تتواجد بصورة طبيعية – كذلك – فى أنواع فطرية أو بكتيرية أخرى. ويمكن التغلب على تلك المشكلة باستخدام ببتيدات نقية. أو بإنتاج monoclonal antibodies.

٢ – الـ monoclonal antibodies:

تتميز الـ monoclonal antibodies بأنها تكون خاصة بأجسام مضادة معينة. ولقد أمكن إنتاجها لعدد من الفيروسات والفيتوبلازما والأنواع البكتيرية والفطرية. ولكن إنتاجها مكلف.

ولمزيد من التفاصيل عن تلك الطرق وغيرها من الطرق الأحدث والأكثر تقدمًا .. يراجع Dickinson (٢٠٠٣).

تحديد هوية الفيروسات المسببة للأمراض النباتية

يعتمد تقسيم الفيروسات على عشرات الخصائص الفيروسية التى تتعلق بالمظهر العام للفيروسات وخصائصها الفيزيائية. وخصائص الأحماض النووية والبروتينات والدهون والمواد الكربوهيدراتية (إن وجدت أيًا من الدهون والمواد الكربوهيدراتية بالفيرس)، وتنظيم الجينوم وانقسامه، والخصائص الأنتيجينية والبيولوجية. وكما فى الكائنات الحية تُقَسَّم الفيروسات إلى رتب، وعائلات، وأجناس، وأنواع تشترك كل منها فى خصائص معينة. ويعطى Hull (٢٠٠٢) بيانًا مفصلاً بالخصائص التى يُبنى عليها تقسيم الفيروسيات، وبالعائلات الفيروسية والأجناس التى تتبع كل منها وخصائصها. والفيرس الممثل لكل جنس منها.

ويلزم عند تحديد هوية الفيروسات المسببة للأمراض النباتية التفريق بين السلالات المختلفة لنفس الفيرس، وبين الفيروسات المختلفة التى تنتمى لنفس مجموعة الفيروسات. والفيروسات المختلفة كلية عن بعضها البعض، كما يلى:

أولاً: تختلف الفيروسات غير القريبة Unrelated عن بعضها فى صفة أو أكثر من الصفات الثابتة وراثيًا، مثل:

١ – نوع الحامض النووى وخصائصه.

٢ – حجم جزيئاته، وشكلها، ومدى تساوقها.

٣ – حجم وعدد البولى ببتيدات فى جزىء الفيرس.

٤ – قدرة الجزيئات على التفاعل مع مضادات السيرم لجزيئات الفيروسات الأخرى.

٥ – نوع الأعراض المرضية التى تحدثها فى عوائلها.

٦ – المجموعة التى تنتمى إليها الكائنات الناقلة له.

٧ – طبيعة العلاقة بين الفيرس والكائن أو الكائنات الناقلة له.

ثانيًا: تشترك الفيروسات التى تنتمى إلى نفس المجموعة الفيروسية فى خاصية أو أكثر من الخصائص السابقة، ولكنها قد تتميز بما يلى:

١ – الاختلاف فى بنية الغلاف البروتينى من الأحماض الأمينية بالقدر الذى يجعل لكل فيرس خصائص سيرولوجية، وإليكتروفوريتية electrophoretic (الحركة فى المجال الكهربائى) تميزه عن غيره من الفيروسات.

٢ – يكون لها أنواع مختلفة من الكائنات الناقلة لها، ولكنها تكون قريبة من بعضها.

٣ – تختلف فى مدى عوائلها وشدة الأعراض التى تحدث بها، ولكنها تتشابه فى نوع الأعراض المرضية التى تحدثها.

ثالثاً: تتشابه سلالات الفيرس الواحد فى معظم الخصائص، ولكنها غالبًا:

١ – تختلف قليلاً فى بنية الغلاف البروتينى من الأحماض الأمينية، ولذا .. فإنها تختلف قليلاً فى خصائصها السيرولوجية والإليكتروفوريتية.

٢ – تختلف فى نوع species الكائن الناقل لها، أو فى مدى سهولة انتقالها به.

٣ – تحدث أعراضًا تختلف فى شدتها (Gibbs & Harrison ١٩٧٦).

يستدل على هوية الفيروسات النباتية بعديد من الشواهد والاختبارات. ويستفاد من بعض هذه الاختبارات فى دراسات التربية لمقاومة هذه الفيروسات، ولذا .. فإننا نذكر – فيما يلى – بعضًا من هذه الطرق، لتكون دليلاً للمربى فى هذا المجال.

أولاً: أعراض الإصابات الفيروسية

برغم أنه لا يمكن الاعتماد كلية على أعراض الإصابة فى تحديد هوية الفيروسات المسببة للأمراض النباتية، إلا أنها تعد مرشدًا هامًا فى هذا الشأن يمكن أن يوجه الباحث نحو الاتجاه الصحيح من حيث كون الإصابة فيروسية، أم غير فيروسية. ومن حيث حصرها فى مجموعة فيروسات معينة تتشابه من حيث الأعراض التى تُحدثها للنباتات.

