠ إلى سنة ١٩٧٦ وقد ذكر كثير من الباحثين أن هذا المرض غامض ومحير. بعد اكتشاف المسبب تبين أن المشاكل التى كانت تقابل الباحثين فى هذا المرض هى :-

١ - طول الفترة اللازمة للحصول على بادرات من أشجار جوز الهند.

٢ - البادرات التى أقل من خمسة سنوات لا يظهر عليها أعراض المرض أبداً.

٣ - يصعب اكتشاف الإصابة فى الأطوار الأولى.

٤ - تستمر أعراض المرض على الشجرة مدة من ١٠ - ١٥ سنة.

٥ - يبدأ إثمار الأشجار وهى ذات عمر من ٥ - ١٠ سنوات.

٦ - تستمر الشجرة تعطى إثمار لغاية ٦٠ سنة على الأقل.

أعراض مرض كادانج - كادانج:

يستطيع الشخص المدرب ذو الخبرة أن يعرف بأن الشجرة أصبحت مصابة بهذا المرض عندما تبدأ فى حمل جوزات أصغر وأكثر استدارة (كروية) عن الوضع الطبيعى وذات خدوش أو تشققات شكل ٥٤. أما من النواحي الأخرى فإن الشجرة تظهر سليمة تماماً، وفى الحقيقة فإن عدد الجوزات المنتجة يمكن أن يكون أكثر قليلاً من الوضع العادى، ثم بعد ذلك فإن علامات المرض الأخرى لا تلبث أن تتداعى للظهور. يتكشف على الأوراق بقع صفراء والتى تظهر مائية فى إنعكاس الضوء شكل ٥٥. وهى لا تشبه البقع المتكونة عن الحشرات الماصة ولا البقع الناتجة عن بعض الفطريات، وليس لها مركز بنى، تصبح البقع أكثر عدداً كلما

تقدم المرض معطية ثلثي الجزء السفلى من قمة الشجرة المظهر المصفر بعد مدة من الزمن.

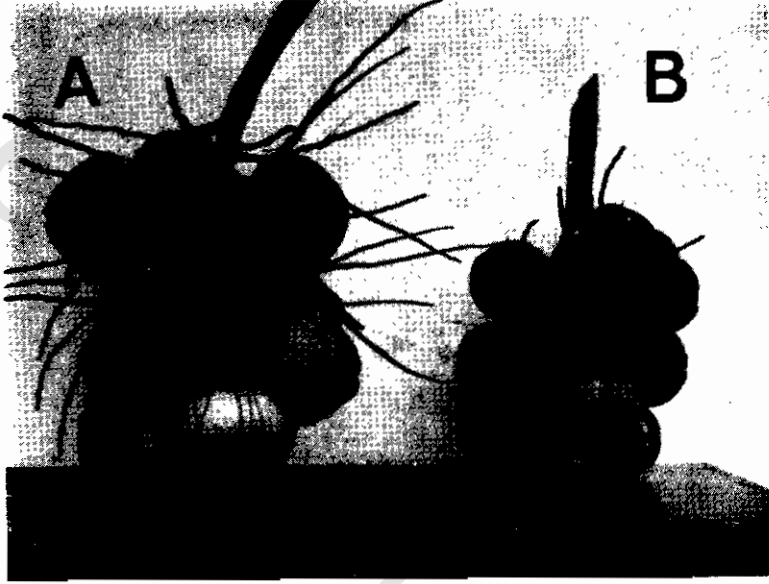
إنتاج الجوزات ينخفض ويتوقف بعد ٢ - ٣ سنوات من ظهور أول الأعراض. عناقيد الزهرة (العناكيل أو الشماريخ) تصبح أصغر وذات قمم سوداء وغالباً ما تفشل في الخروج كاملة من الغطاء المغلف لها شكل ٥٦. تبقى الألياف عادة متلاصقة مع قواعد السعف، مع أنه في الأشجار السليمة يكون هذا الليف منفصلاً وبعيداً عن قواعد السعف. كلما تقدم المرض أكثر يصبح السعف أقصر شكل ٥٧. السعف الأكبر سناً فإنه يتدلى قبل أن يكتمل النمو والنضج ويسقط وتصبح قمة الشجرة صغيرة مقتصرة على باقة من السعف الأصفر القصير. لا تلبث أن تموت الأشجار بعد أن تصل هذا الطور. في كثير من الحالات تنقرم الأشجار بشكل واضح وتظهر الشجرة في حالة سيئة جداً من حيث قصر الأوراق وتدليها واصفرارها وعدم الإثمار وتموت الشجرة.

أما أعراض المرض الأكثر إنتشاراً في منطقة جنوب غرب الباسفيك والتي تظهر على أشجار نخيل الزيت ونخيل جوز الهند، تكون الأعراض على شكل بقع برتقالية على الأوراق والذي يسمى في الفلبين التبقع البرتقالي الوراثي (GOS) Genetic orange spotting.

الوقت الذي ينقضى بين ظهور أولى الأعراض وموت الشجرة يتراوح من ٣ - ١٥ سنة وبالمتوسط حوالي عشرة سنوات. يعتبر مرض كادانج - كادانج من أسهل الأمراض تشخيصاً وذلك بواسطة أعراضه الواضحة وبواسطة بطء تدهور الشجرة، وبالنسبة للمتخصصين بهذا المرض فإن أعراض المراحل المتقدمة للمرض لا تلتبس أبداً مع الأمراض الأخرى أو الاضطرابات الفسيولوجية المختلفة مثل زيادة الرى أو نقص التغذية.

هناك صفة مميزة لهذا المرض وهى أن الأعراض تعتمد على عمر الشجرة.

النخلات (الأشجار) التي عمرها أقل من عشرة سنوات فإنها نادراً ما تصاب وتزداد نسبة الإصابة بالمرض كلما تقدم عمر النخلة حتى يصبح عمرها أربعين عاماً وعندها نسبة احتمال الإصابة تبقى ثابتة بعد هذا السن.



شكل رقم ٥٤ :

عناقيد من جوزات جوز الهند. A : سليمة. B : مصابة. يلاحظ الإستدارة وصغر الحجم والخدوش في الثمار المصابة.



شكل رقم ٥٥ :

أعراض البقع المائية في الأوراق المصابة من نخيل جوز الهند بمرض كادانج - كادانج.





شكل رقم ٥٦ :

أعراض مرض كادانج - كادانج في النورة في أشجار نخيل جزر الهند. اليسار سليمة أما الوسط واليمين مصابة يلاحظ اسوداد القمة وعدم خروج عتاكيل الأزهار.



شكل رقم ٥٧ :

أعراض الإصابة بمرض كادانج - كادانج في نخيل جوز الهند يلاحظ اصفرار وتقزم وصفر قمة الشجرة المصابة مقارنة مع الشجرة السليمة على اليسار.

## أصل وانتشار مرض كادانج - كادانج :

من أين أتى مرض كادانج - كادانج؟؟. هناك فرضيات تقول بأن المرض نشأ في جزيرة San Miguel في بداية الثلاثينات من هذا القرن ثم إنتشر إلى مناطق أخرى وبسرعة وتقدم في خلال العشرين سنة الأخيرة. وعلى كل حال فإن التقارير القديمة والدراسات الحديثة على إنتشار هذا المرض تعارض وتنكر هذه النظرية. إن أول نشرة عن مرض كادانج - كادانج يقول فيها كاتبها إنه في سنة ١٩٣١ زار منطقة الفلبين ولاحظ أن هذا المرض أكثر أهمية على أشجار جوز الهند في جزيرة San Miguel وكان المواطنون يسموه مرض كادانج - كادانج. هناك بعض الباحثين الذين ذكروا أن اسم هذا المرض كان مؤلوفاً في أواخر الأربعينات وأوائل الخمسينات بالنسبة للمواطنين. هذه الآراء تبين أن المزارعين حاولوا مقاومة هذا المرض إلا أنهم لم يفلحوا في ذلك.

هناك أدلة أخرى ضد نظرية أصل نشوء المرض من جزيرة San Miguel وذكر أن المرض كان موجوداً في جميع مقاطعات Bicol وأنه لم ينتشر من جزيرة San Miguel.

## الخسائر الاقتصادية :

إن أكبر خسائر اقتصادية حدثت في أشجار جوز الهند نتيجة للإصابة بمرض كادانج - كادانج كان في الخمسينات حيث ذكرت الإحصائيات سنة ١٩٦٠ أن مليون شجرة ماتت خلال سنة واحدة في الفلبين أما الإحصاءات الحديثة سنة ١٩٨٢ تبين أن هناك حوالي ٥٠٠ ألف شجرة تفقد سنوياً من جميع مقاطعات الفلبين.

## مسبب المرض :

منذ ملاحظة المرض سنة ١٩٢٧ بدأت الأبحاث لمعرفة مسبب المرض واستمرت حتى سنة ١٩٧٣ وعندها ذكر أن هذا المرض يتسبب عن فيروس وذلك اعتماداً

على طبيعة الأعراض ومقدرة المرض على أن ينتشر بشكل وبائي واستمرار المرض وتقدمه حتى بعد التسميد الجيد وعدم وجود بكتيريا أو فطر ممرض مرافق لهذا المرض. مع أن معظم الباحثين وافقوا على أن المرض يتسبب عن فيروس، إلا أنه لم يكن هناك دليل مقنع بأن هذا المرض معدى بالنسبة لأى من النباتات الأخرى. فشلت المحاولات التي أجريت لنقل مسبب المرض إلى أشجار أخرى سواء بالعصارة أو بالحشرات أو بأى طريقة أخرى.

مع كل هذه الحلقات من الفشل فى الأبحاث إلا أنها لم تؤخذ كدليل على أن المرض لا يتسبب عن فيروس، حيث أن هناك بعض الفيروسات النباتية يصعب اكتشافها بالمكروميكروب الالكتروني وكثير من الفيروسات النباتية يصعب نقلها عن طريق العصارة النباتية. كذلك استعملت أنواعاً عديدة من الحشرات لنقل المسبب من الأشجار المصابة إلى الأشجار السليمة واستعملت ملايين الحشرات وآلاف البادرات لينقل إليها المرض ولكن لم يثبت نهائياً أن مسبب المرض ينتقل بالحشرات.

بعض الباحثين مثل Petzold سنة ١٩٧٤ ذكر أن هناك كائنات شبيهة بالركتسيا فى برانشيما اللحاء فى الأشجار المريضة ولكن ثبت خطأ هذا البحث ثم إنجته البحث عن النيما تود وعن نقص العناصر فى التربة ولكنها كلها فشلت فى تحديد مسبب المرض.

فى سنة ١٩٧٣ إنجته البحث عن الفيرويد كمسبب لمرض كادانج - كادانج وبعد محاولات عديدة وإتباع طريقة PAGE تبين أن المرض يتسبب عن فيرويد. كان أول تقرير عن وجود الفيرويد كمسبب لهذا المرض سنة ١٩٧٥ وذلك من قبل العالم Randles.

أخيراً ثبت أن مرض كادانج - كادانج يتسبب عن فيرويد سمي Coconut Cadanig - cadanig Viroid - ويكتب باختصار (CCCVd) أو ccRNAs.

جزيئات ccRNAs صغيرة جداً وذات صفات قريبة من صفات فيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس. يتكون هذا الفيرويد من جزيئات RNA تكون دوائر مغلقة من RNA ذو خيط واحد وفيها مقاطع عديدة من القواعد المتكاملة والتي تشكل روابط هيدروجينية عبر الجزئ جاعلة الدوائر تنطوى وتعطى شكل ثنائى الخيط إلى حد ما. مثل هذا التركيب لا يوجد إلا فى الفيرويدات والفيروسايدات وغير معروف لأى جزيئات أخرى من RNA وهى تعطى الفيرويد صفات تكون متوسطة بين صفات RNA أحادى الخيط وثنائى الخيط. إن تسخين ccRNA تحت ظروف معينة Formamide يحطم الروابط الهيدروجينية عندئذ تفتح الدوائر ويمكن أن يلاحظ تحت الميكروسكوب الالكترونى. هذه المعاملة أظهرت أنه ليس جميع جزيئات ccRNA دائرية ولكن بعضها مستقيم وله طبيعة تركيب دبوس الشعر.

#### أشكال فيرويد CCCVd :

بالأبحاث المستمرة على فيرويد كادانج - كادانج فى أشجار جوز الهند تبين أن لهذا الفيرويد أربعة أشكال وهى :-

١ - 1 - CCCVd وهذا له نوعين سريع (f) fast و بطيء (s) slow ويكتب CCCVd - 1 - f أو CCCVd - 1 - s .

٢ - 2 - CCCVd وهذا له أيضاً نوعين سريع (f) fast و بطيء (s) slow ويكتب CCCVd - 2 - f أو CCCVd - 2 - s .

وفيما يلى شرح لاكتشاف وصفات هذه الأنواع.

بعد أن تم اكتشاف مسبب مرض كادانج - كادانج وتأكد أنه يتسبب عن فيرويد أو حمض نووى ccRNA تسابقت الأبحاث فى دراسة هذا المرض.

باستعمال طريقة التهجين الجزيئى والتي حساسيتها ١٠٠ ضعف حساسية طريقة الهجرة الكهربائية استعملت هذه الطريقة لدراسة ccRNA وتبين أن ccRNA

يتكون من 1 - ccRNA و 2 - ccRNA وإنهما متقاربان جداً من بعضهما البعض وهناك تشابه كبير جداً بينهما فى تتابع القواعد. وفى الدراسات التالية أمكن معرفة التتابع الكامل لقواعد 1 - ccRNA و 2 - ccRNA وأصبح من الواضح أن 2 - ccRNA يمثل ببساطة ارتباط جزئين من 1 - ccRNA فهى تمتلك (٥٠٠ نيوكليتيده للثانى و ٢٥٠ نيوكليتيده للأول، إلا أنه ثبت خطأ هذا التقدير) وكذلك تبين أن هناك علاقة قريبة جداً بين ccRNA و فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس حيث أن التركيب الثانوى لكل منهما متشابه جداً. وفى بعض المقاطع فإن تتابع القواعد فى كليهما يكون متماثل وذلك فى منطقة وسط الجزئ.

أظهرت الدراسات الأخرى أن كلا من 1 - ccRNA و 2 - ccRNA يمكن أن توجد بشكلين مختلفين سمي الأول سريع fast والثانى بطيء slow وذلك بسبب إختلاف سرعتهم فى الهجرة الكهربائية فى الجيل. إن الأشجار المصابة بالمرض فى المراحل المبكرة جداً دائماً تحتوى الأشكال السريعة من 1 - ccRNA و 2 - ccRNA، بينما الأشجار المريضة فى الأطوار المتأخرة من المرض دائماً تحتوى الأشكال البطيئة. أما الأشجار ذات الأعراض المتوسطة، دائماً تحتوى الشكلين مع بعض، ولكن فى بعض الحالات النادرة يمكن أن تتواجد الأربعة أشكال مميزة فى سعفة واحدة (ورقة النخيل تسمى سعفه). لقد ثبت أن السعفات الحديثة والتي لا تظهر أية علامات للمرض بأنها تحتوى الأشكال السريعة من 1 - ccRNA و 2 - ccRNA، بينما لم يكتشف أى من الأشكال السريعة فى السعفات المتقدمة بالسن. كلما تقدمت السعفه فى السن كلما تحولت الأشكال السريعة إلى أشكال بطيئة من الفيرويد (جدول ٣١).

إن التمييز بين الأشكال السريعة والبطيئة من ccRNA مهم جداً وذلك لمعرفة إنتقال المرض.

جدول ٣١: وجود الشكل السريع والبطيء من ccRNA في سعفات نخيل جوز الهند المصاب بالمرض.

رقم السعفة على الشجرة من القمة	شكل الفيروس قبل ظهور الأعراض	شكل الفيروس عند بداية الأعراض	شكل الفيروس في الطور الأول من المرض	شكل الفيروس في الطور المتوسط	شكل الفيروس في الطور المتأخر من المرض
من ١ - ١٢	سريع	سريع	سريع + بطيء	بطيء	بطيء
من ١٣ - ١٦	سريع	سريع	سريع	بطيء	بطيء
من ١٧ - ٢٢	-	سريع	سريع	سريع + بطيء	بطيء

### انتقال مرض كادانج - كادانج والمدى العائلي للفيروس:

يمكن أن ينتقل المرض عن طريق حقن بادرات جوز الهند بالحقنة الضاغطة لمستخلص RNA منقى من أوراق أشجار مصابة بالمرض. يكون النقل بهذه الطريقة بنسبة منخفضة حوالي ١٧٪ فقط. أجرى تحسين على هذه الطريقة حيث تحقن مستخلصات RNA المأخوذة من أوراق ذات إصابة حديثة وحيث أن هذه المستخلصات تحتوي الأشكال السريعة من ccRNA، وهذه الأشكال أكثر عدوى ونشاط في إصابة الأشجار من الأشكال البطيئة. عندما استعمل ٢ ملغ مستخلص غير مفصل من Unfractionated RNA يحتوي شكل سريع كانت نسبة النجاح في الحقن ١٠٠٪. أما عندما كان يحوى الشكل البطيء كانت نسبة الإصابة ٣٠٪. أما عندما كان يستعمل ١,٧ ملغ فيه شكل سريع كانت نسبة النجاح ٣٠٪. أما استعمال ١,٣ ملغ يحتوي شكل بطيء كانت نسبة الإصابة صفر٪.

تحقن البادرات بحقنة ضاغطة وذلك لإدخال محلول RNA في نسيج قمة البادرة حيث بدايات تكشف السعفات. يصعب إجراء الحقن إذا تعدت البادرة سن خمسة سنوات حيث أن قواعد السعفات تغطي على الأنسجة الطرية التي يتم فيها الحقن. بعد عملية الحقن تظهر الأعراض النموذجية بعد ١ - ٢ سنة من الحقن

وخلال مدة سنتين من الحقن يبدأ ظهور أعراض التقزم. عادة ما يتوقف إنتاج الجوزات كلية (لأن الشجرة حقنت قبل الإثمار) ولكن في بعض الأصناف التي تعطى ثمار مبكراً فإن هذه الثمار يظهر عليها أعراض المرض النموذجية. بعد تقدم المرض وظهور المراحل الأخيرة يظهر سعفات قصيرة نموذجية الأعراض وتبقى الألياف ملتصقة مع قواعد السعفات. يكون تقدم المرض بطيء جداً في الحقن الصناعي أكثر منه في الحالة الطبيعية.

إن إنتقال المرض في الطبيعة عن طريق الحشرات الناقلة يبدو أنه أكثر عوامل النقل احتمالاً، مع أن جميع المحاولات التي بذلت لنقل الفيرويد عن طريق الحشرات القارضة أو الماصة فشلت في ذلك. ولقد وجد أن تجمع حشرة *Plesispa reichei* يكون بالقرب من الأشجار المريضة ١٦ ضعف وجودها بالقرب من الأشجار السليمة، وكذلك فإن حشرة *Octodonta angulosa* توجد بالقرب من الأشجار المريضة ٨٢ ضعف وجودها بالقرب من الأشجار السليمة، مع ذلك فإنه لغاية سنة ١٩٩٤ لم تحدد أية حشرة تنقل الفيرويد أو إذا كانت الحشرات ذات دور في نقل الفيرويد.

المدى العائلي:

يمكن أن يهاجم الفيرويد عدة أنواع من وحيدات الفلقة منها:-

1 - *Areca catechu*

4 - *Elaeis guineensis*

2 - *Corypha elata*

5 - *Chrysalidocarpus lutescens*

3 - *Adonidia merrillii*

6 - *Oreodoxa regia*

صفات فيرويدات كادانج - كادانج:

إن الشكلين من CCCVd التي ترافق مرض كادانج - كادانج تتواجد على شكل سريع fast يرمز له f ويطيء slow ويرمز له s. إن اكتشاف هذين النوعين لا يتأثر



بتخزين الورقة أو بطريقة إستخلاص الحمض النووى. إن الفحص الجهازى للأشجار المصابة أظهر أن حدوث هذه الأشكال يتأثر بطور تكشف المرض فى الأشجار. إن الأشكال السريعة من كل 1 - ccRNA و 2 - ccRNA تكون سائدة فى الأطوار الأولى من المرض، بينما الشكل البطئ هو الوحيد الموجود فى الأطوار المتأخرة من المرض. فى بعض الأشجار يحدث تحول من الشكل السريع إلى الشكل البطئ فى السعفات التى حدث فيها تقدم كبير للمرض. إن كل من 1 - ccRNA السريع والبطئ كلاهما دائرى وتختلف فى الوزن الجزيئى وفيهما تشابه كبير فى تتابع النيوكليوتيدات. إن اللقاح الذى يحوى الشكل السريع أكثر حيوية من الذى يحوى الشكل البطئ. يقدر الوزن الجزيئى بواسطة الميكروسكوب الالكترونى بحوالى 100 000 دالتون للسريع و 150 000 دالتون للبطئ. كما وأن 1 - ccRNA يوجد بكمية أكبر من 2 - ccRNA.

إن مرض كادانج - كادانج يختلف عن بقية الأمراض الفيروسية فى نقطتين أساسيتين، الأولى: وجود نوعين من RNA مرافقة للمرض، الثانية التنوع المختلف فى هذين النوعين ويسمى electrophoretic variation. إن الاختلاف الكبير فى الحركة الكهربائية فى الجيل والوزن الجزيئى فى كل من 1 - ccRNA السريع والبطئ يعود لطول الوقت الذى خضعت فيه الشجرة للإصابة.

عند تخزين الورقة على 4°م على فترات لمدة 9 أيام أو التجميد على فترات لمدة 4 أيام قبل الاستخلاص بالطرق القياسية ليس له تأثير على الشكل فى 1 - ccRNA. إن الهجرة الكهربائية سواء فى s أو f على درجة الحرارة العادية أو 60°م فإن كل منهما يسير فى الحزمة الخاصة به وهذه تميز الأشكال الدائرية من 1 - ccRNA.

إن الشكل 1 - ccRNA نوع f له محيط 107 نانومتر أما نوع (s) فإن له محيط 123 نانومتر وبالتالي فإن إختلاف التنوع فى الهجرة الكهربائية لا يعود للتركيب الثانوى أو لوجودهما على شكل دائرى أو مستقيم ولكن يرجع إلى إختلاف الوزن الجزيئى. فى جدول 32 عزلات من 1 - ccRNA و 2 - ccRNA وبعض صفاتها.

عدد النيوكليوتيدات + طول التتابع المتضاعف في كل عزلة إن وجد								
نوع الفيروس والعزلة	San Narciso	Ligao 5	Ligao 1T	Ligao 191D	Ligao 620 C	Ligao 14B	Tinambac	Bao 54
ccRNA - 1 - fast	—	—	٢٤٧ / ٢٤٦	٢٤٧ / ٢٤٦	٢٤٧ / ٢٤٦	٢٤٧ / ٢٤٦	٢٤٦	٢٤٦
ccRNA - 1 - slow	(٥٠) ٢٩٧	(٥٠) ٢٩٦	(٥٥) ٣٠١	(٥٠) ٢٩٦	(٥٠) ٢٩٦	(٥٠) ٢٩٦	—	(٤١) ٢٨٧
ccRNA - 2 - fast	—	—	٤٩٤ - ٤٩٢	—	—	—	—	٤٩٢
ccRNA - 2 - slow	—	—	—	—	—	—	—	٥٧٤ (٤١)

ملاحظات:-

الرقم بين قوسين هو عدد النيوكليوتيدات الإضافية على الطول الأصلي (التتابع المتضاعف).

الرقمين اللذين بينهما ( / ) يعنى أنهما خليط من عزلتين كل منهما لها عدد نيوكليوتيدات الأول أو الثاني.

(-) تعنى لا توجد عزلة تابعة لهذا الفيروس.

إن عزلة Bao 54 هي المثلثة لفيروس كاداغ - كاداغ في الأربعة أشكال ولكن هي المقصودة عندما يذكر فيروس CCCVd وأحياناً يذكر اسم الفيروس مختصر ويضاف أمامه

رقم ٢٤٦.

إن الأشكال السريعة والبطيئة من ccRNA - 1 (٢٤٦ و ٢٨٧ نيوكليوتيدة) والشكل السريع ccRNA - 2 (٢٩٢ نيوكليوتيدة) كلها معدية. لم يكن هناك فرق معنوي بين حيوية الأشكال السريعة من ccRNA - 1 و ccRNA - 2 وبين الأشكال المستقيمة والدائرية من ccRNA - 1. إن الشكل السريع من ccRNA - 1 هو بشكل معنوي أكثر الأشكال مقدرة على إحداث العدوى. إن القطعة الزائدة المكررة ٤١ نيوكليوتيدة خفضت حيوية وكفاءة الإصابة في ccRNA من ٦٨٪ إلى أقل من ٥٪. وبالتالي يمكن القول بأن جانب اليد اليمنى من الجزئ الأصلي للفيروس تلعب دوراً معنوياً في الحيوية. يوجد الشكل البطيء في الأشجار المصابة فقط في وقت ظهور الأعراض على الورقة. أما في المراحل المبكرة من المرض فإن الشكل السريع فقط هو الذى يكون موجود، وبالتالي فإن هذا الشكل هو المسئول في الطبيعة عن إنتشار المرض، وبالتالي فإن الأشكال البطيئة يكون لها دور أولى في تكشف الأعراض، بينما الشكل السريع ccRNA - 1 - f يكون له الدور الأساسى

في الحيوية وانتشار المرض. إذن يمكن القول بأن الشكل السريع ccRNA - 1 - f هو الوحدة الأساسية المعدية لفيروس كادانج - كادانج ويعتبر هو الممثل الوحيد لفيروس كادانج - كادانج في نخيل جوز الهند.

إن العزلة Baa0 54 هي الممثلة للفيروس ccRNA - 1 - fast وكذلك لـ ccRNA - 1 - s - 1 وإن الشكلين لـ ccRNA - 1 - s فيهما كثير من القواعد المزدوجة داخل الجزئ وتستطيع أن تشكل شكل شبه عصوي مثل بقية الفيروسات.

إن ccRNA - 1 - fast فيه ٢٤٦ نيوكليتيده أما الشكل البطيء فيه ٢٨٧ نيوكليتيده. إن الشكل البطيء ccRNA - 1 - s يحتوي جميع التتابع وتركيب أصغر الأشكال ccRNA - 1 - fast ولكن يختلف عنه بإضافة تتابع مزدوج وتركيب ٤١ نيوكليتيده من رقم ١٠٣ إلى ١٤٣ وهذه القطعة مضافة على نهاية اليد اليمنى من الجزئ الطبيعي للفيروس أما التتابع المزدوج فهو على موقع ١٢٣ و ١٢٤ من ccRNA - 1 - f.

أما تتابع النيوكليتيدهات في ccRNA - 2 - fast فهو يحتوي ٤٩٢ نيوكليتيده أما الشكل البطيء يحتوي ٥٧٤ نيوكليتيده وهما perfect dimers لأشكال ccRNA - 1 - s السريع والبطيء. إن كلا من ccRNA - 1 - f و ccRNA - 1 - s تحتوي على مواقع للانشطار بواسطة أنزيم Ribonuclease T<sub>1</sub> على اليد اليمنى مشكلة عروة دبوس الشعر بين المواقع ١٢٤ و ١٢٥ في ccRNA - 1 - f وبين المواقع ١٤٥ - ١٤٦ في ccRNA - 1 - s. كما وأن ccRNA - 2 - fast به مواقع للانشطار، عند حدوث هذا الانشطار يعطى جزئين من ccRNA - 1.

**تنوعات ccRNA البطيء ووقت حدوث الإصابة:**

في المراحل الأولى من مرض كادانج - كادانج فإن الأشكال السريعة فقط من ccRNA - 1 و ccRNA - 2 تكون موجودة في الأشجار المصابة وبعد حوالي ٢٤ - ٣٠ شهراً من ظهور الإصابة، فإن الأشكال البطيئة من ccRNA - 1 و ccRNA - 2 تبدأ في الظهور وتزداد بتقدم المرض حتى تختفي الأشكال السريعة

وتسود الأشكال البطيئة. هذه البيانات مع ما سبق من إثبات أن الأشكال السريعة أكثر عدوى وحيوية من الأشكال البطيئة تتفق مع الانتاج الجديد من فيروسات كادانج - كادانج. ويمكن تلخيص ما سبق في النقاط الآتية:-

١ - الشكل البطيء من 1 - ccRNA يختلف عن الشكل السريع بوجود تتابع مفرد مكرر مغروز في الجزئ ويمكن أن يتولد ببساطة من الشكل السريع بواسطة ميكائزم التجهيز أو النسخ.

٢ - عزلات الشكل البطيء من 1 - ccRNA تختلف في الحجم وفي التتابع المتكرر المغروز وهذا يؤدي إلى القول بانعزال الأصل في هذه التنوعات البطيئة.

٣ - بينما معظم العزلات السريعة تحتوي تتابع مختلف على نهاية 198 ويتكون من معدلات مختلفة من النوع 246 و 247 فإن كلاً من العزلات التسعة البطيئة تحتوي تجمع مفرد متجانس إما مع أو بدون نهاية C في موقع متجانس لنهاية 198 في الشكل 1 - f - ccRNA ومع حجم واحد من تتابع متكرر.

إن هذه المعلومات تتفق مع توليد ccRNA ذو الأشكال البطيئة من ccRNA ذو الأشكال السريعة عن طريق تتابع مفرد نادر يحدث مرتين في فيروس كادانج - كادانج، وبالتالي فإن جميع جزيئات ccRNA البطيئة نشأت من جزيئات آباء مفردة سريعة وتكون تجمعت في شكل معين.

### طرق عزل ودراسة فيروس كادانج - كادانج

نظراً للطبيعة المختلفة لهذا الفيروس وإخلافه عن بقية الفيروسات فضلنا أن نذكر الطريقة العملية لدراسته.

مصدر المادة المعدية:

تستعمل أشجار جوز الهند المصابة طبيعياً بفيروس كادانج - كادانج كمصدر للعدوى. تؤخذ سعفه رقم 6 (ذات عمر 5 - 6 شهور) أو سعفه رقم 20 (ذات

عمر ١٨ - ٢٠ شهر) حيث أنها تحتوي على أكبر تركيز من ccRNA، السعفه رقم ٦ تكون غنية بالفيروس الشكل السريع والسعفه رقم ٢٠ تكون غنية بالفيروس الشكل البطيء. يؤخذ حوالي ١ كغم من الوريقات من كل سعفة. تنزع الوريقات عن الحامل ويزال العرق الوسطى منها ثم تفرم الوريقات إلى قطع مساحة كل منها ١ سم<sup>٢</sup> ويستعمل سكين حاد.

### استخلاص الأحماض النووية:

تستخلص الأحماض النووية من الأوراق وذلك بأن يؤخذ ٢٥٠ غرام من الأوراق المفرومة ثم تضرب في خلاط مع ٧٥٠ مللتر من محلول غير منتظم من ٠,١ مول سلفايت الصوديوم. يرشح المخلوط وينقى بواسطة آلة الطرد عن المركز سرعة ١٠٠٠٠ لفة لمدة عشرة دقائق. المواد الطافية من ٥ كغم أوراق تجمع ويضاف إليها Polyethylene glycol 6000 وذلك لترسيب الجزيئات الكبيرة Macromolecules. تجمع الكريات الصغيرة بواسطة آلة الطرد عن المركز وتستخلص مرتين بمادة SDS - phenol chlorophorm. ترسب الأحماض النووية من الطور المائي بإضافة ثلاثة أحجام من الإيثانول. تجمع الكريات الصغيرة الناتجة بواسطة آلة الطرد عن المركز ويعاد استخلاصها بمادة SDS - phenol chloro-phorm. تجمع الأحماض النووية من الطور الثانى عن طريق الترسيب بالإيثانول. بعد ذلك يعاد تعليق الأحماض النووية فى ٠,١ مول أستيت الصوديوم ونصف حجم من ١% Cetyl trimethyl ammonium bromide يضاف لإعادة ترسيب الأحماض النووية. تجمع الكريات الصغيرة بالطرد عن المركز وتغسل أربعة مرات فى ٧٥% إيثانول محتوى ٠,١ مول أستيت الصوديوم. ثم بعد ذلك يعاد تعليق الكريات الصغيرة فى ٠,١ مول أستيت الصوديوم وتستبعد الأحماض النووية أحادية الخيط بالمعاملة بمادة كلوريد الليثيوم. الباقي من الأحماض النووية (تشمل RNAs الفيرويدي) يعاد ترسيبها عن طريق إضافة ثلاثة أحجام من الإيثانول. الكريات

الأخيرة من الحمض النووي يعاد تعليقها في ٠,٠١، أستيت صوديوم، ٥٪ سكروز وذلك للهجرة الكهربائية.

### فصل الأحماض النووية:

تفصل ccRNAs عن الأحماض النووية في النبات بواسطة ثلاثة دورات من PAGE وهي الاسم المختصر لـ Poly acry lamide gel electrophoresis باستعمال الجيل المائل. في الدورة الأولى تهاجر جميع مستخلصات الحمض النووي من الأوراق تحت ظروف غير مدنترة في سمك ٣ ملم من ٥٠٪ جيل في منظم (TBE) Trie - borate. بعد الصبغ بمادة Toluidine blue و gel slices تحتوي ال RNAs المطلوبة. تقطع كل شريحة وتفرد على سمك ٣ ملم من ٥٪ جيل محتويًا ٨ مول يوريا في منظم TBE. تهاجر حزمة RNA في الجيل الأصلي أثناء الهجرة الكهربائية. بعد الهجرة الكهربائية، فإن الأشكال المستقيمة والدائرية تحدد بالصبغ وتفحص شرائح الجيل المحتوية على هذه الأشكال. كل شريحة تفرد على سمك ٣ ملم ٣,٣٪ جيل في منظم TBE. وبعد الهجرة الكهربائية فإن حزمة RNA تكتشف بالغسيل أو الإزالة من قاعدة الجيل باستعمال جهاز الفصل Bio - Rad preparative apparatus. يجمع ال RNA بالترسيب مع ثلاثة حجوم من الايثانول محتوية ١, ٠ مول اسيتات الصوديوم.

### حقن بادرات جوز الهند:

يستعمل جوز الهند *Cocous nucifera L. Tambolilid*. تجمع الجوزات التي تستعمل كتنقاوى من ١٠٠ شجرة عشوائياً، هذه الأشجار يجب أن تكون ذات عمر ٢٥-٣٠ سنة مفتوحة التلقيح. نفس الأشجار التي تؤخذ منها الجوزات تستعمل في جميع التجارب اللاحقة. تحقن البادرات التي حصل عليها من الجوزات بمحقن ذو ضغط عال يسمى Panjet (معروف عالمياً خاصة في لندن). التجربة الأولى تحقن البادرات ذات عمر ٣ شهور ثم تحفظ في الظلام (شكل ٥٨) لمدة ٢٤ ساعة قبل الحقن بأربعة حقنات أخرى كل منها

١٠٠ ميكولتر في قاعدة الانطلاقة الورقية الأولى ثم بعد ذلك تحفظ البادرات تحت الظل لمدة ٢ - ٣ أسابيع قبل نقلها إلى الحقل وتزرع على مسافات ٢ م.

أما في الطريقة الثانية (التجربة الثانية) فإن الجوزات التي تستعمل تقاوى تزال قشرتها جزئياً وحال بدء ظهور الريشة من القشرة وكذلك الجذور تحقن البادرات بالمحقن ويدخل ٢٥ ميكولتر لكل نمو. يستعمل أربعة جرعات تحقن في قاعدة الريشة وأربعة جرعات للجذور. تحفظ البادرات المحقونة في رمل رطب وفي الظل لمدة ٣ - ٤ أسابيع ثم تنقل وتزرع في التربة في أوعية بولى أيلين وتحفظ في الصوبا لمدة ٢ - ٣ شهور ثم تنقل إلى الأرض الدائمة.

### إختبار البادرات المحقونة:

تجرى إختبارات التحليل للبادرات المحقونة لمعرفة وجود ccRNA المطلوب معرفته بعد ١ - ٢ سنة من الحقن وذلك بأخذ ١٠ غرام عينات من سعفات ذات عمر ٣ شهور ويجرى عليها عملية استخلاص الأحماض النووية وتقارن مع الإصابة الطبيعية. جدول ٣٣، ٣٤، ٣٥.

جدول ٣٣: يبين الانتاج المتوسط لفيروس كادانج - كادانج النقى في جوز الهند المتحصل عليه من الإصابة الطبيعية في النبات.

إنتاج ccRNA ميكوغرام / كيلو غرام أوراق		شكل RNA	نوع ccRNA
مدى	متوسط		
٢٣ - ١٥٤	٦٨	دائرى	ccRNA - 1 - fast 246 - 247 residues
—	٥	مستقيم	246 - 247 residues ccRNA - 1 - slow
٢٥ - ٢٨٠	٧٧	دائرى	287 residues
٣ - ١٣	٨	مستقيم	301 residues ccRNA - 2 - fast
١ - ٢٥	٨	دائرى	492 - 494 ccRNA - 2 - slow
١ - ٥	٤	مستقيم	574

\_\_\_\_\_ الأمراض الفيرويدية المتسببة عن مجموعة PSTVd \_\_\_\_\_

جدول ٣٤ : حيوية الشكل السريع والبطيء لفيروس كادانج - كادانج المنقى من أشجار مختلفة .

النسبة المئوية للبادرات المصابة بالحقن		تركيز الشكل 1 ميكوغرام / ملتر
شكل ١ بطيء	شكل ١ سريع	
صفر	٥٠	١٠٠
صفر	١٠	٦٤
صفر	١٠	٢٥
صفر	٢٠	١٠
صفر	٢٠	٥
صفر	١٠	٠,١

تحقن عشرة بادرات كل مرة.



شكل رقم ٥٨ :

طريقة حقن بادرات جوز الهند بالحقنة Panjet الشكل العلوي A بادرات ذات عمر ٣ شهور.  
الشكل السفلي B بادرات حديثة الإنبات.



جدول ٣٥ : مقارنة بين طريقتي الحقن (المذكورة في طريقة العمل) الأولى والثانية في البادرات ذات عمر ٣ شهور.

طريقة الحقن		شكل ccRNA المستعمل في الحقن
الأولى	الثانية	
٢/٥٠	٥/٣٤	ccRNA - 1 - f
١/٤٧	٣/٣٥	ccRNA - 2 - f
١/٥٠	٤/٢١	ccRNA - 1 - s
٢/٣٨	١٢/٢٣	ccRNA - 1 - s + f

ملاحظة :

الرقم يدل على عدد النباتات المصابة على عدد النباتات المحقونة.

## ب - مرض تنازاجا في جوز الهند

### Coconut Tinangaja Disease

كان أول ذكر لمرض تنازاجا على أشجار نخيل جوز الهند *Cocos nucifera* سنة ١٩٧١ في جزيرة Guam من جزر ماريانز في المحيط الباسيفيكي. إقترح بعض العلماء أن مسبب هذا المرض مشترك مع مسبب مرض كادانج - كادانج على أشجار نخيل جوز الهند في الفلبين حيث أن كلا المرضين يؤدي إلى تثبيط نمو وموت العائل قبل تمام النضج، ولكن مرض كادانج - كادانج قد نال قدراً كبيراً من الدراسة. الصفات المشتركة الأخرى لهذين المرضين تشمل بقع شاحبة على الأوراق، خفض كبير في قمة الشجرة وانحطاط في حيويتها، وتأثر مدة البقاء للأشجار المصابة وتصبح ٢٥ سنة أو أكثر قليلاً (الوضع الطبيعي للأشجار تعيش ٦٠ سنة على الأقل). الاختلاف الوحيد الملاحظ في الأعراض هو التأثير على إنتاج الجوزات، حيث أن مرض كادانج - كادانج يرافقه دائماً إنتاج جوزات أصغر أكثر استدارة (كروية) وتكون ذات خدوش أو تشققات أما مرض تنازاجا إذا تقدم

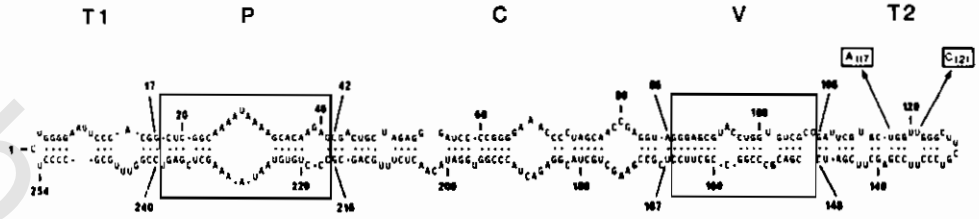
فى الأشجار فإنه يؤدى إلى ظهور جوزات صغيرة ذات قشور متطاولة محتطة بدون وجود نواة فيها.

وبالمثل كما فى مرض كادانج - كادانج فإن هذا المرض يتسبب عن فيروس.

### مسبب المرض:

يتسبب المرض عن فيروس ويسمى فيروس تنانجاجا (Coconut Tinangaja Viroid و يكتب (CTiVd). لقد اكتشف الفيروس فى تحضيرات الحمض النووى المأخوذة من أشجار نخيل جوز الهند المصابة بمرض تنانجاجا. مكونات RNA للفيروس تشبه تلك الموجودة فى مرض كادانج - كادانج فى جوز الهند الذى يتسبب عن فيروس CCCVd ولقد ذكر أن للفيروس الجديد نفس صفة الهجرة فى الجيل تشابه تلك التى لأصغر شكل من أشكال CCCVd ذو أُل ٢٤٦ نيوكليتيده. زيادة على ذلك فإن تحضيرات الحمض النووى من الأشجار المصابة بالمرض تتهجن بكفاءة عالية مع cDNA (<sup>3</sup>H) المجهزة للفيروس CCCVd ذو أُل ٢٤٦ نيوكليتيده أكثر منه للحمض RNA للفيروس CCCVd نفسه وبذلك إقترح بعض العلماء التسمية المشتركة لمسببى المرضين. إلا أن إختلاف الأعراض فى الجوزات أدى إلى جعل العلماء يتفقوا على أن هذا المرض يتسبب عن فيروس غير فيروس CCCVd الذى يصيب أشجار جوز الهند فى الفلبين.

إن أنواع RNA ذات الهجرة المتشابهة فى الجيل مع CCCVd - 246 نقيت من مستخلصات الحمض النووى وجهزت من أشجار جوز هند مصابة بمرض تنانجاجا ودرس التتابع بها بطريقة Direct RNA enzymic. فوجد أن ال RNA المنقى به ٢٥٤ نيوكليتيده وأن هذا ال RNA مرافق دائماً لمرض تنانجاجا. أما التركيب الثانوى لهذا الحمض فهو مطابق لشكل التركيب الحلزونى والعصوى الشكل للفيروس الدرنة المغزلية فى البطاطس. وجد أن لفيروس CTiVd سلالتين مختلفتين فى ٢ نيوكليتيده وقد لوحظت هاتين السلالتين فى العزلات المختلفة من الأشجار. وهناك مقارنة بين هذا الفيروس وفيروسات أخرى فى جدول رقم ٣٦. وإن الشكل الوصفى لهذا الفيروس مذكور فى شكل ٥٩.



شكل رقم ٥٩ :

تتابع النيوكليوتيدات المفترض في التركيب الثانوي لعزلتين من فيروس CTiVd، الاختلاف الوحيد بينهما هو وجود U محل A في الموقع ١١٧، ووجود U محل C في الموقع ١٢١.

إن فيروس CTiVd متقارب جداً مع فيروس 246 - CCCVd حيث أن فيهما نسبة تتابع متمائل تقارب ٦٤٪. إن التماثل الكبير وليس التماثل الكامل بين CTiVd و CCCVd يمكن أن يفسر إمكانية حدوث cross - hybridization بين كلا ال RNAs وكذلك الاختلاف في تعبيرات الأعراض بين المرضين.

جدول ٣٦: تماثل التتابع بين نطاقات فيروس CTiVd وبعض الفيرويدات المماثلة.

مقارنة CTiVd مع الفيرويدات المذكورة	% تماثل تتابع في نطاقات					
	T <sub>1</sub>	P	C	V	T <sub>2</sub>	الكلى
CCCVd - 246	٦٨	٥٠	٦٦	٧٥	٥٩	٦٤
PSTVd	٢٨	٣٦	٦٣	٢٨	٣٦	٤٣
HSVd	٦٠	٣٩	٤٧	٣٢	٤١	٤٠
CEVd	٣٨	٣٨	٦٧	٤٠	٣٨	٤٦

بجانب التماثل بين CCCVd و CTiVd فإن هذا الأخير يحتوى عدة مناطق ذات تنابع وتركيب متماثل مع PSTVd ومتطابق مع نموذج النطاقات المفترضة للفيرويدات. وجد أن نطاق T<sub>1</sub> يحتوى تنابع متكرر من CCUC وهذه المجموعة تتكرر ابتداءً من ١ - ٢٥١. أما نطاق T<sub>2</sub> فإنه يحوى تكرار CCUUC فى نيوكليوتيدات من ١٣١ إلى ١٣٥. أما نطاق P فى فيروس CTiVd فهو غنى بالبيورين Purine فى الشريط العلوى وهو بذلك مشابهاً للفيرويدات الأخرى شاملاً سيادة تنابع الأدينين والذى هو عال القابلية للإنشطار بواسطة RNase U<sub>2</sub> خلال تفاعلات التنابع. أما الخيط السفلى فيه سيادة تنابع الأدينين كما فى CCCVd. الخيط السفلى فيه نطاق P بالنسبة للفيرويدات الأخرى غنى فى تنابع اليوردين Uridine وهذا يعكس ولو جزئياً مقدرة هذا الفيرويد على مهاجمة عوائل وحيدة الفلقة monocotyledonous كما فى CCCVd مقابل العوائل ثنائية الفلقة فى الفيرويدات الأخرى.

وبالمقابل فى الفيرويدات الأخرى، فإن الجزء من جزئ الفيرويد الأكثر حفظاً بين CTiVd و CCCVd متوافق مع أكثر النطاقات تغيراً وهو نطاق V فى بقية الفيرويدات. إحدى الاحتمالات أن نطاق V فى CCCVd يحتوى تنابعات أساسية للمضاعفة الجزئية للتنابع المفترضة لتنشأ من جديد أثناء إصابة أشجار جوز الهند بواسطة CCCVd. إن حدود هذه التضاعفات تحدث فى نطاق V وفى وسط نهاية العروة فى نطاق T<sub>2</sub> من CCCVd. إن الفيرويد CTiVd الذى يهاجم أشجار جوز الهند يمكن أيضاً أن يودى إلى إعادة إتحاد مماثلة فى RNA. إن الأشكال الدائرية والمستقيمة لفيرويد CTiVd مشابهة لتلك الموجودة فى CCCVd، إلا أن RNA المستقيم يكون تركيزه منخفضاً ولكن مساوياً فى حجمه لإحدى تنوعات CCCVd مع نهاية أول ٥٠ نيوكليوتيدة.

للفيرويد CTiVd عزلتان والفرق الوحيد بين العزلتين المأخوذتين من أشجار مختلفة من جوز الهند هو تغير U مكان A فى الموقع ١١٧ وتغير U إلى C فى نهاية النيوكليوتيدة ١٢١، بهذه المواقع يمكن التمييز بين العزلتين.

## ٤ - فيروسات الأقحوان Chrysanthemum Viroids

### أ - مرض تقزم الأقحوان Chrysanthemum Stunt Disease

#### مقدمة:

يعتبر مرض تقزم الأقحوان من أوائل الأمراض الفيرويدية المكتشفة وله تاريخ في تطور الأبحاث الفيرويدية يشبه تاريخ الأبحاث التي أجريت على مرض الدرنة المغزلية في البطاطس.

كان أول وصف لهذا المرض سنة ١٩٤٧ وذلك من قبل العالم Dimock ووصفه على أنه مرض معدى وذلك اعتماداً على تجارب النقل بالتطعيم. وفي سنة ١٩٤٩ ذكر العالم Olson أن العامل المسبب لهذا المرض ينتقل بواسطة حك الورقة بورقة أخرى مصابة، وهذا أكده علماء آخرون بحثوا في هذا المرض منذ سنة ١٩٥٠ إلى سنة ١٩٥٣. ولقد وجد أنه من بين ٧٦ نوع نباتى مزروع من العائلة المركبة، كان هناك ٣٩ نوعاً فقط قابل للإصابة بهذا المرض. من هذه الأصناف سبعة (خمسة أصناف *Chrysanthemum* وصنفان *Senecio*) يتكشف عليها أعراض مميزة واضحة جداً. حاول كثير من العلماء استعمال إختبار البقع الموضعية Local lesions فوجدوا أن هذا الإختبار لا ينطبق على الأعراض المرضية لهذه النباتات إلا أنه فى سنة ١٩٦٨ فإن العالم Lawson et al اكتشف بقع موضعية نشوية على أوراق النباتات المحقونة من نوع *Senecio cruentus* بعد حقنها بعامل التقزم ولكنه وجد أن هناك إختلاف فى عدد البقع بين الحوامل الزهرية وبين الأوراق فى نفس

النبات السابق قال إن استعمال هذه البقع في دراسة المسبب يعوق الكشف عن الكميات الصغيرة في تركيز عامل التقزم. ونظراً لعدم وجود العائل الملائم للإختبارات الحيوية وتشخيص المرض تأخر الكشف عن، ومعرفة طبيعة مسبب المرض. ذكر بعض الباحثين سنة ١٩٥٢ أن عامل التقزم غير طبيعي في ثباته للحرارة ولم يفقد حيويته حتى بعد غلي المستخلصات المأخوذة من النباتات المصابة، وذكر أيضاً أن حيوية الفيرويد تعود إليه ثانية في المستخلصات المعاملة بالكحول.

حاول العالم Hollings ومساعدوه سنة ١٩٦٤ تنقية عامل التقزم عن طريق الترسيب بمادة كبريتات الأمونيوم ثم استعمال آلة الطرد عن المركز المجزئة ثم المعاملة بمذيبات عضوية. كذلك حضرت مستخلصات الفينول لتحديد فيما إذا كان العامل المسبب للمرض يمكن نقله بهذه المستخلصات أم لا. وذكر نفس العالم أنه ولا أى من هذه المستخلصات كان معدياً. مع أن هناك أجزاء صغيرة جداً مشابهة لتلك الموصوفة لفيروس الذبول المتبقع في الطماطم وجدت في النباتات المريضة ولكنها لم توجد في النباتات السليمة، إلا أنه لم يتوفر الدليل بأن هذه الأجزاء معدية. وفي سنة ١٩٦٨ استطاع نفس العالم المذكور إجراء عملية استخلاص من النباتات المريضة باستعمال ٠,١ مول منظم فسفاتي ثم معاملة المستخلص بمادة Chloroform butanol وحصل على عائم شديد العدوى. أما المستخلصات المحضرة في ٠,٠٢ مول منظم فسفاتي لم تكن معدية. كانت الحيوية والمقدرة على العدوى موجودة في الحبيبات الداخلية من اللب المتجانس والمعاد استخلاصه في خلاط والمعامل بمادة Chloroform butanol والمنقى باستعمال السرعة البطيئة لآلة الطرد عن المركز، أما الجزء العائم من المادة التي تم استخلاصها لم تكن معدية.

ذكر العالم Holling أن حيوية عامل التقزم فقدت في مستخلصات خام مكونة من ٠,٠٠٥ مول منظم فسفاتي معامل بـ RNase (3ug / ml) ولكن إذا كان المنظم ٠,٥ مول ونفس تركيز الأنزيم لا تفقد الحيوية.

استمرت الأبحاث في هذا المجال حتى سنة ١٩٧١ حيث ذكر Lawson & Heaton أنه لا يوجد فيروس في النباتات المتقرمة، عندئذ سارت الأبحاث في هذا

المرض موازية للأبحاث على مرض الدرنه المغزلية فى البطاطس وكذلك مرض أكسوكورتز الحمضيات. بعد أن تم إكتشاف أن مرض الدرنه المغزلية فى البطاطس يتسبب عن فيروسات اتجهت الأبحاث عن فيروس مسبب لمرض تقزم الأقحوان، وفعالاً ثبت أن هذا المرض يتسبب عن فيروس وسمى فيروس تقزم الأقحوان (CSVd) *Chrysanthemum Stunt Viroid* وذلك من قبل العالم Diener & Lawson سنة ١٩٧٣.

### الأعراض:

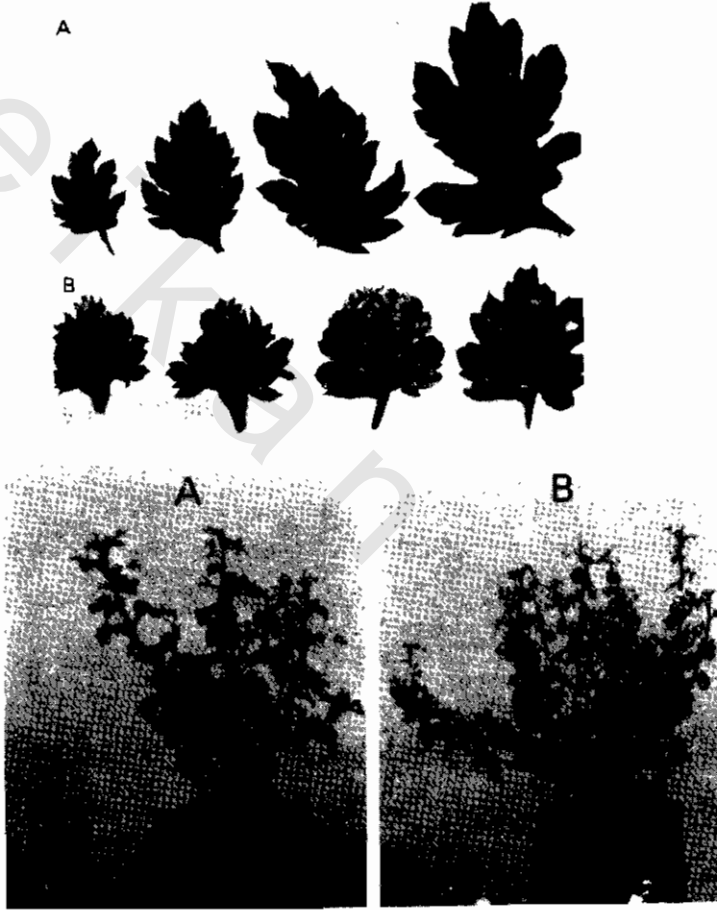
يوجد هذا المرض فى كل من الولايات المتحدة، كندا، Netherland، جنوب أفريقيا، إيطاليا والبرازيل. يسبب المرض خسائر تتراوح من نسبة بسيطة إلى نسبة عالية فى زراعات الأزهار وفى الأقحوان المزروع فى الحدائق وإذا لم تؤخذ الاحتياطات والمراقبة فيمكن أن يصل المرض إلى نسبة وبائية عالية.

تكون نباتات الأقحوان وازهارها أصغر من النباتات السليمة وأكثر شحوباً وذات نوعية أدنى بالمقارنة مع النباتات العادية، بعض الأزهار قد تظهر مائلة للون الأبيض (مبيضة). تتفتح الأزهار المريضة مبكراً عن الأزهار العادية بمدة ٧ - ١٠ أيام. غالباً ما تنمو البراعم الجانبية قبل الألوان وتنتج أعداداً كبيرة من الفروع والمدادات (شكل ٦٠). يظهر على بعض الأصناف ندباً بيضاء أو يظهر تلطخات صفراء على الأوراق. تكون العقل المأخوذة من النباتات المصابة ضعيفة التجذير وتظهر النباتات المصابة تغيرات فى الميتابولزم وفى بدايات الكامبيوم. غالباً ما تتقزم النباتات بعد إبتداء الإصابة بحوالى شهر أو أكثر وإن هذه الصفة (التقزم) تكون السائدة لغاية موت النبات ولذا سمي المرض باسم مرض تقزم الأقحوان.

### الكائن الممرض:

يتسبب هذا المرض عن فيروس تقزم الأقحوان *Chrysanthemum stunt Viroid* (CSVd) يتكون من ٣٥٤ - ٣٥٦ نيوكليتيده وذلك حسب العزلات. ينتقل هذا الفيروس عن طريق العصارة. نقطة التخفيف القصى للفيروس حوالى ١ : ١٠٠٠٠، درجة الحرارة المميتة ٩٦ - ١٠٠ م لمدة عشرة دقائق. يحتفظ الفيروس بمقدرته على إحداث إصابة لمدة شهرين فى العصارة ولمدة سنتين فى

الأوراق الجافة. ينتشر الفيرويد بسهولة في العصارة المحمولة على الأصابع أو على السكاكين أو الأدوات الزراعية المستعملة أثناء العمليات الزراعية مثل التقليم، تشذيب النباتات، أخذ العقل، قطف الأزهار. لا ينتقل الفيرويد بالحشرات أو نواقل أخرى.



شكل رقم ٦٠ :

أعراض الإصابة بفيرويد تقزم الأقحوان على نبات الأقحوان.  
العلوى: A: أعراض الإصابة بالفيرويد CSVd على أوراق الأقحوان مراحل مبكرة.  
B: أعراض الإصابة بالفيرويد CSVd على أوراق الأقحوان مراحل متأخرة.  
السفلى: A: نبات الأقحوان سليم. B: نبات الأقحوان مصاب بالفيرويد ويظهر عليه أعراض كثرة الفروع والتقزم.



يتحرك الفيرويد ببطء خلال النبات وغالباً ما يحتاج إلى ٥ - ٦ أسابيع ليتحرك خارج الورقة المحقونة ويصل الساق. تتشكف الأعراض الجديدة بعد ٣ - ٤ شهور من الإصابة. يبقى الفيرويد حياً أساساً في النباتات المصابة التي يبدو أنها معمرة وتحمله إلى الموسم القادم. يمكن أن تتلوث النباتات أيضاً بالفيرويد من أجزاء النباتات الميتة.

يصيب الفيرويد كل من الأقحوان والطماطم ونبات *Gynura*.

كما في بقية الفيرويدات فإن هذا الفيرويد له شكلان الأول دائري والثاني مستقيم وإن هذين الشكلين قد إختبرا لمعرفة حيويتهما على نبات *G. aurantiaca* وإن جدول رقم ٣٧ يبين أن كلا الشكلين لهما كفاءة متساوية في الإصابة، وهذا ما يؤدي إلى القول بالغاء ما كان يعرف بأن كفاءة الشكل المستقيم كانت ناتجة عن إختلاط الشكل الدائري مع الشكل المستقيم. أمكن استخلاص ٢٠٠ ميكوغرام شكل دائري من كل كيلوغرام من المادة النباتية الحية المصابة بالفيرويد وكذلك استخلاص ٣٥ ميكوغرام شكل مستقيم من كل كيلوغرام من المادة النباتية الحية المصابة بالفيرويد.

عند فحص مستحضرات نقية من فيرويد CSVd بالميكروسكوب الالكترونى فإن الجزيئات الدائرية المدنترة تشاهد مع بعض الجزيئات المستقيمة. تكون بعض الجزيئات المستقيمة أكثر سمكاً من الجزيئات الدائرية. الجزيئات الأطول والأقل سمكاً هي الأشكال المدنترة للشكل المستقيم المشكل بواسطة عملية ال nicking للجزيئات الدائرية خلال ١٥ - ٢٠ ثانية من التحضين في ٩٨٪ Formamide على درجة ٦٠م التي هي ضرورية للتفريد. أما بالنسبة للأشكال المستقيمة من الفيرويد فهي الأسرع هجرة في الجيل.

جدول ٣٧: نتائج إختبارات الشكل الدائرى والمستقيم من فيروس تقزم الأفحوان على نبات *G. aurantiaca*.

شكل الفيروس المختبر	تركيز الفيروس المختبر (ميكوغرام / مل) حيوية الإصابة به %						
	٥	١	٠,٥	٠,١	٠,٠٥	٠,٠١	٠,٠٠٥
شكل دائرى	٪١٠٠	—	٪١٠٠	—	٪٧٥	—	٪١٧,٨
شكل مستقيم	٪١٠٠	—	٪١٠٠	—	٪٨٢	—	—
شكل دائرى	—	٪٧٥	—	٪٦٠	—	٪١٧,٨	—
شكل مستقيم	—	٪١٠٠	—	٪٥٠	—	٪١٨	—

#### الأعراض التشريحية:

لدراسة الأعراض التشريحية لفيروس تقزم الأفحوان، يستعمل أنواع من نبات الأفحوان حساسة للفيروس وتكون كاشفة له بحيث أن أعراض الإصابة الفيرويدية تكون نموذجية على هذا النبات. ومن أهم الأصناف التى تعتبر كاشفة لهذا الفيروس هو الصنف Bonnie Jean.

تجرى الدراسة التشريحية على نبات الأفحوان المصاب بالفيروس بعد ظهور الأعراض عليه، إن التعبيرات المرضية بالأعراض تحدث بعد أربعة أسابيع من الحقن عندما تبدأ النباتات المحقونة بالفيروس CSVd فى إظهار إنحناء شديد فى الساق. خلال الفترة من ٤ - ١٠ أسابيع بعد الحقن فإن النباتات غالباً ما تتقزم ويظهر تبقع وتبرقش على الأوراق العلوية وأخيراً على الأوراق السفلية. لا يلاحظ سلوك متناسق من الأعراض يتبع ذلك.

عندما يؤخذ جزء القمة المرستيمية من النباتات المحقونة بالفيروس ويقارن شكلها غير الطبيعى مع تلك المأخوذة من النباتات غير المحقونة، يلاحظ بالمقارنة أن القمم المرستيمية فى النباتات المحقونة تكون ملتوية ومتقزمة وأحياناً مشوهة. يمكن اكتشاف الفيروس CSVd بواسطة الهجرة الكهربائية فى الجيل بعد ٣ أسابيع من الحقن فى

جميع النباتات المحقونة أما النباتات غير المحقونة فلا يلاحظ الفيرويد في مستخلصاتها.

لكي ندرس الأعراض التشريحية في النباتات المصابة بالمرض يجب أن نقارن بين الصفات التشريحية للنباتات السليمة والمصابة. لذا يجب أن نذكر الآن الصفات التشريحية للنباتات السليمة ثم التغيرات التشريحية في النباتات المصابة ونقارن بينهما.

### تشريح النباتات غير المريضة:

عند عمل مقاطع طولية وعرضية في الساق وفحصها لتحديد الوضع التشريحي لساق نبات الأبقوان صنف Bonnie Jean فإن تشريح الساق يشبه ما ذكره كل من Mandalay و Delaware. المقاطع العرضية في أنسجة العرق الوسطى للورقة في مناطق القمة النامية والقاعدة أظهرت أن البشرة العلوية والسفلية كل منهما يتكون من طبقة مفردة من الخلايا. تكون الخلايا البرانشيمية السياجية Palisade متطاولة إلى مثلثة الشكل منضغطة في ترتيبها. أما الميزوفيل الإسفنجي يكون فيه فراغات بين الخلايا ويتكون من خلايا غير منتظمة الشكل. أما الحزم الوعائية فتتكون من غلاف الحزمة، اللحاء، الكامبيوم الوعائي والخشب.

عند فحص سلسلة مقاطع طولية من مرستيم خضري وآخر تكاثرى فإن المقاطع الوسطى من المرستيم التكاثرى تتكون من واحدة أو إنتين من الطبقات الرقيقة وصف من الخلايا مكونة مرستيم العرق ومنطقة جانبية على كلا طرفي منطقة النسيج المتوسط. يختلف تشريح المرستيم التكاثرى عن المرستيم الخضري في عرض وإتساع القمة والذى من هذه المنطقة تنشأ مكونات الزهرة.

### تشريح النباتات المحقونة بالفيرويد CSVd:

#### ١ - الساق:

التغيرات التشريحية في النباتات المصابة بالفيرويد CSVd تظهر بعد أربعة أسابيع من الحقن ولكن تكون أكثر وضوحاً في العينات المأخوذة للفحص بعد ٧ أسابيع

من الحقتن. تحدث أكثر التغيرات وضوحاً في الجزء العلوى من النبات. يكون الكامبيوم الوعائى أكثر وأول الأنسجة المتأثرة ويبدو أن التغيرات فى الكامبيوم هى المسئولة عن التغيرات اللاحقة فى الأنسجة الأخرى. أما التغيرات التشريحية فى الخشب واللحاء والقشرة لا تكون شديدة مثل تلك الملاحظة فى الكامبيوم الوعائى. يلاحظ فى الجزء السفلى من النبات أحياناً خلايا متضخمة بين خلايا الألياف سميكة الجدار من غطاء الحزمة الوعائية، هذه الخلايا المتضخمة غالباً ما تكون خلايا ذات جدر مميزة بوضوح والأنوية فيها لا تكون دائماً واضحة أو مرئية.

فى الجزء العلوى من النبات، فإن خلايا الكامبيوم فى الحزم الوعائية تظهر مشوهة ومن الصعب تمييزها عن خلايا اللحاء والخشب المجاورة لها. فى مناطق أخرى تظهر الخلايا فى الكامبيوم الوعائى كأنها مطحونة (شكل ٦١). الاختلال الوظيفى للكامبيوم الوعائى يكون واضح فى الحزم الوعائية فى النسيج المصاب، والبدايات الكمبيومية كثيراً ما تكون غير واضحة وتفتقر إلى الجدر الخلوية المميزة (شكل ٦٢). يحدث تحطيم للبدايات الكمبيومية بالإضافة إلى التميز غير الكامل فى البدايات الكمبيومية. وهذا يؤدى إلى تكوين نسيج يتكون من خلايا ذات جدر رقيقة تكون غالباً مستطيلة الشكل متعامدة فى صفوف. خلايا برانشيما الخشب غالباً ما تكون سهلة الصبغ ومتضخمة.

النباتات المصابة والتي تظهر أعراض خارجية بكثرة على جانب واحد من النبات، غالباً ما تظهر تغيرات تشريحية شديدة فى نفس الجانب من النبات. فى هذه المناطق يكون النسيج الوعائى قد احتل بواسطة خلايا متضخمة، والأنوية فى هذه الخلايا متطاولة وقابلة للصبغ. يتجمع البكتين فى جيوب فى مركز النسيج المتضخم والذى ازداد عدده الموجود فى الأجزاء القمية فى الساق وبقايا النسيج الوعائى يلاحظ فى مركز هذه الجيوب.

فى المقطع الطولى فإن الكامبيوم الوعائى عادة يتكون من بدايات شاذة ولكن أيضاً تتميز بتكثف خلايا متضخمة. فى كثير من المقاطع فإن نسيج اللحاء يكون قابل للصبغ والاختبارات الهستوكيماوية للكالوس تكون موجبة. تظهر المقاطع

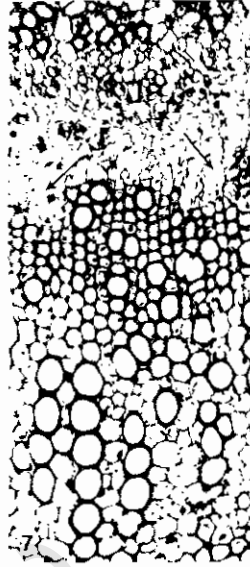
الطولية فى الأنسجة تغيرات تشريحية أقل شدة وتتكون من جيوب ذات مواد داكنة اللون (الصبغة) والتي تعطى إختبار موجب للبكتين. يظهر فى المقاطع الطولية أيضاً خلايا متضخمة من الخلايا البرانشيمية للخشب. هناك تغيرات تشريحية أخرى تشمل مناطق من خلايا متضخمة ومواد داخل الخلايا ذات لون داكن فى القشرة شكل ٦٣. المواد ذات الصبغة الداكنة تعطى نتيجة موجبة لإختبار الصمغ الجرحى وفى بعض الحالات تعطى إختبار موجب للبكتين مستعملة إختبارات Orcinol و Iron absorption. تكون طبقة الابدريم احادية الخلية قد استبدلت فى بعض الأحيان بطبقة عديدة الخلايا أو غالباً بواسطة فجوات محتوية Wound gum وبكتين. التكاثر الخلوى لهذا النوع يكون واضحاً فى المقاطع الطولية.

فى بعض المقاطع يكون هناك كتلة من الخلايا مشابهة فى مظهرها تلك التى فى نسيج القمة المرستيمية تحل محل مكونات النسيج الوعائى. هذه المناطق غالباً ما تتصف بوجود خلايا ذات صبغة داكنة تحتوى أنوية كبيرة واضحة وتمتد خلال النسيج الوعائى فى القشرة.



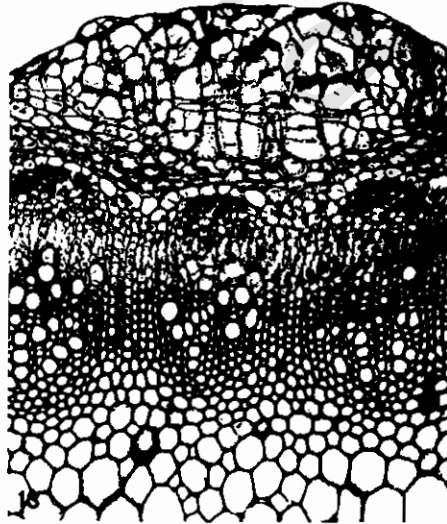
شكل رقم ٦١:

مقطع يظهر التميز غير الكامل فى بدايات الكامبيوم وتحطيم وتكسر الخلايا فى الكامبيوم الوعائى فى ساق نبات الأفحوان المصاب بفيروس CSVd (يلاحظ الأسهم). التكبير ٢٦٥ مرة.



شكل رقم ٦٢ :

مقطع يظهر الفجوات في الكامبيوم الوعائي في ساق نبات الأتقوان المصاب بفيروس CSVd. يلاحظ الأسهم. التكبير ٢٨٠ مرة.



شكل رقم ٦٣ :

مقطع عرضي في ساق نبات الأتقوان المصاب بفيروس CSVd يظهر تضخم الخلايا وزيادة عددها في القشرة والمواد ذات الصبغة الداكنة. التكبير ١٦ مرة.

## ٢ - القمة المرستيمية:

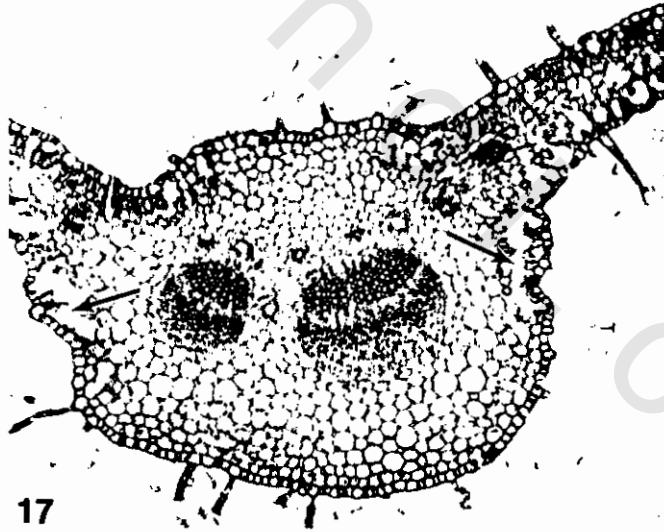
أكثر الاستجابات شيوعاً في العائل عند الإصابة الفيرويدية تلاحظ في المرستيمات الخضرية حيث تتكون فجوات عمودية تمتد خلال مرستيم العرق الوسطى والقمة. إن عدد وحجم هذه الفجوات يختلف من مرستيم إلى مرستيم. أما في المرستيم التكاثرى فإن استجابة العائل للإصابة تكون كما ذكر في المرستيم الخضري وتلاحظ الفجوات بشكل عام. الخلايا في نسيج المرستيمات التكاثرية من النباتات المصابة غالباً ما تكون أقل تماسكاً في ترتيبها من ذلك الملاحظ في النباتات غير المحقونة.

## ٣ - الأوراق:

التغيرات التشريحية في الأوراق الحديثة ذات البثرات المصفرة تشمل تحطيم خلايا الميزوفيل شكل ٦٤. وإن الفجوات المتكونة غالباً ما تكون مرتبطة مع الجانب البعيد عن المحور مباشرة في الجهة الداخلية للبشرة الخارجية السفلى. في بعض مناطق صفحة الورقة يكون الايديرمز السفلى منفصلاً عن بقية النسيج بواسطة هذه الفجوات، بينما في مناطق أخرى فإن خلايا الميزوفيل المتطاولة تعمل جسر أو كوبرى يصل هذه الفجوات من الميزوفيل الاسفنجى إلى الايديرمز السفلى. في بعض المقاطع فإن خلايا الميزوفيل السياجية تكون أقل تلاحماً في ترتيبها منها في الأوراق من النباتات غير المصابة بالفيرويد.

أما في الأوراق التى التحمت فيها البقع الصفراء فإن خلايا الميزوفيل النسيجية تكون غير منتظمة الشكل والحجم وفي بعضها تكون الخلايا متطاولة شكل ٦٥. تكون طبقات الايديرمز دائماً غير واضحة في الأوراق المظهرة أعراض شديدة. في بعض المقاطع يكون هناك خلايا ميزوفيل مفردة متحطمة وتكون البلاستيدات الخضراء والأنوية أقل وضوحاً في هذه الأنسجة منه في خلايا الميزوفيل في نسيج ورقة من نباتات غير محقونة. البلاستيدات الخضراء والأنوية تكون غير مميزة في خلايا الميزوفيل في النباتات المصابة.

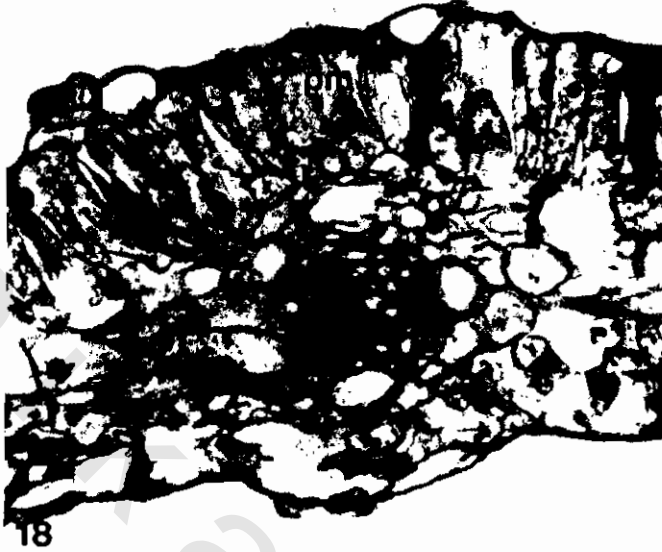
يمكن القول بأن التغيرات التشريحية تدل على أنه يمكن أن يكون هناك فرق مميز بين التغيرات التشريحية الأولية والثانوية، التغيرات التشريحية التي تحدث في الأنسجة المرستيمية والكامبيوم الوعائي ومرستيم الفروع يمكن اعتبارها تغيرات أولية. أما التغيرات التي تلاحظ في الأنسجة الأخرى يمكن اعتبارها تغيرات ثانوية. إن ظهور الأنوية المتضخمة وتمزق النسيج المرستيمي يؤدي إلى القول بأن هذا تعبير عن النشاط المباشر للفيرويد من حيث بناء ال RNA أو تضاعفه في نواة خلية العائل. هذه التغيرات يمكن أن تكون ناتجة من عوامل أخرى مثل عدم التوازن الهرموني وتسمى تأثيرات ثانوية. يمكن القول بأن التغيرات المحدثة في نباتات الأقحوان المصابة بالفيرويد تكون مشابهة لتلك المتسببة عن الإصابة بالفيروسات المختلفة في العائل النباتي.



شكل رقم ٦٤ :

مقطع عرضي في نصل الورقة من نبات أقحوان مصاب بفيرويد CSVd يظهر تحطم نسيج الميزوفيل على الجانب القمي من الليمينا. يلاحظ الأسهم. التكبير ١١ مرة.





شكل رقم ٦٥ :

مقطع عرضى فى نصل الورقة من نبات أقحوان مصاب بفيروس CSVd يبين استطالة الخلايا السايحية. وتحطيم طبقات الايدير. التكبير ٥٧ مرة.

### استعمال فيروس CSVd فى تقليل الإصابة ببكتريا العفن الطرى :

يعتبر مرض تقزم الأقحوان الفيرويدي والإصابة البكتيرية (العفن الطرى) من الأمراض الهامة التى تصيب الأقحوان وتؤثر على إنتاج الأزهار فى النوع *Chrysanthemum morifolium* وإن معظم الدول تمنع فى الحجر الزراعى دخول الأجزاء النباتية من الأقحوان إذا كانت تحمل ببكتريا *Erwinia Chrysanthemi* وكذلك إذا كانت تحمل فيروس تقزم الأقحوان CSVd.

إن ببكتريا *E. chrysanthemi* هى ببكتريا العفن الطرى القادرة على إفراز أنزيمات بكتينية (محللة للبكتين) وتسبب تحطيم البرانشيما الوعائية وتحلل النخاع. لقد وجد أن إنخفاض التفكك فى النخاع الناتج من الإصابة البكتيرية فى عقل الأقحوان المصابة بالفيروس CSVd له علاقة بوجود الفيروس نفسه فى النبات.

لدراسة تأثير الإصابة الفيروية على تحلل النخاع فى عقل الأقحوان صنف Bonnie Jean بواسطة بكتيريا العفن الطرى *E. chrysanthemi* سلالة ١٥٨. تؤخذ عقل من النباتات ذات عمر ٣ أسابيع والتي نشأت من أصول نباتات إما سليمة أو مصابة بالفيرويد CSVd ولكنها مصابة بالبكتيريا ويلاحظ أعراض الإصابة البكتيرية عليها وذلك بأن يظهر على النخاع عفن أحمر داكن طرى بالإضافة لتلون الحزم الوعائية فوق النقطة حيث ينتهى عفن النخاع. لا يظهر أعراض على أنسجة الساق الخارجية.

تبين من الدراسة أن العفن الطرى الذى حدث فى السيقان المصابة بالفيرويد CSVd كان تقريباً ثلث الكمية التى تحدث فى النباتات غير المصابة بالفيرويد. وجد فى إحدى التجارب أن طول النخاع المتحلل (بواسطة البكتيريا) فى النباتات غير المصابة بالفيرويد ١٧,٨ ملم فى حين كان طوله فى النباتات المصابة بالفيرويد ٥,٨ ملم وفى تجربة أخرى كان طول النخاع المتحلل فى النباتات غير المصابة بالفيرويد ٢٢,٦ ملم فى حين أنه كان فى النباتات المصابة بالفيرويد ٧ملم.

#### العلاقة بين الفيرويد الموجود فى النبات وخفض تحلل النخاع بالبكتيريا:

بعد عشرة أيام من زراعة ٢٠ نبات سليم فى أوعية، يفرز فى هذه النباتات أقراص نسيجية (تحقن) إما من أصول سليمة أو من أصول نباتية مصابة بالفيرويد. كان يتم الحقن على بعد ٣٥ ملم تحت قمة الفرع الطرفية. تحفظ جميع النباتات على درجة حرارة ٢٩ - ٣٠م وطول نهار ١٦ ساعة. تزال الأفرع الطرفية بعد عشرة أيام من الحقن وهذا يؤدى إلى تكوين أفرع جانبية. بعد ١٠، ٢٠، ٢٦، ٣٤ و ٤١ يوم بعد الحقن يؤخذ فرع قمى واحد أو جانبى من كل نبات من فوق منطقة الحقن. يؤخذ ٢ غرام من نسيج نصل الورقة ويستعمل للكشف عن الفيرويد. فهرسة النباتات السليمة على ١٠، ٢٠ و ٤١ يوم فقط. يؤخذ قطع من الساق بطول ٥ ملم من قاعدة كل عقلة وتوضع فى مثبت للدراسة الهستولوجية.

الجزء الباقي من الفرع (الساق + أعناق الأوراق) يقطع على بعد ٤٠ ملم تحت القمة وتُحقن بالغمر (بالبكتيريا) لإختبار التفكك البكتيرى.

تبدأ النباتات المحقونة بالفيرويد تظهر الأعراض بعد ٢٧ يوم من الحقن، أما حدوث الأعراض واكتشاف الفيرويد يتم بعد ٣٤ و ٤١ يوم بعد الحقن كما هو واضح فى جدول ٣٨ وتبين أن تفكيك النخاع البكتيرى قد خفض معنوياً فى حالتين إما باكتشاف CSVd فى نسيج الورقة بطريقة PAGE أو بالتعبيرات العرضية للمرض الواضحة للفيرويد. وبشكل عام فإن هناك خفض قليل فى تفكك النخاع قد حصل عليه فى العقل المأخوذة من نباتات محقونة بالفيرويد، ولكن الخفض يكون أكثر إذا كانت العقل مظهرة أعراض الإصابة الفيريودية وتحتوى على كمية يمكن تقديرها من الفيرويد (تكاثرت فيها الفيرويد بكمية كبيرة). الأعراض المرئية (بقع صفراء) تظهر إما لفترة قصيرة قبل أو فى نفس الوقت الذى يكون فيه عيار الفيرويد المكتشف بواسطة إختبار PAGE كاف لأن يسبب ظهور الأعراض.

جدول ٣٨: العلاقة بين تعبيرات الأعراض واكتشاف الفيرويد CSVd ، ٣٤ و ٤١ يوم بعد حقن الأقحوان بالفيرويد.

بعد ٤١ يوم من الحقن		بعد ٣٤ يوم من الحقن	
أعراض الورقة	اكتشاف الفيرويد	أعراض الورقة	اكتشاف الفيرويد
صفر	—	صفر	—
١	—	صفر	—
١	—	صفر	—
١	—	صفر	—
٢	+	صفر	—
٢	+	صفر	—
٣	+	١	+
٣	+	٢	+
٣	+	٢	+
٣	+	٣	+

ملاحظات:

صفر = لا يوجد أعراض، ١ = قليل من البقع على ورقة أو ورقتين، ٢ = بقع على عدة أوراق، ٣ = كثير من البقع على كل الأوراق، + = يمكن اكتشاف الفيرويد، - = فيرويد غير مكتشف.

### إعادة اكتشاف البكتيريا من العقل المحقونة:

أمكن عزل البكتيريا *E. Chrysanthemi* سلالة ١٥٩ المحقونة في العقل النباتية باستمرار من المقطع الأول والثالث (كل مقطع يبعد ٨ ملم عن المقطع الآخر وذلك لإبتداءً من القاعدة) من العقل غير المصابة بالفيرويد والمحقونة أيضاً بالفيرويد CSVd. لم يمكن عزل البكتيريا من المقطع الخامس. هذه النتيجة تدل على أن البكتيريا الموضوعه على القاعدة في العقل السليمة والمحقونة بالفيرويد تتحرك لنفس المسافة العمودية تقريباً وتكون ذات مقدرة على البقاء حية على الأقل خمسة أيام ضمن العقل.

### الإختبارات الهستولوجية:

لم يلاحظ إختلافات تشريحية بين السيقان السليمة والمحقونة بالفيرويد وقت الحقن. إن تشريح سيقان حديثة نموذجية من الأقحوان صنف Bonnie Jean، لوحظ في المقاطع العرضية أنها تختلف قليلاً فقط عن الصنف Giant 4 وهو النموذج الأمثل للتشريح. في سيقان Bonnie Jean يبدأ النخاع في قاعدة الحزم الوعائية بقليل أو بدون ألياف extraxylary تفصل بين النخاع وقاعدة الحزم الوعائية. المقاطع في السيقان المتقدمة بالسن تظهر أغشية للحزمة في الألياف الناضجة، مناطق كبيرة في النسيج الوعائي Interfascicular وكثير من الألياف Extraxylary.

في سيقان العقل السليمة يبدو أن البكتيريا تتحرك إلى أعلى في النخاع وتفكك النسيج. كذلك فإن البكتيريا تتحرك ضمن عناصر الأوعية الخشبية، حيث أنها وجدت ضمن الأوعية فوق المنطقة المتكشفت فيها تعفن النخاع. تحطيم الأوعية تسبب بواسطة البكتيريا عن طريق تحطيم الأوعية الداعمة لنسيج برانشيما الخشب ثم تنتشر من الحزم الوعائية وتفكك النخاع القريب من الخلايا. يكون تفكك الحزم الوعائية والنخاع شديداً بعد خمسة أيام من الحقن بينما الأنسجة الأخرى تظهر غير متأثرة.

وعلى النقيض من ذلك فإن البكتيريا فى العقل المصابة بالفيروس تبقى محددة بشدة مع العناصر الوعائية والتي تكون على شكل مستعمرات أولية وتسبب كمية قليلة من تحلل النخاع فى قاعدة العقلة ولكنها لا تستمر فى الحركة إلى القمة البعيدة. لوحظت البكتيريا ضمن تجاويف العناصر الوعائية، ولكن قليل من الخلايا من برانشيما الخشب، الكامبيوم، اللحاء أو النخاع تحطمت بعد خمسة أيام. الإختبارات الهستولوجية أظهرت عدم وجود إختلافات كبيرة بين مقاطع الساق المصابة والخالية من الفيروس CSVd.

هل هذه الظاهرة وقاية بالتضاد؟؟

إن هذه الظاهرة تختلف عن ظاهرة الوقاية بالتضاد Cross - Protection، حيث أنه فى الأخيرة يكون الكائنين الداخلين فى التجربة ذوى علاقة قريبة من بعضهما البعض مثل سلالات لفيروس أو فيروس معين، ولم يسبق أن استعمل فيروس فى مقاومة أو تخفيض أعراض متسببة عن كائنات أخرى، فى حين أن الفيروسات استعملت فى تخفيض أو زيادة شدة الإصابة بالفطريات.

فى هذه التجربة فإن بكتيريا *E. Chrysanthemi* سلالة ١٥٩، بكتيريا العفن الطرى تمتلك أنزيمات بكتينية والتي يمكن أن تحطم الصفيحة الوسطى Middle lamellae فى الخلايا الرانثيمية مؤدية إلى موت الخلية وفقد إنتفاخ النسيج وبالتالي فإن هذه الأنزيمات تؤثر على الأنسجة العصارية فى الأقحوان (النخاع والبرانشيما الوعائية)، بينما الجدر ذات اللجننة العالية تكون أكثر مقاومة للبكتيريا. عندما تفقد الأنسجة عصاريتها وتتشقق أنسجة الساق فإن استعمالها يكون صعب من قبل البكتيريا وبالتالي يمكن أن نتوقع تكاثر الفيروس وتحركه خلال النباتات المحقونة الناجمة من فقد صفة العصارية، وبالتالي فإن هذا التكاثر يمكن أن يكون كافياً لمنع أو خفض الأنزيمات البكتيرية المحطمة والتي عادة تؤدى إلى العفن الطرى.

لوحظ فى المقاطع المثبتة والمأخوذة من الساق بعد ٨٤ يوم من الحقن بالفيروس CSVd أنها أظهرت كثيراً من Extraxylary fibers وقلنسوة ناضجة للحزمة الوعائية

بالإضافة لزيادة سمك الجدر الخلوية. وعلى أية حال فإن الاختلافات في التشريح العام والذي يمكن أن يحسب لصالح الخفض في كفاءة البكتيريا لا يبدو واضحاً في تجارب مقاطع الساق السليمة والمحقونة بالفيرويد. إن التغيرات الكبيرة في تركيب الساق والتي تحد من الإصابة لا تظهر مبكراً بوقت كاف ليكون متزامناً مع العلاق بالفيرويد المكتشف وتخفيض تفكك النخاع. إذا كان الفقد في عصارية السيقان المصابة بالفيرويد CSVd داخلاً في هذا الموضوع، فمن الصعب تحديد العامل أو العوامل المسؤولة عن الخفض في التفكك. بينما الفرصة لاكتشاف الفقد أو الحصول على كميات صغيرة من مكونات الجدار يمكن أن تكون قليلة، هذه التغيرات يمكن أن تؤثر كثيراً على مقدرة التفكك للبكتيريا.

إن نتائج الدراسات الهستولوجية للمقاطع المصابة بالبكتيريا، يبدو أنها تدل على أن ارتباط أو تجمع البكتيريا في النباتات المصابة بالفيرويد في عناصر الأوعية الخشبية وإن فشل البكتيريا في تمزيق العناصر الوعائية بانطلاقها المتتابع في خلايا النخاع يؤدي إلى القول بأن هناك تغير في تركيب الوعاء. لقد ذكر بعض الباحثين أن بعض نباتات الأقحوان تنتج مادة السوبرين في جدر الأوعية كجزء من إستجابة العائل للإصابة البكتيرية. إن العناصر الوعائية في نبات الأقحوان السليمة تفتقر إلى مادة السوبرين بكميات يمكن تقديرها ولم يوجد مثل هذه التغيرات يمكن أن تحدث في أوعية النباتات المصابة بالفيرويد. زيادة على ذلك فلقد وجد أن مسبب مرض بيرس في العنب يؤدي إلى إنتفاخ الأغشية المغلفة للنخاع وقفل ميكانيكي للنخاع بواسطة إنتاج الكثير من الصمغ أو الجيل، ولا يوجد أى دليل على أن الفيرويد يسبب إنتاج صمغ أو تغير في النخاع والذي يمكن أن يؤدي إلى إعاقة **حركة البكتيريا خلال نسيج النبات. إن بقاء البكتيرية حية في النباتات المصابة** بالفيرويد يكون دليل ضد إفتراض أن هناك مواد خاصة تنتج تكون مميته للبكتيريا. إن دراسة التكاثر البكتيري والانتاج الأنزيمي في النسيج المصاب يمكن أن يظهر أن البكتيريا إما أن تكون غير قادرة على إنتاج كميات عادية من الأنزيمات المحللة أو أن هذه الأنزيمات تكون غير قادرة على تفكيك نسيج النبات. يمكن دراسة الخلية البكتيرية الخالية من الأنزيمات واستعمالها في هذا الغرض.

## ب - مرض الشحوب المتبقع فى الأقحوان

## Chrysanthemum Chlorotic Mottle Disease

كان أول وصف لهذا المرض فى أوائل الخمسينات وكان يعزى إلى مسبب فيروسى، استمرت الأبحاث عليه حتى سنة ١٩٧١ حيث أثبت Dimock et al أن هذا المرض يتسبب عن فيروس وذكّر أن أعراض الشحوب المتبقع التى تظهر فى الأقحوان *Chrysanthemum morifolium* من المستبعد أن تتسبب عن إصابة فيروسية. وفى أبحاثه أثبت أن مسبب هذا المرض يشبه مسبب مرض الدرنة المغزلية فى البطاطس ومسبب مرض تقزم الأقحوان.

## الأعراض:

تظهر أوراق النباتات المصابة بلون أصفر شاحب يتخلله بقع متفاوتة فى اللون الأخضر من الفاتح حتى الغامق. هذه الأعراض تكون المرحلة الأخيرة من الإصابة، أما فى البداية فهو يشبه أعراض الموزايك المتسبب عن الفيروس، لذلك يحدث التباس فى تشخيص هذا المرض وتمييزه عن الأمراض الفيروسية. قد تظهر الأعراض على عدة أوراق على النبات وقد تكون معظم الفروع مصابة. يضعف النبات وتتساقط الفروع القريبة من سطح التربة بعد أن تضعف. النباتات الشديدة الإصابة تظهر باللون الشاحب. كما سبق وذكرنا يكون هناك إلتباس فى أعراض هذا المرض مع الأعراض الأخرى وخاصة الموزايك الفيروسي ونقص العناصر الغذائية فى التربة، إلا أن التبرقش الأخضر على سطح الورقة المصفرة هو الذى يميز الإصابة بهذا الفيروس عن بقية الأمراض الأخرى شكل ٦٦.