ويجب أن يراعى أن نفس الأعراض المشاهدة يمكن أن تحدثها الإصابة بفيروسات مختلفة، كما أن الفيرس الواحد يمكن أن يحدث مدى من الأعراض، ويتوقف ذلك على التركيب الوراثى للعائل والظروف البيئية. هذا .. ولا يستدل - بالضرورة - من اختفاء الأعراض على عدم وجود إصابات فيروسية، فقد تكون الإصابة كامنة أو مستترة latent. ونتناول - فيما يلى - أعراض الإصابات الفيروسية بشئ من التفصيل.

١ - المظهر العام للإصابة

يتباين المظهر العام للنباتات المصابة بالفيروسات، فقد تأخذ الأعراض مظهر تغيرات فى اللون، أو تقزم Dwarfing، أو توقف عن النمو Stunting. أو تورد Rosetting (نتيجة لقصر السلاميات، مما يجعل الأوراق متقاربة من بعضها. كما تتقارب بتلات الوردة)، أو شكل المكنسة Witches' Broom (نتيجة لزيادة التبرعم. والتفرع مع التقزم وقصر السلاميات). أو التدهور Decline (نتيجة لفقد قوة النمو) الذى قد يشمل النبات كله. أو أجزاء منه.

٢ - الانحرافات فى اللون

أ - الأوراق:

(١) تغيرات اللون المتجانسة التوزيع:

قد تكون تغيرات اللون متجانسة التوزيع على كل سطح الورقة، ويتضمن ذلك: اللون الأخضر الباهت chlorosis، واللون الأبيض bleaching، والاصفرار yellowing. والاحمرار reddening؛ بتكوين صبغة الأنثوسيانين، (وهو ما قد يختلط بأعراض نقص

نعناص)، والتلون البنى browning والأسود blackening؛ بتكوين مركبات الميلانين القاتمة اللون، والتلون البرونزى bronzing؛ نتيجة لتحلل وانهيار خلايا البشرة مع بقاء النسيج الوسطى سليمًا (وهو ما قد يختلط بأعراض الإصابة بالعنكبوت الأحمر).

(٢) تغيرات اللون غير المتجانسة التوزيع:

قد تكون تغيرات اللون غير متجانسة التوزيع، ويتضمن ذلك ما يلى:

(أ) الموزايك Mosaic:

يتميز الموزايك بظهور مناطق خضراء باهتة اللون، أو صفراء متبادلة على سطح الورقة مع مناطق خضراء. تكون هذه المناطق ذات زوايا، حيث تحدها العروق الصغيرة التى توجد بالورقة.

(ب) التبرقش Mottling:

تكون المناطق المختلفة فى اللون متبادلة مع المناطق الطبيعية اللون كما فى الموزايك، إلا أنها تكون متداخلة مع بعضها، وذات حواف دائرية.

(جـ) البقع الموضعية Local Lesions:

تتراوح البقع الموضعية فى المساحة من بقع صغيرة مثل سن الدبوس pin-point إلى مساحات كبيرة غير منتظمة الشكل. وتكون هذه البقع صفراء، أو متحللة.

(د) البقع الحلقية Ringspots:

قد تكون الحلقات مفردة، أو عديدة ومتتابعة حول مركز واحد للبقعة Concentric، وتشمل أنسجة صفراء أو متحللة يفصل بينها نسيج سليم.

(هـ) التخطيط Streaking:

يظهر التخطيط على شكل مناطق صفراء طويلة ذات حدود واضحة.

(٣) تغيرات اللون المتجانسة التوزيع على أجزاء معينة من الورقة .. ويتضمن ذلك ما يلى:

(أ) اصفرار العروق Vein Yellowing:

يظهر اللون الأصفر على العروق نتيجة لغياب الكلوروفيل مع بروز لون الكاروتينات والزانثوفيللات.

(ب) شفافية العروق Vein Clearing:

تبدو العروق نصف شفافة Translucent.

(جـ) تحوط العروق Vein Banding:

تبدو العروق محاطة بمناطق مختلفة اللون عن بقية نصل الورقة.

(د) تحلل العروق Vein Necrosis:

يكون ذلك مصاحبًا بموت النسيج الوعائى فى الورقة وتحلله واكتسابه لونًا بنيًا.

ب - الأزهار:

إن من أهم التغيرات فى لون الأزهار ما يلى:

(١) تحول الأجزاء الزهرية إلى أوراق خضرية Phylloidy:

(٢) انحرافات فى لون بتلات الزهرة بزيادة شدة اللون، أو ضعفه، أو حدوث تغير فى الصبغات التى توجد فى طبقة البشرة فى بتلات الزهرة.