## المسبب:

يتسبب هذا المرض (مرض الشحوب المتبقع فى الأقحوان) عن فيروس *Chrysanthemum Chlorotic Mottle Viroid* ويكتب (ChCMVd). يبدو

أن هذا الفيروس يختلف تماماً عن بقية الممرضات الأخرى فهو يصيب ويسبب الأعراض المرضية على نباتات الأقحوان فقط. للفيروس المقدرة على أن يصيب النباتات التي تكون قد أصيبت مسبقاً بأي فيروس آخر وليس عنده القدرة على الحفظ أو الوقاية بالتضاد. لقد استعمل مع كثير من الفيروسات في تجارب الوقاية بالتضاد فلم يثبت بأن عمل وقاية للنبات من أى فيروس متحدى آخر. من الصعب صبغ مستحضرات هذا الفيروس بمادة Toluidine blue.

إن صفات هذا الفيروس تختلف عن بقية الفيروسات حيث أن المدى العائلي له منحصر فقط في بعض أنواع الأقحوان مثل Bonnie Jean ، Deep Ridge ، Mistletoe ، كذلك فإن إنتقال الفيروس بالعصارة صعب. أما تتابع النيوكليوتيدات في هذا الفيروس ووضعه التصنيفي لم يتأكد بعد. يمكن أن تفقد حيوية الفيروس بسرعة في المستخلص وكذلك طريقة الاستخلاص تؤثر على حيوية الفيروس حيث جداول ٣٩ ، ٤٠ تبين بعض صفات هذا الفيروس.



شكل رقم ٦٦ :

أعراض الإصابة على أوراق نبات الأقحوان بالفيروس ChCMV. الورقة a سليمة والورقة B تظهر أعراض الشحوب المتبرقش.



جدول ٣٩: تأثير رقم الحموضة على ثبات فيروس ChCMVd في المستخلص الخام.

% حيوية المستخلص في درجة حموضة							عدد ساعات التحضين	المادة المخففة للمستخلص تركيز ١،١ مول
١٠,٥	٩,٥	٨,٥	٧,٥	٦,٥	٦,٢	٥,٥		
—	—	—	٧٠	٢٠	—	صفر	صفر	Tris - moleate - HCl
—	—	—	٣٠	صفر	—	صفر	٢	
—	—	٨٠	٥٠	—	—	—	صفر	Tris - HCl
—	—	٩٠	٥٠	—	—	—	٢	
—	—	٩٠	١٠٠	—	—	—	صفر	Boric acid - NaOH
—	٩٠	١٠٠	—	—	—	—	٢	
٤٠	٩٠	—	—	—	—	—	صفر	Glycine - NaOH
٣٠	٧٠	—	—	—	—	—	٢	
٦٠	—	—	—	—	—	—	صفر	NaCO3
صفر	—	—	—	—	—	—	٢	
—	—	—	—	—	صفر	—	صفر	water
—	—	—	—	—	صفر	—	٢	

ملاحظات:

كان يستعمل إختبار الحيوية مباشرة بعد التحضير وثانية بعد التحضين لمدة ٢ ساعة على درجة حرارة الغرفة العادية. كان يستخلص من النسيج في Specified diluent (١٠ مل / غرام) ويضبط رقم الحموضة باستعمال ٢ نظامي من هيدروكسيد الصوديوم و ٢ نظامي حمض HCl.

جدول ٤٠: حيوية وثبات الفيرويد بعد طرق الاستخلاص المختلفة.

% الحيوية					تخليص المستخلص			طريقة الاستخلاص
عدد أيام التحضين على درجة ٤ م								
٢٨	٧	٣	١	صفر	١٠-١٠	١-١٠	صفر	
صفر	٣٠	٤٠	١٠٠	٦٠	صفر	٤٠	٦٠	Borate buffer
٧٠	٧٠	٨٠	١٠٠	٩٠	صفر	٤٠	١٠٠	Borate buffer + chloroform n - butanol
٦٠	٦٠	٦٠	٩٠	٧٠	٢٠	٦٠	٦٠	Borate - SDS - buffer + Phenol
—	صفر	٣٠	٢٠	٣٠	صفر	صفر	٤٠	Borate - SDS - buffer + DEP
صفر	صفر	صفر	صفر	صفر	صفر	صفر	صفر	water

ملاحظات:

- ١ - كان يستخلص النسيج في ٠,٢ مول يوريك أسد - هيدروكسيد صوديوم، ٥ مللى مول كلوريد مغنيسيوم حموضة (٩). (٢ مللتر / غرام) والمتجانس بنقى بالسرعة المنخفضة بألة الطرد عن المركز قبل الاختبار.
- ٢ - تختبر النباتات المريضة بعد ٣٠ يوم من الحقن وتحسب النسبة المثوية بين عدد النباتات المريضة والمحقونة.
- ٣ - بيئة الاستخلاص تحتوي كلوروفورم - n - بيوتانول (١ مل / غرام).
- ٤ - Borate buffer تحتوي ١٪ SDS.
- ٥ - كان يستعمل الماء بدلاً من المنظم في التجربة الكنترول.

## ٥ - فيروسات حشيشة الدينار

### Hop Viroids

#### ١ - مرض تقزم حشيشة الدينار

#### Hop Stunt Disease

مقدمة عن نبات حشيشة الدينار:

قبل أن نتكلم عن الأمراض الفيرويدية الهامة والخاصة بنبات حشيشة الدينار وحيث أن هذا النبات لا يزرع في بلدان الشرق الأوسط، نود أن نعطي فكرة عن الوصف النباتي لهذا النبات.

يسمى نبات حشيشة الدينار باللغة العربية الفصحى (جنجل) واسمه العلمى *Humulus lupulus* ويتبع العائلة القنابية Fam. Cannabinaceae. والأصل في تسميته بهذا الاسم غير معروف ولكن يبدو أن كلمة *Humulus* مأخوذة من كلمة *Humus* ومعناها رطب وهي تشير إلى الأرض الرطبة التي ينمو فيها النبات. أما كلمة *Lupulus* معناها الذئب وتشير إلى صفة من صفات النبات حيث أنه يخنق العائل الذى يتسلق عليه مثل الذئب الذى يخنق فريسته.

لا يزرع نبات حشيشة الدينار في منطقة الشرق الأوسط ولكنه يزرع بكثرة في اليابان وانجلترا وفرنسا والولايات المتحدة الأمريكية وقد إنتشرت زراعته في أماكن متفرقة من العالم مثل أمريكا الجنوبية وأستراليا أما موطنه الأصلي فهو أوروبا وآسيا.

نبات حشيشة الدينار عشب معمر متسلق ويلزم له دعامات أو سنادات فى الحقل لسيئند عليها، يعيش فى الأرض من ١٠ - ١٥ سنة ويصل ارتفاعه إلى عشرة أمتار له أوراق بيضاوية الشكل ويحمل النبات أزهاراً مؤنثة وأخرى مذكرة لونها أصفر مخضر قليلاً وتوجد الأزهار فى نورات شبه مخروطية شكل ٦٧. الأزهار المؤنثة أكبر حجماً من الأزهار المذكرة. يوجد فى قواعد الأزهار قنابات ويوجد على قواعد هذه القنابات غدد تحتوى على الزيت الطيار العطرى وهذه الزيوت هى التى تعطى النورة رائحتها وطعمها المميز لحشيشة الدينار. تستعمل المخاريط الثمرية الأنثوية فى العمليات الصناعية حيث هى التى تحتوى شعيرات غزيرة توجد فيها المكونات الفعلية المستفاد منها.

تكاثر حشيشة الدينار إما بالبذور أو بالعقلة وتفضل الطريقة الأخيرة وهى المنتشرة فى أوروبا وأمريكا لسهولتها حيث تزرع العقل فى مشاتل ثم بعد التجذير تنقل إلى الأرض الدائمة. تجمع المخاريط الزهرية فى شهر سبتمبر من كل عام إبتداءً من العام الثالث، عندما يتم نضجها ويتم الجمع فى الصباح الباكر وتنقل إلى حجرة التجفيف الصناعى مباشرة حتى لا يتغير لونها. يعطى الهكتار الواحد حوالى ١٢ - ٢٢ طن من الثمار المخروطية فى الجمعة الواحدة. يستمر النبات يعطى إنتاج لمدة عشرة سنوات.

تستعمل حشيشة الدينار أساساً فى صناعة البيرة حيث تكسبها الطعم المر وهو مرغوب فى صناعة البيرة. كذلك فإن لحشيشة الدينار قيمة حافظة لوجود مواد راتنجية فيها. كذلك فإن حشيشة الدينار عندها قدرة على تكوين رغوة Froth وذلك للأحماض والمواد الراتنجية الموجودة فيها. أما زيت بذرة حشيشة الدينار فهو منوم ومسكن خفيف ويستعمل لتهدئة الأعصاب.



شكل رقم ٦٧ :

يبين شكل الورقة والمخروط في حشيشة الدينار.

أهم مكونات حشيشة الدينار هو الزيت الطيار الموجود في غدد زيتية وشعيرات غدية في النورة المخروطية بنسبة تتراوح من ٠,٣ - ١٪ ويستخلص الزيت بواسطة عملية التقطير وله رائحة نفاذه وطعم مر ويحتوى على مادة Humulene وهو يتبع مجموعة Sesquiterpenes. بالإضافة إلى الزيت الطيار تحتوى المخاريط الزهرية مواد راتنجية منها Humulone ومادة Lupulone ويرجع إليها الطعم المر الداخلى فى صناعة البيرة. كذلك يوجد حمض Lupulinic ومواد تنينية Humulo وكذلك كحول Geraniol.

#### مرض تقزم حشيشة الدينار:

كان أول وصف لهذا المرض بواسطة العالم Yamamoto et al سنة ١٩٧٠ فى اليابان وذكر أن النباتات المريضة تكون ذات عقل قصيرة خاصة فى الساق الرئيسى والفروع الجانبية وتتجمع الأوراق العليا وتلتف إلى الجهة السفلية ويصغر حجم نصل الورقة وتصفّر الأوراق وتسقط أحياناً، تتقزم النباتات. بعد ذلك كثير من الباحثين وصف المرض. إن هذا المرض قد نال قسماً وافياً من الأبحاث مثل مرض الدرنه المغزلية فى البطاطس ومرض تقزم الأقحوان وهو لا يقل عنهما شأنًا من الناحية العلمية.

إصابة نباتات حشيشة الدينار بفيرويد تقزم حشيشة الدينار يؤدي إلى خفض في معدل النمو ولكنه لا يؤثر على معدل تكوين وخروج الأوراق ولا على إختفاء التركيب شبه المطوى الذي يغطى خلايا الاييدرمز. المخاريط الناتجة والمأخوذة من النباتات المصابة تكون صغيرة الحجم محتوياتها من الأحماض الاليفاتية منخفضة إلى النصف أو الثلث بالمقارنة مع النباتات السليمة. كذلك فإن الغدد (اللوبيولين Lupulin) تكون موزعة وأكثر إنتشاراً على القنبات وعلى الأغلفة الزهرية وينخفض عدد هذه الغدد بنسبة تصل ٦٠٪ مقارنة مع النباتات السليمة. بالفحص والتصوير بالميكروسكوب الالكتروني تبين أن معظم الغدد اللوبيولينية الموجودة على أغلفة المخروط من النباتات المصابة تنكمش كثيراً وتذبل. أما الحبيبات الكروية (١,٢ - ١,٩ مليمكرون) لم تلاحظ على سطح هذه الغدد في المخاريط المصابة.

أما خلايا الغدد الراتنجية في المخاريط المصابة جهازياً، عند الفحص الدقيق لها وجد أنها تختلف في نقطتين أساسيتين الأولى: الخلايا المصابة تكون ذات جدر خلوية مشوهة. الثانية: يظهر نقص كبير في المواد Electron dens substance، وقد إكتشف أن هذه المواد تكون على شكل أملاح غير ذائبة والتي تكون مساوية لجزيئات الأحماض الالفاتية من المواد الراتنجية المفرزة بواسطة الغدد الراتنجية.

عند فحص القمم المرستيمية من نباتات حشيشة الدينار المصابة بفيرويد التقزم لملاحظة التغيرات السيتوبلازمية لم يلاحظ أى تغيرات في قمة الفرع لغاية طول ٠,٢ ملم (هذه المنطقة تحمل القمة المرستيمية وزوجان من بداية الأوراق) ولكن في خلايا الطبقة الثالثة من الأوراق المحيطة بالقمة لوحظت جدر الخلايا غير منتظمة واسمك منها في النباتات السليمة، هذه الاضطرابات في جدر الخلية تزداد لغاية الطبقة الخامسة المحيطة من الأوراق بالقمة وتزداد بزيادة الإصابة. كذلك بالإضافة لتشوة الجدر الخلوية يظهر عدم تعضى في البلاستيدات الخضراء. أما أجسام Paramural فلم يطرأ عليها تغيير نتيجة الإصابة. أما جدر النواة والميتوكوندريا

والرايوسومات وجهاز الغشاء السيتوبلازمي لم يحدث عليهما تغيرات نتيجة الإصابة الفيروسية. كما وجد بأن الإصابة الفيروسية تسبب نقصاً في التجدير ويكون هناك اضطرابات في المحتوى الهرموني في النبات وخاصة هرمون أندول أستك أسد والسيتوكاينين.

### مسبب المرض:

يتسبب مرض تقزم حشيشة الدينار عن فيروس تقزم حشيشة الدينار (HSVd) Hop Stunt Viroid هذا الفيروس يتكون من ٢٩٧ نيوكليتيده متتابعة وقد يصل التابع في بعض السلالات إلى ٣٠٣ نيوكليتيده. للفيروس صفات ممرضة وصفات كيميائية مشابهة لفيروس الثمرة الباهتة في الخيار CPFDV ولكنه يختلف عن صفات فيروس الدرنة المغزلية في البطاطس PSTVD. للفيروس HSVd كفاءة ترسيب منخفضة، كذلك فإنه لا يثبط بالفينول أو الكلوروفوم، ويستخلص بالفينول وترسب بالايثانول. درجة حرارة التثبيت للفيروس ٨٤م لمدة عشرة دقائق. أما درجة التخفيف القصوى في العصارة ١ : ٢٥٠٠. كما أن الفيروس يفقد حيويته في تخفيف ١ : ١٠٠٠٠ إذا حفظ يوم واحد على درجة حرارة ٢٠م ولكن ليس أكثر من ثلاثة أيام على درجة ٤م. عندما تترك أجزاء النبات والأوراق والمخاريط لتجف بالشمس فإن حيوية الفيروس تفقد كلية خلال ٣ شهور.

طول الفيروس إذا كان في الشكل المستقيم شبه العصوي ٨٠ نانوميتر. وزنه الجزيئي ١٠٠٠٠٠٠ دالتون. لا ينتقل الفيروس خلال حبوب اللقاح ولا البويضات. يمكن أن يبقى الفيروس حياً في الجهاز الجذري لنباتات حشيشة الدينار خلال شهور الشتاء. ينتقل الفيروس ميكانيكياً وتكون النتيجة أفضل عندما يتم الحقن في الأوراق الأولى حول القمة النامية. كما أنه ينتقل إلى نباتات الخيار Cucumis sativum. تظهر الأعراض النموذجية بعد ١٤ - ١٦ يوم من الحقن. درجات الحرارة أعلى من ٣٠م تلائم تكشف الأعراض الخارجية. درجة الحموضة المثلى لاستخلاص الفيروس ٨ - ٩,٥ pH وأفضل طريقة فصل (استخلاص) تكون بمنظم High salt alkaline.

عند إجراء عملية فهرسة للنباتات المصابة بالفيروس، يلاحظ أن النباتات المصابة بالفيروس HSVd لا يلاحظ عليها أعراض في السنة الأولى من حيث المظاهر الخارجية ولا النقص في محتوى الأحماض الليفاتية. أما في السنة الثانية يمكن ملاحظة هذه الأعراض.

ولقد ذكر أن الفيروس يكون موجوداً في أجزاء النواة في خلايا العائل المصاب ويكون تناسخه في النوية. يكون الفيروس HSVd كما في بقية الفيروسات موجوداً على شكلين الأول شكل مستقيم والثاني دائري وإن كلا الشكلين يكون معدياً ويسبب مرض تقزم حشيشة الدينار.

كما وجد بأن cDNAs ثنائي الخيط المحتوى من ١ إلى ٣ وحدات طول متتابعة من HSVd يكون معدى، وأن نباتات الخيار المحقونة بهذا التركيب تكون أعراضها غير مميزة عن أعراض الإصابة بفيروس HSVd كما في جدول رقم ٤١.

جدول ٤١: الاختبارات الحيوية لفيروس HSVd والأجزاء من ds-cDNA المحتوية أكثر من وحدة طول من RNA الخاص بالفيروس، على نباتات الخيار الكاشفة.

* % حيوية الفيروس بعد	التركيز			الأحماض النووية في التجربة
	٢٠ يوم	٢٨ يوم	٣٥ يوم	
١٧	٣٤	٣٤	٢	Bam H 1 - 1 unit
صفر	صفر	صفر	٠,٤	
١٠٠	١٠٠	١٠٠	٢	Bam H 1 - 2 unit
٤٠	٤٠	٦٠	٠,٤	
صفر	٨٠	١٠٠	١,٥	Bam H 2 - 3 unit
١٦	٧٢	٩٣	٠,٣	
٢٥	١٠٠	١٠٠	٠,٥	HSVd RNA
٥٠	١٠٠	١٠٠	٠,١	
صفر	صفر	صفر	صفر	كترول - ماء

\* كانت تحسب النسبة المئوية بحسب عدد النباتات المصابة على النباتات المحقونة.



كذلك فقد وجد أن التتابع الضروري وجوده لكي يكون الحمض النووي معدي هو ٦٠ وحدة متتابعة مرتبة مرتين من الفيروس HSVd من منطقة A (كما يأتي في السلالات). إن منطقة A هي الحساسة ولها دور كبير في إحداث العدوى. إذا تكون تركيب لا يحوي الستين نيوكليتيده المتتابعة من منطقة A فلا يكون هذا التركيب معدي.

### العوائل المشخصة:

يعتبر نبات الخيار أكثر العوائل حساسية للكشف عن فيروس HSVd. إن إختبار PAGE للخيار للكشف عن الفيروس يحتاج ٩ ساعات. أما إنتظار ظهور الأعراض على نبات الخيار فيحتاج ٣٠ يوماً.

من العوائل المشخصة الهامة والمعروفة للفيروس هي :-

- |  |                                  |
|--|----------------------------------|
| 1 - <i>Gynura aurantiaca</i>           | 3 - <i>Benincasa hispida</i>     |
| 2 - <i>Lycopersicon esculentum</i>     | 4 - <i>Cucumis sativus</i>       |
| 5 - <i>C. melo</i>                     | 6 - <i>Lagenari siceraria</i>    |
| 7 - <i>L. Siceraria Var. siceraria</i> | 8 - <i>L. S. Var. microcarpa</i> |
| 9 - <i>Phaseolus vulgaris</i>          | 10 - <i>Helianthus annuus</i>    |

تظهر أعراض الفيروس على نبات الخيار *C. sativus* على شكل تقزم، إبيضاض أو شفافية العروق، تجعد الورقة بعد ١٤ - ١٧ يوم من الحقن. كذلك فإن أعراض المرض تظهر على الخيار *C. melo* على شكل تقزم، تجعد الورقة وحدوث نكروزز في قمة الورقة بعد ١٦ - ٢٢ يوم من الحقن وتموت أحياناً النباتات المصابة بشدة. أما بالنسبة لنباتات الطماطم فتكون الأعراض غير ظاهرة ويكون تركيز الفيروس فيها منخفضاً عنه في نباتات الخيار. لا ينتقل الفيروس مع بذور الطماطم *L. esculentum*.

يكون تأثير وسلوك الفيرويد HSVd والفيرويد (الثمرة الباهتة فى الخيار) CPFVd فى الجيل متماثلاً ويشابه 7S RNA المستخلص من النباتات السليمة.

ولقد ثبت فى بعض التجارب التى أجريت فى اليابان سنة ١٩٨٩ أن نبات الدخان *Nicotiana tabacum* يعتبر عائل لفيرويد HSVd بعد أن بقى لعدة سنوات يقال بأن نباتات الدخان مقاومة للإصابة بالفيرويد HSVd. وتمت هذه النتيجة بناءً على التجارب التى أدخل فيها HSVd - cDNA فى نبات الدخان بواسطة بلازميد Ti واكتشف تناسخ الفيرويد فى نباتات الدخان المحولة وراثياً Transgenic. ولقد إختبرت قابلية الدخان للإصابة بالفيرويد بطريقتين مختلفتين الأولى بالحقن عن طريق بكتيريا *Agrobacterium* والتى تسمى Agrobacterium inoculation. أما الطريقة الثانية فهى الطريقة الميكانيكية العادية. مع أن الطريقة الميكانيكية كانت تستعمل فى التجارب السابقة، إلا أنها كانت تفشل فى نقل الفيرويد لنبات الدخان ويرجع سبب الفشل لعدم وجود التركيز الكاف من الفيرويد وحيث أن الخطوة الأولى فى الإصابة تكون بثبيت الفيرويد وترجمته فى السيتوبلازم، وبالتالي فإن عدم كفاءة النقل الميكانيكى فى حقن الدخان يكون لعدم كفاءة نقل الفيرويد من السيتوبلازم إلى النواة.

#### التخلص من الفيرويد:

كما هو معروف فإن فيرويد HSVd ينتقل ميكانيكياً وحيث أن هذا الفيرويد يتأثر بكثير من المحاليل الكيماوية مثل ١٪ فورمالدهيد، ١٪ صوديوم هايدروكسيد، ٥٪ صوديوم هايوكلورايد ٥٪ ترائى صوديوم فسفيت، ٢٪ فورمالدهيد. كذلك يوصى باستعمال محلول ٥٪ كالسيوم هايوكلورايت. كذلك فإن تسخين أنصال السكاكين الملوثة لمدة ١٠ دقائق على درجة حرارة ٦٠م كانت فعالة فى التخلص من الفيرويد. كذلك فإن تعريض الفيرويد لدرجة حرارة ٤٠م تمنع إنتقال الفيرويد.

يمكن منع النقل الميكانيكى عن طريقى غمر مقصات التقليم وسكاكين

القطع والأدوات الزراعية المستعملة في الحقل لمدة عشرة دقائق في أى من المحاليل السابقة الذكر.

سلالات الفيرويد:

إن فيرويد HSVd من الفيرويدات ذات السلالات الكثيرة وكل سلالة من هذه السلالات تستخلص من عائل نموذجي لها وتوضع أو تصنف السلالات المتقاربة جداً في زمرة معينة كما في جدول ٤٢ وشكل ٦٨.

جدول ٤٢: سلالات فيرويد حشيشة الدينار وأماكن وجودها.

السلالات % نمائل	الاختلاف في التوبوكليتيدات			عدد التوبوكليتيدات	منطقة إنتشار السلالة	اسم السلالة	زمرة السلالة والعائل
	استبدال	دخول	حذف				
—	—	—	—	—	اليابان	Hop Stunt Viroid	Hop Type
٪١٠٠	—	—	—	٢٩٧	اليابان	HSVd - hop	Hop
٩٩,٧	صفر	صفر	١	٢٩٧	اليابان	HSVd - Peach (A9)	Peach
٩٩,٧	صفر	صفر	١	٢٩٧	الصين اليابان*	HSVd - Grapevine	Grapevine
—	—	—	—	—	اليابان	Hop - Plum Viroid	Plum Type
٩٣,٦	٣	٣	١٣	٢٩٧	اليابان	HSVd - Plum	Plum
٩٣,٦	٣	٣	١٣	٢٩٧	اليابان	HSVd - Peach	Peach
—	—	—	—	—	اليابان	Hop - Citrus Viroid	Citrus Type
٩٦,٣	٢	٧	٧	٣٠٢	اليابان	HSVd - Citrus - 1	citrus
٩٧	١	٦	٧	٣٠٢	اليابان	HSVd Citrus - 2	citrus
٩٦,٣	١	٧	٨	٣٠٣	نذرلان	HSVd - cucumber	cucumber

\* ينتشر الفيرويد في كل من أمريكا - استراليا - فرنسا - اسبانيا - هنجاريا.

لقد وجد أن الفيروسات المستخلصة من البرقوق Plum والخوخ Peach تكون متقاربة جداً مع فيروس HSVd على أساس الصفات المرضية التي تسببها على نباتات العائلة القرعية (الخيار) وإن طريقة التحليل بواسطة PAGE، التهجين الجزيئي، تماثل تتابع النيوكليوتيدات وأعراض هذه الفيروسات على نباتات الخيار صنف (Suyo) كانت تقريباً نفس الأعراض المتسببة عن فيروس HSVd المأخوذ من حشيشة الدينار والمأخوذ من العنب والمأخوذ من الخيار والمأخوذ من الحمضيات تحت نفس ظروف الصويا الزجاجية. إن المدى العائلي للفيروس المأخوذ من DF - plum يشابه الفيروس المأخوذ من حشيشة الدينار والمأخوذ من الخيار. هناك فرق بسيط في المدى العائلي يمكن تمييزه على نباتات الطماطم، فقد ذكر أنه لغاية ١٩٩٠ فإن عزلة DF - plum لم يبدو أنها تصيب الطماطم ولكن الفيروسات HSVd المعزولة من حشيشة الدينار والعنب والخيار والحمضيات تصيب الطماطم بدون إحداث أعراض ظاهرة.

التهجين الجزيئي وتحليل التتابع أظهر أن كلا الفيرويين فيهما أكثر من ٩٠٪ تماثل تتابع مع عزلات HSVd. وبشكل خاص فإن عزلة DF - peach - A9 كانت تختلف بنيوكليوتيدة واحدة عن HSVd المعزول من حشيشة الدينار و ٢ نيوكليوتيدة فقط عن HSVd المعزول من العنب وبالتالي عرفت هذه الفيروسات على أنها سلالات خوخ من HSVd ويشار إليها HSVd - peach. إن هذه العزلات الثلاثة متقاربة جداً مع بعضها البعض وتشكل زمرة واحدة تسمى زمرة حشيشة الدينار Hop type. ومن ناحية أخرى فإن سلالات DF - plum و DF - peach - AF لها نفس التتابع وهي بعيدة القرابة عن زمرة Hop type من مجموعة HSVd وهي أكثر قرابة وصلية مع عزلات HSVd من العنب الألماني. وإن هذه العزلة الأخيرة تختلف في ثمانية مواقع عن الفيروس المعزول من حشيشة الدينار HSVd - hop وأن سبعة من هذه الثمانية هي نفس النيوكليوتيدات في DF - peach AF مع أن DF

peach - AF تختلف بزيادة ١٢ موقع عن hop - HSVd، العزلة تكون نموذجية كما في سلالة HSVd المأخوذة من البرقوق plum ويشار إليها HSVd - plum أو [HSVd - peach - AF] إن HSVd - plum و HSVd grapevine يبدو أنها تشكل زمرة البرقوق وتكتب plum type من مجموعة HSVd.

زيادة على ذلك فإن العزلات المأخوذة من الخيار والحمضيات المذكورة سابقاً متقاربة جداً مع بعضها البعض وتشكل زمرة الحمضيات Citrus type من مجموعة فيروسات HSVd.

في السنوات الأخيرة تم اكتشاف عزلات من HSVd من أنواع مختلفة من النباتات في كثير من أقطار العالم ويمكن تصنيفها إلى ثلاثة زمر كما ذكر سابقاً وهذه الزمر الثلاثة هي زمرة حشيشة الدينار Hop type و زمرة البرقوق Plum type و زمرة الحمضيات Citrus type.

إن التحليل المقارن لتتابع نيوكليوتيدات هذه الزمر يظهر وجود منطقة محفوظة ومنطقة متغيرة في جزئ HSVd. الجزء العلوي من المنطقة المركزية المحفوظة (ذات القواعد من ٦٠ - ١١٤ في السلالة المأخوذة من حشيشة الدينار hop - HSVd) نهاية اليد اليسرى ٢٦٧ إلى ٢٤ في hop - HSVd، والجزء من اليد اليمنى من جزئ HSVd محفوظ (شكل ٦٨).

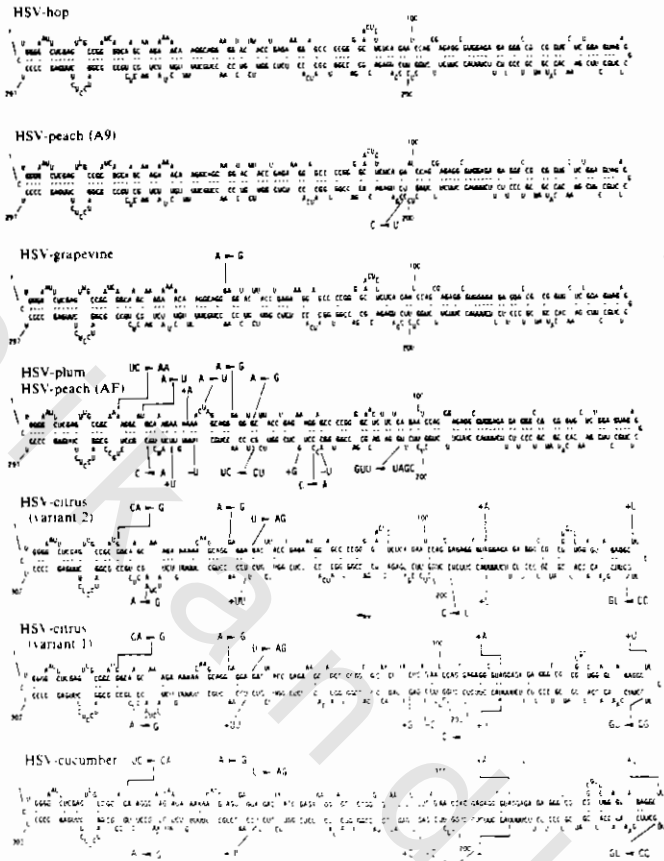
إن أهمية الجزء العلوي من المنطقة المركزية المحفوظة (على الشكل Region A) يكون في تناسخ الفيروس HSVd. إن المنطقة المركزية المحفوظة في الجزء العلوي الملاحظة في العزلات الطبيعية من HSVd متوافقة دائماً مع منطقة A في الشكل والذي من المعتقد أنه يتضمن وصل الأزواج المستعملة في تكاثر الفيروس. بالإضافة إلى ذلك فإن الجزأين الأخيرين المشار إليهما سابقاً هي أيضاً ستكون مهمة في تكاثر فيروس HSVd، بسبب ثلاثة طافرات محدثة في هذا الجزء عن طريق إحداث

ظفرات فى المعمل واللى تجعل HSVd غير معدى. من ناحية أخرى فإن هناك مناطق مختلفة موجودة على جانبي المنطقة المركزية المحفوظة. إن الموقع الموجود عليه واحد منها فى الجهة اليسرى متوافق مع منطقة تغيير المرضية فى فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس وفيروس اكسوكورتز الحمضيات مع أن جميع عزلات HSVd تحدث أعراضاً متشابهة على نباتات الخيار.

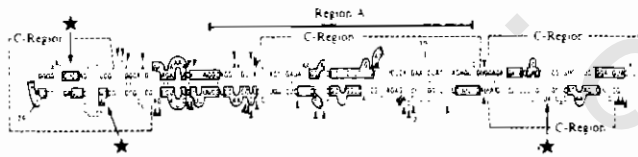
بالاعتماد على نتائج حقن العصارة والتحليل بواسطة PAGE يبدو أكثر احتمالاً بأن HSVd - plum يسبب مرض تنقر الثمرة على البرقوق صنف Taiyo. بالإضافة لذلك، على نبات الخوخ فإن HSVd - peach (AF) والذى هو مرادف للاسم HSVd - plum أو HSVd - peach - A9 يبدو أنها مترافقة مع أعراض تنقر الثمرة. إن هاتين العزلتين لهما تتابع نيوكليوتيدات مختلف. إن HSVd - peach (AF) المعزولة من الخوخ واللى تظهر أعراض تنقر الثمرة الشديدة لها نفس تتابع النيوكليوتيدات كما فى HSVd - plum المأخوذة من الأعراض النموذجية لتنقر الثمرة فى البرقوق، ولكن HSVd - peach (A9) المعزولة من الخوخ المظهرة أعراض تنقر الثمرة البسيطة لها تتابع نيوكليوتيدات مختلف.

نظراً لأن فيروس HSVd المكتشف فى نباتات حشيشة الدينار اليابانية، فيه مجموعة مماثلة من هذه العوامل تسمى HSVd - group، قد تبين بأنها منتشرة بين أنواع عديدة من أشجار الفاكهة مثل العنب، الحمضيات، الخوخ والبرقوق، فإن بعضاً من هذه السلالات من فيروس HSVd تسبب أمراضاً خطيرة على ال hop، الخيار، البرقوق وأحياناً الخوخ ولكنها تصيب العنب والحمضيات ومن المحتمل أن يكون لهذه النباتات (العنب والحمضيات تفاعل معين مع هذا الفيروس HSVd).

A



B



شكل رقم ٦٨ :

A: مقارنة بين تتابع النيوكليوتيدات في DF - peach AF و DF - peach A9 و DF - plum إلى مجموعة HSVd. النيوكليوتيدات المختلفة عن تلك التي في HSVd يشار إليها بأهم.

B: المناطق المحفوظة والمتغيرة في جزيء HSVd (◆) تدل على المواقع حيث التغير في تتابع النيوكليوتيدة قد تميز بين السلالات. (□) تدل على نهايات التتابع المشترك لفيروس HSVd مع تلك في فيروس PSVd. (◆) تدل على مواقع الطفرات التي تجعل HSVd غير معدى عن طريق استعمال تقنية الطفرات في المعمل. C - Region تمثل المناطق المحفوظة. يلاحظ منطقة A الهامة في تركيب الفيرويد.

## ب - الفيرويد الكامن في حشيشة الدينار

### Hop Latent Viroid

كان أول ذكر لمرض غير معروف المسبب يظهر على نباتات حشيشة الدينار في اليابان سنة ١٩٧٧ بواسطة كل من Sasaki & Shikata وذكر هذان العالمان أن هناك بعض الخفض في إنتاجية حشيشة الدينار ويوجد بعض الاضطرابات التركيبية في المحتويات من الأحماض والراتنج الموجود في النباتات المصابة، إلا أنهم لم يذكروا مسبب هذا المرض.

في سنة ١٩٨٠ ظهرت خسائر واضحة في جميع زراعات حشيشة الدينار، وبالرغم من أن الخسائر الاقتصادية كانت واضحة في الانتاج، إلا أن مسبب المرض لم يحدد لأنه لا يوجد أعراض ظاهرة خارجية يمكن تمييزها على النبات وكانت الخسائر تقدر بدون الاعتماد على اسم المرض.

في سنة ١٩٨٧ ذكر في أسبانيا أن فيرويد وجد بالمصادفة أثناء الكشف عن فيرويد تقزم حشيشة الدينار، يرافق زراعات حشيشة الدينار وهو مميز عن فيرويد تقزم حشيشة الدينار، وقد إعتقد الباحثون أن هذا الفيرويد له علاقة مع بعض المظاهر المرضية في هذا النبات. في سنة ١٩٨٨ كان أول وصف علمي لهذا الفيرويد في اليابان وذلك من قبل كل من Ramm & Sanger و Puchta وهذا الوصف مذكور في مجلة Nucleic acid Res. العدد ١٦ صفحة ٤١٩٧ - ٤٢١٦ .

سمى الفيرويد باسم الفيرويد الكامن في حشيشة الدينار Hop Latent Viroid ويكتب HLVD. ينتشر هذا الفيرويد في بريطانيا، اليابان، نذرلاند وأسبانيا.

### الأعراض غير المنظورة:

ينتشر هذا الفيرويد في معظم زراعات حشيشة الدينار في العالم. يوجد في النبات بدون إظهار أعراض مرئية، إلا أن هناك خسائر تعتبر أعراض غير مرئية تلاحظ في



النباتات المصابة. يكون إنتاج المخاريط في النباتات المصابة أقل منه في النباتات غير المصابة. كذلك فإن وزن المخروط يقل في النباتات المصابة بنسبة ٨٪ عنه في النباتات السليمة، وبالتالي فإن الانتاج الكلي ينخفض ويصل خفض الإنتاج حوالي ٣٥٪. كذلك تنخفض نسبة الأحماض الأليفاتية في النباتات المصابة بنسبة ٣٠٪ عنها في غير المصابة، في بعض الأصناف يكون الخفض ١٥٪ فقط. أما أحماض بتا والتي هي beta - acids ترتفع في النباتات المصابة بالفيرويد عنها في النباتات السليمة. تنضج المخاريط في النباتات المصابة قبل النباتات السليمة.

هناك بعض الملاحظات المرئية قد تعتبر أعراض نتيجة الإصابة بالفيرويد، من هذه الملاحظات تكون النباتات غير المصابة ذات لون أخضر هذا الخضار أشد منه في النباتات المصابة والمجاورة وتكون هذه النباتات أكثر قوة More Vigorous بحيث أنها تصل بسهولة إلى الأسلاك الموجودة في قمم السنادات (النبات متسلق ويصل النوع في بريطانيا إلى طول خمسة أمتار ويعتمد على سنادات) وتعطي نموات طرفية غزيرة. كذلك فإنه قبل موسم الجمع في سبتمبر يكون التمييز بين النباتات المصابة وغير المصابة غير لافتاً للنظر من حيث قوة النبات. النباتات المصابة تسمى النباتات غير القوية non - Vigorous. وثبت بالتجربة أن جميع النباتات غير القوية non - Vigorous مصابة بالفيرويد أما النباتات القوية تتراوح نسبة وجود الفيرويد فيها من ٥٪ - ١٥٪ ويلاحظ في جدول ٤٣ تأثير الإصابة على كثير من محتويات المخاريط.

جدول ٤٣: الإنتاج وصفات المخاريط لنوع Omega من حشيشة الدينار مصاب بالفيرويد HLVd وأخرى غير مصابة.

حالة النبات	إنتاج المخاريط بالغرام / طازج	حجم المخروط عند الجفاف	القيمة الوصلية	٪ الأحماض الأليفاتية	٪ أحماض بتا	كوميبولين في أحماض اللا ٪	كوليبيولين في أحماض بتا ٪	الزيت ٪ حجم / وزن	مايرسين ٪ في الزيت
مصاب	١٤٣٠	١٠٣	٧,٠٩	٦,٧٥	٣,٨	٣٣,٨٧	٥١,٠٧	٠,٧٨	١٩,٥٤
سليم	٢٢٦٦	١٥٦	٩,٣٥	٩,٧٢	٢,٩٣	٣٠,٦٥	٥١,٧٣	٠,٦٨	١٢,٥٧

## الفيرويد:

اسم الفيرويد Hop Latent Viroid (HLVd). يتكون الفيرويد من تتابع ٢٥٦ نيوكليوتيدة. له عائلين فقط هما *Humulus lupulus* و *H. japonicus*. يمكن اكتشاف الفيرويد في بقايا النبات بعد أن تكون جميع الأجزاء الهوائية قد ماتت في الشتاء وذلك باستعمال طريقة Dot - blot hybridization. من السهل كذلك اكتشاف الفيرويد في نسيج الأجزاء الهوائية في منتصف الموسم الثاني للنمو ومن الصعب اكتشافه مبكراً في بداية موسم النمو. يمكن اكتشاف الفيرويد أيضاً بسهولة بين بداية الموسم ومنتصفه ويمكن كذلك اكتشاف الفيرويد في قواعد السيقان الجديدة ثم بعد ذلك ينتشر كلما تقدمت النباتات في النمو ويصبح قابل للاكتشاف عندما يصل قريباً من القمة النامية من السيقان في منتصف الموسم، تقريباً في الوقت الذي تكون فيه معظم استطالات النمو إنتهت وبدأ الأزهار. تكون أعناق الأوراق أكثر الأنسجة كفاءة للإختبار ولإنبات وجود الفيرويد، وذلك لسهولة جمعها ولكبر فصل الورقة وقلة وجود المثبطات بها. إن التهجين في Dot - blot أو في الموقع قد فشلا في اكتشاف الفيرويد HLVd في قمم الأفرع من النباتات النامية على درجات حرارة منخفضة ١٠م و ١٥م. ولذلك فإن هناك فشل في إنتاج نباتات خالية من الفيرويد في مزارع القمة المرستيمية في المعمل. هذا يؤدي إلى القول بأن هذه الأجزاء تحتوى فيرويد HLVd ولكن بمستوى منخفض جداً بحيث لا يمكن اكتشافه بأى من الطريقتين.

إن هذا الفيرويد ينتشر بشكل كبير جداً في بريطانيا بحيث أن جميع زراعات حشيشة الدينار تقريباً تصاب به. لقد أجرى إختبار لوجود الفيرويد HLVd بطريقة Nucleic acid hybridization باستعمال ٤٧٦ عينة مأخوذة من زراعات تجارية وإن هذه العينات تمثل نصف إنتاج حشيشة الدينار في بريطانيا، لقد أمكن اكتشاف الفيرويد في ١٧٪ من العينات وتتراوح نسبة الإصابة في العينات من صفر٪ إلى ٨٩٪.

لقد وجد أن هذا الفيروس موجود في جميع الأصناف الحساسة لفطر الذبول *Verticillium* باستثناء صنف واحد اسمه Sunshine وهو صنف قديم ينمو في مزرعة واحدة في بريطانيا. كما وجد أن هناك صنفان أقل تحملاً لفطر الذبول، إلا أن الإصابة الفيروسية فيهما بكمية أقل. ولكن الأصناف التجارية الهامة المتحملة للذبول كلها تكون غير مصابة بالفيروس HLVD. جدول ٤٤ يبين الأصناف الحساسة لفطر الذبول ونسبة الإصابة الفيروسية فيها.

ينتقل الفيروس ميكانيكياً بالحقن بالعصارة وله شكلان دائري ومستقيم وإن تتابع النيوكليوتيدات ٢٥٦ تترتب في تركيب ثانوي، وفيه منطقة مركزية محفوظة مثل بقية الفيروسات ولكن ليس فيه ما يسمى Viroid - specif oligo A في الجزء الأيمن العلوى في شكل الجزئ شبه العصى.

جدول ٤٤: الإصابة الفيروسية في مخاريط حشيشة الدبئار المأخوذة من أصناف حساسة للذبول الفيرتسيليم وغير حساسة. يلاحظ أن الجدول قسمن يميني ويساري.

الصف متحمل للذبول	عدد النباتات المختبرة	عدد النباتات المصابة	% إصابة	% إصابة	عدد النباتات المصابة	عدد النباتات المختبرة	الصف (حساس) غير متحمل للذبول
Bramling cross	٨	١	١٢	٩	٧	٧٩	Fuggle
Progress	١٢	١	٨	٤٣	٢٠	٤٦	Goldings
WGV	١٦	صفر	صفر	٨٩	٢٥	٢٨	Omega
Wye Target	٨٢	صفر	صفر	صفر	صفر	١	Sunshine
Yeoman	٤٥	صفر	صفر	١٤	١١	٧٨	wye challenger
EMY	٢	١	٥٠	١٥	١١	٧١	wye North down
				٦٢	٥	٨	Zenith

## ٦ - فيروسات الطماطم

### Tomato Viroids

#### أ - مرض النبات الذكري في الطماطم

##### Tomato Planta Macho Disease

#### مقدمة:

كان أول وصف لهذا المرض في المكسيك سنة ١٩٧٤ وذلك بواسطة Belalcazar & Galindo. ونتيجة أبحاثهما المستمرة على هذا المرض ذكرا أنه يتسبب عن عامل معدى سهل الانتقال ميكانيكياً ويصعب إنتقاله بالوسائل الأخرى. إن هذا المرض ينتشر في الحقل عن طريق احتكاك المجموع الخضري للنباتات المريضة مع المجموع الخضري للنباتات السليمة وبالأيدى والأدوات الزراعية الملوثة. أجريت تجارب عديدة لمعرفة المسبب ومن هذه التجارب معاملة العصاره المستخلصة من النباتات المريضة بطرق الكشف والتحليل المختلفة، تبين أن هناك أجزاء صغيرة جداً ومعدية موجودة في مستخلص الأوراق المريضة وبناءً على هذه النتائج إعتبر المرض بأنه يتسبب عن فيروس. باستمرار الأبحاث أحاطت الشكوك بهذه النتائج مما حدى بالعالم Galindo ومرافقه أن يستمرا في البحث وخاصة باتجاه الفيرويد لأن علم الفيرويدات كان قد نشأ علماً شاباً يافعاً وبدأت الأبحاث تتسابق إليه. وهكذا استطاع الباحثان أن يثبتا بأن الأجزاء المعدية ليست فيروس وذلك بالاعتماد على الميكروسكوب الالكتروني والآلات المبعثرة للضوء وغيرها. وعندما حضرا حمض نووى من الحزم المبعثرة للضوء وإجراء فصل للأحماض النووية Fractionated

وذلك بالمعاملة بكلوريد الليثيوم وجدا أن هناك جزئ عالى الشدة فى العدوى فى محلول كلوريد الليثيوم LiCl - soluble fraction وإفترضنا أن هذه الأجزاء ليست فيروس وذلك بسبب أن الأحماض النووية فيها كانت ذات وزن جزيئى منخفض نسبياً. لقد تأكد العالمان أن المسبب فيروس وليس فيروس وقررا أن مرض النبات الذكري فى الطماطم Tomato Planta Macho Disease يتسبب عن فيروس وليس عن فيروس. كذلك فإن المسبب الفيروسى لهذا المرض يمكن تأكيده على أساس الأعراض التى تظهر على العائل والتى تشبه تلك الأعراض المتكونة على الطماطم المصابة بمرض Tomato Bunchy Top Disease، وكذلك يشبه الأعراض المتكونة على الطماطم نتيجة الإصابة بفيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس وكذلك يشبه الأعراض المتسببة على الطماطم من الإصابة بفيروس اكسوكورتز الحمضيات وبالتالي تأكد أن مرض النبات الذكري فى الطماطم يتسبب عن فيروس.

#### الأعراض:

عرف هذا المرض فى المكسيك وهو يهاجم الطماطم *Lycopersicon esculentum* المزروعة فى جميع ولايات المكسيك وخاصة فى منطقة Cuahutla المشهورة بزراعة الطماطم وخاصة للتصدير. يعرف المرض فى تلك المنطقة باللهجة المحلية باسم (Planta Macho) يعنى النبات الذكر وذلك بسبب أن النباتات التى تصاب بالمرض لا تنتج ثمار تسوق، فى بعض السنوات يسبب المرض خسائر كبيرة وأحياناً يسبب فقد كامل فى المحصول.

النباتات المصابة تعاني من التقزم الشديد وتتدلى الأوراق والوريقات ويأخذ النبات المظهر المتهدل وكأنه مرشوش بمبيدات الحشائش عريضة الأوراق أو كأنه يعاني من العطش الشديد (شكل ٦٩). الأوراق المتقدمة فى السن تأخذ اللون الأصفر ثم تجف وتسقط، تصبح أنصال الوريقات متجعدة وهشة وسريعة الانكسار. تحت الظروف المثلى المناسبة للمرض يمكن أن يتكشف نكروزز فى عروق الأوراق والساق.

أهم مظهر يميز هذا المرض هو أن النباتات المصابة تنتج كثيراً من الأزهار والثمار أكثر من النباتات السليمة، إلا أن هذه الثمار تبقى صغيرة جداً لا يزيد حجمها عن حجم البلية (marlbes) وليس لها أية قيمة تسويقية أو إقتصادية.



شكل رقم ٦٩ :

أعراض الإصابة بمرض فيرويد النبات الذكري في الطماطم على المجموع الخضري.

A: أعراض شديدة

B: أعراض متوسطة

المسبب:

يتسبب مرض النبات الذكري في الطماطم عن فيرويد اسمه فيرويد النبات الذكري في الطماطم Tomato Planta Macho Viroid. ويكتب باختصار (TPMVd). يتكون هذا الفيرويد من ٣٦٠ نيوكليوتيدة. عند تحضير معلقات لمستخلصات النباتات المصابة بالمرض وحقنها في البادرات السليمة، تبين أن

الأعراض تبدأ في الظهور بعد ٢١ يوم من الحقن وتزداد أكثر ابتداءً من ٢٦ يوم بعد الحقن. ولقد وجد أن هذا الفيروس إذا حضن مع RNase يفقد حيويته نهائياً أما إذا حضن مع DNase فلا يتأثر بذلك (مثل بقية الفيروسات) ولقد وجد أن سرعته في الهجرة الكهربائية مشابهة لسرعة فيروس PSTVd، واعتماداً على هذه الصفة برز سؤال أمام جميع العاملين على هذا الفيروس هو هل هذا الفيروس سلالة من سلالات PSTVd أم لا؟؟. عندئذٍ إنجذبت الأبحاث لتحديد العلاقة بين فيروس النبات الذكر في الطماطم TPMVd وفيروس الدرنة المغزلية في البطاطس PSTVd. وباستعمال الطرق الحيوية وطرق التحليل الكيميائية مثل Finger prints تبين أن فيروس TPMVd هو فيروس منفصل وليس سلالة شديدة كما كان يقال من سلالات PSTVd وذلك اعتماداً على :-

١ - لقد تبين أن هناك أنواعاً كثيرة من النباتات مقاومة للإصابة بفيروس TPMVd ولكنها قابلة للإصابة بالفيروس PSTVd.

٢ - هناك أنواع من النباتات العائل يستطيع الفيروس أن يتكاثر فيها ولكن PSTVd يحدث أعراض في هذه العوائل في حين أن TPMVd لا يسبب فيها ظهور أية أعراض.

٣ - وجد أن هناك أنواع نباتية مشخصة أخرى لهذا الفيروس TPMVd منها نبات *Gynura aurantica*. فمن المعروف أن فيروس PSTVd وفيروس اكسوكورتر الحمضيات CEVd يصيبان هذا النبات ويتكاثران فيه (تناسخ) وتظهر عليه أعراض مميزة، ولكن هذا النبات عند حقنه بالفيروس TPMVd فإن هذا الفيروس يتناسخ في النبات (يتكاثر) وذلك بعد ٣ أسابيع من الحقن، ولكن هذا النبات لا يظهر عليه أعراض إصابة بالفيروس TPMVd ويبقى Symptomless.

٤ - كذلك فإن الفيروس TPMVd والفيروس PSTVd تتشارك في كثير من العوائل ولكنهما يختلفان إختلافاً معنوياً في تفاعلهما مع هذه العوائل من

حيث القابلية للإصابة والتعبيرات المرضية. فوجد أن كل من *Gomphrena* ، *Nicotiana - tabacum* و *Datura stramonium* ، *globosa* هذه الثلاثة عوائل مناسبة للفيرويد ويتكاثر فيها (يتناسخ) ولكنها لا تدعم الفيرويد TPMVd وتساعد على التناسخ (التكاثر) أما العوائل:

1 - *Nicotiana glutinosa*

2 - *Solanum melongena*

3 - *Solanum tuberosum*

هي عوائل للفيرويين ولكنها تصاب فقط بفيرويد الدرنة المغزلية PSTVd وتظهر عليها أعراض مرضية ولا يظهر عليها أعراض مرضية إذا أصيبت بالفيرويد TPMVd.

هذه المميزات أكدت للباحثين أن فيرويد TPMVd هو فيرويد منفصل وليس سلالة شديدة من سلالات فيرويد الدرنة المغزلية في البطاطس PSTVd.

### انتشار الفيرويد TPMVd في النباتات المصابة:

إن جدول ٤٥ يبين أن الفيرويد TPMVd أمكن اكتشافه في جميع أجزاء نباتات الطماطم المصابة. أما الأوراق الناضجة التي لم يظهر عليها أعراض وجدت باستمرار تحتوى كميات أقل مما هو موجود في الأوراق الصغيرة المظهرة للأعراض. وجدت أكبر كمية من الفيرويد TPMVd في السيقان والجذور. أما جدول ٤٦ يبين أن الفيرويد متواجد في جميع الأجزاء تحت الخلوية في النبات باستثناء ال *Postribosomal* ووجد أن خلايا الورقة فيها مستويات عالية من الفيرويد موجودة في أجزاء من الأنوية. أما في خلايا الساق فإنه يوجد نسبة بسيطة من الفيرويد مرافقة للنوية. معظم الفيرويد متواجد في الميتوكوندريا والأغشية ويوجد نسبة منخفضة جداً في البلاستيدات الخضراء والرايوسومات.



## الوقاية بالتضاد Cross - Protection :

كما هو معروف فإن إصابة نباتات الطماطم بالسلالة المعتدلة من فيروس PSTVd يقيها من إظهار الأعراض (التعبيرات المرضية) عند حدوث إصابة ثانية بالسلالة الشديدة من PSTVd أو الإصابة بفيروس أكسوكورتز الحمضيات CEVd. اعتماداً على ذلك إنجتهت الأبحاث لمعرفة فيما إذا كانت إصابة نباتات الطماطم بالسلالة المعتدلة من PSTVd يمكن أن تحفظ النباتات من الإصابة أو إظهار التعبيرات المرضية عند حقنها بالفيروس TPMVd بعد مدة من حقنها بالسلالة المعتدلة من الفيروس PSTVd.

جدول ٤٥ : التركيز النسبي لفيروس TPMVd في أجزاء مختلفة من نباتات الطماطم.

الفهرسة الحيوية		جزء النبات
تجربة ثانية	تجربة أولى	
٥٩	٤٤	جذر
٤٨	٦٥	ساق
٤٥	٤٠	الورقة الأولى والثانية غير مظهرة أعراض
٥٨	٥٣	الورقة الثالثة والرابعة مظهرة أعراض

ملاحظات:

التجربة الأولى: كانت درجة الحرارة في الصوبا الزجاجية منخفضة وكانت الأعراض متوسطة.  
 التجربة الثانية: كانت درجة الحرارة في الصوبا الزجاجية ٢٩م والأعراض شديدة.  
 كانت تستعمل أربعة تخفيفات للفيروس وهي ١ - بدون تخفيف ٢ - تخفيف ١ : ١٠، ٣ - تخفيف ١ : ١٠٠، ٤ - تخفيف ١ : ١٠٠٠.  
 كانت الفهرسة الحيوية تجرى كما في بقية أنواع التجارب بدون تمييز.  
 كانت تحقن النباتات في طور الفلقات بمستخلص من نباتات مصابة بالفيروس ثم توضع في الصوبا الزجاجية حتى تصل طول أربعة ورقات ثم يؤخذ منها المستخلص ويقدر فيه الفيروس.

جدول ٤٦: توزيع الفيرويد TPMVd فى الأجزاء تحت الخلوية فى ورقة الطماطم ونسيج الساق.

الفهرسة الحيوية		جزء الخلية المختبر
الأوراق	الساق	
٢٦	٦	النواة
١٨	١٤	البلاستيدات الخضراء
٩	١٩	الميتوكوندريا
٢٤	١٨	الأغشية الخلوية
١٩	١٢	الرايوسومز
صفر	صفر	بوست رايوسومال

ملاحظات:

كانت تجرى عملية الفهرسة الحيوية كما فى أى تجربة أخرى.  
الأجزاء تحت الخلوية تؤخذ من النباتات المظهرة الأعراض النموذجية.

أجريت تجارب على ثلاثة مجموعات من بادرات الطماطم كل مجموعة فيها أربعة بادرات، حقنت بالسلالة المعتدلة من الفيرويد PSTVd ثم بعد ذلك حقنت بالفيرويد المتحدى TPMVd بعد ٥، ١١، ١٧ يوم. ثم حقنت ثلاثة مجموعات أخرى بالفيرويد TPMVd لوحده أيضاً على فترات ٥، ١١، ١٧ يوم وذلك لمقارنة الأعراض وتأثيرات النمو على كل فيرويد. ثم حقنت ثلاثة مجموعات من بادرات الطماطم بالسلالة المعتدلة من PSTVd لوحدها.

يبين جدول ٤٧ أن النباتات المصابة بالسلالة المعتدلة من فيرويد PSTVd لوحدها لها تأثير قليل على نمو النباتات وتؤدى إلى إصابة متوسطة، بينما الإصابة بالفيرويد TPMVd لوحده يؤدى إلى خفض شديد فى طول النباتات ويسبب أعراض شديدة.

عندما حقنت النباتات بالفيروس المتحدى TPMVd بعد خمسة أيام من الحقن بالسلالة المعتدلة من PSTVd فإن التقزم الملاحظ في النباتات قد إنخفض قليلاً، بمرور ١٦ - ٤٠ يوم بعد الحقن الأول فإن الأعراض كانت أقل شدة إلى حد ما.

عندما حقنت النباتات بالفيروس المتحدى TPMVd بعد ١١ و ١٧ يوم من الحقن بالسلالة المعتدلة من فيروس PSTVd لم يلاحظ تغيرات معنوية في النمو بين النباتات المحقونة بالفيروسين وبين تلك النباتات المحقونة بالفيروس TPMVd لوحده وذلك بسبب أن موعد الحقن متأخر نوعاً ما وأن النباتات أصبحت أكبر عند حقنها بالفيروس TPMVd وبالتالي فإن التأثير على النمو إنخفض كثيراً بالمقارنة في التجربة التي فيها تم الحقن بالمتحدى بعد خمسة أيام. عند المقارنة مع الكنترول كان هناك خفض قليل في شدة الأعراض لوحظ ثانية في النباتات المحقونة بالفيروسين، هذا لوحظ بعد ٩، ٤٠ يوماً بعد الحقن الأول في الاختبار مع المتحدى على يوم ١١ ولكن فقط ٤٠ يوم بعد الحقن الأول في الاختبار مع المتحدى على يوم ١٧.

ويمكن القول باختصار أن جميع الإختبارات تدل على أنه، بغض النظر عن مدة الزمن التي تفصل بين حقن النباتات بالسلالة المعتدلة من PSTVd والفيروس المتحدى TPMVd، يحدث هناك تداخل بسيط في التعبيرات الكاملة لمرض النبات الذكري في الطماطم تحدث في النباتات المحقونة بالفيروسين. هذا التداخل كان بسيطاً بحيث لا ينظر إليه وكأنه ظاهرة وقاية بالتضاد cross - protection. هذا يتأكد بملاحظة أن النباتات المحقونة بالفيروسين، فإن أعراض مرض النبات الذكري تظهر باستمرار مبكراً وكانت بشكل أولى أكثر شدة في النباتات الكنترول التي حقنت بالفيروس TPMVd في نفس الوقت الذي حقن فيه الفيروس PSTVd. قد يمكن تفسير ذلك بأنه نوع من ال Synergistic أكثر منه Antagonistic بين الكائنين المرضيين.

جدول ٤٧: تأثير إصابة نباتات الطماطم بالسلالة المعتدلة من الفيرويد PSTVd على التغيرات المرضية للإصابة بالفيرويد TPMVd.

كثافة الأعراض على يوم				طول النبات سم بعد يوم			نظام الحقن (التجربة)
٤٠	٢٩	١٦	١٣	٤٠	٢٩	١٦	
							١ - بداية الحقن
++	++	++	+	٣٣	٢٧	١٦	أ - سلالة فيرويد PSTVd المعتدلة لوحدها
++++	++++	+++	+++	١٣	١٢	١٠	ب - فيرويد TPMVd لوحده
-	-	-	-	٣٥	٢٩	١٨	ج - كترول
							٢ - حقن المتحدى بعد خمسة أيام
+++	+++	++	++	١٦	١٤	١٣	أ - PSTVd - m / TPMVd
++++	++++	+++	+	١٣	١١	١١	ب - فيرويد TPMVd لوحده
-	-	-	-	٣٧	٣٢	١٨	ج - كترول
							٣ - حقن المتحدى بعد ١١ يوم
++	++	++	-	٢٦	٢٣	١٦	أ - PSTVd - m / TPMVd
+++	+++	-	-	٢٦	٢٤	١٨	ب - فيرويد TPMVd لوحده
-	-	-	-	٤١	٣٧	٢٥	ج - كترول
							٤ - حقن المتحدى بعد ١٧ يوم
++	++	?	?	٣١	٢٨	١٧	أ - PSTVd - m / TPMVd
+++	-	?	?	٣٠	٣٠	١٨	ب - فيرويد TPMVd لوحده
-	-	-	-	٤٦	٤٢	٣٠	ج - كترول

ملاحظات:

PSTVd - m تمنى سلالة فيرويد الدرة المغزلية في البطاطس المعتدلة.

- لا يوجد أعراض، ?? لم يجرى لها إختبار، (+) أعراض بسيطة (++) أعراض متوسطة، (+++) أعراض شديدة،

(++++) أعراض شديدة جداً. كان يستعمل متوسط طول أربعة نباتات.

نباتات الكترول التي لم تحقق بأى من الفيرويديين لم تظهر عليها أعراض لأنها سليمة.

## العوائل الطبيعية للفيرويد:

اجريت تجربة لتحديد العوائل الطبيعية للفيرويد، جمعت بذور ٥٣ نوع نباتي تمثل ١٥ عائلة نباتية توجد بالقرب من مزارع الطماطم فى المكسيك. حقنت البادرات الناتجة من هذا البذور ميكانيكياً بالفيرويد TPMVd. كانت النتيجة أن أصيب ١٣ نوع من النباتات كلها تتبع العائلة الباذنجانية. وجد أن ثمانية أنواع من هذه الثلاثة عشر تصاب طبيعياً بالفيرويد كان أهمها *Solanum torvum* وإن شدة الأعراض تتراوح من إصابة بسيطة جداً كما فى كل من *Solanum nigrescens* و *Physalis philadelphica* إلى إصابة شديدة جداً كما فى *Lycopersicon esculentum*. وجد أن نسبة تركيز الفيرويد فى جميع العوائل الطبيعية تكون عالية فى فترة الخريف بنسبة ١٤,٥٪ أكثر منها فى الربيع والصيف حيث تكون النسبة ٠,٤٪. بعد أن عرف بأن الفيرويد ينتشر فى ١٩ ولاية فى المكسيك درس التوزيع الجغرافى لهذا المرض وتأثير البيئة فى ذلك فوجد أن الخط الحرارى (الذى يحدد درجات الحرارة) الذى يحدد ٢٢م هو الحدود الفاصلة بين المناطق التى يوجد فيها الفيرويد فى الزراعات البرية لنباتات العائلة الباذنجانية والمنطقة التى لا يوجد فيها الفيرويد، على هذه النباتات ووجد أنه ينتشر فى مقاطعة Tepalcingo بنسبة ٣٢,٥٪ فى نباتات الطماطم. بناءً على هذه النتائج إتجه البحث لمعرفة العامل الناقل للفيرويد والذى يجب أن يتوفر فى الشتاء والخريف ولا يظهر فى الربيع والصيف.

## انتقال الفيرويد:

سبق وأن ذكرنا أن فيرويد TPMVd ينتقل ميكانيكياً بسهولة سواء بالاحتكاك أو بالأدوات الزراعية الملوثة أو أثناء إجراء العمليات الزراعية والملازمة بالأيدى الملوثة. إن دراسة إنتشار الفيرويد والظروف الحرارية التى تحيط بانتشاره جعلت الباحثين لا يقفوا مكتوفى الأيدى ويكتفوا بالقول بأن الفيرويد ينتقل ميكانيكياً. إستمرت الأبحاث المضنية أربع سنوات على هذا الفيرويد لمعرفة طرق إنتقاله، أعطت هذه الأبحاث نتائج مثمرة وذلك باكتشاف ناقل حشرى ولتأكيد هذا استمر البحث

على هذا الناقل مدة ستة شهور بعد ذلك صدر القرار النهائي وهو أن حشرة المن *Myzus Persicae* هي الناقل النشط لهذا الفيرويد. إن حشرة المن المذكورة تتجمع على نباتات الفاسيالتز من العائلة الباذنجانية *Physalis aff foetens* وهو نبات برى عائل للفيرويد وأن حشرة المن تعيش على هذا النبات وبالتالي تنقل الفيرويد من العائل البرى إلى النباتات المزروعة. لقد وجد أيضاً أن جميع أطوار الحشرة قادرة على أن تنقل هذا الفيرويد. ولقد وجد أيضاً أن هذا العائل يؤثر على درجة النقل بحشرة المن عندما يستعمل كمصدر للفيرويد.

إن نبات *Physalis aff foetens* يلائم إنتقال الفيرويد بنسبة ٩٧٪ بينما نباتات الطماطم لا تساهم في نقل الفيرويد إلا بنسبة ٣٣٪. وجد أن الفيرويد يبقى في الحشرة لمدة ٢٤ ساعة بعد اكتسابها له. يبدو أن الحشرة تتكاثر على سبعة أنواع من النباتات والتي هي أيضاً عوائل للفيرويد. إن نبات *Solanum rostratum* هو أكثر الأنواع مناسبة لتكاثر الحشرة وبالتالي لإنتشار الفيرويد. أما نبات الطماطم فهو أقل الأنواع ملائمة لتكاثر الحشرة الناقلة. إن الحشرة تزداد أعدادها إلى أقصى حد في شهر يناير وتصل أدنى حد من التكاثر في شهر مايو وهذا ما يتوافق مع إنتشار الفيرويد على نباتات الطماطم ويمكن اعتماداً على ذلك وضع برنامج جيد لمقاومة الحشرة وبالتالي مقاومة الفيرويد بطريق غير مباشر.

## ب - مرض تقزم قمة الطماطم

### Tomato Apical Stunt Disease

يتسبب هذا المرض عن فيرويد تقزم قمة الطماطم (TASVd) *Stunt Viroid*. لهذا الفيرويد سلالتين السلالة الأولى اسمها سلالة ساحل العاج وتتكون من ٣٦٠ نيوكليتيده والثانية سلالة إندونيسيا وتتكون من ٣٦٣ نيوكليتيده. تبلغ نسبة تماثل التتابع في هذا الفيرويد ٩١٪. يسبب أعراض شديدة على الطماطم صنف *Rutgers*.

تظهر الأعراض على شكل تقزم فى قمة النبات بحيث تقصر السلااميات وتصغر الأوراق (شكل ٧٠). تصفر الأوراق السفلية وتسقط تبقى النباتات ضعيفة وينخفض الإنتاج كثيراً. ينتقل الفيرويد ميكانيكياً بسهولة عن طريق تلوث الأيدى والأدوات الزراعية وأثناء العمليات الزراعية.

هناك تجارب كثيرة على هذا الفيرويد بحيث يتكون فيرويد جديد مركب من جزئين جزء من فيرويد تقزم القمة فى الطماطم والجزء الثانى من فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس أو فيرويد اكسوكورتز الحمضيات. وبالفعل أمكن تركيب فيرويد جديد فيه صفات الفيرودين وهذه أبحاث كثيرة لا مجال لذكرها هنا.



شكل رقم ٧٠ :

أعراض الإصابة بفيرويد تقزم القمة فى الطماطم.

١ - كترول ٢ - الإصابة بالعزلة الأندونيسية ٣ - الإصابة بعزلة ساحل العاج.

## جـ - مرض القمة الشجيرية فى الطماطم

### Bunchy Top Disease of Tomato

مقدمة :

كان أول وصف لهذا المرض فى جنوب أفريقيا وذلك سنة ١٩٣١ من قبل العالم McClean. إستمرت أبحاث هذا العالم على مرض القمة الشجيرية فى

الطماطم لغاية سنة ١٩٣٥ وذكر بأن هذا المرض ينتشر في جنوب أفريقيا ويسبب خسائر كبيرة في محصول الطماطم ونشر أول بحث عن هذا المرض في مجلة اسمها South African Department of Agriculture Science Bulletin 139. ذكرت الأعراض ونسبة الإصابة والخسائر إلا أن مسبب المرض إفتراض على أنه فيروس، مع ذلك فإن طرق الانتقال وصفات المسبب لم توضح في تلك الأبحاث وبقيت الشكوك محيطة بهذا المسبب المرضى. في سنة ١٩٧٩ ذكر هذا المرض في الهند وأجريت عليه تجارب عديدة إلا أنها لم تحدد المسبب ولا طريقة الانتقال. في سنة ١٩٨١ كان هناك وصف لهذا المرض في المجلة العلمية الأكاديمية في غرب أفريقيا. إن مرض القمة الشجرية في الطماطم ينتشر في الهند بشكل كبير ويسبب خسائر كبيرة ولذلك يسمى باسم مرض القمة الشجرية الهندى في الطماطم Indian Bunchy Top Disease of Tomato. أجريت تجارب عديدة على مسبب المرض في الهند وإتجهت هذه الأبحاث إلى الفيروس واستبعدت الفيروس. لقد عزل الفيروس من نباتات الطماطم *Lycopersicon esculentum* المصابة بمرض التقزم الشجرى الهندى. باستعمال طرق الإختبارات Blot hybridization بالمنقب cRNA المعلم بالفسفور المشع ٣٢ المخصص لاكتشاف الفيروسات المختلفة، وجد أن هذا الفيروس الهندى شديد التقارب والعلاقة مع فيروس اكسوكورتز الحمضيات CEVd. ولقد أظهر تحديد التتابع أن الفيروس يتكون من ٣٧٢ نيوكليتيده ولقد أعطى اسم فيروس اكسوكورتز الحمضيات سلالة الطماطم CEVd - t وهذه السلالة تختلف عن السلالات الأسترالية للفيروس CEVd بستة وثلاثين نيوكليتيده عن السلالة A و ٤٧ نيوكليتيده عن السلالة B ويختلف عن سلالة العنب الأسبانية بتغير ٥٢ نيوكليتيده. وتحليل النشوء الوراثى لهذا الفيروس تؤكد بأنه قريب الصلة مع فيروس CEVd فى جميع تركيب النطاقات باستثناء نطاق المرضية والنطاقات الطرفية اليسارية والتي هى مطابقة تماماً لما هو فى فيروس الدرنة المغزلية فى البطاطس وفيروس تقزم القمة فى الطماطم.



## الأعراض:

يصيب هذا المرض نبات الطماطم *Lycopersicon esculentum* وتظهر الأعراض على شكل توالد مستمر وغزير من النموات الحديثة في قمة النبات مصحوباً بتقزم هذه النموات الحديثة وتدليها وحدوث تشوهات كثيرة مختلفة في أنصال الأوراق (الوريقات) ونكروز في العروق. تتشابه أعراض هذا المرض مع مرض تقزم القمة في الطماطم المذكور سابقاً ويصعب التمييز بينهما إلا بالعين الخبيرة حيث أن هذا المرض تكون فيه قمم النباتات أكثر غزارة من المرض الأول وتكون الأوراق الصفراء قليلة في مرض شجيرة الطماطم الهندي ولكن هذه الأخيرة ليست علامة مميزة دائماً بل قد يحدث العكس عند إختلاف درجات الحرارة عن الظروف المثلى للنبات.

## المسبب:

يتسبب مرض القمة الشجيرية الهندي في الطماطم عن فيروس هو عبارة عن سلالة من سلالات فيروس اكسوكورتز الحمضيات CEVd - t ويطلق عليه CEVd - t ويتكون هذا الفيروس من 372 نيوكليوتيدة تتكون من A 72 و C 109 و G 113 و U 78 وبذلك تكون محتوياته من G + C تساوي 59,7% وهي قريبة من الفيروسات النموذجية الأخرى. وأن نسبة G + C إلى نسبة A + U تساوي 1,48 وإن التركيب الثانوي لهذا الفيروس يتكون من أزواج قواعد عالية ويأخذ ظاهرياً شكل عصوي ثنائي الخيط والذي فيه مناطق حلزونية قصيرة التابع مع عروات منتفخة داخلية.

بتحليل تتابع تركيب النطاقات الخمسة لهذا الفيروس ومقارنتها مع الفيروسات الأخرى والفيروسايدات أعطت النتيجة المذكورة في جدول 48. إن المنطقة متغيرة النطاق ونطاقات جانب الطرف الأيمن قريبة الشبه غالباً مع ما هو موجود في فيروس

اكسوكورنز الحمضيات CEVd، بينما نطاق المرضية يشبه فيرويد الدرنة المغزلية في البطاطس PSTVd أما الطرف اليسارى فهو أكثر تشابهاً وقرباً مع فيرويد تقزم قمة الطماطم TASVd.

إن حدود النطاقات لفيرويد القمة الشجرية الهندى عزلة t - CEVd هى كما يلى :-

- ١ - نطاق الطرف الأيسر من ٣٢٦ إلى ٣٧٢ فى الخيط السفلى } ٩٣  
ومن ١ إلى ٤٦ فى الخيط العلوى } نيوكليتيده
- ٢ - نطاق المرضية من ٤٧ إلى ٧٥ فى الخيط العلوى } ٦١  
ومن ٢٩٤ إلى ٣٢٥ فى الخيط السفلى } نيوكليتيده
- ٣ - المنطقة المركزية المحفوظة من ٧٦ - ١٢٢ فى الخيط العلوى } ٩٧  
ومن ٢٤٤ إلى ٢٩٣ فى الخيط السفلى } نيوكليتيده
- ٤ - المنطقة المتغيرة من ١٢٣ إلى ١٥٠ فى الخيط العلوى } ٥٧  
ومن ٢١٥ إلى ٢٤٣ فى الخيط السفلى } نيوكليتيده
- ٥ - نطاق الطرف الأيمن من ١٥١ إلى ٢١٤ تأخذ جزء من الخيط العلوى  
وجزء من الخيط السفلى يتكون من ٦٤ نيوكليتيده.

المميزات العامة للمسبب:

الصفة الأولى :-

من نتائج الدراسات السابقة تبين أن مرض القمة الشجرية الهندى فى الطماطم يتسبب عن فيرويد وأن هذا الفيرويد من سلالات الفيرويدات التى تصيب الطماطم

جدول ٤٨: يبين أعداد النيوكليوتيدات المتغيرة في كل نطاق بالنسبة للفيرويد ١-CEVd.

عدد النيوكليوتيدات المختلفة الموجودة في كل نطاق من الفيرويدات عن فيرويد القمّة الشجرية في الطماطم											الفيرويد وسلالاته
المجموع	الطرف اليسار		المنطقة المتغيرة		المنطقة المركزية المسطوّرة		المرضية		الطرف اليمين		
	عدد	Z	عدد	Z	عدد	Z	عدد	Z	عدد	Z	
											١ - CEVd
٣٦	٧,٨١	٥	٢٨,٠٧	١٦	صفر	صفر	٢٢,٩	١٤	٠,٩	١	السلالة الأسترالية A
٤٧	٦,٢٥	٤	٢٦,٣	١٥	٢,٠٦	٢	٢٤,٥٩	١٥	١١,٨	١١	السلالة الأسترالية B
٥٣	١٤,٠٦	٩	٢٨,٠٧	١٦	٣,٠٩	٣	٢١,٣١	١٣	١٢,٩	١٢	السلالة الأسيانية G
											٢ - PSTVd
٢٤٤	٦٧,١٨	٤٣	١٤٧,٣٦	٨٤	٥٢,٥٧	٥١	٢١,٣	١٣	٤٦,٢٣	٤٣	السلالة المتوسطة I
٢٣٤	٦٧,١٨	٤٣	١٤٥,٦	٨٣	٥١,٥٤	٥٠	٢٥	١٥	٤٦,٢٣	٤٣	السلالة المعتدلة M
٢٣٨	٦٧,١٨	٤٣	١٤٧,٣٦	٨٤	٥٢,٥٧	٥١	٢٢,٩٥	١٤	٤٩	٤٦	السلالة الخفيفة S
											٣ - TASVd
٢٣١	٧٦,٥٦	٤٩	١٨٥,٩٥	١٠٦	١٨,٥٥	١٨	٨١,٩٧	٥٠	٨,٦	٨	عزلة أفريقيا
٢٣٥	٧١,٨٧	٤٦	٢٠٠	١١٤	٢١,٦٤	٢١	٧٢,٣	٤٤	١,٠٧	١٠	عزلة أندونيسيا
٢٨٦	٧٣,٤٣	٤٧	٢٠٠	١١٤	٥١,٥٤	٥٠	٥٢,٤٦	٣٢	٤٦,٢٣	٤٣	٤ - TPMVd

ملاحظات:

محتوى فيرويد ١-CEVd: الطرف اليسار ٩٣، نطاق المرضية ٦١، المنطقة المركزية المحفوظة ٩٧ المنطقة المتغيرة ٥٧، الطرف اليمين ٦٤.

النسبة المئوية الزائدة عن ٧١٠٠ تعني أن نيوكليوتيدات الفيرويد المقارن أكثر من نيوكليوتيدات ١-CEVd وكلها مختلفة.

مثل فيروس تقزم القمة فى الطماطم TASVd أو فيروس النبات الذكري فى الطماطم TPMVd ولكنه سلالة مميزة من سلالات فيروس اكسوكورتز الحمضيات CEVd ولم يسبق لهذا الفيروس أو هذا المرض أن وجد مترافقاً مع أمراض أخرى من أمراض الطماطم. لقد ثبتت العلاقة القريبة لهذا الفيروس مع فيروس CEVd بواسطة إختبار Blot - hybridization وباستعمال cRNAs متخصصة لاكتشاف عدد كبير من الفيروسات وأن تحليل التتابع قد أكد بأن هذا الفيروس هو سلالة منفصلة من CEVd، وأطلق عليه اصطلاح سلالة الطماطم من فيروس اكسوكورتز الحمضيات t-CEVd. مع أن فيروس تقزم قمة الطماطم وفيروس النبات الذكري فى الطماطم تسبب أمراض تحدث طبيعياً ومنتشرة فى مناطق كثيرة، إلا أن مرض القمة الشجرية الهندي هو أول مرض يصيب الطماطم ويتسبب عن فيروس CEVd.

#### الصفة الثانية:

إن فيروس t-CEVd أكثر قرباً وعلاقة مع فيروس العزلة الأسترالية A، حيث أن هناك إختلاف فى ٣٦ تغير فى النيوكليوتيدات، حصل استبدال فى ٢٩، وثلاثة إضافة (ادخال) وإزالة ٤. أما فى العزلة الأسترالية B هناك إختلاف فى ٤٧ نيوكليوتيدة منها ٣٨ إستبدال و ٤ إضافة (ادخال) و ٤ إزالة أما فى سلالة العنب من CEVd فإن لتغير فى ٥٣ نيوكليوتيدة، منها ٤٦ إزالة وإضافة ٢ وخمسة حذف.

كما هو الحال فى عزلة العنب الأسترالية g-CEVd فإن تتابع النيوكليوتيدات فى t-CEVd تختلف كثيراً عن السلالات A، B وهذا الإختلاف أكثر من الإختلافات الموجودة بين B و A نفسها، مما يدل على الانعزال النسبى لكل من g-CEVd و t-CEVd عن بقية سلالات CEVd المعزولة من الحمضيات، وقد يرجع سبب ذلك لإختلاف أصل العائل هذا يعنى العنب والطماطم حيث الإختلاف النباتى بينهما كبير.

## الصفة الثالثة:

إن الاختلافات التي تحول CEVd - A إلى CEVd - t موجودة أساساً في الطرف اليسارى وفي نطاق المرضية والنطاق (المنطقة) المتغير، بينما النطاق المركزى ومنطقة الطرف اليمين لا تخضع أساساً لأى تغيرات. كذلك فإن CEVd - t يشابه أيضاً CEVd - g فى هذه المجالات إلا أن منطقة الطرف اليمين ومنطقة الطرف اليسار تختلف معنوياً عن CEVd - A.

إن تغيير النيوكليوتيدات بين سلالات CEVd المؤدية إلى تحورات فى التركيب الثانوى المفترض لنطاق المرضية قد استخدمت من قبل الفيرويد فى تحويرات التعبيرات المرضية على الطماطم. ولقد ثبت أن معظم هذه التغيرات التى تؤدى إلى تركيب ثانوى مختلف فى نطاق المرضية للسلالات المعتدلة (عند مقارنتها مع السلالات الشديدة) تتواجد خارج القلب المركزى والذى هو محفوظ بشدة فى جميع السلالات الشديدة. هذا القلب المركزى يتكون من 6 - A5 تتابع (غالباً فى عروة داخلية) وملاصقة لزوج قواعد السيقان. بفحص القلب المركزى فى CEVd - t تبين أن تركيبه الثانوى نموذجى كما هو فى جميع السلالات الشديدة باستثناء الثمانية قواعد الموجودة فى المنطقة الحلزونية إلى اليمين من تتابع (A) Aligo الموجود فى السلالات الشديدة من CEVd التى تتعوق بواسطة دخول (غرز) خمسة نيوكليوتيدات (تؤدى إلى عروة داخلية من ثلاثة مراكز قواعد مزدوجة A - U). إن تخفيض الثبات الحرارى لهذه المنطقة الموضعية لا يؤثر بالضرورة على شدة التعبيرات المرضية. هذا يكون واضحاً أكثر بحقيقة أن القلب المركزى لنطاق المرضية موجود فى كل السلالات الشديدة من الفيرويد CEVd (باستثناء CEVd - t)، تحدث أيضاً فى جميع سلالات PSTVd بغض النظر فيما إذا كانت تحدث أعراض متوسطة أو معتدلة أو شديدة فى الطماطم.

#### الصفة الرابعة:

إن دراسة نشوء الفيروسات أجريت مع كل تركيب لكل نطاق بمفرده في الفيروسات المختلفة وهذا أدى إلى القول بأن النطاقات المتماثلة في مختلف الفيروسات قابلة للتغير وهذا يكون أكثر وضوحاً عن طريق ملاحظة تتابع النيوكليوتيدات في فيروس *Columnnea* الكامن والذي يتكون من تتابعات سائدة تبين أنها موجودة في فيروسات أخرى. ونتيجة معرفة تتابع فيروس العنب الأسترالي والذي إقترح بأنه نتيجة لإعادة الاتحاد (الارتباط) المتكررة في RNA. بالمثل يمكن القول بأن الفيروس *t-CEVd* هو نتيجة إعادة الاتحاد بين RNA في فيروسات مختلفة أو يمكن القول بأن هذا الفيروس *t-CEVd* هو حلقة بين فيروس *PSTVd* وفيروس *TASVd* التي تسبب أعراض مرضية في الطماطم. أو القول بأنه مركب من جزئين من الفيرويين الذين يصيبان الطماطم.

## ٧ - فيروس الخيار

### Cucumber Viroid

#### مرض الثمرة الباهتة في الخيار

#### Cucumber Pale Fruit Disease

#### أعراض المرض:

يهاجم هذا المرض نباتات الخيار *Cucumis sativus* تظهر النباتات المصابة متقزمة فيها شفافية عروق وتتجدد الورقة قبل أن تسقط. تصفر الأوراق السفلى وتسقط أحياناً وتجف أحياناً أخرى قبل أن تسقط، يضعف المجموع الخضري ويضعف نمو النبات وتقل الانتاجية. تصبح الثمار صفراء أو خضراء باهتة وتكون متكرمشة أحياناً وذات شكل غير منتظم يقل الانتاج بنسبة كبيرة، تصبح الثمار غير صالحة للتسويق. يتشابه هذا المرض في أعراضه مع أعراض كثير من أمراض الفيروسات التي تهاجم الخيار إلا أن الميزة الرئيسية التي تميزه عن الإصابات الفيروسية هو عدم ظهور تلونات أو موزايك في نصل الورقة باستثناء شفافية العروق. وكذلك لا يتكون زوائد على الثمرة ولا يصبح نسيجها اسفنجياً كما في بعض الإصابات الفيروسية.

#### المسبب:

يتسبب هذا المرض عن فيروس الثمرة الباهتة في الخيار Cucumber Pale Fruit Viroid ويكتب باختصار (CPFVd). بقى الاعتقاد سائداً بأن هذا المرض يتسبب عن فيروس تقزم حشيشة الدينار HSVd حيث أن فيروس تقزم حشيشة الدينار له

سلالات عديدة ويتراوح عدد النيوكليوتيدات في هذه السلالات من ٢٩٧ إلى ٣٠٣، إلا أن السلالة التي تصيب نبات الخيار طولها ٢٩٧ نيوكليوتيدة. ولقد وجد أن فيروس الثمرة الباهتة في الخيار CPFVd يتكون من ٣٠٣ نيوكليوتيدة. ولقد أجريت تحاليل عديدة وتجارب تمييز بين هذا الفيروس وسلالة فيروس HSVd فأصبح من المؤكد أن هذا الفيروس CPFVd هو فيروس منفصل لوحده وليس عزلة من عزلات فيروس تقزم حشيشة الدينار، إلا أن هناك كثير من المراجع لا تزال تذكر أن فيروس الثمرة الباهتة في الخيار هو عزلة من عزلات فيروس تقزم حشيشة الدينار.

هناك أسباب أدت إلى الاعتقاد بأن فيروس CPFVd هو عزلة من عزلات HSVd

وهي:-

١ - إن بعض عزلات فيروس HSVd تسبب أعراض على نبات الخيار متماثلة تماماً مع ما يسببه فيروس الثمرة الباهتة في الخيار.

٢ - لا يمكن التفريق بين عزلة فيروس HSVd وفيروس CPFVd اعتماداً على الأعراض أبداً.

٣ - كلا الفيروسين له تماثل تتابع عال جداً يصل ٩٥٪ إلا أنه غير متطابق.

٤ - العوائل التي تصيبها عزلة HSVd هي نفسها التي يصيبها الفيروس CPFVd.

معظم الأبحاث أقرت بأن فيروس CPFVd وفيروس HSVd كلاهما عامل مسبب لمرض الثمرة الباهتة في الخيار وهما يوجدان منفصلين في عوائل نباتية مختلفة مثل *Cucumis sativus* للفيروس الأول و *Humulus lupulus* للفيروس الثاني في مناطق مختلفة. يمكن فصل الفيروسين بطريقة PAGE ووجد أن فيروس CPFVd أكبر من فيروس HSVd بحوالى ستة نيوكليوتيدات وإن كلا الفيروسين فيه تماثل تتابع عال جداً إلا أنها غير متطابقة. يختلف CPFVd عن الفيروس HSVd عزلة الخيار في تتابع النيوكليوتيدات على موقع ١٦ والذي يتضمن



تغيير ٨ نيوكليوتيدات ودخول ٧ نيوكليوتيدات وحذف واحدة من HSVd. كلا الفيروسين فيهما تماثل تتابع ٩٥٪. إن فيروس CPFVd يشكل تركيب شبه عصوي مع عديد من أزواج القواعد وأنه يتماثل مع PSTVd بنسبة ٥٥٪ ونفس النسبة مع فيروس HSVd عزلة الخيار. كذلك فإن تماثل عزلات CPFVd يصل ٩٥٪ أما تماثل عزلات HSVd فهو ١٠٠٪. كلا الفيروسين يسبب إصابة كامنة في الطماطم ولا يهاجمان نبات *Gynura*.

### انتقال الفيروس:

ينتقل فيروس CPFVd خلال بذور وحبوب اللقاح في الطماطم صنف Rutgers وتصبح النباتات مصابة جهازياً وتظهر الأعراض على النباتات وينخفض الإنتاج، لكن نباتات الطماطم النامية من بذور مصابة لا يظهر عليها أعراض ولكن يمكن اكتشاف الفيروس فيها بطريقة electrophoresis على ٥٪ بولي أكريلاميد جيل ويكشف عن الفيروس في البذور بواسطة Spot hybridization.

يتحرك الشكل الدائري من الفيروس في الهجرة الكهربائية أقل من سرعة فيروس HSVd عزلة الخيار. أما الشكل المستقيم للفيروس لم يمكن كشفه بالصغ في الجيل ولكن يستدل عليه بالاختبارات الحيوية. يبلغ متوسط طول الشكل الدائري لفيروس CPFVd حوالي (٨٢ ± ٢, ٤) نانومتر أما طول الشكل الدائري لفيروس HSVd عزلة الخيار (٨٣ ± ٢, ٤) نانومتر.

### المدى العائلي:

وجد أن هناك ١٢ نوعاً من العائلة القرعية من ٢٦ نوع تصاب بفيروس HSVd عزلة الخيار وتختلف شدة الإصابة حسب نوع النبات المزروع وحسب الصنف وإن العوامل القابلة للإصابة بالفيروس HSVd عزلة الخيار والتي تظهر أعراض قابلة للتشخيص هي:-

- 1 - *Benincase hispida*
- 2 - *Cucumis melo* Var. *acidulus*
- 3 - *Cucumis melo* Var. *conomon*
- 4 - *Cucumis melo* Var. *inodolus*
- 5 - *Cucumis melo* Var. *reticulatus*
- 6 - *Lagenaria siceraria* Var. *clavata*
- 7 - *Lagenaria siceraria* Var. *gourda*
- 8 - *Lagenaria siceraria* Var. *microcarpa*
- 9 - *Luffa cylindrica*
- 10 - *Cucurbita moschata*

### فيرويد HSVd عزلة الخيار:

كما هو معروف فإن إصابة بادرات الخيار بفيرويد HSVd عزلة الخيار يسبب تقزم ملحوظ وأوراق غائرة العروق مجعدة. نتيجة الإصابة بهذا الفيرويد يحدث نقص في نسبة منظم النمو أندول أستك أسد في أول عشرة أيام بعد الحقن وقبل تجعد الورقة ويستمر على الأقل لمدة ٣٠ يوم. كذلك تتأخر الأزهار المؤنثة في الظهور عن الوقت المعتاد. أما منظم النمو الجبرلك أسد فإن مستوياته لا تتأثر بالإصابة.

درس تأثير عدة مواد كيميائية على حيوية فيرويد HSVd عزلة الخيار فوجد أن حيوية الفيرويد تزداد بإضافة البنتونايت Bentonite ولكنها تنخفض بإضافة اوكسالات الصوديوم و RNA الخميرة. زادت الحيوية قليلاً باستعمال تانك أسد بتركيز ١، ٠ ملغ / ملتر وقلت الحيوية أيضاً باستعمال تانك أسد بتركيز ١ ملغ / ملتر. تثبط نشاط الفيرويد كلية باستعمال RNase البنكرياس وكذلك بإضافة Acridine orange وازرق الميثيلين و Toludine blue O عندما يكون الفيرويد تحت الإضاءة العادية أما تحت الظلام فإن الحيوية انخفضت بنسبة أقل. إن تثبيط الحيوية باستعمال Bentonite مع مخلوط الفيرويد يحدث مع الصبغة أما بدون صبغة فتزداد الحيوية.

## ٨ - فيرويدات كوليومنيا

### Columnnea Viroids

#### ١ - فيرويد كوليو منيا الكامن

#### Cloumnea Latent Viroid

#### مقدمة:

إن نبات *Columnnea* من نباتات الزينة التابعة للعائلة الجسنراسية *Gesneriaceae*. إن هذا النبات يسمى *Epiphytic* وهو عبارة عن تحت شجيرات *Subshrubs* أو أعشاب منشأها جنوب أمريكا وهي تنمو في سلال معلقة في الصوبات الزجاجية أو البيوت في أمريكا الشمالية. يتكاثر هذا النبات أساساً عن طريق العقل المأخوذة من الساق وهي تستطيع أن تحافظ وتديم الفيرويد فيها.

#### الفيرويد:

إن فيرويد الكوليومنيا الكامن *Columnnea Latent Viroid (CLVd)* يوجد بشكل كامن في نبات الزينة المسمى *Columnnea erythrophae* والذي ينمو تجارياً. إذا هاجم الفيرويد البطاطس والطماطم فإنه يسبب أعراض شبيهة بأعراض فيرويد الدرنة المغزلية في البطاطس عند مهاجمته للبطاطس. إن تتابع نيوكليتيديات هذا الفيرويد وتركيبه الثانوي المقترح بين أنه يتكون من RNA أحادي الخيط دائري يتكون من 370 نيوكليتيديداً والتي تأخذ التركيب ذو الشكل العصى بعدد من أزواج القواعد والتي تميز جميع الفيرويدات المعروفة. إن الحركة في الهجرة الكهربائية للفيرويد

الدائري CLVd تحت ظروف غير مدنترة تؤدي إلى القول بوجود التركيب الثلاثي.