(٣) تغير فجائى Breaking، يكون عادة على صورة نقط، أو خطوط، أو أجزاء من نسيج متغير اللون، وهى أعراض قد تختلط مع التغيرات الوراثية.

(٤) الاخضرار العام للبتلات Verescence.

جـ - الثمار:

قد تشمل التغيرات فى لون الثمار كل الثمرة، أو أجزاء منها، وتكون هذه التغيرات على شكل تعريق (مثل الرخام) Marbling، أو تبرقش، أو تبقع Spotting.

د - الجذور:

قد تكون التغيرات فى لون الجذور على شكل بقع، أو تحلل.

٢ - التشوهات Malformations

قد تشمل التشوهات أيًا من الأجزاء النباتية كما يلى:

أ - الأوراق:

قد تظهر تشوهات الأوراق على إحدى الصور التالية:

(١) تحرف أو تشوه Distortion .. مثل التغضن Crinkling، والالتفاف Curling، والالتواء Twisting.

(٢) الانحناء لأسفل Epinasty.

(٣) ضيق نصل الورقة Narrowing مع بقاء نمو العروق طبيعيًا تقريبًا.

(٤) صغر الحجم.

(٥) زيادة السمك .. وقد يشمل ذلك كل نصل الورقة، أو أجزاء منه، أو يقتصر على العروق.

(٦) تكوّن بروزات على نصل الورقة Enation يترتب عليها غالبًا التفافها.

ب – الأزهار .. تحدث بها أنواع مختلفة من التشوهات، وقد تظهر أجزاء زهرية غير طبيعية.

جـ – الثمار .. تتكون ثمار مشوهة وذات أشكال غير منتظمة، كما قد تتكون تورمات سرطانية، وقد تفشل البذور فى إكمال تكوينها.

د – السيقان .. تحدث بها تشوهات، وقد تقصر السلاميات.

هـ – الجذور .. قد تتحلل، أو تموت من القمة نحو القاعدة dieback، وقد تتكون بها أورام سرطانية.

٤ - أعراض أخرى

تشمل الأعراض الأخرى للإصابات الفيروسية: الذبول وسقوط الأوراق Defoliation، والسقوط المبكر للأوراق، والانحراف عن العدد الطبيعى للأزهار، والإزهار المبكر أو المتأخر عن الموعد الطبيعى، وظهور طعم غير طبيعى للثمار، وتكوين إفرازات غير طبيعية، والتصمغ gummosis، وحرشفة القلف Bark Scalling، وتكوّن النقر بالخشب Wood Pitting، وتورم النموات الخضرية، وعدم توافق الطعوم Graft Incompatibility.

٥ - احتجاب الأعراض Masking of Symptoms

لا تظهر أية أعراض للإصابة بالفيروسات – تحت بعض الظروف – بالرغم من وجود الفيرس فى النبات، وهى الحالة التى تعرف باسم الإصابة الكامنة Latent Infection، وترجع إلى عوامل خاصة كدرجة الحرارة، والضوء، ونقص أو زيادة العناصر الغذائية.

٦ - تحمل الإصابة Tolerance

تظهر حالة تحمل الإصابة عندما لا تظهر أية أعراض مرضية على النبات بالرغم من حمله للفيرس. وهى ترجع إلى التركيب الوراثى للعائل.

٧ - العوامل المسببة لأعراض شبيهة بأعراض الإصابات الفيروسية

من أهم هذه العوامل الطفرات التى تتسبب فى ظهور نموات غير طبيعية، ونقص العناصر، وأضرار مبيدات الحشائش. وأضرار الإصابات الحشرية والأكاروسية، وأضرار ملوثات الهواء الجوى.

وتتميز جميع هذه الحالات بأن أعراضها لا تنتقل خلال التطعيم. أو مع العصير الخلوى.

ثانياً: تحديد الخصائص الطبيعية للفيرس

من أهم الخصائص الطبيعية التى تفيد فى التعرف على هوية الفيرس ما يلى:

١ — درجة الحرارة المثبطة للفيرس Thermal Inactivation Point:

تعرف درجة الحرارة المثبطة للفيرس بأنها الدرجة التى تلزم لتثبيط نشاط الفيرس — فى العصير الخلوى — تمامًا خلال فترة تعرض للحرارة مقدارها عشر دقائق.