يحتوي الفيرويد CLVd العديد من تماثل التابع المشابهة لما في مجموعة فيروسات PSTVd ولكنه يحتوي منطقة مركزية محفوظة نموذجية كما هو موجود في فيروس تقزم حشيشة الدينار HSVd. كذلك فإن الفيرويد CLVd يشارك في بعض الصفات الحيوية مع كل من مجموعة الفيروسات B2 و B3. من المحتمل أن يكون الفيرويد CLVd قد نشأ نتيجة من تداخل وإعادة الاتحاد للحمض RNA بين مجموعة HSVd ومجموعة فيروسات PSTVd أثناء تكاثرهما في نفس النبات.

## ب - فيروس نيماتانتش

### Nematanthus Viroid

#### مقدمة:

عزل فيروس من نباتات زينة اسمها *Nematanthus wettsteinii* هذه النباتات غير مظهرة لأعراض مرضية، وذلك باستعمال طريقة R - PAGE وذلك لتحليل الأحماض النووية منخفضة الوزن الجزيئي. أمكن نقل الحمض النووي إلى الطماطم وثلاثة أصناف مزروعة من البطاطس ونباتات *Scopolia sinensis* بالحقن الميكانيكي أو بالتطعيم. إن نباتات العائلة الباذنجانية المحقونة يتكشف عليها أعراض مشابهة لتلك المتسببة عن فيروس الدرنة المغزلية في البطاطس PSTVd. إن فيروس نيماتانتش يتكون من 372 نيوكليوتيدة، تركيبها كالاتي: - 214 من G + C و 158 من A + U وأن نسبة G + C / A + U تساوي 1,35. إن واحدة من سبعة كلونات cDNA أظهرت إختلاف في التابع G to A على موقع 73. إن أكثر التراكيب الثانوية نباتاً لهذا الفيرويد هي تلك التي تمتلك أزواج قواعد C : G و 78 و A : U و 37 و G : U مع أقل طاقة حرة من (456.9 KJ -). إن هذا الفيرويد متقارب تماماً مع فيروس كوليومنيا الكامن الذي يتكون من 370 نيوكليوتيدة. إن فيروس نيماتانتش

يملك مناطق ذات تتابع مماثل ١٠٠٪ مع ستة فيروسات تتبع مجموعة PSTVd ومجموعة فيروس ندب الجلد فى التفاح ASSVd. كذلك فإن الفيروس يتناسخ فى نباتات الطماطم عندما تحقن مع PSTVd. كذلك فإنه أمكن وقاية نباتات الطماطم بالوقاية بالتضاد ضد فيروس PSTVd عندما حقنت مقدماً بالفيروس نيماتنثص.

### الأعراض:

يتكشف على النباتات المصابة بهذا الفيروس أعراض تتميز بأنها ميكروسكوبية. فى الطماطم تظهر الأعراض على شكل صفر الأوراق بحيث تكون أصغر من الوضع الطبيعى والتي تتقزم مجتمعة فى قمة النبات. أحياناً فإن العروق الوسطية من الأوراق يتكشف عليها خطوط ميتة ومتحللة Necrotic streaks. هناك فرق معنوى كبير بين طول النباتات المصابة والسليمة حيث تكون النباتات المصابة متقزمة بشكل واضح.

أما فى نباتات *S. sinensis* يتكشف عليها بقع متحللة جهازية وتخطيطات بالإضافة إلى أن الورقة تصل طور الشيخوخة قبل أن تنضج. إن هذه الأعراض مماثلة جداً لتلك المحدثة بواسطة الفيروس PSTVd فى العوائل الخاصة به. إن إصابة نباتات الطماطم بالفيروس CLVd - N يظهر عليها أعراض معتدلة تظهر بعد ٣ - ٤ أسابيع ويتكشف أوراق أصغر من الأوراق الطبيعية ويحدث تقزم فى النبات.

### الفيروس:

لقد وجد أن الفيروس المستخلص من نبات *Columnnea* يستطيع أن يصيب نباتات العائلة الباذنجانية ومن ضمنها البطاطس. كما أن نبات *Columnnea* يستطيع أن يحافظ ويديم الفيروس فيه (يجعله مستمراً فيه) بطريقة غير محددة وأحياناً ينقله. فى الحصر المحدود لنباتات الزينة فى أمريكا اكتشف إصابة بالفيروس غير مظهرة أعراض فى نبات الزهرة الجرابية *Nematanthus (Hypocryta) wettsteinii*. إن هذا الفيروس يتكون من ٣٧٢ نيوكليتيده وفيه ٩٧,٨٪ تماثل مع الفيروس الكامن

لنبات *Columnnea* والذي يكتب CLVd. ولقد وجد أنه كما في CLVd فإن الفيرويد المأخوذ من *N. wettsteinii* يصيب نباتات العائلة الباذنجانية ومن ضمنها البطاطس. وبسبب قربه التام والعلاقة الوراثية مع CLVd فإن هذا الفيرويد إعتبر سلالة متميزة من CLVd تحدث طبيعياً في النبات من أنواع *Nematanthus* وأعطى اسم CLVd - N.

### انتقال الفيرويد:

أخذت نباتات طماطم ونباتات *S. sinensis* ونباتات بطاطس وحقنت ميكانيكياً بمستخلصات الحمض النووي المأخوذ من نباتات مريضة من *N. wettsteinii* فكانت نسبة الإصابة ٣٠ نبات من بين ٩٣ نبات محقون. أما بالتطعيم فأصبحت ٢٠ بادرة من ٦٣ نبات مطعوم. أما بواسطة التجريح فأصيب ٣ نباتات من ١٥ نبات معاملة. يحدث هذا الفيرويد أعراض على نباتات العائلة الباذنجانية تشبه الأعراض الناتجة عن PSTVd. لم يثبت لغاية الآن (١٩٩٢) إنتقال الفيرويد بالبذور سواء في البطاطس أو الطماطم أو كولويومنيا.

### تداخل الفيرويد والوقاية بالتضاد:

عندما حقنت نباتات الطماطم بالفيرويد PSTVd السلالة المعتدلة وكذلك بالفيرويد CLVd - N أعطت نفس الأعراض، وبالتالي فإن تأخير ظهور الأعراض لا يمكن استعماله لتحديد تداخل الفيرويدات. إن اكتشاف وتقدير كمية شرائح RNA الفيرويدي بواسطة R - PAGE استعملت لدراسة تفاعلات الفيرويد في الإصابات المختلطة. النباتات المحقونة بلقاح مركب يحتوي كلا الفيرويديين تصبح مصابة بكلا الفيرويديين بغض النظر عن مرحلة النمو وقت الحقن.

في دراسات الوقاية بالتضاد، عندما حقنت النباتات بفيرويد PSTVd السلالة المعتدلة ثم بعد ذلك حقنت بالمتحدي الفيرويد CLVd - N فإن الأخير قد اكتشف

بعد ثمانية أسابيع من الحقن وبالمقابل عندما حقنت النباتات بالفيروس CLVd - N وبعد ذلك حقنت بالسلالة المعتدلة من PSTVd فإن هذه الأخيرة لم تكتشف بعد ثمانية أسابيع ولكنها احتاجت إلى أكثر من ذلك بكثير مما يدل على حدوث وقاية بالتضاد لنباتات الطماطم من الإصابة بالسلالة المعتدلة من الفيروس PSTVd. وهذا يعنى أن الحقن السابق بالفيروس CLVd - N تمنع السلالة المعتدلة PSTVd من أن تثبت أقدامها فى النبات.

### تمائل تتابع الفيروس مع الفيروسات الأخرى:

عند مقارنة تتابع الفيروس CLVd - N مع الفيروسات الأخرى تبين أن هناك قرابة وثيقة جداً مع الفيروس CLVd الذى يتكون من ٣٧٠ نيوكليتيده. من بين النيوكليتيديات ال ٣٧٢ التى يتكون منها CLVd - N فإن هناك ٣٦٢ نيوكليتيده متوافقة مع تتابعات موجودة فى CLVd. كما أن CLVd - N يختلف عن تتابعات CLVd فى نطاق P من الخيط السفلى حيث UUC تنقلب إلى UGUCU أما فى الخيط العلوى فإن نطاق V يحدث فيه إنقلاب من UGCC إلى ACG.

إن الفيروس CLVd - N يظهر تماثل جزئى مع كثير من الفيروسات تتبع بشكل أساسى إلى مجموعة PSTVd. إن نطاق الطرف اليسارى من CLVd - N يكون متماثل مع تلك الموجود فى الطرف اليسارى لكل من PSTVd و CSVd و CEVd و TASVd و ASSVd. أما نطاق الجانب الأيمن للفيروس CLVd - N يتماثل مع فيروسات TPMVd و TASVd و PSTVd. إن الأربعة عشر نيوكليتيده من CLVd - N الممتدة فى الخيط العلوى فى نطاق P متماثلة ١٠٠٪ مع المناطق الخاصة بها من فيروس TPMVd، بينما ١٢ نيوكليتيده (قطعة من الخيط السفلى) من النطاق P تكون متوافقة توافقاً نموذجياً مع المناطق المشابهة لها فى كل من PSTVd، TPMVd و TASVd. إن كلا الجزأين العلوى والسفلى من المنطقة

المركزية المحفوظة في CLVd - N هي نفسها مع الأجزاء المتوافقة مع فيروس HSVd.

إن الدرجة العالية من تماثل التتابع بين الفيرويدات المختلفة قد عزيت إلى خلق فيرويدات مركبة عن طريق إعادة الاتحاد. وعلى أية حال فإن وجود تناهات متطابقة في نطاقات خاصة (C، P) والنطاقين الطرفيين) من CLVd - N وفيرويدات أخرى عديدة نشأت من أصول عديدة غير متعلقة مع النبات العائل الطبيعي، هذا يؤدي إلى القول بأن فيرويدات حديثة نشأت من أجداد مشتركة ثم تعرضت إلى تأثيرات أدت لحدوث تطورات متقاربة.



## الفصل السابع

### فيروسات مجموعة A

### تحت مجموعة ASBVd

#### ١ - مرض ضربة الشمس فى الأفوكادو

#### Avocado Sunblotch Disease

#### مقدمة:

يسمى نبات الأفوكادو باللغة العربية الفصحى باسم الزبدية ونظراً لعدم شيوع هذا الاسم العربى فإننا نستعمل الاسم الحرفى الأجنبى وهو افوكادو.

لوحظت أعراض مرض ضربة الشمس فى الافوكادو سنة ١٩٢٨ وكان يعزى إلى مسبب فيروسى ولقد انتشر فى كاليفورنيا منذ سنة ١٩٣١ ولقد وصف أعراضه Horne & Parker وقالوا إن مرض ضربة الشمس مرض فيروسى خطير يصيب نبات الافوكادو *Persea americana*. استمرت الأبحاث على هذا المرض لغاية سنة ١٩٦٢ وأكدت الأبحاث أنه مرض يتسبب عن فيروس وإن هذا الفيروس ينتقل بالتطعيم وبالبدور، إلا أنه لم يذكر أية صفة أخرى عن هذا الفيروس ولم يمكن عزله أو دراسة صفاته وذلك لصعوبة العزل وبقاء المسبب حياً. وبقي الحال على ما هو عليه من هذا الاعتقاد حتى سنة ١٩٧٠ حيث ظهرت أعراض لهذا المرض فى استراليا، وفى هذه الفترة كان فجر علم جديد للفيروس قد إفتتح من قبل

العالم Diener فتشكلت ثلاثة مجموعات من العلماء فى استراليا لبحث ودراسة هذا المرض وكانت هذه المجموعات تتكون من :-

المجموعة الأولى Peter Palukaitis et al

المجموعة الثانية J.L. Dale and R. N. Allen

المجموعة الثالثة Mohamed Ali and Wayne Thomas

أجريت الدراسات على مسبب مرض ضربة الشمس فى الافوكادو بأن عزلت جميع الأحماض النووية منخفضة الوزن من الأشجار المصابة والأشجار السليمة، وتبين أن مسبب المرض هو حمض نووى ذو وزن جزيئى  $(6 - 7) \times 10^4$  دالتون ووصف بأنه ذو شكل دائرى ومقاوم للتشيط بالحرارة، وكان يعزل من بعض الأشجار مع أنها لا تظهر أعراض وسميت حاملة للمسبب Carrier وغير مظهرة للأعراض Symptomless. ولقد تبين أن مسبب مرض ضربة الشمس فى الافوكادو ذو وزن جزيئى أصغر من الوزن الجزيئى لفيروس تقزم الأقحوان وفيروسات الحمضيات وإن التحليل باستعمال طريقة التهجين واستعمال cDNA معلم بالفسفور المشع دل على أن هذا المسبب يتكون من RNA أحادى الخيط ولقد أمكن اكتشاف المسبب بعملية التحليل السابقة. ولقد تأكد أن مسبب المرض موجود فى ١٢ شجرة من الافوكادو حيث أعطت نتيجة إيجابية للفهرسة وللاختبارات البيولوجية لمرض ضربة الشمس. إن العلاقة الكاملة بين مرض ضربة الشمس ووجود مسبب المرض دل على أن إختبار تهجين cDNA يمكن أن يستعمل فى فهرسة هذا المرض وإن إجراءات الكشف هذه تحتاج ٥ أيام، أما إجراءات الكشف بالطرق البيولوجية تحتاج سنتين.

إن مستوى مسبب مرض ضربة الشمس فى مستخلص الأحماض النووية المنقى جزئياً من عدد مختلف من مصادر أوراق الافوكادو المصابة بالمرض يختلف (مثلاً حوالى ١٠٠٠٠ جزء) من ٢٪ إلى  $2 \times 10^{-5}$ ٪ بالوزن وإن الحد المنخفض

الممكن اكتشافه بواسطة إختبار التهجين يقدر بحوالي ١٠-٥٠٪ بالوزن وهذا يساوي على الأقل ٣١٠ أكثر حساسية من اكتشاف المسبب المرضي بواسطة PAGE لمستخلص الحمض النووي من الورقة.

بعد هذه النتائج استطاعت المجموعات الثلاثة المكلفة بدراسة المرض من إثبات أن المرض يتسبب عن فيروس و ذلك سنة ١٩٧٧ وسمى هذا الفيروس باسم فيروس ضربة الشمس في الافوكادو Avocado Sunblutch Viroid ويكتب باختصار (ASBVd).

### الأعراض:

تظهر أعراض مرض ضربة الشمس في الافوكادو على السيقان والفروع الخضراء للنباتات المصابة على شكل خطوط صفراء اللون كما تظهر على الثمار خطوط صفراء إلى حمراء اللون. الأعراض التي تظهر على السيقان والثمار هي الشائعة ومن السهل تمييزها. غير أن الأوراق قد يعترها تشوه بسيط و ابيضاض العروق وإصفرار وتظهر في مراحل أخرى من الإصابة أوراق متبرقشة. الأشجار المصابة تتدلى فروعها وتتقزم أحيانا.

ولقد ذكر Thomas & Mohamed سنة ١٩٧٩ أن المرض في استراليا يحدث بمظهرين، المظهر الأول أشجار تظهر عليها أعراض مميزة على الثمرة والقلب وإن نسبة بسيطة ٢ - ٥٪ فقط من ثمار هذه الأشجار يكون فيها بذور تحمل مسبب المرض. أما المظهر الثاني فهو عبارة عن أشجار تكون حاملة للمرض وغير مظهرة للأعراض وتسمى حاملة أو ناقلة بدون أعراض Symptomless Carriers. هذه الأشجار لا يظهر عليها أعراض سواء على الثمرة أو القلب ولكن الأعراض سوف تتكشف على القلم الذي يستعمل طعماً عليها. إن ٨٦ - ١٠٠٪ من الثمار المأخوذة من هذه الأشجار الحاملة بدون إظهار أعراض، تحمل مسبب المرض، ومع ذلك فإن البادرات من هذه البذور تكون أيضاً حاملة للمرض بدون أعراض إلا أنه

عند تطعيمها بقلم سليم (مأخوذ من أشجار سليمة) فإن نموات هذا القلم سوف يتكشف عليها أعراض المرض.

وبشكل عام يمكن تمييز أعراض المجموع الخضري على شكل نوعين من الأعراض المرئية، النوع الأول تبرقش الأوراق وتلونها بدرجات مختلفة من الأخضر حتى الأصفر وهذا العرض يتسبب عن سلالة أو تنوع معين. والنوع الثاني إبيضاض عروق الأوراق حيث يظهر حامل الورقة والعرق الرئيسي والتفرعات الجانبية له بيبضاء وقد يحدث تشوه في قمة الورقة أو قاعدة النصل، وهذا العرض يتسبب أيضاً عن سلالة أو تنوع آخر وسوف نتكلم بالتفصيل عن هذه التنوعات (السلالات) فيما بعد إن شاء الله.

أما بالنسبة للبلاستيدات الخضراء فيظهر فيها عدم تعضى كامل وتوقف تام كلية في المناطق الصفراء أما المناطق الخضراء تستمر سليمة عادية. بالفحص الميكروسكوبى تبين أنه فى المناطق الصفراء ينخفض ترتيب الجرانـ Granas rear- rangement فى نصل الورقة ويظهر إنتفاخ فى العضيات ويتكون فجوات ويتواجد قليل من Paramural bodies فى الخلايا السليمة ولكن يتكون منها الكثير فى المناطق الصفراء ويتغير تعضيتها الداخلى.

تعاقب تكشف الأعراض بعد الحقن بأنسجة مصابة بضربة الشمس:

### **The Progression of Symptoms Development After Ioculation With Sunblotch - infected Tissues**

إن تثبيط إنتشار الفيرويد ضمن نسيج ورقة مظهرة أعراض الابيضاض وارتباطه فى حركة غير محددة فى كل من الأنسجة المبرقشة والحاملة للفيرويد بدون أعراض يؤدى إلى القول باحتمال حدوث إنعزال فى تجمعات الفيرويد وتكوين تنوعات، هذه التنوعات المفترضة لفيرويد ASBVd يمكن أن تكون ظهرت عن طريق التفاعل مع العائل.

إن إنعزال تنوعات ASBVd الذى يحدث فى الافوكادو يمكن أن يكتشف أو يحدد بواسطة أعراض مميزة ومحددة. نظراً لأن إنتقال مرض ضربة الشمس بواسطة مستخلصات الأنسجة بالإضافة إلى الفيرويد النقى صعب جداً ويحصل عليه بصعوبة وغير متوقع، لذا يلجأ إلى استعمال نسيج مصاب ويزرع فى النبات (نوع من التطعيم)، وبالتالي فإن أية تأثيرات تحدث بواسطة تنوعات أو عزلات (أى أنواع للفيرويد) ذات التركيزات المنخفضة من تجمعات ASBVd مثل تنوع ASBVd - B يكون عندها فرصة كافية للتعبير عن نفسها بالأعراض التى تحدثها.

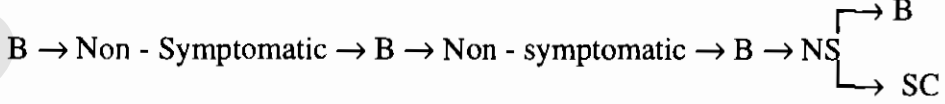
إن دليل نجاح إنتقال الفيرويد بواسطة الطريقة السابقة يكون بواسطة التعريفات المنظورة للأعراض وبواسطة الكشف بطريقة sPAGE وهذه تحدث فى ٣ - ٨ شهور. فى جميع الحالات، بغض النظر عن مصدر اللقاح، فإن أعراض المجموع الخضرى الأولية هى إبيضاض الأوراق، بعد هذا الظهور يمكن أن يستدل بأن تنوع الفيرويد ASBVd - B موجود فى جميع تجمعات الفيرويد حتى عندما تكون مغطاة Masked عند الكشف بواسطة sPAGE بمستويات عالية من تنوعات ASBVd - V و ASBVd - Sc. كلما تقدم نمو الافوكادو المحقون بنسيج مبيض فإن أعراض الإبيضاض تظهر على فترات غير منتظمة.

أما النباتات التى حصل لها حقن من نسيج مبرقش أو نسيج حامل غير مظهر للأعراض، يتكشف أساساً أعراض تبرقش الورقة. إن التحليل بواسطة sPAGE أظهر على أن ASBVd - V يصبح التنوع السائد فى الأشجار المصابة، هذا يكون متوافق مع سيطرة وإنتشار أعراض التبرقش. مع استمرار الإصابة لأكثر من سنة فمن المحتمل إعادة اكتشاف فروع حاملة بدون أعراض تحتوى ASBVd - Sc من سيقان والتى لانزال مظهرة أعراض التبرقش. من هذه الفروع فإن النباتات الحاملة بدون أعراض التى نتجت لم تظهر تعبيرات الأعراض المرضية أبداً حتى مع وجود معيار على من الفيرويد فى نسيج المجموع الخضرى.

يمكن رسم تتابعات الأعراض كالآتي :-

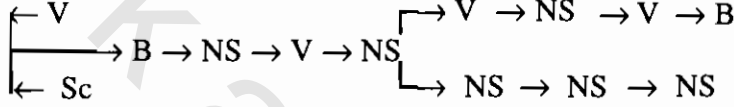
١ - إذا كان اللقاح فيه تنوع B من ASBVd فإن تتابع الأعراض يكون

كالآتي :-



٢ - إذا كان اللقاح فيه تنوع V أو تنوع Sc من ASBVd فإن تتابع الأعراض

يكون كالآتي :-



ملاحظة إن NS تعنى «Non - symptomatic» .

### مسبب المرض :

يتسبب مرض ضربة الشمس فى الافوكادو عن فيروس ضربة الشمس فى الافوكادو (Avocado Sunblotch Viroid (ASBVd) وكان يكتب قبل سنة ١٩٩٢ بدون حرف d). يتكون الفيروس من ٢٤٧ نيوكليوتيدة ولكن بعض عزلاته أو تنوعاته تصل إلى ٢٥١ نيوكليوتيدة.

إن هذا الفيروس يمتلك موقع فريد بين الفيروسات. من ناحية التركيب فإنه يمتلك تماثل تتابع محدود بالنسبة للفيروسات الأخرى، ومن ناحية وظيفية فإن ASBVd هو الفيروس الوحيد الذى ذكر عنه بأن نسخ ال RNA الخاصة به تتوالد فى المعمل (تنسخ) من كلونات cDNA وقابلة لأن تصنع فى أماكن خاصة فى غياب الأنزيمات. مع أن التتابع المتغير بين العزلات المختلفة من ASBVd قد إقترحت، إلا أن تتابع العزلات الأسترالية فقط من هذا الفيروس هى المعروفة والمحددة جيداً. وقد تحدد تتابعات جميع العزلات الأسبانية من فيروس ASBVd المتحصل عليها من أشجار الافوكادو نوع Fuerte المظهرة أعراض هذا المرض. وسواء فى

تتابعات العزلات الأسترالية أو العزلات الأسبانية فقد تبين أن جميع التتابعات المختلفة لوحظت في العروتين الطرفيتين من الجزئ ولكن ليس في جزئه المركزي والذي يبدو أنه مشمولاً في التجهيز الذاتي لأنواع RNA السالبة والموجبة من الفيروس ASBVd. إن ظهور تماثل تتابع عال يساوي أو أكثر من ٩٨٪ في عزلتين مأخوذتين من أسبانيا وأستراليا (مناطق جغرافية مختلفة) يؤدي إلى القول أو التأكيد بأن الأصل مشترك لكلا العزلتين وأن منشأهما واحد.

### فيروس ضربة الشمس في الافوكادو:

لقد وصف فيروس ضربة الشمس في الافوكادو ASBVd بأنه تركيب شبه عصوي من RNA يتكون من ٢٤٧ نيوكليتيده والتي تحدث مجموعة أعراض مرض ضربة الشمس. إن هذا الفيروس يعتبر غير نموذجي وذلك بسبب تتابع نيوكليتيدهات وتركيبه. فإن التركيب الغني بقاعدة U - A وتماثل التتابع المنخفض بالنسبة للفيروسات الأخرى يجعل الفيروس غير نموذجي. وبالتالي يمكن القول بأن ASBVd لا يتناسب مع الإجماع الذي إتفق عليه علماء الفيروس لنموذج تركيب النطاقات الموصوف من قبل العالم Keese & Symons سنة ١٩٨٥. ومما يقلل حدة غضب العلماء على فيروس ASBVd أن Harnandez and Flores قد ذكرا في أبحاثهما الحديثة سنة ١٩٩٢ أن هناك فيروس آخر له صفات لافتة للنظر وقرية جداً من صفات فيروس ASBVd وهذا الفيروس الجديد إسمه فيروس الموزايك الكامن في الخوخ (Peach latent mosaic Viroid (PLMVd) والمستقبل القريب سيكشف لنا الكثير عن هذا الفيروس.

إن المعيار العال إلى حد بعيد من ASBVd والذي أحياناً يصل تركيزات 5 RNA للعائل هذه أيضاً صفة غير عادية بين الفيروسات. كذلك فإن المدى العائلي الضيق جداً والمحدود بشكل خاص في العائلة الغارية Lauraceae وخاصة الجنس *Perea americana* أدى إلى القول بأن هناك علاقة خاصة جداً بين الفيروس وعائلة النباتي.

فى الدراسات التى أجراها Marcos & Flores سنة ١٩٩٢ على تثبيط الفيروس بـ مادة  $\alpha$  - amanitin تبين أن بناء RNAs الخاصة بالفيروس ASBVd لم يتأثر باستعمال ١ أو ٢٠٠ ميكوغرام / ملتر من هذه المادة مع أن تركيز ١ ميكوغرام / ملتر يثبط أنزيم RNA Polymerase II أما تركيز ٢٠٠ ميكوغرام / ملتر يثبط أنزيم RNA Polymerase III وهذه الأنزيمات تثبط بتلك التراكيز فى جميع النباتات والحيوانات. إن عدم تأثير تكاثر الفيروس (نسخه وبناءه) بهذه التراكيز يدل على أن نسخه وبناءه لا يعتمد على أى من هذين الأنزيمين، وبالتالي يمكن القول بأنه إما أنزيم RNA Polymerase I أو أنزيم RNA Polymerase غير محدد المعالم لهما نشاط مقاوم لمادة  $\alpha$  - amanitin ولهما دور فى تناسخ الفيروس إذن هذان الأنزيمان يؤثران على قالب RNA ويلعبان دوراً فى تناسخ الفيروس ASBVd وهذه صفة جديدة لهذا الفيروس حيث أن جميع الفيروسات المدروسة حتى سنة ١٩٩٢ تستعمل RNA Polymerase II فى تناسخها أما هذا الفيروس فلا يستخدمه.

إن وجود تنوعات للفيروس ASBVd قد استدلت عليها من الاختلافات فى تتابع النيوكليوتيدات وتقديرات حجم الجزيء لعزلات الفيروس. وعلى أية حال فإن هذه السلالات المقترحة أو المفترضة لم يثبت أبداً على أنها تنوعات مميزة بواسطة الاختلاف فى صفاتها البيولوجية.

ينتقل الفيروس بالتطعيم وبالبدور وإن الطريقة الأساسية لإنتشار المرض هو استعمال أصول حاملة للمرض بدون إظهار أعراض مميزة.

كذلك فإن مقاومة المرض تكون باستعمال الأصول الخالية من وجود الفيروس فيها وتأكيد ذلك بالعوامل التحليلية المختلفة وكذلك استعمال أقلام تطعيم خالية من الفيروس بغض النظر عن وجود أعراض أم لا.

### نمايز أعراض المجموع الخضرى فى الأفوكادو المصاب:

لقد وصف مرض ضربة الشمس فى الأفوكادو عن طريق ظهور مجموعة أعراض شديدة الاختلاف، شاملة تخطيط الساق، تلون الثمرة وتبقعها بالإضافة إلى مجموعة أعراض على المجموع الخضرى مختلفة. بالملاحظة المستمرة للأشجار



المصابة تحت ظروف الصوبا الزجاجية لعدة سنوات أصبح من الممكن تعريف نموذجين محددين جيداً ومميزين من الأعراض على المجموع الخضري. هذه الأعراض إما أن تظهر على شكل منطقة شديدة الإصفرار مترافقة مع الأنسجة الوعائية الناقلة (العروق الورقية) أو أن تظهر على شكل تبرقش (درجات مختلفة من تنوع اللون الأخضر) الذي ينتشر خلال الورقة شكل ٨٠. هذه النماذج يمكن أن توجد على الأفرع المختلفة من نفس الشجرة أو على شكل حالات منفصلة على أشجار مختلفة، وبالتالي فإن تفاعلات المجموع الخضري المميزة مع الفيرويد يمكن تقسيمها إلى ثلاثة أنواع أساسية: -

- ١ - إبيضاض (إزالة اللون الأخضر) Bleached ويرمز لها الصفة B.
- ٢ - تبرقش (درجات مختلفة من اللون الأخضر) Variegated ويرمز لها V.
- ٣ - حاملة بدون أعراض (الفيرويد موجود ولكن لا تظهر الأعراض) Symptomless Carrier ويرمز لها Sc.

إن أكثر الأعراض الأساسية شيوعاً لمرض ضربة الشمس في الافوكادو هو ظهور تخطيطات في الساق، إلا أن أولى أعراض المجموع الخضري والمنتشرة كثيراً هي ظهور مناطق صغيرة محددة جيداً خالية من اللون ولها المظهر المبيض. هذا العرض لا ينتشر إلا في منطقة محددة جداً من الفرع وهي القمة النامية المفردة النشيطة ولا ينتشر أبداً في بقية أجزاء الشجرة. إن مجموعة الأوراق التي تظهر هذا العرض، أحياناً يظهر عليها إبيضاض ملحوظ في أعناق الأوراق وإبيضاض في العرق الوسطى مع وجود مناطق مشوهة في قمة الورقة وقاعدتها ملاصقة للعرض الوسطى ذات نسيج مبيض.

في بعض الحالات فإن النموات الجديدة من الفروع المحتوية أوراق مبيضة أيضاً يتكشف عليها نموذج الورقة المتبرقشة الذي يشبه التبرقش الوراثي. في الأشجار المريضة الأخرى يظهر نسيج جديد سليم وغير مظهر للأعراض. من بين الأوراق المتبرقشة من الممكن أن نجد نصف ورقة يوجد عليها أعراض غير منفصلة بوضوح بواسطة العرق الوسطى عن النصف الثاني للورقة المصابة بالفيرويد وغير مظهرة

للأعراض. ولقد وجد أنه من غير الممكن التمييز بين الأوراق غير المظهرة للأعراض والتي تتكشف على فروع عليها أعراض والأوراق السليمة الخالية من الممرض.



شكل رقم ٨٠ :

مقارنة بين ورقة سليمة وثلاثة أوراق مصابة من نبات الافوكادو المصاب بفيروس ضربة الشمس  
a = ورقة سليمة، b = أعراض الايضاض، c = أعراض التبرقش، d = الورقة حاملة للفيروس  
ولكن بدون أعراض.

## اكتشاف فيروس ASBVd فى النسيج المصاب:

لاكتشاف الفيروس ASBVd فى النسيج النباتى المصاب، تؤخذ نسيج نباتية من مناطق مختلفة من الشجرة وتجري عليها الإختبارات. ولقد تبين أن المعيار العال من تركيزات ASBVd يكتشف بواسطة طريقة sPAGE والتي فيها حرف (s) يرمز إلى sequential، وهذه الطريقة تكشف الفيروس فى النوعين من الأعراض فى الأنسجة، الأعراض المبرقشة والأعراض المبيضة، وكذلك بهذه الطريقة يمكن اكتشاف الفيروس فى مستخلصات نسيج غير مظهر للأعراض-Symptomless carrier er تابع للسلسلة المبرقشة أما إذا كان تابع للسلسلة المبيضة فإنه يكون بتركيز غير كاف لتعريفه تماماً.

كذلك تستعمل طريقة PCR amplification لزيادة حساسية الكشف من الأنسجة التى أعطت نتيجة سلبية للإختبار باستعمال sPAGE. بهذه العملية يمكن اكتشاف الفيروس من مستخلصات أنسجة من مناطق غير مظهرة للأعراض أو أوراق مبيضة بالإضافة إلى نسيج غير مظهر للأعراض من نموات حديثة على فروع أظهرت مسبقاً أعراض ولكن كان إختبارها سالب لفيروس ASBVd باستعمال sPAGE. يمكن القول بأنه يمكن اكتشاف الفيروس ASBVd بطريقة sPAGE وطريقة PCR amplification فى جميع أنواع الأنسجة المحتوية لفيروس. إن الفيروس ASBVd يمكن اكتشافه فقط بطريقة PCR فى الأوراق غير المظهرة للأعراض الموجودة فى النموات الحديثة من الفروع المحتوية أوراق مبيضة، أما الأوراق غير المظهرة للأعراض التى تكشفت من فروع فيها أوراق مبرقشة، عادة تحتوى معيار عال من الفيروس يكون من السهولة اكتشافه بواسطة sPAGE. كذلك هناك علاقة مشابه بين الفيروس فى الأوراق الحاملة وغير المظهرة للأعراض والأوراق المبرقشة يمكن اكتشافها فى الجزء غير المظهر للأعراض الذى من الورقة المبرقشة، حيث نستطيع اعتباره نوع من النسيج الحامل للفيروس وبدون أعراض.

يمكن اكتشاف الفيروس في البراعم الزهرية في الأشجار المصابة وذلك باستعمال PAGE. تستعمل البراعم الزهرية بدلاً من الأوراق كمصدر للفيروس، وبمقارنة هذه الطريقة مع طريقة استعمال الأوراق نجد الأولى نسبة نجاحها ١٠٠٪، بينما نسبة نجاح طريقة استعمال الأوراق ٥٥٪. أما بالنسبة للوقت فتحتاج إلى ستة ساعات فقط.

**تنوعات فيروسية ضربة الشمس في الافوكادو:**

#### Variants of Avocado Sunblotch Viroid

إن تحليل التتابع المقارن لتجمعات الفيروس المتكونة طبيعياً قد شاركت بشكل معنوي في زيادة معرفة هذا الفيروس وعلى أساس هذه الدراسات قد اقترح نموذج للفيروس مقسم إلى نطاقات من حيث التركيب والوظيفة واقترحت مساهمة هذه النطاقات في تطور الفيروس. إن فيروس ضربة الشمس في الافوكادو فيه قليل من تماثل التتابع بالنسبة للفيروسات الأخرى ويعتبر شاذ من هذه الناحية ويوضع في التصنيف في صف منفصل لوحدة من الفيروسات. زيادة على ذلك فإن فيه صفة أخرى لم تشترك معه فيها الفيروسات الأخرى وهي مقدرة نسخ RNA للفيروس بأن تتناسخ في المعمل من كلونات Dimeric cDNA من الخيط الموجب والسالب للفيروس، كذلك صفة الإنشطار الذاتي في مواقع مخصصة في غياب الأنزيمات.

باستعمال طريقة التحليل Fingerprint ثنائية الاتجاه مرتين للفيروس ASBVd المنقى والمهضوم بأنزيم RNase البنكرياسي و T<sub>1</sub> أدى إلى القول بأن هناك تنوعات التتابع موجودة في الفيروس. زيادة على ذلك فإن هذه النتائج قد دعمت بالدنترة الحرارية لـ Profiles من هجين ASBVd RNA : cDNA متماثل وآخر المفترض أن يكون غير متماثل، ولقد تبين وجود عزلتين ذات ٢٤٧ نيوكليوتيدة. ولقد ذكر

Pallas et al سنة ١٩٨٨ وجود عزلة مميزة واضحة بأقل تغيير في القواعد في العروات الطرفية اليمنى واليسرى من الجزئ عند مقارنتها مع التنوع الأصلي للفيرويد والمسمى 1-SB. ولقد ذكر Rakowski & Symons سنة ١٩٨٩ أن هناك ١٦ تنوع جديد من عزلات حصل عليها من ثلاثة أشجار أفوكادو من مناطق متفرقة.

عند تنقية فيرويد ASBVd حسب طريقة Palukaitis & Symons من أوراق أشجار مظهرة أعراض مرضية مختلفة أو حاملة وغير مظهرة للأعراض وجد أن هناك ثلاثة عزلات A، B، C. العزلة A فيها تتابع ٢٣ كلونة كاملة من cDNA ولها تنوعان. أما العزلة B فيها تتابع ١١ كلونة كاملة من cDNA ولها ستة تنوعات أما العزلة C ففيها تتابع ١٧ كلونة كاملة من cDNA ولها عشرة تنوعات. وقد استعملت التحضيرات النقية من الفيرويد لتوليد كلونات cDNA للفيرويد ASBVd من كل عزلة باستعمال إثنين من ال Primers المصنعة من Oligonucleotid. البرايمر الأول فيه ٢٢ قاعدة وهو 5'- d (TCGGAACAGACCTGGTTTCGTC) - 3' والتي تتجهن أطرافه مع مركز ٤٢ - ٦٣. أما البرايمر الثاني الذي يستعمل لتصنيع الخيط الثاني فيتكون من ١٩ قاعدة mer oligonucleotid - 19 وهو 5'- d (CTTCCGACTCTGAGTTTC) - 3' وهذا يتوافق مع الأطراف ٦٤ - ٨٢. ولقد استعمل زوج آخر من البرايمرز الأول لبناء الخيط الأول والثاني لبناء الخيط الثاني من الحمض البادئ الأولى. وهذه البرايمرز هي 3' - d (TCTTCCCTGAAGAGACGA) - 5' والثاني 3' - d (TGGGAAGAACAACACTGATGAG) - 5'.

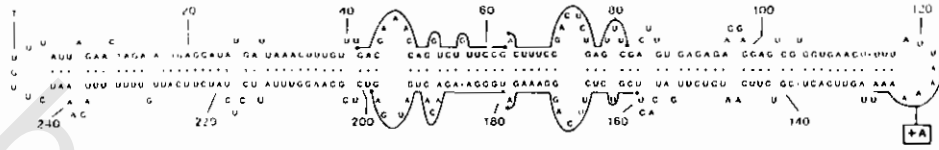
من بين ٥١ كلونة كاملة لـ cDNA محضرة من ثلاثة عزلات أمكن الحصول على ١٧ تنوع مختلف من ضمنها العزلة الأصلية 1-SB جدول رقم ٥٦ إن تتابع العزلة الأصلية 1-SB - ASBVd وجد في ١٩ من ٢٣ كلونة لـ cDNA محضرة

من عزلة A والأربعة كلونات الباقية من cDNA كانت متماثلة مع بعضها ومختلفة عن تتابع SB-1 عن طريق زيادة A مفردة في المنطقة الممتدة من طرف A بين ١٢٢ - ١٢٨ والتي فيها سبعة A (شكل ٨١، a). جميع كلونات cDNA المحضرة من عزلة B و C تختلف عن تتابع SB-1 بتغيير في النيوكليوتيدات، دخول نيوكليوتيدات أو إزالة على تسعة مناطق ممكنة (شكل ٨١، b، c). إن قاعدة واحدة مفردة  $U \rightarrow A$  تغيرت على الطرف ٢٩ كانت موجودة في ثمانية من ٩ كلونات مختلفة من cDNA متولدة من عزلة C ولكن ليست في التنوع من عزلة A و B. إن هذا التغيير  $U \rightarrow A$  على أطراف ٣ - ٦ وجدت في جميع كلونات cDNA المتولدة من عزلة B، علاوة على ذلك في إثنين فقط من عزلات C. في كلونات cDNA لكل من عزلات B و C فإن نيوكليوتيدة A المتعددة الموجودة بين طرفي ١٢٢ - ١٢٨ وكذلك U المتعددة والممتدة بين طرفي ٢٣٠ - ٢٣٦ تظهر تنوع في الطول عن طريق إضافة وحذف في الأطراف في (شكل ٨١، c، b).

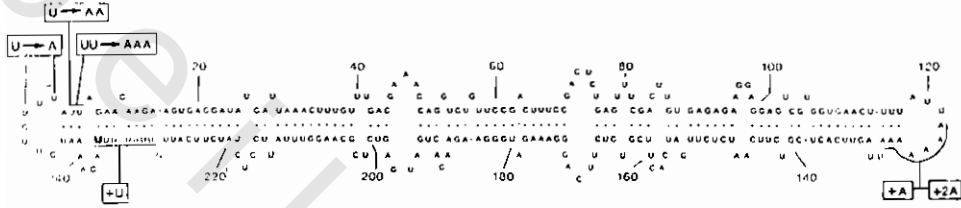
إن التنوع المتمثل بواسطة كلونات cDNA من عزلات A، B، C يختلف في الحجم من ٢٤٦ إلى ٢٥١ نيوكليوتيدة. هناك إختلافات مماثلة لما في هذا الفيروس تحدث في فيروسات أخرى مثل تنوعات فيروس أكسوكورتنز الحمضيات (يعني تختلف التنوعات في الأطوال) حيث تنوعاته من ٣٧٠ - ٣٧٥ نيوكليوتيدة، أما تنوعات فيروس الدرنة المغزلية في البطاطس فهي ثابتة الحجم ٣٥٩ نيوكليوتيدة.

إن التركيبات الثانوية المتوقعة للتتابعات المتولدة من عزلة B محتوية  $U \rightarrow AA$  وكذلك  $UU \rightarrow AAA$  في مراكز خمسة وستة (شكل ٨١، b). هذا سيؤدي إلى الحصول على عروة في اليد اليسرى أوسع من تلك الموجودة في التنوع الأصل SB-1. التركيبات الثانوية المتوقعة لجميع التنوعات تكون بشكل أساسي معتمدة على التنوع SB-1 (شكل ٨١، a).

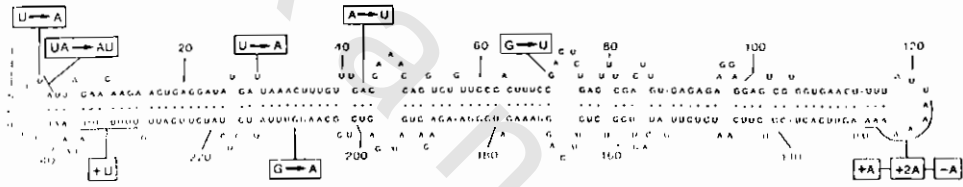
(a)



(b)



(c)



شكل رقم ٨١ :

- الاختلافات في التنوعات من عزلات فيروس ASBVd متمثلة في a, b, c.
- c: تدل على التركيب الثانوي المفترض للعزلة الأصلية SB-1، النيوكليوتيدات المتغيرة موضوعة في مستطيلات والسهم يدل على حلول الثانية بدل الأولى.
- a: تبين الأربعة مراكز البادئة في مركز الجزئ والمستعملة في توليد كلونات cDNA.
- c, b, a: تبين النيوكليوتيدات في نهاية اليد اليمنى واليسرى من الجزئ وتبين مواقع الإضافة أو الحذف أو الإحلال وتبين زيادة الحجم في U و A.

وعلى عكس ما هو مشابه في مواقع التتابع المختلفة في تنوعات فيروس ايكسوكورترز الحمضيات وفيروس الدرنه المغزلية في البطاطس، فإن النهاية الطرفية لليد اليمنى واليسرى في جزئ ASBVd هي مجموعة من النيوكليوتيدات المختلفة. إن مناطق التتابع المختلفة في تنوعات PSTVd و CEVd موجودة في المناطق المرضية

والمتغيرة وهي Pathogenic and Varialbe Regions. هذه المناطق تكون على أى طرف من المنطقة المركزية المحفوظة فى الفيروسات الشبيهة بالفيروس PSTVd ولكنها غير موجودة فى ASBVd.

إن عزلات B و C تتكون من مخلوط معقد من التنوعات بالمقارنة مع عزلة A التى فيها تنوعين فقط قد عرفا فى تتابع ال ٢٣ كلون من cDNA (شكل ٨١). من كلونات cDNA المتولدة من عزلات B و C هناك أكثر من النصف تمثل تنوعات مختلفة ومواقع متشابهة وجدت مع عزلتين فقط من عزلات CEVd والذى ذكر وصفه بإسهاب فى حالة عزلة J - CEVd. هناك تسعة تنوعات وجدت فى تتابع ال ١١ كلون كامل من cDNA، بينما أربعة تنوعات وجدت فى تسعة كلونات كاملة من cDNA من عزلة CEVd - DE 30.

ومن المهم أن نذكر أنه من بين ال ٤١ موقع المتغير فى ١٦ تنوع بالنسبة لتتابع العزلة الأصلية 1 - SB فإن إثنين فقط لم تدخل فى الحذف أو الإحلال من U و / أو A. إن تنوعات 9 - C تحوى G → A أما تنوع 10 C فيحوى G → U (إحلال)، بينما مواقع C لم تدخل فى أى تعديلات. إن إحلال U → A تحور سائد فى ٢٢ من ٤١ موقع تغيير.

إن تنوعات عزلة C تحتوى نيوكليوتيدات متغيرة فى المنطقة المحددة بالبوادئ المستعملة لتحضير أول مجموعة من كلونات cDNA. هذه النتيجة تؤكد ضرورة تتابع المناطق دائماً تحت البرايمرز فى حالة حدوث عدم موافقة. هذه الاختلافات تحدث ضمن تتابع التركيبات الثانوية لرأس المطرقة الموجب والسالب المزدوج والذى هو ضرورى للانشطار الذاتى فى جزئ ASBVd فى المعمل شكل ٨٢، ولكن لاتتضمن تلك القواعد المحفوظة بشكل كامل بين إنشطار ذاتى آخر ل RNAs محتوية تركيب رأس المطرقة.

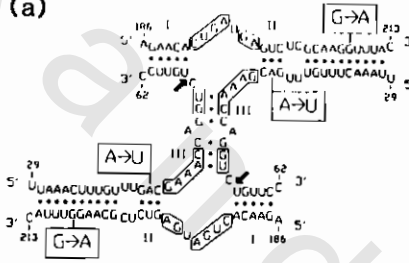
بالنسبة لتنوع 10 - C فإن تغير النيوكليوتيدات G → U على موقع ٧٠ يكون على مكان الانشطار الذاتى للخط السالب RNA (شكل ٨٢، b). وعلى أية حال فإن نشاط عملية الإنشطار الذاتى خلال النسخ ل RNA سالب للتنوع 10 - C كان



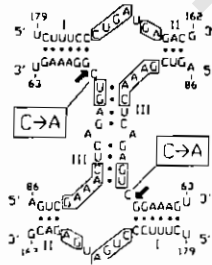
مشابهاً ٥٥٪ تقريباً للنسخ للخييط السالب RNA في SB - 1 باستعمال كلونات cDNA Dimeric.

ومن المسلم به أن أى من هذه التنوعات يمكن أن يكون نتيجة لحدوث نسخ خطأ أثناء بناء cDNA، لأننا لو أردنا أن نتأكد عملياً من ال ٥١ كلونة المنسوخة من cDNA باختبار كل واحدة على حدة لاحتاج الأمر إلى سنتين أو أكثر. وبالنسبة لتنوع C - 16 و C - 17 فإن الإنشطار الذاتى فى المعمل هو نتيجة للعمل ولكن يمنعها من تمثيل تنوع التابع الذى يحدث طبيعياً نظراً لأن الإنشطار الذاتى يعتبر بأنه يلعب دوراً هاماً فى تناسخ ASBVd. واعتماداً على أبحاث Semancik سنة ١٩٩٤ فإن تنوع ASBVd - Sc يشابه ASBVd - SB1.

(a)



(b)



شكل رقم ٨٢:

نموذج تركيب ثانوى لرأس المطرقة المضاعف لمواقع الانشطار الذاتى الموجبة والسالبة فى SB - 1 ASBVd وتغير القاعدة المفردة الموجود فى تنوعات C - 9 الموجب (a) و C - 10 السالب (b). إضافة روابط هيدروجينية محيطية جانبية تربط الساق فى مراكز ٢٩ - ٤٠. التحول من A → G يتغير فى موقع ٢٠٨ مشمولاً فى شكل (a). النيوكليوتيدات الموضوعة فى مستطيلات هى المحفوظة بين جميع RNAs ذاتى الانشطار المشابهة. أما أرقام I، II، III والأسهم فإنها تدل على الروابط الهيدروجينية التى تربط السيقان ومواقع الانشطار وهذا أيضاً محفوظ بين التركيبات لشبه المطرقة فى التابع السالب، فى نفس رقم ومركز النيوكليوتيدة تكون محتجرة كما فى التابع الموجب.

جدول ٥٦ : توضيح مختصر لتغير النيوكليوتيدات في التنوعات المتحصل عليها من عزلات فيروسات ضرية الشمس في الايفوكادو A، B، C بالمقارنة مع العزلة الأصلية SB-1.

عزلة الفيرويد	تنوع التتابع	عدد كلونات cDNA التي لها نفس التتابع	أرقام النيوكليوتيدات التي في العزلة الأصلية SB-1 والتي يحدث لها تغير	عدد النيوكليوتيدات في تنوع التتابع
A	A-1	١٩	—	٢٤٧
B	A-2	٤	١٢٢ - ١٢٨ +A	٢٤٨
	B-1	١	٣ U→A ٥ U→AA	٢٤٩
B	B-2	١	٢٣٠ - ٢٣٦ +U	٢٥١
			٣ U→A ٥ U→AAA	
B	B-3	١	١٢٢ - ١٢٨ +A ٢٣٠ - ٢٣٦ +U	٢٥١
			٣ U→A ٥ U→AA	
B	B-4	٥	١٢٢ - ١٢٨ +2A ٢٣٠ - ٢٣٦ +U	٢٤٨
			٣ U→A	
B	B-5	٢	٥ - ٦ UU→AAA	٢٤٩
			٣ U→A ٥ - ٦ UU→AAA	
B	B-6	١	٢٣٠ - ٢٣٦ +U	٢٤٩
			٣ U→A ٥ - ٦ UU→AAA	
C	C-1	١	١٢٢ - ١٢٨ +A	٢٤٨
	C-2	٤	١٢٢ - ١٢٨ +A	٢٤٧
	C-3	٢	٢٩ U→A	٢٤٨
	C-4	١	١٢٢ - ١٢٨ +A ٢٩ U→A	٢٤٦
	C-5	٢	١٢٢ - ١٢٨ -A ٢٩ U→A	٢٤٩
	C-6	٣	١٢٢ - ١٢٨ +2A ٢٩ U→A	٢٤٨
	C-7	١	٢٣٠ - ٢٣٦ +U ٢٩ U→A	٢٤٩
	C-8	١	٢٣٠ - ٢٣٦ +U ٢٩ U→A	٢٤٧
	C-9	١	٤٣ A→U ١٢٢ - ١٢٨ +A	٢٤٨
	C-10	١	٢٠٨ G→A ٣ - ٤ UA→AU ٢٩ U→A ٧٠ G→U	٢٤٧

اكتشاف فيروس ضربة الشمس في الافوكادو في البلاستيدات الخضراء فى الأوراق:

هل بكتيريا البناء الضوئى همزة وصل بين الفيرويدات والنباتات؟؟

لقد صنف فيريد ضربة الشمس فى الافوكادو فى تحت مجموعة خاصة من الفيرويدات وذلك لصفاته المميزة الفريدة عند مقارنته مع الفيرويدات معروفة التابع. إن التابع الموجود فى فيروس ASBVd يظهر تماثل منخفض بالنسبة للفيرويدات المعروفة الأخرى، بالإضافة إلى أن الخيوط الموجبة والسالبة من RNA الفيرويدى عندها القابلية لأن تخضع لتفاعلات الانشطار الذاتى فى المعمل خلال تركيب رأس المطرقة. إن عملية التحلل الذاتى والتي من المحتمل أيضاً أن تكون فعالة أو مؤثرة فى ميكانزم التضاعف فى الطبيعة لهذا الفيرويد، فإنه يتشارك فيها أو يشترك معه فقط فيروس الموزايك الكامن فى الخوخ (PLMVD) Peach Latent Mosaic Viroid وغير موجودة فى أى من الفيرويدات النموذجية الأخرى مثل PSTVd وغيره. إن تجارب تفريق الجزيئات تحت الخلوية (أصغر من الخلية) قد أظهرت موقع PSTVd فى الأنوية وخاصة فى أجزاء النوية فى أوراق الطماطم المصابة، هذه الملاحظة تأكدت بواسطة طريقة التهجين فى الموضوع Situ - hybridization والتحليل بواسطة Confocal laser scanning microscopy of the fluorescent Signals للمواد المنتجة بواسطة PSTVd فى الأنوية المعزولة. كذلك فإن فيرويدات أخرى تشترك بتماثل تتابع عال مع PSTVd تظهر أيضاً فى ترافق مع الأنوية، وفى بعض الحالات مع مكونات الغشاء، وعلى أية حال عندما درس إنتشار الفيرويد ASBVd فى الأجزاء تحت الخلوية (أقل من خلية) فوجد الفيرويد بشكل أساسى مترافقاً مع البلاستيدات الخضراء و / أو الشبكة الاندوبلازمية أو مع السيتوبلازم هذا يدل على أن ASBVd يبدو أيضاً أنه فريد فى هذه الناحية وهذه إضافة جديدة لصفاته الفريدة.

إن تتابعات RNA فى تخضيرات النسيج يمكن أن تتمركز فى وضع معين عن طريق إتحادات فى التهجين فى الموضوع والميكروسكوب الالكترونى ونظراً لأن هذه الطريقة أقل عرضة أو ميلاً للتكاثر الصناعى منها فى إجراءات التفريق فلقد

استعملت لغاية ١٩٩٤ في حالة الفيروسات. ولقد كانت هناك دراسة لاستكشاف كفاءتها عن طريق إعادة الإختبار لمعرفة تركز ASBVd في الأجزاء تحت الخلوية.

### طريقة الكشف عن مكان تواجد الفيروس:

أخذت أجزاء ورقة من نبات افوكادو *Persea americana* سليمة وأخرى مصابة ولكنها غير مظهرة للأعراض بفيروس ASBVd العزلة الأسبانية وثبتت في مثبت Karnovsky المحور والذي يتكون من-2% Paraformaldehyde, 2% glutaraldehyde, 2% glutaraldehyde in 50 mM cacodylate buffer pH 7.2, with 5mM CaCl<sub>2</sub> وأجرى لها عملية dehydrated خلال سلسلة ايثانول على درجة ( - ٢٠م) وغمرت في LRGold على درجة حرارة ( - ٢٠م) تحت الأشعة فوق البنفسجية. حملت مقاطع ذهبية اللون على شبكات نكل ١٥٠ ميش (mech) مغطاة بغطاء Formvar. أجرى التهجين كما في طريقة McFadden G.1 سنة ١٩٩٠ باستعمال منقّب RNA معلم بمادة داى جوز جنين وموجه ضد الخيط الموجب من RNA (وهو الفيروس المعدي والمسيطر من RNA الفيرويدي) تحت ظروف شديدة (٦٠م، ٥٠٪ فورماميد Formamide) لمدة ٣ ساعات. صنع المنقّب عن طريق النسخ فى المعمل لـ linearized plasmid محتويًا على وحدة كاملة الطول مغروزة فى ASBVd باستعمال T7 RNA Polymerase و- 11 Digoxigenin UTP. تفحص الشبكات فى الميكروسكوب الالكترونى JEOL JEM 100C. كانت تجرى عملية تقدير المناطق المشغولة بواسطة عضيات الخلية على طابعات بتكبير ٥٠٠٠ باستعمال Area Meter موديل LI - 3100 (LI - COR) وهذا النموذج معروف فى أمريكا.

فى التهجين فى الموضوع كان التقدير يتم عن طريق عد الأجزاء الذهبية الغروية التى كانت ملاحظة باستمرار فى البلاستيدات الخضراء، بعد عد هذه الأجزاء الصغيرة تبين أن معظم البلاستيدات الخضراء فى النسيج المصاب بالفيروس ASBVd تحتوى بمعدل ١٢ حبيبة والتى تمثل ٧٠ - ٨٠٪ من عدد الحبيبات الكلى جدول ٥٧.

بقية الحبيبات تظهر في السيتوبلازم والفجوة. أما بقية مكونات الخلية الأخرى مثل الميتوكوندريا، الأنوية وجدر الخلية كانت لا تحتوى شئ يذكر. نفس الشئ لوحظ في العدد المطلق للحبيبات فى العضية الواحدة، ذكرت أيضاً عندما كانت كثافة الحبيبة لكل وحدة مساحة فى كل عضية محسوبة. عندما قورنت هذه القياسات بين نباتات الكنترول والنباتات المصابة كان هناك زيادة معنوية أكثر من عشرة أضعاف يمكن أن تكتشف فى البلاستيدات الخضراء المعلمة والسيتوبلازم من الخلايا المصابة بالفيروس ASBVd. فى تجارب إضافية أخرى على الكنترول نفسه باستعمال نسيج مصاب بالفيروس ASBVd ومنقب موجه ضد الخيط الموجب لفيروس اكسوكورتز الحمضيات (هذا الفيروس يختلف كثيراً فى تتابعه عن فيروس ASBVd) فإن معدل حبيبة واحدة لكل عضية قد لوحظت فى العد (باستثناء الميتوكوندريا) وهكذا كانت القيمة أقل بعشرة أضعاف فى CEVd.

إن اكتشاف الفيروس ASBVd فى البلاستيدات الخضراء chloroplasts عن طريق التهجين فى الموضع أكد جزئياً مناقشات سابقة عن تمركز ASBVd فى البلاستيدات الخضراء أو الشبكة الاندوبلازمية مبنياً على معلومات محددة حصل عليها عن طريق التفريق بألة الطرد عن المركز وهذا ما ذكره Mohamed & Thomas سنة ١٩٨٠، ومن ناحية ثانية فإن دراسات متقنة عن أجزاء الخلية التى تهاجم بالفيروس ASBVd ذكرت أن الفيروس موجود فى السيتوبلازم وكميات أخرى توجد فى البلاستيدات الخضراء وهذا ما ذكره Marcos J.F. سنة ١٩٩٠.

نستطيع أن نقرر الآن بأن قليل جداً من الفيروس ASBVd يمكن أن يوجد فى السيتوبلازم، إلا أن معظم الفيروس يكون مترافقاً مع البلاستيدات الخضراء. إن تمركز الفيروس ASBVd فى البلاستيدات الخضراء آثار استفسارات هامة وكثيرة ومنتظر من الأبحاث المستقبلية الإجابة عليها.

إن مركز تجمع الفيروس ASBVd يختلف عن المركز تجمع فيروس PSTVd وبعض الفيروسات المماثلة هذا يدل على تفاعلات متميزة بين خلية العائل

والفيروس في هذين المقعنين. ومن المهم أن نعرف أنه إذا كان فيروس PLMVd وهو الفيروس الوحيد الآخر المعروف والذي يشارك فيروس ASBVd في عملية التحليل الذاتي لسلاسل RNA، هل هو أيضاً يتركز في البلاستيدات الخضراء؟؟ فإذا كانت الإجابة نعم فيكون هناك مجموعة جديدة من الفيروسات لها صفات معينة ولها مجال جديد في التمرکز، إلا أنه لسوء الحظ فإن هذا الفيروس الجديد يتواجد بمستويات منخفضة جداً تجعل هذه الدراسة صعبة، إلا أن العلم ليس عليه حاجة صعبة فالمستقبل القريب سيجد حلاً لهذه المشكلة ونعرف الكثير عن الشقيق الجديد PLMVd.

ومن ناحية أخرى (سبق أن ذكرنا ذلك) فإن تناسخ الفيروس ASBVd قد تبين بأنه غير حساس للمستويات العالية من  $\alpha$ -amanitin هذا يؤدي إلى القول بأنه إما أن أنزيم النواة والذي يسمى RNA - Polymerase like 1 أو لنشاط أنزيم RNA Polymerase - غير معروف أيضاً مقاوم لمادة  $\alpha$ -amanitin تعمل على قالب RNA وتلعب دوراً في تناسخ ASBVd. وبالتالي يمكن القول بأن تناسخ ASBVd يمكن أن يساعد Catalyzed by بواسطة الأنزيم المسمى RNA Polymerase like 1 في الأنوية مع الفيروس ثم ينتقل إلى البلاستيدات الخضراء، أو يكون هناك بديلاً يمكن أن يتناسخ فيه وهو البلاستيدات الخضراء نظراً لأن نشاط أنزيم RNA - Poly-merase لهذه العضية يكون غير حساساً لمادة  $\alpha$ -amanitin.

أخيراً فإنه من المؤكد أن ASBVd وبعض الفيروسات الأخرى تتكاثر أيضاً في البلاستيدات الخضراء، هذا يؤدي إلى القول باحتمالية أن بكتيريا البناء الضوئي يمكن أن تكون واحدة من الحلقات بين الأجداد العليا للفيروس والنباتات وإشارات على احتمالية وجود RNAs شبيهة بالفيروسات في بدائيات النواة والنباتات الأولية.

هذه الفقرة الأخيرة تكون جواباً للسؤال الذي كان موضوع عنواناً لهذا البحث.

جدول ٥٧: تقدير الشكل القياسي للمناطق المشفولة بواسطة العضيات الخلية المختلفة ونتائج التعليم المنيع للذهب immunogold بعد التجهين في الموضع باستعمال منقّب DNA موجب ضد الخيط الموجب من ASBVd في أنسجة ورقة أفوكادو مصابة بالفيرويد وأخرى سليمة.

أجزاء الذهب المعدودة		متوسط مساحة المنطقة $Um^2$			العضيات المعدودة في		الجزء المختبر في الورقة		
لكل $Um^2$	لكل عضية				أوراق سليمة أوراق مصابة				
سليمة مصابة	سليمة مصابة	% سليمة	% سليمة	% سليمة	سليمة	مصابة			
٣,٢٨	٠,٢٨	٤٠	١٧,٧	٢٥٤	٧,٦	١٤٢,٨	٢٩	٧١	بلاستيدات خضراء
٠,٢	٠,٠١	٩	٢٥,٤	٣٦٥,٧	٤٦	٨٦٤,٩	١٠	٢٧	سيتوبلازم
٠,٣٥	٠,٢٨	٤	٠,٧	٩,٨	٠,٥	٨,٦	٣٠	٨١	ميتوكلندريا
٠,٠٣٤	٠,٠٢٦	٢٥	٥٠,٦	٧٣٧,٣	٤٣,٦	٨١٨,٥	١٠	٢٠	فجوة
٠,١٠١	٠,١٥٢	٩	٥,٦	٨١,٢	٢,٣	٤٣,٤	٦	٢٣	نواة

ملاحظة:

حلت ١٠ خلايا سليمة من خلايا ميزوفيل الأفوكادو و ٢٧ خلية ميزوفيل مصابة بالفيرويد.

### ملخص أبحاث العالم Semancik عن فيروس ضربة الشمس في الأفوكادو:

إن الميكانيكية التي بواسطتها ينعزل الفيروس أو يتوزع بدون إنتظام ضمن أنسجة العائل من الأشجار الخشبية هي غير مفهومة جيداً، فمثلاً مخلوطات فيروسات الحمضيات والذي يبقى فيها الفيروس ثابتاً لعدة سنوات في البرتقال الحلو-Citrus si-nensis أو السترون C. medica غالباً ما تنعزل إلى عدة نماذج في الكريب فروت C. paradisi C. reticulata. إن نقص الفيروسات المتخصصة من المخلوط يحدث عادة مع مخلوط من فيروسات غير متقاربة. إن معيار الفيروس وشدة الأعراض لا يبدو أنها عوامل كمفاتيح في نقص المكونات من المخلوط.

إن التوزيع المتناقض الذي يظهر أثناء الكشف عن الفيروس ASBVd يؤدي إلى فحص جميع أجزاء النبات وتحديد أماكن توزيع هذا الفيروس. هذا الفيروس الذي يستطيع أن يتجمع إلى معيار عال جداً وجاهز للكشف، في كثير من الحالات من المستحيل كشفه في الأنسجة غير المظهرة للأعراض من الأشجار التي سبق إختبارها بنتيجة إيجابية لمرض ضربة الشمس. هذا يؤدي إلى القول بالتوزيع غير المنتظم للفيروس في أنسجة العائل أو التجمع المتمركز لتنوعات مميزة للفيروس. إن الخفض أو المنع أو إبعاد الفيروس من الأجزاء غير المظهرة للأعراض في الورقة التي هي مظهرة أعراض قد ذكر في كثير من الأبحاث.

إن إختلافات حجم الجزئ بين التنوعات قد أستدل عليه بواسطة استعمال التحليل بـ PAGE تحت ظروف غير مدنترة وارتبطت مع وجود أو غياب الأعراض، هذه الفرضية سنة ١٩٨٤ لا تؤيد بالأبحاث الحديثة سنة ١٩٩٤.. إن إختلاف حجم الجزئ في التنوعات يمكن اكتشافه في الأجزاء المظهرة أعراض والتي تبين أعراض إما إبيضاض أو تبرقش. لا يوجد حجم غير متماثل قد اكتشف بواسطة sPAGE بين تنوعات ASBVd من مستخلص أنسجة حاملة بدون أعراض (Sc) أو ذات أعراض تبرقش (V).

عندما تعرف إنعزالات فيروس عن طريق ظهور أعراض معينة يحدث زيادة كبيرة في اكتشاف تتابع تنوع معين. من هذا أصبح من الممكن إختيار أنسجة بالمنظر والتي تحتوي تنوعات تتابع مميزة من تجمعات بتنوعات مثل B - ASBVd و V - ASBVd و Sc - ASBVd.

ولدعم الدليل على حدوث إنعزالات لتجمعات فيروس محددة ضمن أنسجة يمكن أخذها من الحركة المحددة بشكل كبير لـ B - ASBVd من المناطق المظهرة للأعراض إلى المناطق غير المظهرة للأعراض في أوراق مفردة مظهرة أعراض الإبيضاض. نظراً لأن الإبيضاض هو عرض المجموع الخضري الأولى لمرض ضربة الشمس، فإن الدور الأولى في الإنتقال نستطيع أن نستنتجه بأنه سيظهر



B - ASBVd وبالتالي فإن الحيوية النوعية Specific infectivity المنخفضة لتحضيرات من مسبب مرض ضربة الشمس في الأفوكادو يمكن أن توضح بواسطة المعيار المنخفض من B - ASBVd. إن تنوع B - ASBVd يمكن أن يكتشف حتى في الزيادة الضخمة من V - ASBVd و Sc - ASBVd وهذا يتميز بظهور الإصابة متأخرة.

إن تجمعات التنوعين السائدين من ASBVd وهما تنوع V و Sc غير مقيدة في أنسجة العائل. وعلى أية حال فإن هذه الأشكال من ASBVd ليست شائعة خلال الأطوار الأولى من الإصابة بضرية الشمس، إنها تظهر كأشكال ثانوية والتي تميل إلى التجمع باستمرار الإصابة.

إن المواقع السائدة في التتابع غير المتماثل في ASBVd هي العروات الطرفية، وإن إختلافات النيوكليوتيدات التي توجد في ثلاثة تنوعات تعكس هذا. وعلى أية حال فإن هذا غير مشابه لأكثر التتابعات حفظاً في نطاقي T<sub>1</sub> و T<sub>2</sub> من الفيروسات الأخرى.

إن النتيجة الإيجابية التي حصل عليها Rakowski & Symons سنة ١٩٨٩ في أبحاثهما على مرض ضربة الشمس في الأفوكادو، وقياسها على أبحاثنا نجد أن تتابع A - 1 الذي ذكره الباحثان ممثل في أبحاثنا في SB - 1 وهو التنوع الأصلي للفيروس. وكذلك فنحن قد وجدنا أن ASBVd - Sc في تتابع نيوكليوتيدات كلوناته مشابه لما هو في ASBVd - SB1. عندئذ يمكن القول أن تتابع A - 1 يماثل تتابع Sc ويمثل تتابع الفيروس الأصلي ASBVd - SB1. إن المعيار العال من عزلة فيروس ضربة الشمس ASBVd - Sc واسع الانتشار خلال أنسجة الأفوكادو (وهذا يؤكد الاستنتاج الذي ذكرناه سابقاً) من المحتمل أن يكون مساوياً للعزلة الأصلية SB - 1.

أما التنوع A - 2 فهو أكبر من A - 1 بنيوكليوتيدة واحدة ويوجد في أربعة كلونات cDNA وهو متطابق مع ASBVd - V تتابع كلون ١٤ في أبحاثنا. جميع

التنوعات الكبيرة بين ٢٤٩ و ٢٥١ نيوكليتيده المذكورة من قبل العالمين السابقين تتمثل بواحد أو اثنين من كلونات cDNA، هذه الكلونات كانت موجودة بتكرار منخفض وهي مشابهة لـ ASBVd - B.

إن التغيرات والإضافات في اليد اليمنى من عروة ASBVd - V يجعلنا نتنبأ بأنها ستؤدي إلى جعل المنطقة الطرفية أوسع أو مفتوحة أكثر. إن التوسع المقترح في تكرار A في العروة اليمنى من ASBVd - B ادخلت محور استثنائي في التركيب مع ضمانات للدور الأولى المقترح لهذا النوع في بدايات مرض ضربة الشمس. لقد اقترح Godman et al سنة ١٩٨٤ أن تناسخ الفيرويد يمكن أن يبدأ عن طريق ربط أنزيم RNA - polymerase II المعتمد على DNA في العروة الطرفية من جزئ الفيرويد وأن هذا التغيير التركيبي يمكن أن يعمل كموقع ربط متخصص.

إن تقدم الأعراض وإنتاج الفيرويد من البدايات لتكشف إصابة ضربة الشمس تظهر مميزات كل من الإصابات الحادة والدائمة. إن الطور الأولى لمرض ضربة الشمس يتميز عن طريق الكشف لتنوع ASBVd - B في تفاعل ذاتي محدد وهذا يكون مشير لشكل إصابة حادة. التعبيرات المرضية تبدأ عن طريق ASBVd - B ثم تتكشف بعد ذلك إلى إصابة دائمة كامنة مع إصابة دورية ولكن يحدث تغييرات غير متكررة تقطعها إما أعراض الإبيضاض أو التبرقش.

وأخيراً فإن مرض ضربة الشمس يكون أفضل وصف له بأنه إصابة مزمنة مع إنتاج معيار عال ومستمر ويمكن تقديره من ASBVd - Sc خلال العائل. إن هذه العلاقة الأخيرة الوطيدة بين العائل والكائن الممرض من الصعب جداً إدراكها بوضوح نظراً لأنها غير متبوعة بأية أعراض. هذا الطور يتميز بخفض كبير في إنتاج الثمار وزيادة كبيرة منسجمة في النقل بالبذرة في بعض الزراعات.

إن المعيار العال من ASBVd - Sc المكتشف فى الأنسجة غير المظهرة للأعراض يدل على تحول فى مسبب مرض ضربة الشمس إلى الشكل الذى يكون فيه مثل non - antagonistic RNA والذى يتواجه مع الأحماض النووية المنظمة فى العائل. برغم ذلك ونظراً لأن المستلخصات من هذه الأنسجة عندها المقدرة على إحداث الشكل الحاد أو المبيض من الإصابة إلا أن ASBVd - B يجب أن تتواجد ولو على أقل مستوى مطلوب وضرورى لإحداث إصابة حتى فى وجود معيار عال جداً من ASBVd - Sc. وبالعكس فإن بعض الأبحاث تفترض وجود ASBVd - Sc فى تجمع حتى يحدث فيه توسيع العروة الطرفية اليمنى فى الجزئ لكى تحدث إعادة تنشيط للعزلة ASBVd - B ويزداد عددها وتحدث إصابة وهكذا.

بهذا التقرير الذى قدمه العالم Semancik سنة ١٩٩٤ يظهر واضحاً الأسباب فى شرح فيروس ضربة الشمس فى الافوكادو، وذكر كل شئ معروف عنه تقريباً.

## ٢ - فيروسات الخوخ

### Peach Viroids

#### أ - مرض الموزايك الكامن فى الخوخ

##### مقدمة:

ذكر هذا المرض فى الولايات المتحدة الأمريكية فى أوائل الخمسينات وكان يسمى موزايك الخوخ Peach mosaic وكان يعزى إلى مسبب فيروسي، إلا أن طرق إنتقال الكائن المسبب لم تكن واضحة واستمرت الأبحاث عليه حتى إتضح جيداً أن المرض لا يتسبب عن فيروس.

كان أول ذكر لهذا المرض فى فرنسا سنة ١٩٧٦ بواسطة العالم Desvignes وذكر أن هذا المرض منتشر بشكل كبير جداً فى فرنسا ويهاجم معظم أصناف الخوخ المزروعة. ذكر أيضاً فى اليابان فى نهاية السبعينات وكان يسمى قبل ذلك باسم الموزايك الأصفر فى الخوخ Peach Yellow mosaic.

ينتشر هذا المرض فى فرنسا بشكل كبير جداً، فقد وجد أن ٢٠٪ من زراعات الخوخ القادمة من أمريكا مصابة بهذا المرض وأن ٤٠٪ من الزراعات القادمة من اليابان مصابة بالمرض نفسه. أما فى الأصناف الأمريكية فينتشر المرض بنسبة ٨٨٪ وتصل النسبة فى الأصناف الأسبانية ٩٤٪. يبدو أن هذا المرض عالمى الإنتشار. لقد ذكر أن حوالى ٤٠٠ صنف من الخوخ فى مركز الأبحاث فى فرنسا أنها حاملة للمرض. لقد وجد أن هذا المرض متخصص على الخوخ ولم يمكن نقله أو اكتشافه فى النباتات الخشبية أو الشجيرة.

استطاع العالم Desvignes et al ورفقاه أن يثبتوا بأن هذا المرض يتسبب عن فيروس وليس عن فيرس.

### الأعراض:

إن مرض الموزايك الكامن فى الخوخ هو بشكل عام كامن فى أشجار الخوخ *Prunus persica*. تظهر أعراضه على شكل موزايك على قليل من الأوراق فقط. أولى علامات المرض تصبح واضحة على أشجار الخوخ ذات عمر سنتين، يصعب اكتشاف الأعراض قبل هذا العمر. تشمل هذه الأعراض تأخير فى التوريق (إظهار الأوراق) والأزهار والنضج. مدة التأخير هذه تختلف من أسبوع إلى أسبوعين ولكن فى معظم الحالات لا يقل التأخير عن أسبوع. ثانى علامات المرض هو ظهور خطوط متقطعة أرجوانية على بتلات الأزهار ذات اللون الأبيض الوردى وتكون هذه العلامة واضحة فى الجو الدافئ. أما الثمار زيادة عن كونها تتأخر فى النضج يصبح سطحها خشن وذات شكل غير منتظم مسطحة قليلاً ذات لون غير طبيعى يميل إلى الأبيض مع وجود شقوق على خط التحام نصفى الثمرة. يظهر بقع على سطح الثمرة تختلف عن لون جلد الثمرة. تكون الثمرة سهلة الفتح أو تكون مفتوحة قليلاً إلا أن هذا العرض الأخير نادر الحدوث.

تبدو الأشجار وكأنها متقدمة فى السن أكثر من سنها الطبيعى بعدة مرات بعد أن تتخطى خمسة سنوات. يظهر نكروز فى البراعم وتكون الشجرة أكثر حساسية لأضرار الصقيع وأمراض التقرح. يحدث المرض خسائر إقتصادية كبيرة جداً فى بعض الحالات وتكون الأشجار بحالة يرثى لها (شكل ٨٣).

تسبب بعض عزلات الفيروس موزايك على شكل لطع كبيرة وظهور تنقيط ونكروز فى الأوراق، هناك عزلات أخرى تسبب تنقر الساق والتفاف الأوراق. تتقدم السيقان وتكون غليظة ومنتفخة، تتجمع الأوراق فى قمم الفروع على شكل خصلات وتبدو الشجرة ذات نموات حديثة قصيرة وقليلة جداً وتكون كمية

الإثمار منخفضة جداً. الأوراق تكون رفيعة وضيقة بها بقع صفراء وخضراء (شكل ٨٤).

إن هذا المرض اسمه Peach latent mosaic Disease مرض الموزايك الكامن في الخوخ. من هنا ينشأ إستفهام، إذا كان هذا المرض كامن فلماذا تظهر كل هذه الأعراض؟؟. للإجابة على هذا السؤال نقول إن كلمة الكامن (Latent) فى الاسم ادخلت وصفاً للمرض منذ أول ملاحظة له فى فرنسا، حيث لم تلاحظ الأعراض على الأوراق فى البداية. وكذلك يقصد بها أن معظم الأعراض سواء الناتجة طبيعياً أو بالعدوى الصناعية لا تظهر على الأوراق فى البداية وذلك لأن أهم علامات المرض التى ذكرناها سابقاً هى تأخير التوريق والإزهار والنضج وتشوه الثمرة وتشقق الخط الواصل بين نصفي الثمرة وهكذا كما ذكرنا سابقاً وأن الأعراض لا تكون واضحة على الأوراق قبل ٢ - ٣ سنوات، وبالتالي استعملت كلمة الكامن Latent والمقصود بها على الأوراق. ثم بعد أن عرفت جميع أعراض المرض فى مراحل نمو النبات المختلفة ومنها الأوراق لم تحذف الكلمة واستمر استعمالها ولكن بدون مدلول منطقي.

هناك دراسات أجريت فى إيطاليا استمرت لعدة سنوات على ثمار خوخ مصابة بمرض معين فى مناطق البساتين المختلفة وخاصة فى مقاطعة Ravenna. أعراض هذا المرض تكون على شكل دوائر صغيرة واضحة على جلد الثمرة ذات لون أصفر مخضر خفيف. هذه الأعراض تخفض من القيمة التسويقية للثمار. المرض هذا ينتشر فى كثير من المناطق المحددة ومعروف فيها.

إن التحليل بطريقة PAGE لمستخلصات الأحماض النووية للثمار والأوراق أظهرت وجود جزيئات RNA دائرية ذات وزن جزيئى منخفض ولكن لم يحدد (لغاية ١٩٩٢). وكذلك لم يحدد هذا المرض هل هو من عزلة جديدة لهذا الفيروس أم أنه فيروس منفصل.

## المسبب:

يتسبب مرض الموزايك الكامن في الخوخ عن فيروس Peach Latent Mosaic Viroid ويكتب PLMVd. لقد درس تتابع هذا الفيروس فوجد أنه يتكون من جزيء RNA دائري به 337 نيوكليوتيدة والتي تأخذ الشكل المتفرع عندما تنفرد في نموذج أقل طاقة حرارية حرة. يظهر في هذا الفيروس (PLMVd) تماثل محدود بالنسبة للفيروسات الأخرى وكذلك بالنسبة للفيروسات، ولكنه لا يحوى أى من صفات تتابع المركزى المحفوظ لأى من تحت المجموعات النمذجية للفيروسات. وعلى أية حال فإن تتابع جزء من الفيروس حوالى الثلث تقريباً به عناصر مطلوبة لتتشكل فى ال RNAs من كلا القطبين لتركيبات رأس المطرقة وهذه التركيبات هى التى تقوم بعملية الإنشطار الذاتى كما فى فيروس ضربة الشمس فى الأفوكادو ASBVd وفى بعض الفيروسات. إن الخيط الموجب والسالب من RNA الجزئى وكامل الطول من نسخ PLMVd تحتوى تركيبات رأس المطرقة وتظهر الإنشطار الذاتى خلال النسخ وبعد التنقية كما هو متوقع من هذه التركيبات.

إن الدراسات الكاملة على هذا الفيروس أثبتت أن فيروس PLMVd يجب أن يضم إلى تحت مجموعة فيروسات يمثلها ASBVd والتي تتميز أفرادها بمقدرتها على الإنشطار الذاتى فى المعمل وأحياناً فى الطبيعة خلال تركيبات رأس المطرقة. وبالنظر إلى شجرة النشوء فى الفيروسات (هذه الشجرة موجودة فى مراجع تصنيفات الفيروسات) فلقد إقترح فيها أن PLMVd والفيروس ASBVd يمكن أن تمثل حلقة تطور ونشوء بين الفيروسات والفيروسات.

يمكن أن ينقى فيروس PLMVd بعد خطوتين من ال PAGE ويمكن أن يتحصل على 1 - 2 ميكروغرام من الفيروس من كل كيلوغرام ورق خوخ طازج.

كذلك يمكن الحصول على الفيروس ثانية من الثمار الحديثة المجموعة فى نهاية طور الأزهار، ولكن الكمية المتحصل عليها من هذه الثمار تكون أقل منها فى الأوراق. الفيروس لا يهاجم أى من *Cucumis sativus* ، *Gynura aurantiaca* ، *L. esculentum* و *C. morifolium* .

لا يوجد تماثل تتابع مشترك بين فيروس PLMVd وفيروس CEVd العضو الممثل تحت مجموعة فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس PSTVd ولا مع ASBVd العضو الممثل لمجموعة A فى الفيروسات. ومن ناحية أخرى مع أن PLMVd يختلف كلية فى تتابعه عن ASSVd، إلا أن الفيروسين يبدو أنهما يشتركان فى قليل من تماثل التتابع. كذلك هناك تماثل تتابع محدود موجود بين PLMVd والفيروس HSVd .



شكل رقم ٨٣ :

أعراض الإصابة بفيروس PLMVd على أشجار الخوخ ذات عمر سبعة سنوات.





نكل رقم ٨٤ :

أعراض إصابة أوراق الخوخ صنف GF - 305 بالسلالة الشديدة من فيروس PLMVd والتي هي 168 - D.

### تتابع النيوكليوتيدات فى فيروس PLMVd :

باستعمال تداخلين Overlapping وطول كامل من كلونات cDNA من الفيروس PLMVd إحداهما يحصل عليه بواسطة برايمر (26 - mer) على المواقع بين ١٩٣ و ٢١٨ والثانية حصل عليها بواسطة برايمر (34 - mer) بين المواقع ٩١ - ١٢٤، إختبرت ودرست مواقعها فى الاتجاهين. إن كلونات cDNA الثانوية جعلت من الممكن تصحيح التتابع المتطابق بنهاية 5 للبريمر الأول. إن شكل ٨٥ يظهر التركيب الأولى للفيروس PLMVd والذى هو RNA دائرى يتكون من ٣٣٧ نيوكليوتيدة تتألف من ٩٠ G بنسبة ٢٦,٧٪ و ٨٧ C بنسبة ٢٥,٨٪ و ٨٠ A بنسبة ٢٣,٧٪ و ٨٠ U بنسبة ٢٣,٧٪. وبالتالي فإن الفيروس يحتوى من G + C نسبة ٥٢,٥٪ وهى أقل من تلك الموجودة فى الفيروسات الأخرى حيث تصل ٥٦ - ٦٠٪ باستثناء فيروس ASBVd حيث تصل فيه ٣٨٪.

عند مقارنة تتابع الفيرويد PLMVd مع الفيرويدات النموذجية ومع بعض الفيروسايدات وجد أنه مع أن هذا الفيرويد يشارك تماثلات التتابع مع جميع الفيرويدات النموذجية والفيروسايدات، إلا أن هذه التماثلات تكون محدودة ولا تشمل التتابع عال الحفظ الذى يميز المنطقة المركزية لأفراد تحت مجموعة B<sub>1</sub>. وعلى أية حال فإن الخيط السالب والموجب من RNAs للفيرويد PLMVd لا تمتلك التتابع المحفوظ من تركيب رأس المطرقة الذى يحدث فيه الإنشطار الذاتى من RNAs فى الفيرويد ASBVd وفى بعض RNA للفيروسايدات.

#### التركيب الثانوى المقترح للفيرويد PLMVd:

فى البحوث التى أجريت على التركيب الثانوى للفيرويد PLMVd بأقل طاقة حرة of lowest free energy أدت إلى ظهور تركيب غير متوقع له نقطتى تفرع والذى يخرج منها ٣ - ٥ أذرع، بينما مواصفات التركيب شبه العصى وجدت فى جميع الفيرويدات النموذجية باستثناء الفيرويد الكامن فى حشيشة الدينار hop latent Viroid والذى له تركيب ذو شعبتين أكثر ثباتاً إلى حد ما من الشكل شبه العصى الذى من المفروض الحصول عليه. إن تطبيق نفس الوضع على حالة ASBVd أدى أيضاً إلى تكوين شكل شبه عصى ولكن بشعبة قصيرة على واحدة من نهاياته وهذا يتفق مع النتائج السابقة.

فى التركيب الثانوى المقترح للفيرويد PLMVd فإن تزاوج نيوكليوتيدات تمثل ٧١,٢% من المجموع حيث شملت ٥٢,٥% G + C و ٤٠,٨% A + U و ٦,٦% G + U.

#### تركيب رأس المطرقة للفيرويد PLMVd:

يظهر فى شكل ٨٦ أنه فى PLMVd RNA أن الأقطاب الموجبة والسالبة فيها:

١٣ مركز محفوظ معاً مع عناصر أخرى تميز تركيبات رأس المطرقة المسئول عن تفاعل الإنشطار الذاتي في المعمل في الفيرويد ASBVd. إن كلا تركيبى رأس المطرقة للفيرويد PLMVd يكون داخلاً فى قطعة تمثل تقريباً ثلث تتابع الفيرويد ولها سيقان ثابتة جداً رقم III فى شكل ٨٦ ذراع قصير يتحلق خارجياً فى نهاية ساق I و II مشابهاً فى هاتين الحالتين تركيبات رأس المطرقة فى الفيروسايدات والمرافقات الفيرويدية أكثر من تشابهها مع الفيرويد ASBVd.

ومن المهم أن نذكر هنا أن استبدال القواعد الموجودة فى الكلونة الثانوية للفيرويد PLMVd فى منطقة تركيب رأس المطرقة إما أن لا يؤثر على ثبات ساق II و III أو أنه يتمركز فى العروات. إن التركيب السالب والموجب لرأس المطرقة يشارك كثيراً فى تماثل التتابع.

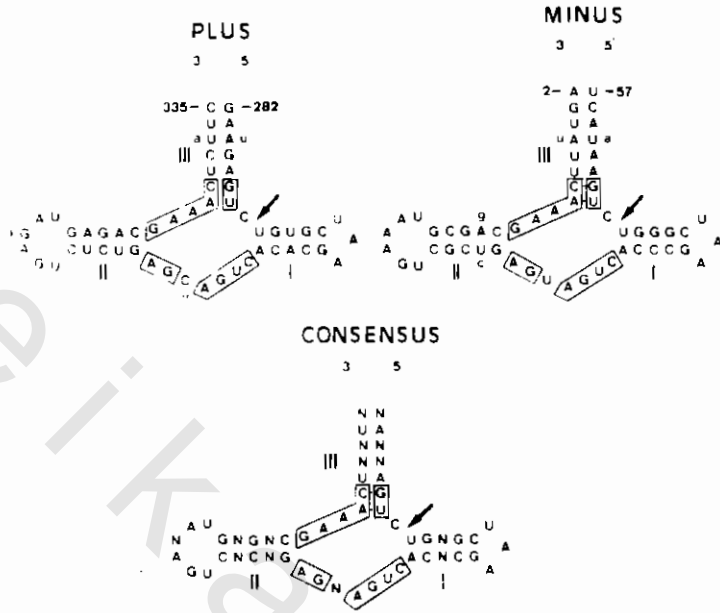
#### موقع الفيرويد PLMVd بين الفيرويدات والفيروسايدات:

إن شجرة نشوء وارتقاء الفيرويدات تنسب الفيرويد PLMVd إلى أفراد تحت مجموعة الفيرويدات النموذجية حيث أنه ينسب إلى مجموعة ASBVd. ويمكن القول باختصار أن الأصل المشترك المقترض لنشوء الفيرويدات والفيروسايدات يمتد ليشمل PLMVd بالإضافة إلى فيرويد 1 Coleus blumei Viroid ويبدو أن PLMVd بعيد عن الفيرويدات النموذجية ويكون قريب جداً من ASBVd ويكون قريب بشكل خاص من الفيروسايد vLTSV حيث أن الحمض النووى فى ASBVd وفى vLTSV له تركيب رأس المطرقة فى كلا القطبين.



شكل رقم ٨٥:

التركيب الثانوي الناتج من استعمال الطاقة الحرة المنخفضة لفيروسيد PLMVd. نطاقات السالب الموجب للإنشطار الذاتي محددة بالإعلام. إن المراكز الثلاثة عشر المحفوظة موجودة في جميع تركيبات رأس المطرقة ويشار إليها بشرطيات. مراكز الإنشطار الذاتي المتوقعة مشار إليها بأسمهم. رؤوس الأسهم الصغيرة تشير إلى الأقطاب الموجبة والسالبة. إن التركيب الأولي للفيروسيد PLMVd باختلافات التابع الناتجة من استبدال القواعد مشار إليها فوق التابع. إن مواقع Sma I و Pst I موجودة بين المواقع ١٠٩ - ١١٤ و ٢٤١ - ٢٤٦ بالترتيب.



شكل رقم ٨٦:

تركيب رأس المطرقة من الموجب والسالب في PLMVd RNAs مع أسهم مشيرة إلى مواقع الإنشطار الذاتي. المواقع المحفوظة في غلب بخط سميك هي التابع المحفوظ في جميع تركيبات رأس المطرقة في مواقع متشابهة. الحروف السفلية تدل على قواعد مستبدلة N تعنى مواقع غير محفوظة. إن تركيب رأس المطرقة يجمع بين الأفراد السالبة والموجبة من PLMVd وتكون دائماً موجودة. إن زوج القواعد الطرفي في الساق III من تركيب رأس المطرقة من PLMVd RNA الموجب لا يوجد في التابع المأخوذ من كلون PLMVd الثانوى حيث أن C على الموقع ٣٣٥ قد استبدل بـ A.

### الصفات العامة للفيروسات:

#### ١ - الصفة الأولى:

إن الصفة الجديدة بالذكر لفيروس PLMVd هي مقدرته على تشكيل تركيب رأس المطرقة والتي هي من مميزات الفيروسات وليكنها لغاية الآن معروفة في فيروس واحد هو ASBVd. إن فيروس PLMVd يستطيع مثل ASBVd أن يتولى القيام

بتركيب رأس المطرقة فى الأحماض النووية RNAs فى كلا القطبين، مع أنه بالنسبة للتركيبات المزدوجة لرأس المطرقة قد إفترض بأنها تعمل فى تفاعلات الإنشطار الذاتى (خاصة فى القطب الموجب) نظراً لأن تركيب رأس المطرقة المفرد فى الفيروس ASBVd غير ثابت. وعلى العكس من ذلك فإن تركيبات رأس المطرقة فى الفيروس PLMVd ثابتة وأن الأحماض النووية RNAs تحتوى فقط مجموعات من تتابع PLMVd ذات كفاءة قطبية فى الإنشطار الذاتى خلال النسخ، تدل على أن هناك تفاعلات متماثلة أكثر احتمالاً لأن تقع خلال ميكانيكية تركيب الجزيء. إن تركيبات رأس المطرقة للسالب والموجب فى PLMVd أكثر علاقة وقرباً من بعضها البعض أكثر منها فى أى من تركيبات رأس المطرقة المعروفة الأخرى، هذه الحالة قد لوحظت أيضاً بين تركيبات رأس المطرقة فى الفيروس سايد vLTSV. زيادة على ذلك فإن الثلاثة عشر مركزاً المحفوظة من السالب والموجب فى رؤوس المطرقة للفيروس PLMVd وتمثلها فى مواقع الإنشطار الذاتى (مفصلة بواسطة ٩٦ موقع نيوكليتيدي) تحدث فى مواقع متعاكسة فى التركيب المفترض فى الموجب والسالب من RNAs PLMVd وأيضاً تحدث فى vLTSV، كذلك فإن مواقع الإنشطار الذاتى فى vLTSV تكون مفصلة بستة نيوكليتيديات فقط وإن جزء من نطاقات الإنشطار الذاتى تكون متداخلة. إن التركيبات من أقل طاقة حرة لأى من RNA PLMVd يحتوى تركيبات رأس المطرقة وبناء على ذلك تكون غير متوقعة الإنشطار الذاتى. هذه التكوينات تكون غالباً موجودة فى النسخ النقية الكاملة بالإضافة إلى الفيروس الدائرى المعدى. إختيارياً فإن التكوينات الفعالة يمكن أن تتشكل خلال النسخ وتحت الإنشطار الذاتى قبل أن يتم بناء RNA وأن معظم التركيبات غير الفعالة الثابتة يمكن أن تتشكل. ومن المهم أن نذكر هنا أن هناك تماثل بين مواقع النيوكليتيديات المشكلة من ساق I و II من تركيبات رأس المطرقة فى PLMVd السالب والموجب، بشكل خاص من تلك التى هى قريبة من العروة مفردة الخيط الداخلية أو الأساسية والمواقع المماثلة من تركيبات رأس المطرقة فى PLMVd (الموجب) والموجب فى فيروس سايد البرسيم المنقط والموجب والسالب فى فيروس سايد vLTSV.

## ٢ - الصفة الثانية:

إن الصفة الثانية من صفات PLMVd الجديرة بالاهتمام هي نموذج التركيب الثانوى ذو الطاقة الحرة المنخفضة حيث يظهر فيه نقطتى تفرع، غير مشكلة، بالتالى للتركيبات شبه العصوية التى تميز معظم الفيروسات النموذجية. إن التركيب المتفرع للفيروس PLMVd، يمتلك، مع ذلك، ثبات ضمن المدى لتلك التركيبات شبه العصوية للفيروسات النموذجية كما يستدل من القيم المتحصل عليها بالمقياس  $\Delta G / N$ . إن هذا النوع من التركيب المتفرع قد ذكر فى بعض الفيروسات والفيروسايدات، مع أنه فى حالة الفيروس PLMVd فإن عدد التفرعات يكون أكبر وهى أطول أيضاً. إن الأهمية الفسيولوجية لهذا التركيب المفترض غير معروفة (١٩٩٤) مع أن الجزء المحتوى للتتابع الداخلى فى تركيبات رأس المطرقة يكون ثابت جداً (هناك قطعة مشابهة ثابتة يمكن أن تتشكل فى القطب السالب) وكما قلنا سابقاً من الممكن أن يحفظ جزئيات الفيروس الدائرى من الإنشطار الذاتى.

## ٣ - الصفة الثالثة:

كما ذكرنا سابقاً فإن فيروس PLMVd يصيب الخوخ *Prunus persica* وإن أكثر السلالات شدة هى D - 168 وإن أكثر الأنواع حساسية للمرض هى شتلات النوع GF - 305. كذلك فإن هذا الفيروس PLMVd يشابه الفيروس ASBVd فى كونه لا يحتوى تتابع GAUUUU المحفوظة فى جميع الفيروسايدات فى موقع مشابه فى تركيبها الثانوى المفترض والذى يمكن أن يلعب دوراً فى تناسخ هذه الفيروسايدات.

## ٤ - الصفة الرابعة:

إن المدى العائلى المحدود جداً للفيروس PLMVd وهو المسبب لمرض الموزايك الكامن فى الخوخ *Prunus persica* فقط، هذا يذكرنا بالصفة المماثلة فى

فيروسيد ASBVd والذي يسبب ضربة الشمس في الافوكادو فقط *Persea americana* وبعض الأنواع من العائلة الغارية (Lauraceae) كذلك فإنهما يشتركان في إظهار بعض الأعراض المتشابهة. إن فيروسيد PLMVd لا يسبب ظهور الأعراض على الأوراق إلا بعد أن تصل الشجرة لعمر خمسة سنوات وبقية الأعراض تظهر مبكراً. كذلك فإن الأعراض المتكونة بسبب ASBVd على الأوراق لا تكون منتظمة أيضاً، وبعض الإصابات تكون كامنة أو بدون أعراض على الأوراق.

#### ٥ - الصفة الخامسة:

إن التابع في الفيروسيد PLMVd فيه تماثل جزئي بالنسبة للفيروسيدات الأخرى بالإضافة إلى بعض الفيروسسايدات ونتيجة لدراسة شجرة أصل ومنشأ الفيروسيدات (ذكرناها سابقاً) وجد بأن هناك علاقة بين الفيروسيد PLMVd والفيروسسايد vLTSV أيضاً فإن طول تفرع الفيروسيد يكون حقيقة تدل على المنشأ الطويل المنفصل لهذا التابع وعلى الصفات الحيوية التي تثبت بأن هذا الفيروسيد فعلاً يتبع الفيروسيدات وليس الفيروسسايدات، ولكنه يمثل حلقة وصل أو حلقة تطور واضحة جداً بين الفيروسيدات والفيروسسايدات أكثر من دور الفيروسيد ASBVd في تمثيل حلقة الربط هذه.

#### ٦ - الصفة السادسة:

إن فيروسيد PLMVd هو الفيروسيد الثاني من تحت مجموعة الفيروسيدات التي تتميز بأنها تمتلك تركيبات رأس المطرقة المسئول عن الإنشطار الذاتي في المعمل والذي من المحتمل أن يلعب أيضاً دوراً في تجهيز بوادئ ال Oligomeric في الطبيعة. إن الفيروسيد ASBVd هو النموذج المثالي لتحت هذه المجموعة والتي أعطيت إسم avsunviroid.

#### ٧ - الصفة السابعة:

ينتشر فيروسيد PLMVd في المزارع النامية فيها شجيرات الخوخ وينتشر في مساحات واسعة من هذه المزارع، إلا أنه لا يوجد دليل على الانتقال الميكانيكي في



الحقل عن طريق الأيدي أو الأدوات الزراعية الملوثة إلا أن هذا الرأى يحتاج إلى دراسات أوسع. لقد ثبت أن هذا الفيرويد ينتقل بواسطة حشرة المن *Myzus persicae* ولكن الظروف المحيطة بانتقال هذا الفيرويد بهذه الحشرة لا تزال قيد البحث.

## ٨ - الصفة الثامنة:

يمكن اكتشاف الفيرويد PLMVd بأى من الطريقتين ١ - طريقة PAGE وهي أكثر سرعة ومتخصصة فى إكتشاف الفيرويد الدائرى ولكنها لا تعمل إكثار لكمية الفيرويد الموجودة فى العينة، وبالتالى يمكن أن تفشل هذه الطريقة فى كشف الفيرويد فى المستخلص إذا كان كميته منخفضة (مثلاً فى حالات الإصابة الحديثة). ٢ - من ناحية أخرى فإن الإختبارات الحيوية مع أنها تتطلب وقت طويل إلا أنها أكثر حساسية وهى الطريقة الثانية فى الكشف عن الفيرويد. إن فهرسة بادرات الخوخ سلالة GF - 305 أظهرت أن الفيرويد PLMVd ينتشر جيداً فى جميع أعضاء النبات، الفروع الحديثة والأغصان القديمة والأوراق والجزور. كذلك فقد أمكن اكتشاف الفيرويد بطريقة PAGE فى مختلف أجزاء النبات المصابة بالفيرويد فى شجيرات GF - 305 منها الجذور، نصل الأوراق، العروق الرئيسية، القلف وخشب الساق. كذلك فإن طريقة PAGE تسمح بالكشف عن الفيرويد فى الثمار الحديثة والناضجة. لا يتواجد هذا الفيرويد فى البذور وبذلك فهو لغاية (١٩٩٤) لم يثبت أنه ينتقل بالبذور.

## ب - مرض تنقر ثمار الخوخ والبرقوق

### Dapple Fruit Disease of Plum and Peach

#### مقدمة:

لقد إكتشف مرض جديد على البرقوق *Prunus salicina* فى اليابان وذلك بواسطة العالم Terai سنة ١٩٨٥. أعراض هذا المرض على شكل بقع كبيرة حمراء منتشرة على الثمار خاصة الصنف Taiyo عند النظر للثمار من على بعد

يلاحظ وكأنها منقرعة نظراً لانعكاس الأشعة من البقع المختلف عن إنعكاسها من سطح الثمرة. ينتقل المرض عن طريق التطعيم وسمى مرض تنقر ثمار البرقوق Plum Dapple Fruit Disease. بعد ذلك تم اكتشاف مرض آخر يصيب البرقوق يتميز بظهور لون أحمر مصفر في لحم الثمرة صنف Soldam وينتشر بشكل واسع في اليابان وسمى مرض إصفرار ثمار سولدم Soldam Yellow Fruit Disease وهذا المرض وصفه أيضاً العالم Terai سنة ١٩٨٧. يبدو أن كلا المرضين يتسبب عن نفس الكائن المرض. ونظراً لأن أشجار البرقوق السليمة صنف Taiyo التي حقنت بالتطعيم من صنف سولدم الذى عليه أعراض مرض إصفرار ثمار سولدم، تكشف على الثمار أعراض تنقر والعكس بالعكس. هذا يدل على أن هناك علاقة بين المسبيين. هناك أعراض مماثلة تتكون من بقع كبيرة شاحبة على ثمار الخوخ *Prunus persica* على الصنف Asama - Hakutou في اليابان.

لقد اكتشف فيرويد مسبب مرض تنقر الثمار على الصنف Taiyo فوجد أنه مشابه لفيرويد تقزم حشيشة الدينار HSVd السلالة التى تصيب العنب وهو ذو تماثل تتابع عال نسبياً بالنسبة إلى مجموعة فيرويد HSVd.

### مسبب المرض:

لقد عزلت الفيرويدات من أشجار البرقوق *Prunus salicina* المصابة بمرض تنقر ثمار البرقوق Plum dapple fruit disease ومن أشجار الخوخ *Prunus persica* المظهرة أيضاً أعراض تنقر الثمار. عند حقن الفيرويدات ميكانيكياً فى نباتات العائلة القرعية تظهر أعراض نموذجية للأعراض التى يسببها فيرويد تقزم حشيشة الدينار HSVd فى نباتات القرعيات. إن التركيب الكامل لتتابع النيوكليوتيدات فى عزلة الفيرويد من الخوخ ومن البرقوق تسمى عزلة AF كانت متماثلة وفيها ٢٩٧ نيوكليوتيدة ذات تماثل تتابع ٦, ٩٣٪ بالنسبة للفيرويد HSVd عزلة حشيشة الدينار. هناك عزلة أخرى من الخوخ تسمى عزلة (A9) تكون من ٢٩٧ نيوكليوتيدة ولكن تماثل التتابع فيها ٧, ٩٩٪ بالنسبة للفيرويد HSVd عزلة حشيشة الدينار، وإن فيها

نيوكليتيديدا واحدة تغير مكانها. هذه النتائج أدت إلى القول بأن هذه الثلاثة فيرويدات هي سلالات من فيرويد HSVd وتسمى HSVd - Plum ، HSVd - plum AF و HSVd - Peach A9. إن الفرق الوحيد بين هذه العزلات وعزلة HSVd - hop (المعزولة من حشيشة الدينار) موجود في جزء اليد اليسرى من الجزيء متضمنة الجزء السفلى والمنطقة المركزية المحفوظة. ولقد تأكدت الأبحاث في اليابان بأن هذه العزلات هي المسببة لمرض تنقر الخوخ ومرض تنقر البرقوق.

### الصفات العامة للعزلات المسببة للأمراض:

لقد تبين أن كلا الفيرويديين المعزولين من البرقوق والخواخ هما قريبا العلاقة جداً مع فيرويد HSVd على أساس أعراضهما المرضية على نباتات العائلة القرعية وعلى التحليل بواسطة PAGE وطريقة تهجين الجزيء. إن أعراض هذه الفيرويدات على نبات الخيار صنف Suyo كانت نفسها دائماً تتسبب عن HSVd عزلة حشيشة الدينار. إن المدى العائلي لعزلة الفيرويد المأخوذة من البرقوق ليشابه المدى العائلي للعزلة من حشيشة الدينار ولكن عزلة البرقوق لا تهاجم الطماطم، في حين أن عزلة حشيشة الدينار تصيب الطماطم بدون إحداث أعراض. إن عزلة الخوخ (A9) تختلف بنيوكليتيديدا واحدة عن عزلة حشيشة الدينار وتسمى فيرويد حشيشة الدينار المعزول من الخوخ HSVd - peach أما التي من البرقوق تسمى فيرويد حشيشة الدينار المعزول من البرقوق HSVd - plum.

بالاعتماد على نتائج تجارب الحقن بالعصارة والتحليل بواسطة PAGE يبدو أكثر احتمالاً بأن HSVd - plum تسبب مرض تنقر الثمار النموذجي في البرقوق صنف Taiyo ، كذلك فإن العزلة نفسها تسبب تنقر الثمار على الخوخ. أما HSVd (AF) أو عزلة HSVd - peach (A9) يبدو أنهما مترافقتان مع أعراض تنقر الثمار في الخوخ والبرقوق. إن هاتين العزلتين فيهما تتابع نيوكليتيديات مختلف. إن العزلة HSVd - peach (AF) المعزولة من الخوخ تظهر أعراض تنقر شديدة جداً على الخوخ ولكن HSVd - peach A9 المعزولة من الخوخ تظهر أعراض تنقر

بسيطة جداً على البرقوق. ولكن يجب أن نذكر هنا أن هناك احتمال حدوث خطأ في طرق عزل هذه العزلات أو أن هناك فيروس آخر لم تتمكن التجارب من اكتشافه له دور مهم في إظهار الأعراض (ومرافق أو غير مرافق للعزلات السابقة) موجود في أشجار الخوخ أو البرقوق. ونظراً لأن HSVd قد اكتشف على نباتات حشيشة الدينار في اليابان فإن هناك مجموعة من العوامل المرضية المشابهة لهذا الفيروس وتسمى مجموعة HSVd وهي منتشرة ومسببة أمراض في أنواع مختلفة من أشجار الفاكهة مثل العنب، الحمضيات، الخوخ والبرقوق. بعض هذه السلالات من HSVd تسبب أمراضاً خطيرة على حشيشة الدينار، الخيار، البرقوق وأحياناً الخوخ ولكنها تصيب العنب والحمضيات بدون إظهار أعراض (كامنة) ويمكن النظر إلى هذه النباتات أن لها دور مهم في إظهار وبائية HSVd وتعتبر مصدر كبير وكثيف لإنتشار الفيروس.

## فيروسات تحت الدراسة

### 1 - فيروس تقزم الدخان البري

#### *Nicotiana glutinosa* Stunt Viroid (NgSVd)

##### مقدمة:

يتعرض نبات الدخان البري *Nicotiana glutinosa* إلى الإصابة بفيروس تقزم الدخان البري NgSVd، وتتميز أعراض الإصابة به وتظهر على شكل تدلى الأوراق، التقزم، المظهر الشجيري أو العنقودي للنباتات وأحياناً يظهر نكروز على أوراق النبات. بإجراء عملية التحليل بواسطة طريقة PAGE على مستخلصات النبات وجد أن هناك حمض نووي ذو وزن جزيئي منخفض له سرعة أكثر من سرعة فيروس تقزم قمة الطماطم الهندي TBTVd. لقد تأكد من هذه العملية (PAGE) أن مرض تقزم الدخان البري يتسبب عن هذا الفيروس. يختلف فيروس NgSVd عن فيروس تقزم قمة الطماطم الهندي في المدى العائلي الذي يصيبه حيث أن فيروس NgSVd يمكن أن ينتقل إلى:

1 - *Nicotiana clevelandii*

2 - *N. debneyi*

3 - *N. plumbaginifolia*

4 - *Luffa acutangula*

5 - *Cucumis sativus*

6 - *Cajanus cajan*

7 - *Vigna unguiculata*

8 - *Chenopodium amaranticolor*

ينفصل الحمض النووي RNA المعدى للفيروس إلى حزمتين في الجيل تدل الأولى على الشكل المستقيم للفيروس وتدل الثانية على الشكل الدائري. يبلغ الوزن الجزيئي للفيروس 1,1 × 10<sup>6</sup> دالتون.

### الأعراض:

أولى أعراض هذا المرض تدلى الأوراق وهذا المظهر يحدث بعد 10 - 15 يوم من الحقن ويظهر على جميع النباتات المحقونة بالفيروس. بعد 20 - 30 يوم يصبح 80% من النباتات المحقونة متقزمة ذات مظهر شجيرى أو عنقودى، هذا المظهر يتكون نتيجة لتثبيط نموات القمم وكثرة نموات الفروع الجانبية المتكونة من البراعم الإبطية. بعد 2 - 3 شهور من الحقن تظهر الأعراض الثانوية وتبدأ على شكل نكروزرز في العروق الرئيسية في الورقة ثم العروق الفرعية ثم تمتد إلى أسفل لتصل عنق الورقة ثم الساق. تفشل النباتات المصابة في الإزهار وإذا أعطت أزهار تكون هذه الأزهار عقيمة.

إن تعبيرات الأعراض المرضية المتسببة عن الفيروس NgSVd وتركيز هذا الفيروس كلاهما يعتمد على درجة الحرارة والضوء. أثناء شهور الصيف المشمس (ذات الكثافة الضوئية العالية) والفترات الضوئية الطويلة بمتوسط 6,9 ساعة يومياً، وذات درجات الحرارة العالية 40 - 45م، فإن كلاً من الأعراض الأولية والثانوية تظهر بسرعة أكثر حيث تحتاج الأعراض الأولية 16 - 20 يوم أما الثانوية تحتاج 50 - 60 يوم وتكون الأعراض أكثر شدة في كلتا الحالتين. أما في فصول الشتاء ذات درجات الحرارة المنخفضة حوالي 8 - 17م وكثافة إضاءة منخفضة وإضاءة شمسية أقل من 7,8 ساعة، تظهر الأعراض الأولية معتدلة أو متوسطة وتحتاج 20 - 30 يوم حتى تظهر (بعد الحقن) ولا يتكشف نكروزرز على أى من النباتات المحقونة تحت هذه الظروف. يكون متوسط معيار الفيروس NgSVd 0,16 ميكوغرام لكل غرام نسيج في شهور الشتاء، يكون هذا المعيار 0,37 ميكوغرام / غرام نسيج نباتى في شهور الصيف.

يصيب الفيرويد نباتات من العائلة البقولية (أول فيرويد يذكر في هذا الموضوع) حيث يصيب جنس البسلة الهندية.

### العدى العائلي للفيرويد:

نباتات الدخان *N. glutinosa* المحقونة بالفيرويد (NgSVd) المستخلص من النباتات المصابة يظهر عليها جميع مواصفات الأعراض المرضية المذكورة سابقاً وتبقى النباتات عقيمة. أمكن نقل الفيرويد بنجاح إلى عدة أنواع من العائلة الرمرامية *Chenopodiaceae* والقرعية والبقولية والباذنجانية. وهي كالاتي:-

١ - *Chenopodium amaranticolor* - تسبب الإصابة الفيرويدية على هذا النبات ظهور بقع موضعية شاحبة يتبع ذلك تدلى الأوراق ثم موزايك متبرقش على الأوراق وتقرم في النباتات.

٢ - *Cucumis sativus* . يظهر على الأوراق بقع كبيرة شاحبة وتتجدد قمم الأوراق وتنشئ لأسفل وكذلك تلتف حواف الأوراق إلى أسفل.

٣ - *Luffa acutangula* . يظهر على الأوراق موزايك متبرقش معتدل مع حواف غير منتظمة وتتجدد قمم وحواف الأوراق إلى أسفل.

٤ - *N. clevelandii* . يظهر على النبات أعراض تدلى وشحوب الأوراق وتقرم ومظهر القمة الشجيرية في النبات.

٥ - *N. debneyi* يظهر تدلى ونكروز على الأوراق.

٦ - *N. plumbaginifolia* . يظهر أعراض شديدة تتمثل في التفاف الأوراق إلى أعلى.

٧ - *Nicotiana sp.* لا يتكون أزهار على أنواع هذا الجنس.

٨ - *Cajanus cajan* . هذا أول جنس من العائلة البقولية يصيبه الفيرويد. يظهر على النباتات المصابة نكروز في العروق على الأوراق المحقونة أما الأوراق

غير المحقونة فى نفس النبات يظهر عليها بقع على شكل بثرات على الأوراق الثلاثة.

٩ - *Vigna unguiculata* تظهر الأعراض على شكل بثرات على الأوراق ونكروزر العروق بعد ١٥ - ٢٠ يوم من الحقن.

لا يصيب هذا الفيروس نباتات الطماطم التى هى عامل كاشف شائع لكثير من الفيروسات وهذه الصفة تجعله يتميز عن كثير من الفيروسات التى تهاجم الطماطم أو تكون الطماطم كاشف لها. بقية صفات الفيروس لا تزال تحت الدراسة.

نشرة هذا البحث فى مجلة Plant Disease سنة ١٩٩١ مجلد ٧٥ عدد ١٠ صفحة ١٠٦٨ إلى ١٠٧١.

## ٢- فيروس تقزم القرنفل

### Carnation Stunt Viroid

مقدمة:

كان أول وصف لهذا المرض (مرض تقزم القرنفل) فى الولايات المتحدة الأمريكية سنة ١٩٨٣ من قبل العالم Lominel و Morris وإن التحليل بواسطة طريقة PAGE أكد أن التركيب الدائرى للحمض RNA الفيرويدي ذو وزن جزيئى حوالى ٨٠٠٠٠ - ٨٥٠٠٠ دالتون. ينتشر هذا المرض فى كل من إيطاليا وأسبانيا.

الأعراض:

أعراض المرض تكون على شكل تقزم، تشوهات ونموات كثيرة غير عادية للساق، إنخفاض عقد الإزهار والأزهار التى تتكون تكون مشوهة. الإختبارات التى أجريت فى إيطاليا على العينات المصابة أظهرت أن RNA الصغير المرافق للمرض



موجود في شكلين دائريين أحدهما بطيء والآخر سريع في الهجرة الكهربائية في الجيل يشار إليهما Carnation Stunt Associated Viroids الأول يسمى (Car SAV - slow) أما الآخر فيشار إليه (Car SAV - fast). الفيرويد ذو الشكل البطيء Car SAV - slow قدر حجمه فوجد أنه يتكون من ٢٨٠ نيوكليتيده وإن جزء من هذا التابع تبين أنه يمكن أن ينشئ ويأخذ تركيب رأس المطرقة كتلك المتوقع أنها تعمل إنشطار ذاتي في المعمل للفيرويديين النباتيين ASBVd و PLMVd وفي فيروسايدات النبات ونسخ من فيروسايد السمندل Newt Satellite 2 DNA.

### الكائن المسبب:

لم يتأكد بعد فيما إذا كان مسبب هذا المرض فيرويد أو فيروسايد لأن فيه صفات كثيرة مشتركة بين هاتين المجموعتين من المسببات المرضية. لذلك لا يشار إليه بأنه فيرويد بل بأنه مرافق لتقزم القرنفل (Car SAV) وإذا قلنا في هذا الشرح كلمة فيرويد فإن ذلك من باب المجاز فقط.

درس تتابع نيوكليتيديات RNA الدائري المعزول من نبات القرنفل المصاب بالتقزم وتبين أنه يتكون من ٢٧٥ نيوكليتيده تتخذ شكل التركيب الثانوي المتفرع عند أقل حرارة حرة. إن كل من الخيوط السالبة والموجبة لهذا الحمض تستطيع أن تشكل تركيب رأس المطرقة المفترض بأنه وسيط في الإنشطار الذاتي في المعمل. إن النسخ السالبة كاملة الطول والأخرى غير الكاملة من فيرويد تقزم القرنفل الدائري الشاملة تركيب رأس المطرقة تظهر عملية الإنشطار الذاتي خلال النسخ وبعد التنقية، هذا يدل على دخول تركيب رأس المطرقة المفرد في تفاعل الانشطار الذاتي. أما في حالة النسخ الموجبة فإنه فقط الدايمرك Dimeric RNA وليس ال monomeric عندها كفاءة الانشطار الذاتي خلال النسخ والتنقية وهذا يقوى بشدة دخول رأس المطرقة المزدوج في الإنشطار الذاتي أكثر من إنشطار النطاق المفرد. وعلى أية حال فإن نسخ موجبة من monomeric تنشطر ذاتياً بعد التنقية بمعدل منخفض في تفاعل معتمد على التركيز والذي أكثر احتمالاً بأن يحدث خلال ميكائيزم بين

الجزئيات Intramolecular mechanism. إن مقارنة تحليل التتابع قد أظهر أن فيروس تقزم القرنفل الدائري يشترك في تشابهات كثيرة مع بعض الفيروسيدات أو الفيروسايدات. إن الحمض النووي RNA الصغير الدائري والذي يمكن أن يكون فيروس أو فيروسايد هو المسبب لأعراض التقزم في القرنفل.

### العزلة الأسبانية:

الدراسات التي أجريت على هذا المرض في أسبانيا ذكرت أن RNA الدائري الذي يصيب القرنفل يتكون من ٢٧٥ نيوكليتيده وهو قريب الشبه مع تلك الفيروسيدات المعروفة في إيطاليا والولايات المتحدة ومع أن كثير من الأبحاث قد أكدت بأن هذا المسبب فيروس إلا أن هناك بعض التحفظات على ذلك.

استمرت الدراسات على عزلة أسبانيا ذو الحجم ٢٧٥ نيوكليتيده ووجد أن هذه النيوكليتيديات تتكون من ٨٤ G بنسبة ٣٠,٥٪، ٥٧ C بنسبة ٢٠,٧٪، ٦٢ A بنسبة ٢٢,٥٪ و ٧٢ U بنسبة ٢٦,٥٪ وبالتالي يكون G + C بنسبة ٥١,٢٪. إن التركيب الثانوي المتكون على أقل طاقة حرة يميل إلى التكوين المتفرع وأن ٧٠,٥٪ من مراكزه تكون في أزواج بحيث تكون GC بنسبة ٤٧,٤٪ و AU بنسبة ٣٦,١٪ و GU بنسبة ١٦,٥٪.

إن التحليل المقارن لتركيبات رأس المطرقة للفيروس Car SAV يبين أن هذا الفيروس يمكن أن يشكل تركيبات رأس المطرقة في كل من قطبي الشريطين كما هو الحال في فيروس ASBVd وفيروس PLMVd وفيروسايدات sLTSV و sBYDV. كما وأن التكوينات الناشئة من أقل طاقة حرة من المونومرك الموجب والسالب والداي مرك السالب في Car SAV RNAs لا تحتوي تركيبات رأس المطرقة وبالتالي فإن النسخ النقية المتوافقة غير متوقع لأن تعمل إنشطار ذاتي مالم تتعرض إلى حرارة قبل المعاملة لتشجيع ظهور التكوينات البديلة المحتوية على تركيبات رأس المطرقة.

إن المونومرك السالب والداى مرك الموجب فى Car SAV RNAs يكون فيهما الإنشطار الذاتى خلال النسخ وبعد التنقية أكثر احتمالاً من أن يكون خلال تركيبات رأس المطرقة المفرد والثنائى بالترتيب، وهذا يشبه ASBVd RNA. كذلك فإن تركيب رأس المطرقة من Car SAV RNA يمتلك الحلزون (اللولب) رقم ٣ وكذلك ثلاثة عروات مشابهة فى RNA فى السمندل (بعض الحيوانات). وتمشياً مع نظريات عدم الثبات لتركيب رأس المطرقة فإنه من الصعب اكتشاف الإنشطار الذاتى فى المونومرك الموجب لـ Car SAV RNA خلال النسخ، بينما الإنشطار الذاتى فى الداى مرك الموجب لـ Car SAV RNA يحدث بكفاءة خلال النسخ وبعد التنقية وهذا يؤكد دخول تركيب رأس المطرقة المزدوج فى هذا التفاعل. وهذه النتائج تنطبق مع نتائج الأبحاث على بعض الفيروسسايدات.

ولغاية سنة ١٩٩٤ لا يوجد تأكيدات على أن Car SAV هو من ضمن الفيروسات أو من ضمن الفيروسسايدات والأبحاث القادمة إن شاء الله هى التى سوف تؤكد ذلك.

نشر هذا المقال فى مجلة Nucleic Acid Research, 1992, Vol. 20. No. 23: 6323 - 6329.

### ٣- فيروس لفة أوراق القمح

#### Wheat Leaf Blight Viroid

ذكرت مجلة China J. Virology الصادرة سنة ١٩٨٧ فى الصفحة ١٧٣ - ١٧٦. أن هناك فيروس يصيب القمح يؤدي إلى لفة الأوراق وإصفرارها وهو فيروس كامن فى الحبوب ويسبب المرض المسمى Seed - borne Yellow Leaf Blight Disease. تظهر أعراض هذا المرض على شكل مناطق صفراء متطاولة على نصل الورقة، يظهر فى منتصف هذه المناطق بقع متحللة ذات لون بنى. إذا كانت الأعراض شديدة تظهر نباتات القمح وكأنها ملفوحة. يحدث التباس فى تشخيص هذه الأعراض مع بعض الإصابات الفطرية، إلا أن الفحص الميكروسكوبى يضع تمييزاً لذلك.

بالفحص الميكروسكوبى للخلايا فى منطقة الإصابة (الصفراء قبل التحلل) يظهر تحطم واختفاء أجزاء من الغشاء النووى ويحدث تغيرات فى السيتوبلازم بالقرب من النواة ويحدث تمدد فى قطر الأربطة بلازمودسيماتا Plasmodesmata ويصبح قطر بعضها أكبر من ١٠٠ نانومتر.

#### ٤ - فيروس اللجستروم

##### Privet Viroid

فى المجلة الصينية السابقة ولكن فى عدد آخر. Chaina J. VIROL عدد رقم ٣ فى الصفحة ٥٣ - ٦١ الصادرة سنة ١٩٨٧. ذكرت أن نبات اللجستروم *Ligustrum compactum* يصاب بفيروس ذو شكل دائرى مغلق ويتكون من عديد من قواعد الأزواج وأن وزنه الجزيئى ٠,٧ × ١٠<sup>٥</sup> دالتون. وأن هذا الفيروس لا ينتقل إلى نبات *Gynura aurantiaca*.

#### ٥ - فيروس الإصفرار الهيميت فى نخيل الزيت

##### Oil Palm Fatal Yellowing Viroid

ذكر هذا الفيروس فى مجلة 392 - 394 (4): Fitopatol. BRAS 13 الصادرة سنة ١٩٨٨. تذكر هذه المجلة أن أعراض المرض المتسببة عن هذا الفيروس فى أشجار نخيل الزيت *Elaeis guineensis* تظهر على شكل إصفرار على الأوراق يستمر هذا الإصفرار فى الزيادة حتى يشمل الورقة كلها وتموت.

#### ٦ - فيروس الموزايك المبرقش فى البسلة الهندية

##### Pigeon Pea Mosaic Mottle Viroid

لقد وجد أن هناك حمض نووى RNA منخفض الوزن الجزيئى ١,٣ × ١٠<sup>٥</sup> دالتون عزل من نباتات البسلة الهندية *Cajanus cajan* فى الهند ويسبب هذا الفيروس مرض فى البسلة الهندية هو الموزايك المبرقش. تظهر الأعراض على شكل موزايك متبرقش فى الأوراق، صغر فى حجم الأوراق، تقزم النبات وعدم الإزهار. يمكن نقل هذا النبات بالحقن الميكانيكى ويصيب كل من: -

1 - *Nicotiana glutinosa*

2 - *N. clevelandii*

3 - *Chenopodium amaranticolor*

إن هذا الفيرويد يختلف عن فيرويد تقزم الدخان البرى الذى ذكر سابقاً *N. glutinosa* Stunt Viroid. إن هذا الفيرويد (فيرويد الموزايك المبرقش فى البسلة الهندية) أول فيرويد يذكر بأنه يصيب البقوليات.

هذا المقال فى مجلة 60 - 55 (1) 137 *J. of Phytopathology* الصادرة سنة ١٩٩٣.

## ٧ - فيرويد تقزم الأرقطيون

### Burdock Stunt Viroid

ذكرت مجلة 155 - 147 (2) 29 *SCI SIN SER B* الصادرة سنة ١٩٨٦ أن نبات الأرقطيون *Arctium tomentosum* وهو من النباتات الطبية يتبع العائلة المركبة وتنتشر زراعته فى أوروبا والصين وكذلك النوع *A. lappa* يصابان بنوعين من الفيرويدات التى تسبب تقزم النبات وتبرقش الأوراق كما وأن الكالوس المتكون من الأوراق المريضة ينمو ببطء أكثر إذا قورن مع المتكون من الأوراق السليمة. كذلك فإن تكاثر إحدى الفيرويدات فى الكالوس يكون أسرع خلال الستة إلى ثمانية شهور الأولى. الفيرويدان على درجة عالية من تزاوج القواعد وهما يأخذان التركيب الدئرى والشكل شبه العصى. الوزن الجزيئى للأول  $1,8 \times 10^6$  دالتون والوزن الجزيئى للثانى  $1,7 \times 10^6$  دالتون، وهما أكثر ثباتاً للحرارة من كثير من الفيرويدات الأخرى. لم يحدث أن عزل الفيرويديين معاً من نبات واحد مصاب.

بهذا نختم كتابنا بالحمد لله رب العالمين

«وأخر دعواهم أن الحمد لله رب العالمين»

obeykandi.com

## المراجع

### كتب

- ١ - فتحى محمد عبدالنواب. البيولوجيا الجزيئية (مدخل الهندسة الوراثية). ١٩٩٣. المكتبة الأكاديمية القاهرة. ٤١٥ صفحة.
- ٢ - فوزى طه قطب. النباتات الطبية - ١٩٧٩ - الدار العربية للكتاب - ليبيا - تونس - ٣٥٧ صفحة.
- 3 - Abraham, M., B. Harrow. 1971. Biochemistry. Tenth edition. W. B. Saunders Company. London. 727. pp.
- 4 - Agrios, G. N. 1988. .Plant Pathology. 3rd edition. Academic press INC. New York. 800 pp.
- 5 - Buczacki, S. T. and Harris, K. M. 1982. Pests, Diseases and Disorders of garden plants. Collins St. James place London 512 pp.
- 6 - Francik, R. I. B. *et al.* 1991. Classification and Nomenclature of viruses. Fifth Report of The International Committe on Taxonomy of Viruses. Springer - Verlay Wien. New York. 450 pp.
- 7 - Mandahar. C. L. 1978. Introduction to plant viruses. S. Chand and Company LTD. New Delhi. pp. 333.

- 8 - Maramorocch, K. 1991. Viroids and satellites Molecular Parasites at the Frontier of life. CRC Pres, INC. p. 21 - 58.
- 9 - Roberto, C. 1984. Medical Plants. Macdoland Press London. pp 447. In the English translation. Arnoldo Mondadori Editore S. P. A., Milan.
- 10 - Smith, K. M. 1979. Plant Viruses. Sixth edition. John Wiley Sons. New York 241 pp.
- 11 - Walter, R., E. C. Calavand and G. E. Corman. 1978. Citrus industry volum IV. University of Califorina pp. 365.

ملاحظات :-

- ١ - الأبحاث والمجلات المذكورة هنا مرتبة حسب سنوات البحث.
- ٢ - هناك مراجع خاصة ومحددة في نهاية كل فصل من الكتاب في الجزء الأول.



## أبحاث ومجلات

### أبحاث سنة ١٩٩٤

- 1 - Andrew, G. R. and R. H. Symons. 1994. Infectivity of Linear Monomeric Transcripts of Citrus Exocortis viroid. *Virology* 203: 328 - 335.
- 2 - Chela - Flores, J. 1994. Are viroids molecular fossils of the RNA world? I. *Theoretical Biology* 166 (2) 163 - 166.
- 3 - Domingo, C., V. Conejero and P. Vera. 1994. Genes encoding acidic and basic Class III B-1,3 glucanases are expressed in tomato plants upon viroid infection. *Plant Molecular Biology* 24 (5): 725 - 732.
- 4 - Lima, M. I, *et al.* 1994. Detection of avocado Sunblotch viroid in chloroplasts of avocado leaves by in situ hybridization. *Virology* 138: 385 - 390.
- 5 - Maria, E. N., L. H. Marcellino, E. W. Kitajima. 1994. Nucleotide sequence of the original Brazilian isolate of coleus yellow viroid. *J. General Virol.* 75, 1447 - 1449.
- 6 - Semancik, J. S. and J. A. Szychowski. 1994. Avocado sunblotch disease. *J. General Virology* 75 (7) 1543 - 1549.
- 7 - ———, ———, ———, Rakowski, A. C., and R. H. Symons. 1994. A stable 463 nucleotide variant of citrus exocortis viroid produced by terminal repeats. *J. General Virology* 75 (727 - 732).
- 8 - Takahashi, T., S. Shimakoshi *et al.* 1994. Cytopathology of resin glands from hop plants infected with hop stunt viroid. *zeitschrift f. Pflanzenschutz* 100 (5) 508 - 515.

- 9 - Tornero, P., V. Conejero and P. Vera. 1994. A gene encoding a novel isoform of the PR-1 protein family from tomato is induced upon viroid infection. *Molecular and General Genetics* 243 (1) 47 - 53.
- 10 - Wassenegger, M. *et al.* 1994. RNA - directed de novo methylation and genomic sequences in plants. *Cell (Cambridge)* 76 (3) 567 - 576.

### أبحاث سنة ١٩٩٣

- 11 - Fonseca, M. E., V. L. Marinho and T. Nagata. 1993. Hop latent viroid in hop Germ Plasm Introduction into Brazil from U. S. A. *Plant Dis.* 77 : 952.
- 12 - ——— , ——— and E. W. Kitajima. 1993. French Marigold. A New Experimental Host of Citrus Excocortls Virotd. *Plant Dis.* 77 : 953.
- 13 - He, X. Y., G. H. Zhou and A. S. Liu. 1993. Identification of strains of potato spindle tuber viroid. *Acta Phytopathological Sinica* 23 (4): 361 - 365.
- 14 - Ito, T. *et al.* 1993. Detection of a viroid associated with apple fruit crinke disease. *Annals Phytopatl Society Japan.* 59: 520 - 527.
- 15 - Lakshman, D. K. and S. M. Tavantzis. 1993. Primary and secondary structure of a 360 - nucleotide isolate of potato spindle tuber viroid. *ARCh Virol.* 128 (3 - 4): 319 - 331.
- 16 - Marcos, J. F. and R. Flores. 1993. Self - cleavage reaction of avocado sunblotch viroid RNAs is present in naturally occurring linear viroid molecules. *J. GEN. VIROL.* 74 (5): 907 - 910.
- 17 - Matousek, J., Rakousky S. 1993. Antisense DNA inhibits infections

- of potato spindle tuber viroid. *Folia Biologica* 39 (2): 87 - 99.
- 18 - Matousek, J. *et al.* 1993. Inhibition of potato spindle tuber viroid infection with DNA oligonucleotides. *Biochimie* 75 (1 - 2) 63 - 69.
- 19 - Morton, A., D. J. Barbara and A. N. Adams. 1993. The distribution of hop latent viroid within plant of *Humulum lupulus*. *Annals of Applied Biology* 123 (1): 47 - 53.
- 20 - Ou, F. C. *et al.* 1993. Multiple pathways of reversion in viroids for conservation of structural elements. *EMBO J.* 12 (5): 2129 - 2139.
- 21 - Podleckis, E. V. *et al.* 1993. Chemiluminescent detection of potato and poma fruit viroids. *J. Virol Methods* 43 (2): 147 - 158.
- 22 - Rigden, J. E. and M. A. Rezaian. 1993. Analysis of sequence variation in grapevine yellow speckle viroid I reveals two distinct alternative structures for the pathogenic domain. *Virology* 193 (1) 474 - 477.
- 23 - Rodriguez, M. J. B., J. W. Randles. 1993. Coconut cadang-cadang viroid mutants associated with severe disease vary in both the pathogenicity and the central conserved region. *Nucleic Acids Research* 21 (11) : 2771.
- 24 - Rodrigo, I. *et al.* 1993. cDNA cloning of viroid-induced tomato pathogenesis-related protein P. 23. *Plant Physiology* 102 (3) : 939 - 945.
- 25 - Semancik, J. S. *et al.* 1993. Isolation of citrus exocortis viroid recovered by host and tissue selection. *J. General Virology* 74 (11) : 2427 - 2436.

- 26 - Sing, R. P., A. Boucher and T. H. Somervjlle. 1993. Interaction between a mild and a severe strain of potato spindle tuber viroid. *AM. Potato J.* 70 : 85 - 92.
- 27 - Skrzeczowski, L. J., W. E. Howell and G. I. Mink. 1993. Correlation between leaf epinasty symptoms on two apple cultivars and results of cRNA hybridization for detection of apple scar skin viroid. *Plant Disease* 77 - (9) - : 919 - 921.
- 28 - Stocker, S., M. C. Guitton and H. P. Muhlbach. 1993. Phytosynthetically active suspension cultures of potato spindle tuber viroid infected tomato cells as tools for studying viroid host cell interaction. *Plant Cell Reports.* 12 (11) : 597 - 602.

#### أبحاث سنة ١٩٩٢

- 29 - Adams, A. N. *et al.* 1992. The distribution and spread of hop latent viroid within two commercial plantings of hop. *Ann Appl Biol.* 121 (3) 585 - 592.
- 30 - Ashulin, L., M. Mawassi and M. BAR-Joseph. 1992. procedure to amplify cDNA from viroid RNA templates using the polymerase chain reaction. *Methods Mol Cell Biol.* 3 (2) : 83 - 89.
- 31 - Giunchedi, L. *et al.* 1992. Symptoms of latent mosaic on peach in Emilia - Romagna. *Informatore Fitopatologico* 42 (3) : 47 - 49.
- 32 - Hadas, R., L. Ashulin and M. BAR - Joseph. 1992. Transmission of a citrus viroid to avocado by heterologous grafting. *Plant Disease* 76 (4) : 357.

- 33 - Hataya, T., *et al.* 1992. Detection of hop latent viroid using reverse transcription and polymerase chain reaction. *Ann Phytopath. Soc. JPN* 58 (5): 677 - 684.
- 34 - He, X. Y., *et al.* 1992. detection of potato spindle tuber viroid by polymerase chain reaction. *Virol Sin* 7 (3): 362 - 366.
- 35 - Herold, T. *et al.* 1992. Sequence analysis of five new field isolates demonstrates that the chain length of potato spindle tuber viroid is not strictly conserved but as variable as in other viroids. *Plant Mol Biol* 19 (2): 329 - 333.
- 36 - Hernandez, C. *et al.* 1992. Pear blister canker viroid is a member of the apple scar skin subgroup and also has sequence homology with viroids from other Subgroups. *J. Gen Virol.* 73 (10): 2503 - 2507.
- 37 - \_\_\_\_\_ , \_\_\_\_\_ and R. Flores. 1992. plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self-cleave *in vitro* via hammer-head structure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89 (9): 3711 - 3715.
- 38 - Kryczynski, S., A. Stawiszynska, S. Skrzeczkowska. 1992. Pollen transmission of potato spindle tuber viroid to pollinated potato plants. *Horticulture* 16: 59 - 64.
- 39 - Kyriakou, A. P. 1992. Incidence of Cyprus of citrus exocortis viroid and its mechanical transmission. *Plant Pathol (OXF)* 41 (1): 20 - 24.
- 40 - Marcos, J. F. and R. Flores. 1992. Characterization of RNAs specific to avocado sunblotch viroid synthesized *in vitro* by a cell-free system from infected avocado leaves. *Virology* 186: 481 - 488.

- 41 - Meldrals, Ya. A. *et al* 1992. Detection of potato spindle tuber viroid and chrysanthemum stunt viroid using biotinylated oligodeoxyribonucleotide. *Mol Biol* (Mosco) 26 (3): 540 - 545.
- 42 - Owens, R. A. *et al*. 1992. A new mild strain of potato spindle tuber viroid isolated from wild *Solanum* spp. in India. *Plant Disease* 76 (5): 527 - 529.
- 43 - Randles, J. W. and D. Hanold. 1992. Indexing of coconut germplasm for viroid and virus. *IBPGR* 44 - 45 ISBN 92 - 9043 - 217 - 9.
- 44 - Rezaian, M. R., L. R. Krake and D. A. Golino. 1992. Common identity of grapevine viroids from USA and Australia revealed by PCR analysis. *Intervirology* 34 (1) : 38 - 43.
- 45 - Rigden, J. E. and M. R. Rezaian. 1992. *In Vitro* Synthesis of an infectious viroids: Analysis of the infectivity of monomeric linear *CEV*. *Virology*. 186 (1): 201 - 206.
- 46 - Sano, T. *et al*. 1992. Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 89 (21) 10104 - 10108.
- 47 - Schindler, I. M. and H. P. Muehlbach. 1992. Involvement of nuclear DNA-dependent RNA polymerases in potato spindle tuber viroid replication: A reevaluation. *Plant Sci* 84 (2): 221 - 229.
- 48 - Semancik, J. S. and J. A. Szychowski. 1992. Relationships among the viroids from grapevine. *J. Gen Virol*. 73 (6) 1465 - 1469.
- 49 - ———— , ———— D. J. Gumpf and J. A. Bash. 1992. Interference between viroids inducing excocortis and cachexia diseases of citrus. *Ann. Appl Biol*. 121 (3): 577 - 583.

- 50 - Singh, R. P. *et al.* 1992. Potato spindle tuber viroid is not encapsidated *in vivo* by potato virus Y particles. *Can J. Plan Patho.* 14 (1) : 18 - 21.
- 51 - Singh, R. P., A. Boucher and T. H. Somerville. 1992. Detection of potato spindle tuber viroid in the pollen and various parts of potato plant pollinated with viroid - infected pollen. *Plant Disease* 76 (9) 951 - 953.
- 52 - Singh. R. P. *et al.* 1992. A viroid from *Nematanthus wettseinii* plants closely related to the *Columnnea latent* viroid. *J. Gen Virol.* 73 (11) : 2769 - 2774.
- 53 - Steger, G. *et al.* 1992. Structural requirements for viroid processing by RNase. T.1. *J. Mol Biol.* 227 (3) 719 - 739.
- 54 - Takahashi, T. *et al.* 1992. Growth characteristics in cultured cucumber tissues infected with hop stunt viroid. *J. Phytopath* 136 (4): 288 - 296.
- 55 - Takahashi, T. *et al.* 1992. Comparison of plant hormon requirments in leaf tissues from hop stunt viroid-infected and uninfected hop plants. *Z. P. PFLANZEN SCHUTZ* 99 (1): 62 - 70.
- 56 - Welinicki, M. and C. Hiruki. 1992. Highly sensitive digoxigenin - labelled DNA probe for the detection of potato spindle tuber viroid. *J. Virol Method* 39 (1-2): 91 - 99.
- 57 - Yang, X., A. Hadidi and S. M. Garnsey. 1992. Enzymatic cDNA amplification of citrus excocortis and cachexia viroids from infected citrus hosts. *Phytopathology.* 83 (3): 279 - 285.

## أبحاث سنة ١٩٩١

- 58 - Ashulin, L. *et al* 1991. Nucleotide sequence of a new viroid species, citrus bent leaf viroid isolated from grapefruit in Isreal. *Nucleic Acid Res.* 19 (17): 4767.

- 59 - Belles, J. M., J. Carbonell and V. Conejero. 1991. polyamines in plants infected by citrus exocortis viroid or treated with silver ions and ethephon. *Plant Physiology* 96 (4): 1053 - 1059.
- 60 - Bianco, P. A. and G. A. Vegetti. 1991. Detection and identification of chrysanthemum stunt viroid in Italiy. *Riv Patol Veg* 1 (2-3): 43 - 50.
- 61 - Elena, S. F. *et al* 1991. Phylogeny of viroids, viroid - like satellite RNAs and the viroid-like blister canker disease. *PROC Natl Acad Sci USA* 88 (13): 5631 - 5634.
- 62 - Flores, R. *et al*. 1991. Identification of a new viroid as the putative caused agent of pear blister canker disease. *J. Gen Virol.* 72 (6): 1199 - 1204.
- 63 - Gillings, M. R., P. Broadbent and B. I. Gollnow. 1991. Viroids in Australian Citrus: Relationship to excocortis, cachexia and citrus dwarfing. *Aust J. Plant Physiol* 18 (5): 559 - 570.
- 64 - Hadidi, A., A. J. Hansen, C. L. Parish and X. Yanc. 1991. Scar skin and dapple apple viroids are seed-borne and persistent in infected apple trees. *Res Virol* 142 (4): 289 - 296.
- 65 - Hanold, D. and J. W. Randles. 1991. Detection of coconut cadang - cadang viroid - like sequences in oil and coconut palm and other monocotyledons in the South - west Pacific. *Ann. Appl. Biol.* 118 (1): 139 - 152.
- 66 - Harty, A. 1991. Exocortis viroid in New Zealand. *Orchardist of New Zealand* 64 (9) 38 - 39.
- 67 - Hopp, H. E. *et al*. 1991. Development and application of a nonradioactive nucleic acid hybridization system for simultaneous detection of four potato pathogens. *J. Virol Method* 31 (1): 11 - 30.



- 68 - Kanematsu, S. *et al.* 1991. Comparison of nonradioactive cDNR probes for detection of potato spindle tuber viroid by dot-blot hybridization assay. *J. Virol Methods* 35 (2): 189 - 199.
- 69 - Kryczynski, S., A. Stawiszynska and S. Skazeczkowska. 1991. Detection of potato spindle tuber viroid in composite plant samples. *Phytopathologica - Polonica* 12 : 29 - 32.
- 70 - Loss, P. M., *et al.* 1991. formation of thermodynamically metastable structure containing hairpin II is critical for infectivity of potato Spindle tuber RNA. *EMBO J.* 10 (3): 719 - 728.
- 71 - Matousek, J. *et al.* 1991. An immunochemical testing of pathophysiological reactions of several PSTVd infect tomato. *Biol Plant* 33 (5): 358 - 365.
- 72 - ———, *et al.* 1991. Instable expression of potato spindle tuber viroid complementary DNA trasformed potato. *Arch Phyto., Z.* 27 (3) 167 - 173.
- 73 - Meldrais, Ya. A., I. E. Line and T. I. Gurinovich. 1991. Chrysanthemum stunt viroid cDNA cloning into plasmid pUC19 and the cloned cDNA for detection of chrysanthemum stunt viroid. *Mol Biol. (Mosco)* 25 (5): 1301 - 1307.
- 74 - Mishra, M. D. *et al.* 1991. Indian bunchy top disease of tomato plants is caused by a distinct strain of citrus excocortis viroid. *J. Gen Virol.* 72 - (8): 1781 - 1786.
- 75 - Singh, R. P. *et al.* 1991. Differential migration during polyacrylamide gel electrophoresis suggests conformational differences among strains of potato spindle tuber viroid. *Can. J. Plant Pathol.* 13 - (3) 202 - 211.

- 76 - Singh, R. P., A. Boucher and R. G. Wang. 1991. Detection, distribution and longterm persistence of potato spindle tuber viroid in true potato seed from Chaina. *Potato J.* 68 (1) : 65 - 74.
- 77 - \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, and A. Singh. 1991. High incidence of transmission and occurrence of a viroid in commercial seeds of *Coleus* in Canada. *Plant Disease* 75 (2): 184 - 187.
- 78 - Trnena, L. and J. Matousek. 1991. Aminopeptidase activity in potato spindle tuber viroid infected tomato leaves. *Phytopathol PF lanzenschutz* 27 (2): 117 - 125.
- 79 - Tsagris, M., M. Tabler and H. L. Saenger. 1991. RNase T<sub>1</sub> generates circular RNA molecules from viroid-specific RNA transcripts by cleavage and intramolecular ligations. *Nucleic Acid Res.* 19 (7): 1605 - 1612.
- 80 - Ziegler, A., E. Reiss and J. Schubert. 1991. Detection of potato spindle tuber viroid with nonradioactive hybridization probes. *Arch phytopath. Z.* 27 (5): 411 - 414.

### أبحاث سنة ١٩٩٠

- 81 - Barbara, D. J. et al. 1990. Some effects of hop latent viroid on two cultivars of hop in the UK. *Ann. Appl Biol.* 117 (2): 359 - 360.
- 82 - Barbara, D. J., A. Morton and A. N. Adams. 1990. Assessment of UK hops for the occurrence of hop latent and hop stunt viroids. *Ann. Appl Biol.* 116 (2): 265 - 272.
- 83 - Belles, Joes M., A. Granell and V. Conejero. 1990. Impairment of viroid infection in *G. aurantiaca* plants by treatment with ethephon. *Can J. Plant Pathol* 12 (2): 175 - 179.
- 84 - Candresse, T., T. O. Diener and R. A. Owens. 1990. The role of the

- viroid central conserved region in complementary DNA infectivity. *Virology* 175 (1): 232 - 237.
- 85 - Duran-Vila, N. and J. S. Semancik. 1990. Variations in the crossprotection effect between two strains of citrus exocortis viroid. *Ann. Appl. Biol.* 117 (2): 367 - 378.
- 86 - Dusi, A. N., M. E. N. Fonseca and A. C. Deavila. 1990. Occurrence of a viroid in chrysanthemum in Brazil. *Plant Pathol (OXF)* 39 (4): 636 - 637.
- 87 - Flores, R. *et al.* 1990. Some properties of the viroid inducing peach latent mosaic disease. *Res Virol* 141 (1): 109 - 118.
- 88 - Hu, K., Z. Yong-Zhi and d. DA-Ming. 1990. Effect of some chemicals on infectivity and replication of citrus exocortis viroid. *Virol sin* 5 (4): 410 - 418.
- 89 - Hadidi, A. *et al.* 1990. Homology of the agent associated with dapple apple diseases to apple scar skin viroid and molecular detection of these viroids. *Phytopathol.* 80 (3): 263 - 268.
- 90 - ———, ——— and X. Yang. 1990. Detection of pome Fruit viroids by enzymatic complementary DNA amplification. *J. virol. Methods* 30 (3): 261 - 270.
- 91 - Juarez, J. *et al.* 1990. Separation of citrus viroids by shoot - tip grafting *in vitro*. *Plant Pathol. (OXF)*. 39 (3): 472 - 476.
- 92 - Jiang, L., C. Wel, T. Poand and L. Yi. 1990. Temperature - gradient gel electrophoresis of apple scar skin viroid. *Acta Microbiol Sin* 30 (4): 278 - 283.
- 93 - Marcos, J. F. and R. Flores. 1990. Subcellular location of avocado viroid in avocado teaves. *Plant Sci* 67 (2): 237 - 244.
- 94 - Owens, R. A. 1990. Mutational analysis of viroid pathogenicity: To-

- mato apical stunt viroid. *Mol Plant Microbe Interact* 3 (6): 374 - 380.
- 95 - Owens, R. A., T. Candresse and T. O. Diener. 1990. construction of novel viroid chimeras containing proteins of tomato apical stunt and citrus exocortis viroids. *Virology* 175 (1) 238 - 246.
- 96 - Rezaian M. A. 1990. Australian grapevine viroid evidence for extensive recombination between viroids. *Nucleic Acids Res* 18 (7): 1813 - 1818.
- 97 - singh, R. P., A. Boucher and T. H. Somerville. 1990. Cross - protection with strains of potato spindle tuber viroid in the potato plant and other solanaceous hosts. *Phytopath.* 80 (3) 246 - 250.
- 98 - — , — and G. C. C. Tai. 1990. High levels of viroid in tomato and potato plants inoculated with minimal amounts of potato spindle tuber viroid. *Can J. Plant Pathol* 12 (1): 11 - 15.
- 99 - Vera, P. and V. Conejero. 1990. Citrus exocortis viroid infection alters the *in vitro* pattern of protein phosphorylation of tomato proteins. *Mol Plant-Microbe Interact* 3 (1): 28 - 32.
- 100 - Welnicki, M. *et al* 1990. Detection of potato spindle tuber viroid by molecular hybridization and bioassay. A large - scale comparison. *Potato Research* 33 (4) 497 - 503.
- 101 - Yokoyama, M. *et al.* 1990. Detection of specific RNA by in situ hybridization in plant protoplasts. *Plant Cell Physi.* 31 (3): 403 - 406.
- 102 - Zekanowski, C. *et al.* 1990. Detection of PSTVd in dormant potato tubers by concatameric complementary DNA probe. *J. Virol. Methods.* 30 (1): 127 - 130.

## أبحاث سنة ١٩٨٩

- 103 - Flores, R. 1989. Synthesis of RNA specific to citrus exocortis viroid. *J. Gen Virol.* 70 (10): 2695 - 2706.
- 104 - Fonseca, M. E. *et al.* 1989. A small viroid in *Coleus* sp. from Brazil. *Fitopathol Bras* 14 (1): 94 - 96.
- 105 - Galindo, J., C. Lopez and T. Aguilar. 1989. Discovery of the transmitting agent of tomato planta macho viroid. *Rev Mex Fitopatol* 7 (1) 61 - 65.
- 106 - Hammond, R. W., T. O. Diener and R. A. Owens. 1989. Infectivity of chimeric viroid transcripts reveals the presence of alternative processing sites in potato spindle tuber viroid. *Virology* 170 (2) 486 - 495.
- 107 - \_\_\_\_\_ , \_\_\_\_\_ , \_\_\_\_\_ and d. R. Smith. 1989. Nucleotide sequence and proposed secondary structure of *Columnnea* latent viroid. *Nucleic acids Res.* 17 (23): 10083 - 10094.
- 108 - Harders, J. *et al.* 1989. Imaging of viroids in nuclei from tomato leaf tissue by in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. *EMBO J.* 8 (13): 3941 - 3950.
- 109 - Jaswal, M. S. 1989. Reuse of buffers in return polyacrylamide gel electrophoresis tests for the detection of potato spindle tuber viroid. *AM. Potato J.* 66 (12): 813 - 820.
- 110 - Kondakova, O. A. *et al.* 1989. Potato spindle tuber viroid does not complement TMV temperature-sensitive transport function. *J. GEN Virol.* 70 (6): 1609 - 1612.
- 111 - Koltunow, A. M. *et al.* 1989. Two related viroids cause grapevine yellow speckle disease independently. *J. GEN. Virol.* 70 (12): 3411 - 3420.

- 112 - ———, ———, and M. A. Rezaian. 1989. Grapevine viroid 1B, A new member of the apple scar skin viroid group contains the left terminal region of tomato planta macho viroid. *Virology* 170 (2): 575 - 578.
- 113 - ———, ———, and ———. 1989. A scheme for viroid classification. *Intervirology* 30 (4): 194 - 201.
- 114 - Leitao, T., Duran-Vila, N. 1989. Detection of viroid RNAs in grapevine varieties from Portugal. *Mol. Cellular Bio* 14 (1-2) 29 - 39.
- 115 - Ma, X. *et al.* 1989. A small circular RNA from citrus plant. *Chin J. Virol* 5 (2) 140 - 144.
- 116 - McInnes, J. L., N. Habili and R. H. Symons. 1989. Nonradioactive, photobiotin-labelled DNA probes for routine diagnosis of viroids in plant extracts. *J. Virol Methods* 23 (3): 299 - 312.
- 117 - Meldrais, Ya. A. *et al.* 1989. The use of synthetic oligodeoxyribonucleotide probe for the diagnosis of viroid diseases in potato and chrysanthemum. *Mol Biol (Mosco)* 23 : 816 - 821.
- 118 - Mozhaeva, K. A. *et al.* 1989. A comparative study of various diagnostic method of potato spindle shaped tuber viroid. *Biol Nauki (Mosco)* 0 (7): 104 - 110.
- 119 - Pallas, V. and R. Flores. 1989. Interactions between citrus exocortis and potato tuber spindle viroids in plants of *Gynura aurantiaca* and *Lycopersicon esculentum*. *Intervirology* 30 (1): 10 - 17.
- 120 - Puchta, H. and H. L. Saenger. 1989. Sequence analysis of minute amounts of viroid RNA using the polymerase chain reac

- tion. *Arch Virol.* 106 (3) 335 - 340.
- 121 - Rakowski, A. G. and R. H. Symons. 1989. Comparative sequence studies of variants of avocado sunblotch viroid. *Virology.* 173 (1): 352 - 356.
- 122 - Rivera - Bustamante, R. F. and J. S. Semancik. 1989. Properties of a viroid - replicating complex solubilized from nuclei. *J. Gen. Virol.* 70 (10) 2707 - 2716.
- 123 - Roy, B. P., M. G. Abuhaidar and A. Alexander. 1989. Biotinylated RNA probes for the detection of potato spindle tuber viroid. *J. Virol. Methods.* 23 (2): 149 - 156.
- 124 - Sano, T. *et al.* 1989. Hop Stunt Viroid strains from dapple fruit disease of plum and peach in Japan. *J. Gen Virol.* 70 (6): 1311 - 1320.
- 125 - Schroeder, M. and H. L. Weidemann. 1989. Simplified application of return gel electrophoresis for the routine detection of potato spindle tuber viroid. *Bull Oepp.* 19 (4) 661 - 666.
- 126 - Singh, R. P. *et al.* 1989. Characteristics of cross-protection with potato spindle tuber viroid strains in tomato plants. *Can. J. Plant Pathol* 11 (3) 263 - 267.
- 127 - Tanimura, H. *et al.* 1989. chemical synthesis of the 24 RNA fragments corresponding to hop stunt viroid. *Nucleic Acids Res.* 17 (20): 8135 - 8148.
- 128 - Vera, P. and V. Conejero. 1989. The induction and accumulation of the pathogenesis-related P 69 proteinase in tomato during citrus exocortis viroid infection and in response to chemical treatments. *Physiol. Mol. Plant Pathol* 34 (4): 323 - 334.
- 129 - Vera, R., J. H. Yago and V. Conejero. 1989. Immunogold localiza-

- tion of the citrus exocortis viroid-induced pathogenesis - related proteinase P 69 in tomato leaves. *Bethesda* 91 (1): 119 - 123.
- 130 - Yang, G., D. Daming and Z. Yongzhi. 1989. Infection of *Gynura aurantiaca* leaf protoplasts with citrus exocortis viroid. *Chin J. Virol.* 5 (3): 277 - 279.
- 131 - Yang, G., Z. Y. Chen and D. Daming. 1989. Two kinds of circular RNA in *G. aurantiaca* cell infected with citrus exocortis viroid. *China J. Virol* 5 (11): 364 - 369.
- 132 - Yamaya, J. *et al.* 1989. Expression of hop stunt viroid from its complementary DNA in transgenic tobacco plants. *Mol Plant - Microbe Interact* 2 (4): 169 - 174.
- 133 - Zhang, H. *et al.* 1989. Detection of potato spindle tuber viroid with biotin-labelled PSTVd complementary DNA probe. *China J. Virol.* 5 (1): 72 - 76.

## أبحاث سنة ١٩٨٨

- 134 - Branch, A. D. *et al.* 1988. Interference between coinoculated virioids. *Virology* 163 (2): 538 - 546.
- 135 - Branch, A. D., B. J. Benenfield and H. D. Robertson. 1988. Evidence for single rolling circle in the replication of potato spindle tuber viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 85 (23): 9128 - 9132.
- 136 - Candresse, T. *et al.* 1988. Detection of chrysanthemum stunt viroid using nick translated probes in a dot-blot hybridization assay. *J. Virol. Methods* 20 (3): 185 - 195.
- 137 - Chen, W., L. Lei, T. Po, P. Vos and R. Goldbach. 1988. Molecular cloning of complementary DNA of chrysanthemum stunt



- viroid. *Chin J. Virol* 4 (2): 173 - 175.
- 138 - Chen, W. *et al.* 1988. Grafting external healthy pear bud induces scar skin viroid in apple. *Chin J. Virol.* 4 (4): 367 - 370.
- 139 - Diener, T. O., D. R. Smith and M. Davino. 1988. Citrus B viroid identified as strain of hop stunt viroid. *Plant Dis.* 72 (8) 691 - 693.
- 140 - Duran - Vila, N. *et al.* 1988. A definition of citrus viroid groups and their relationship to the excocortis disease. *J. Gen Virol.* 69: 3069 - 3080.
- 141 - ——— , ——— 1988. Production of viroid - free grapevines by Shoot tip culture. *Am. J. Vitic* 39 (3): 217 - 220.
- 142 - Keese, P., M. E. Osorio - Keese and R. H. Symons. 1988. Coconut tinangaja viroid: Sequence homology with coconut cadang - cadang viroid and other PSTVd related RNAs. *Virology* 162 (2): 508 - 510.
- 143 - Khoury, J. *et al.* 1988. Concentration and distribution of mild and severe strains of PSTV in cross-protection tomato plants. *Phytopathology.* 78 (10): 1331 - 1336.
- 144 - Koltunow, A. M. and M. A. Rezaian. 1988. Grapevine yellow speckle viroid. Structural features of a new viroid group. *Nucleic Acids Res.* 16 (3) 849 - 864.
- 145 - ——— , ——— , ——— and L. R. Krake. 1988. Hop stunt viroid and Australian grapevine cultivars. *Australians plant Pathol.* 17 (1): 7 - 10.
- 146 - Kryczynski, S. *et al.* 1988. Transmission of three viroids through seed and pollen of tomato plants. *J. Phytopath.* (BERL) 121 (1): 51 - 57.
- 147 - Ma, X. X. X. *et al.* 1988. An effective procedure for the separation

- and preparation of citrus exocortis viroid. *Virolsin* 3 (4): 370 - 375.
- 148 - Ohshima, K. *et al.* 1988. comparative studies on hostrange and the infectivity of hop stunt viroid cucumber isolate (cucumber pale fruit viroid) native RNA and its complementary DNA. *Arch Phytopathol Pflanzenschutz* 24 (6) 475 - 484.
- 149 - Puchta, H., K. Rumm and H. L. Saenger. 1988. The molecular structure of hop latent viroid, a new viroid occurring world wide in hops. *Nucleic Acids Res.* 16 (10): 4197 - 4216.
- 150 - Rezaian, M. A., A. M. Koltunow and L. R. Krake. 1988. Isolation of three viroids and a circular RNA from grapevines. *J. Gen virol.* 69 (2): 413 - 422.
- 151 - Sano, T. *et al.* 1988. Synthetic oligonucleotide hybridization probes to diagnose hop stunt viroid strains and citrus exocortis viroid. *J. Virol. Methods* 19 (2): 109 - 120.
- 151 - Semancik, J. S., C. N. Roistacher, R. and N. Duran - Vila. 1988. Citrus Cachexia viroid, a new viroid of citrus. Relationship to viroids of the exocortis disease complex. *J. Gen. Virol.* 69 (12): 3059 - 3068.
- 152 - Singh, R. P. and A. Boucher. 1988. Loss of potato spindle tuber viroid from tuber tissues after repeated freezing. *AM. Potato J.* 65 (5): 283 - 288.
- 153 - ———, and ——— and J. E. Seabrook. 1988. Detection of the mild strains of potato spindle tuber viroid from single true potato seed by return electrophoresis. *Phytopathol.*, 78 (6): 663 - 667.
- 154 - Xiong, C. *et al.* 1988. Growth properties of CEVd-infected *Gynura aurantiaca* cell suspension system. *Acta Micro Biol Sin* 28 (4): 361 - 366.

- 155 - Zhang, QI - YA, Z. GE and DA-Ming. Ding. 1988. Distribution of citrus exocortis viroid in different organs of *Gynura aurantiaca*. *Virol Sin* 3 (1): 71 - 76.
- 156 - — , — , —1988. Could CEVd be removed by root propagation. *Chin J. Virol.* 4 (3): 275 - 276.

### أبحاث سنة ١٩٨٧

- 157 - Bernardy, M. G., G. G. Jacoli and H. W. J. Ragetli. 1987. Rapid detection of potato spindle tuber viroid by dot blot-hybridization. *J. Phytopath* (BERL) 118 (2): 171 - 180.
- 158 - Bitters, W. P., N. Duran - Vila and J. S. Semancik. 1987. Effect of citrus exocortis viroid on flower and fruit structure and development on Etrog citron. *Plant Disease* 71 (5): 397 - 399.
- 159 - Granell, A., J. M. Belles and V. Conejero. 1987. Induction of pathogenesis - related protein in tomato by citrus exocortis viroid, silver ion and ethephon. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 31 (4): 83 - 90.
- 160 - Grasmick, M. E. and S. A. Slack. 1987. Detection of potato spindle tuber viroid in true potato seed by bioassay on Rutgers tomato. *AM. Potato J.* 64 (5): 236 - 244.
- 161 - Kryczynski, S. and E. Paduch - Cichal. 1987. A comparative study of four viroids. *J. Phytopathol.* (BERL) 120 (2): 121 - 129.
- 162 - Lopez - Herrera, C., F. Pliego and R. Flores. 1987. Detection of avocado Sunblotch viroid in Spain by double polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Phytopathol.* (BERL) 119 (2): 184 - 189.

- 163 - Morelli, L. T., P. E. Nelson and R. K. Horst. 1987. Histopathology of the Chrysanthemum cultivar Bonni Jean infected with Chrysanthemum Stunt Viroid. *Phytopathology* 77 (5): 655 - 660.
- 164 - Paduch - Cichal, E. and S. Kryczynski. 1987. A low temperature therapy and meristem - tip culture for eliminating four viroids from infected plants. *J. Phytopathol.* (BERL). 118 (4): 341 - 346.
- 165 - Pallas, V., A. Navarro and R. Flores. 1987. Isolation of a viroid - like RNA from hop different hop stunt viroid. *J. Gen Virol.* 68 (12) 3201 - 3206.
- 166 - Palukaitis, P. 1987. Potato spindle tuber viroid: Investigation of the longdistance, intraplant transport route. *Virology.* 158 (1): 239 - 241.
- 167 - ———, and M. Zaitlin. 1987. The nature and biological significance of linear potato spindle tuber viroid molecules. *Virology* 157 (1): 199 - 210.
- 168 - Pechan, R., H. Kuvert and H. J. Gross. 1987. Are small RNAs associated with Crohns' disease? *Z. Natur. Sect Bio Sci* 42 (7/8): 1000 - 1008.
- 169 - Schwingamer, M. W. and P. Broadbent. 1987. Association of viroids with a graft-transmissible dwarfing symptoms in Australian orange trees. *Phytopath.* 77 (2): 205 - 209.
- 170 - ———, ———, ———1987. Detection of viroids in dwarfed orange trees by transmission to chrysanthemum. *Phytopathol.* 77 (2): 210 - 215.
- 171 - Semancik, J. S., R. Rivera - Bustamante and A. C. Goheen. 1987. Widespread occurrence of viroid-like RNA species in grapevines. *AM. J. ENOL VITIC* 38 (1): 35 - 40.

- 172 - Singh, R. P. and A. Boucher. 1987. Electrophoretic separation of a severe from mild strains of potato spindle tuber viroid. *Phytopathol.* 77 (11): 1588 - 1590.
- 173 - Tsagris, M., M. Tabler and H. L. Saenger. 1987. Oligomeric potato spindle tuber viroid RNA does not process autocatalytically under conditions where other RNA species do. *Virology* 152 (1): 227 - 231.
- 174 - Weidemann, H. L. 1987. The distribution of potato spindle tuber viroid in potato plants and tubers. *Bull OEPP* 17 (1): 45 - 50.
- 175 - Zhou, Y. C. and D. Daming. 1987. A preliminary study on the cultivation of citrus exocortis viroid in the tissue culture of *Gynura aurantiaca*. *Chin J. Virol* 3 (3): 277 - 281.

#### أبحاث سنة ١٩٨٦

- 176 - Belles, J. M. *et al.* 1986. Antiviroid effects of ribavirin of citrus exocortis viroid infection in *Gynura aurantiaca*. *Physiol Mol Plant Pathol* 28 (1): 61 - 66.
- 177 - Conejero, V. and A. Granell. 1986. Stimulation of a viroid - like syndrome and the impairment of viroid infection *Gynura aurantiaca* plants by treatment with silver ions. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 29 (3): 317 - 324.
- 178 - Diener, T. O. 1986. Viroid processing: A model involving the central conserved region and hairpin I. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 (1): 58 - 62.
- 179 - Dinter, G. G. 1986. Viroids and virusoids are related to group I introns. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 (17) 6250 - 6254.
- 180 - Duran - Vila, N., R. Flores and J. S. Semancik. 1986. Characteriza-

- tion of viroid - like RNA associated with the citrus exocortis Syndrome. *Virology* 150 (1): 75 - 84.
- 181 - Flores, R. 1986. Detection of citrus exocortis viroid in crude extracts by dot-blot hybridization. *J. Virol Methods* 13 (2): 161 - 170.
- 182 - Grasmick, M. E. and S. A. Slack. 1986. Effect of potato spindle tuber viroid on sexual reproduction and viroid transmission in the true potato seed. *Can. J. Bot.* 64 (2) 336 - 340.
- 183 - Orozco, V. G. and J. G. Alonso. 1986. Ecology of tomato plant macho viroid. *Rev. Mex Fitopathol* 4 (1): 19 - 28.
- 183 - Rivera - Bustamante, R. F., R. Gin and J. S. Semancik. 1986. Enhanced resolution of circular and linear molecular forms of viroid and viroid - like RNA by electrophoresis in a discontinuous pH system. *Annl Biochem* 156 (1): 91 - 95.
- 184 - Schumacher, J., *et al.* 1986. Diagnostic procedure for detection of viroid and viruses with circular DNA by return - gel electrophoresis. *J. Phytopathol.* (Berl) 115 (4): 332 - 343.
- 185 - Sano, T. *et al.* 1986. A viroid resembling hop stunt viroid in grapevines from Europe, the USA and Japan. *J. Gen Virol* 67 (8): 1673 - 1678.
- 186 - Schwinghamer, M. W. and G. R. Scott. 1986. Survey of New South Wales potato crops for PSTVd. *Plant Dis.* 70 (8) 774 - 776.
- 187 - Semancik, J. S. 1986. Separation of viroid RNA by cellulose chromatography indicating conformational distinctions. *Virol.* 155 91): 39 - 45.
- 188 - Singh, R. P., D. Levesque and R. R. King. 1986. A rapid procedure for the purification of PSTV. *Can J. Plant Pathol.* 8 (1) 54 - 58.

- 189 - Visvader, J. E. and R. H. Symon. 1986. Replication of *in vitro* constructed viroid mutants. *Embo J.* 5 (9): 2051 - 2056.
- 190 - Wang, M. C. et al. 1986. Alternation in cell wall composition and structure in viroid - infected cells. *Physiol Mol. Plant Pathol.* 28 (1): 107 - 124.
- 191 - Yoshikawa, N. and T. Takahashi. 1986. Inhibition of hop stunt viroid replication by  $\alpha$ -amanitin. *Z. Pflanzenkr Pflanze Nschutz* 93 (1): 62 - 71.
- 192 - Zhang, Q. Y. et al. 1986. Synthesis of CEVd and CSVd and detection by the probes. *Virol Sin* 1 (4): 93 - 98.

#### أبحاث سنة ١٩٨٥

- 193 - Bar - Joseph, M., et al. 1985. Detection of avocado sunblotch viroid by hybridization with synthetic oligonucleotide probes. *J. Virol Methods* 10 (1) 69 - 74.
- 194 - Barker, J. M. et al. 1985. Dot-blot procedure with phosphorus-32 DNA probes for the sensitive detection of avocado sunblotch and other viroids in plants. *J. Virol Methods* 10 (2): 87 - 98.
- 195 - Flores, R. et al. 1985 - Detection of viroid and viroid - like RNA species from grapevine. *J. Gen Virol.* 66 (10): 2095 - 2102.
- 196 - Grasmick, M. E. and S. A. Slack. 1985. Symptom expression enhanced and low concentrations of Potato spindle tuber viroid amplified in tomato with high light intensity and temperature. *Plant Dis.*, 69 (1): 49 - 51.
- 197 - Imperial, J. S., R. M. Bautista and J. W. Randles. 1985. Transmission of the coconut cadang - cadang viroid to six species of palm by inoculation with nucleic acid extracts. *Plant Pathol (London)* 34 (3): 391 - 401.

- 198 - Kano, T. and A. Yamaguchi. 1985. Indexing for citrus exocortis viroid using herbaceous plants. *Bull Fruit Tree Stn Ser B* 12 (95 - 108).
- 199 - Keese, P. and R. H. Symons. 1985. Domains in viroids. Evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proc. Natl. Acad Sci USA* 82 (14): 4582 - 4586.
- 200 - Koganezawa, H. 1985. Transmission to apple seedlings of a low molecular weight RNA extracted from apple scar skin disease trees. *Ann. Phytopathol. Soc. JPN.* 51 (2): 176 - 182.
- 201 - Meshi, T. *et al.* 1985. The sequence necessary for the infectivity of hop stunt viroid complementary DNA clones. *Mol Gen Genet.* 200 (2): 199 - 206.
- 202 - Mohamed, N. A. *et al.* 1985. Purification and infectivity of the coconut cadang - cadang viroid. *Phytopathology*, 75 (1): 79 - 83.
- 203 - Sano, T. *et al.* 1985. A viroid - like RNA isolated from grapevine has high sequence homology with hop stunt viroid. *J. Gen Virol* 66 (2): 333 - 338.
- 204 - Schnoelzer, M. *et al.* 1985. Correlation between structure and pathogenicity of potato spindle tuber viroid. *EMBO J.* 4 (9): 2181 - 2190.
- 205 - Singh, R. P. and C. F. Crowley. 1985. Successful management of potato spindle tuber viroid in seed potato crop. *Can. Plant Dis Surv* 65 (1): 9 - 10.
- 206 - Takahashi, T. *et al.* 1985. Some characteristics in cytopathic changes induced by viroid infection. *J. Fac. Agric Iwate Univ.* 17 (3): 267 - 280.



- 207 - — , — and S. Yaguchi. 1985. Strategies for preventing mechanical transmission of hop stunt viroid. Chemical and heat inactivation on contaminated tools. *Z. Pflanzenk Pflanzenschutz* 92 (2): 132 - 137.
- 208 - Yoshizaki, T. *et al.* 1985. The effects of some chemical on the infectivity of cucumber isolate of hop stunt viroid. *Ann Phytopathol Soc. JPN* 51 (4): 405 - 412.
- 209 - Yaguchi, S. and T. Takahashi. 1985. Syndrome characteristics and endogenous IAA levels in cucumber plants incited by hop stunt viroid. *Z. Pflanzenk P.* 92 (3): 263 - 269.

#### أبحاث سنة ١٩٨٤

- 210 - Boiko, A. L., G. S. Litvinov and S. A. Romasher. 1984. Viroid causing stunt deformity of hop plants in biocenoses of the Ukrainian SSR. *D. A. N. U. S. S. B. G. K. B. N. 0* (11): 62 - 65.
- 211 - DA GRACA, J. V. and T. E. Mason. 1984. Detection of avocade sunblotch viroid in flower buds by polyacrylamide gel electrophoresis. *Phytopathol., Z.* 108 (3/4) : 262 - 266.
- 212 - Flores, R. 1984. Is the conformation of viroids involved in their pathogenicity. *J. Theor Biol* 108 (4): 519 - 528.
- 213 - Momma, T. and T. Takahashi. 1984. Development morphology of hop stunt - viroid infected hop plants and analysis of their cone yield. *Phytopatho. Z.* 110 91): 1 - 14.
- 214 - Mohamed, N. R. and J. S. Imperial. 1984. Detection and concentration of coconut cadang - cadang viroid in coconut leaf extracts. *Phytopathology* 74 (2): 164 - 169.

- 215 - Perez, R. *et al.* 1984. Exocortis viroid presence in clementine Mandarin grafted on Troyer. *Cent Agric* 11 (3): 65 - 72.
- 216 - Spiegel, S., M. Alper and R. N. Allen. 1984. Evaluation of biochemical methods for the diagnosis of the avocado sunblotch viroid in Israel. *Phytoparasitica* 12 (1): 37 - 44.
- 217 - Sano, T., I. Uyeda and E. Shikata. 1984. Comparative studies of hop stunt viroid and cucumber pale fruit viroid. *Ann. Phytopathol Soc. JPN* 50 (3): 339 - 345.
- 218 - Schumacher, J., J. W. Randles and D. Riesner. 1984. A 2 - dimensional electrophoretic technique for the detection of circular viroids and virusoids. *Annl Biochem.* 135 (2) : 288 - 295.
- 219 - Semancik, J. S. and Judy, Z. 1984. Enhanced detection of viroid - RNA after selective divalent cation fractionation. *Ann. Biochem.*, 135 (2): 275 - 279.
- 220 - Steger, G. *et al.* 1984. conformational transitions in viroids and virusoids *J. Biomol Struct Dyn* 2 (3): 543 - 572.
- 221 - Tabler, M. and H. Saenger. 1984. Cloned single - stranded and double - stranded DNA copies of PSTV RNA and coinoculated subgenomic DNA fragments are infectious. *Eur Mol Biol Organ J.* 3 (13): 3055 - 3062.
- 222 - Uyeda, I., T. Sano and E. Shikata. 1984. Purification of cucumber pale fruit viroid. *Rnn. Phytopathol. soc. JPN.* 50 : 331 - 338.
- 223 - Vasileva, T. Y. and K. A. Mozhaeva. 1984. Resistance of PSTVd to certain physical factors. *Biol Nauki (Mosco)* 0 (3): 15 - 21.

- 224 - Watermeyer, S. R. 1984. Detection of chrysanthemum stunt viroid in South Africa by PAGE and bioassay. *Plant Dis.* 68 (6): 485 - 488.
- 225 - Yaguchi, S. and T. Takahashi. 1984. Response of cucumber cultivars and other cucurbitaceous species to infection by hop stunt viroid. *Phytopathol. Z.* 109 (1) : 21 - 31.
- 226 - ———, and ——— 1984. Survival of hop stunt viroid in the hop garden. *Phytopathol. Z.* 109 (1) 32 - 44.

### أبحاث سنة ١٩٨٣

- 227 - Deloire, A., P. Mampouga and J. Robert. 1983. Studies of an incompatibility to grafting, produced in 2 species of citrus, with the aid of *in vitro* micrografts due to the presence in the scion of exocortis viroid. *Cr Seances Acad Sci Ser III Sci Vie* 297 (13) 621 - 626.
- 228 - Kiefr, M. C., R. A. Owens and T. O. Diener. 1983. Structural similarities between viroids and transposable genetic elements. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 80 (20) 6234 - 6238.
- 229 - Larosa, A. *et al.* 1983. Chrysanthemum stunt viroid in Italy. *Riv. Patho Veg* 19 (2): 77 - 84.
- 230 - Momma, T. and T. Takahashi. 1983. Cytopathology of shoot apical meristem of hop plants infected with hop stunt viroid. *Phytopathol. Z.* 106 (3) : 272 - 280.
- 231 - Muehlbach, H., O. Faustmann and H. L. Saenger. 1983. Conditions for optimal growth of PSTVd infected potato cell suspension and detection of viroid - complementary longer - than - unit - length RNA in these cells. *Plant Mol Biol* 2 (5): 239 - 248.

- 232 - Riesner, D. M. *et al.* 1983. Dynamics and interactions of viroids. *J. Biomol Struct Dyn* 1 (3) 669 - 688.
- 233 - Rosner, A. S., M. Alper and M. Bar Joseph. 1983. Detection of avocado sunblotch viroid - *Plant Mol. Biol* 2 (1): 15 - 18.
- 234 - Schumacher, J., H. L. Saenger and D. Riesner. 1983. Subcellular localization of viroids in highly purified nucleic acid from tomato leaf tissue. *EMBO J.* 2 (9): 1549 - 1556.
- 235 - Spiesmacher, E. *et al.* 1983. Oligomeric forms of PSTVd and of its complementary RNA *Bio Sci Rep* 3 (8): 767 - 774.
- 236 - Takahashi, T., M. Takada and N. Yoshikawa. 1983. Comparative indexing of hop plants for hop stunt viroid infection. *J. Fac. Agri Iwate Univ.* 16 (3): 141 - 150.

### أبحاث سنة ١٩٨٢

- 237 - Branch, A. *et al.* 1982. Cell-Free circularization of viroid progeny RNA by an RNA ligase from wheat germ. *Science* 217 : 1147 - 1149.
- 238 - Flores, R. and J. S. Semancik. 1982. Properties of a cell-free system for synthesis of citrus exocortis viroid. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 79 (20): 6285 - 6288.
- 239 - Galindo, A., J. D. R. Smith and T. O. Diener. 1982. Etiology of Planta Macho aviroid disease of tomato. *Phytopathol.* 72 (1) 49 - 54.
- 240 - Gross, H. J. *et al.* 1982. Nucleotide sequence and secondary structure of CEVd and CSVd. *Eur J. Biochem.* 121 (2): 249 - 258.
- 241 - Haseloff, J. *et al.* 1982. Viroid RNA of cadang - cadang disease of coconut. *Nature* (London) 229 (2881). 316 - 321.

- 242 - Momma, T. and T. Takahashi. 1982. Ultrastructural of hop stunt viroid - infected leaf tissue. *Phytopath. Z.* 104 (3): 211 - 221.
- 243 - Mohammed A. R. *et al.* 1982. Characterization of the different electrophoretic forms of the cadang - cadang Viroid. *J. Gen. Virol.* 63 (1): 181 - 188.
- 244 - Mosch, W. H. *et al.* 1982. Development of a standered method for detection of PSTVd in potato plants. *NETH J PLANT PATHOL.* 88 (3): 113 - 122.
- 245 - Naddi, Z. E. *et al.* 1982. Studies of the viroid of exocortis diseases in citrus plants. *Izv. Timiryazen S-KH AKAD O* (4): 187 - 189.
- 246 - Ohno, T. *et al.* 1982. purification and characterization of hop stunt viroid. *Virology.* 118 (1): 54 - 63.
- 247 - Owens, R. A and T. O. Diener. 1982. RNA intermediates in PSTVd replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 79 (1): 113 - 117.
- 248 - Rohde, W. 1982. Affinity chromatography of viroid RNA. *Arch Virol* 71 (2): 169 - 176.
- 249 - Yoshikawa, N. and T. Takahashi. 1982. Purification of hop stunt viroid. *Ann Phytopathol Soc. JPN* 48 (2): 182 - 191.
- 250 - Zelcer, A. *et al.* 1982. PSTVd infected tissues contain RNA complementary to the entire viroid. *J Gen Virol* 59 (1): 139 - 148.
- 251 - Zelazny, B. and E. Pacumbaba. 1982. Incidence of cadang - cadang disease of coconut palm in Philippins. *Plant Dis* 66 (7): 547 - 549.

#### أبحاث سنة ١٩٨١

- 252 - Boccardo, G. *et al.* 1981. Tinangaja and bristle top coconut disease of uncertain etiology in Guam. *Phytopathology* 71 (10): 1104 - 1107.

- 253 - DA GRACA, J. V. and M. M. Martin. 1981. Ultrastructural changes in avocado leaf tissue infected with avocado sunblotch viroid. *Phytopathol Z* 102 (3/4): 185 - 194.
- 254 - Diener, T. O. 1981. Viroids: Minimal biological system: *Biosciences* 31 (1): 38 - 44.
- 255 - Dickson, E. 1981. A model for the involvement of viroids in RNA splicing. *Virology* 115 (1): 216 - 221.
- 256 - Klotz, G. and H. L. Saenger. 1981. Electron microscopic evidence for viroid conformers. *Eur J. Cell Biol.* 25 (1): 5 - 7.
- 257 - Imperial, J. *et al.* 1981. Variation in the viroid - like RNA associated with cadang - cadang disease. *J. Gen Virol.* 56 (1): 77 - 86.
- 258 - Owens, R. and T. O. Diener. 1981. Sensitive and rapid diagnosis of PSTVd disease by nucleic acid hybridization. *Science* (Wash - Dc) 213 (4508) : 670 - 672.
- 259 - Palukaitis, P. *et al.* 1981. Rapid indexing of the sunblotch disease of avocado using a complementary DNA probe to avocado sunblotch viroid. *Ann Appl Biol:* 98 (3): 439 - 450.
- 260 - Sano, T., M. Sasaki and E. Shikata. 1981. Comparative studies on hop stunt viroid, cucumber pale fruit viroid and PSTVd. *Ann. Phytopathol. Soc. JAP.* 47 (5) 599 - 605.
- 261 - Walter, B. 1981. A viroid on tomato in west Africa. Identity with PSTVd. *CR Seances Acad Sci Ser III Sci* 292 (8): 537 - 542.

### أبحاث سنة ١٩٨٠ وما قبلها

- 262 - Hari, V. 1980. Ultrastructure of potato spindle tuber viroid-infected tomato leaf tissue. *Phytopathology.* 70 (5): 385 - 387.

- 263 - Harris, P. S. and I. A. Browning. 1980. The effects of temperature and light on the symptom expression and viroid concentration in tomato of a severe strain of PSTVd. *Potato Res.* 23 (1): 85 - 94.
- 264 - Mohamed, N. A. and W. Tomas. 1980. Viroid - like properties of an RNA species associated with the sunblotch disease of avocado. *J. Gen Virol.* 46 : 157 - 168.
- 265 - Palukaitis, P. and R. H. Symons. 1980. Purification and characterization of the circular and linear forms of chrysanthemum stunt viroid. *J. Gen Virol* 46 (2) 477 - 490.
- 266 - Semancik, J. S. and P. R. Desjardins. 1980. Multiple small RNA species and the viroid hypothesis for the sunblotch disease of avocado. *Virology.* 104 (1): 117 - 121.
- 267 - Silvergate, A. F. *et al.* 1980. Reduction of pith maceration by *Erwinia chrysanthemi* in chrysanthemum cuttings infected with CSVd. *Phytopathol.* 70 (2): 135 - 139.
- 268 - Takahashi, T. and H. Takusari. 1980. Some factors affecting mechanical transmission of hop stunt disease agent. *Phytopathol. Z.* 96 (4): 352 - 360.
- 269 - Velasco, J. R., A. S. Lansangan and E. Canapi. 1980. Island, Philippines: observations on coconut cadang - cadang. *Philipp. J coconut Stud.* 5 (1): 11 - 16.
- 270 - Wahn, K. F. and H. L. Saenger. 1980. Cytopathic changes in leaf tissue of *Gynura aurantiacae* infected with the viroid of citrus exocortis. *J. Gen Virol* 49 (2): 355 - 366.
- 271 - Palukaitis, P. *et al.* 1979. characterization of a viroid associated with avocado sunblotch disease. *Virology* 99 (1) : 145 - 151.

- 272 - — , —1979. Hybridization analysis of chrysanthemum stunt viroid with complementary DNA and the quantitation of viroid RNA sequences in extracts of infected plants *Virology* 98 (1): 238 - 245.
- 273 - Riesner, D. *et al.* 1979. Structure and structure formation of viroids. *J. Mol Biol.* 133 (1) 85 - 116.
- 274 - Niblett, C. L. *et al.* 1978. Cross protection among four viroids. *Virology* 91 (1): 198 - 203.
- 275 - Sasaki, M. and E. Shikata. 1978. Studies on hop stunt disease : 2 properties of the causal agent, a viroid. *Rep Res Lab Kirin Brew Co LTD.* 0 (21): 41 - 48.
- 276 - ———— 1978. Studies on hop stunt disease : 2 properties of a viroid. *Ann Phytopathol Soc. JPN.* 44 (5): 570 - 577.
- 277 - Schumann, G. L. *et al.* 1978. Comparison of tomato bioassay and slab gel electrophoresis for detection of PSTVd in potato. *Phytopathol.* 68 (9): 1256 - 1259.
- 278 - Semancik, J. S., L. K. Grill and E. L. Civerolo. 1978. Accumulation of viroid RNA in tumor cell after double infection by *A. tumefaciens* and citrus exocortis viroid. *Phytopath.* 68 (9): 1288 - 1292.
- 279 - Singh, R. P. and R. E. Williams. 1978. PSTVd: Circular dichroism spectrum and physical chemical studies of its interaction with ethidium bromide. *Can J. Biochem* 56 (10) : 934 - 938.



رقم الإيداع  
١٩٩٦ / ٥٥٧٥