ولإجراء اختبار درجة الحرارة المثبطة للفيرس .. يتم تحضير العصير الخلوى للنبات المصاب بالفيرس فى محلول منظم مناسب، ثم ترشيحه، وإضافة ملليلترين من الراشح إلى كل واحد من ثمانى أنابيب خاصة ذات غطاء بـ "قلاووظ". توضع هذه الأنابيب فى حمامات مائية ذات حرارة تتراوح من ٣٠–١٠٠°م بفارق ١٠°م بينها. تترك الأنابيب فى الحمامات المائية لمدة ١٠ دقائق، ثم تخفض حرارتها بسرعة، بتعريضها لتيار من الماء البارد. ويلى ذلك اختبار فاعلية الفيرس بعد المعاملة باستخدامه فى عدوى نباتات قابلة للإصابة، ويفضل أن تكون النباتات من التى يُحدث فيها الفيرس بقعًا موضعية.

تلاحظ النباتات المختبرة لمدة أربعة أيام إلى ثلاثة أسابيع، على ضوء النتائج .. يحدد المجال الحرارى الذى يحدث عنده التثبيط (مثلاً من ٦٠- ٧٠°م). ولتحديد درجة

الحرارة التى يحدث عندها التثبيط .. يكرر الاختبار السابق مع استخدام حمامات مائية ذات درجات حرارة تتراوح بين ٥٩ و ٧١°م بفارق ثلاث درجات، حيث تكون درجة الحرارة المثبطة للفيرس هى أقل درجة حرارة لا يصاحبها ظهور أية أعراض للإصابة بالفيرس.

ويقدر معامل التثبيط الحرارى Thermal Inactivation Coefficient للفيرس – فى الحالات التى يُحدث فيها الفيرس بقعًا موضعية على النباتات المختبرة – كما يلى:

$$Q_t = (C_o - C_T) / (C_o - C_{T-t})$$

حيث إن:

Q_t = معامل التثبيط الحرارى الذى يرتبط بفرق فى درجة الحرارة قدره t.

C_o = التركيز الأصلى للفيرس (عدد البقع الموضعية التى يحدثها العصير الخلوى غير المعامل حراريًّا).

C_T = تركيز الفيرس بعد معاملته حراريًّا عند درجة حرارة T.

C_{T-t} = تركيز الفيرس بعد معاملته حراريًّا عند درجة حرارة مقدرها (T-t).

وتكون قيمة t عادة ١٠ درجات مئوية. كما تكون قيمة Q_t أكثر دقة كلما كانت T أقل قليلاً من درجة التثبيط الحرارى.

٢ – فترة احتفاظ الفيرس – وهو خارج العائل – بقدرته على إحداث الإصابة Longevity *in Vitro*:

تعرف هذه الفترة بأنها المدة التى يظل معها الفيرس – المحمول فى العصير الخلوى المستخلص من النبات المصاب – قادرًا على إحداث الإصابة، مع حفظ العصير الخلوى خلال تلك الفترة فى درجة حرارة الغرفة (٢٠–٢٢°م).

وتقدر تلك الفترة بتحضير عصير خلوى رائق (مرشح) لنبات مصاب، ويضاف إليه ٠,٠١٪ استربتوميسين، أو أوريوميسين Aureomycin لمنع أى تلوث بكتيرى، ويلى ذلك وضع العصير المعامل فى أنابيب ذات غطاء بـ "قلاووظ" بمعدل ملليلترين من

العصير بكل أنبوبة. ويستخدم العصير المخزن بهذه الطريقة فى عدوى عائل مناسب. ويفضل أن يكون من العوائل التى يحدث فيها الفيرس بقعًا موضعية.

يجرى اختبار فاعلية الفيرس بعد ١، و٣، و ٦، و ٩، و ١٢، و ١٥، و ٣٠، و ٦٠، و ٩٠، و ١٥٠ يومًا من التخزين. وإذا اتضح أن مدة احتفاظ الفيرس بفاعليته تقع بين فترتين متباعدتين (مثل بين ١٥، و ٣٠، أو بين ٣٠، و ٦٠ يومًا) .. لزم إعادة الاختبار. مع قصر معاملات التخزين فى حدود الفترتين اللتين دل عليها الاختبار الأول. واختبار فاعلية الفيرس كل ٢-٥ أيام.

وإذا أجرى هذا الاختبار على فيرس يُحدث بقعًا موضعية على عوائل دالة indicator hosts، فإنه يمكن تقدير "فترة نصف الحياة" Half Life time – وهى الفترة التى تفقد فيها عشيرة متجانسة من الفيرس نصف نشاطها – حسب المعادلة التالية:

$$t_{1/2} = (T \log 2) / (\log P_o - \log P_1)$$

حيث إن:

$t_{1/2}$ = فترة نصف الحياة.

P_o = نشاط العشيرة الأصلية (العصير الخلوى المستخلص قبل تخزينه).

P_1 = نشاط العشيرة بعد مرور فترة مقدارها T.

T = فترة المعاملة.

٣ – نقطة التخفيف النهائى Dilution End Point:

تعرف نقطة التخفيف النهائى بأنها أقصى تخفيف ممكن للعصير الخلوى للنبات لمصاب يسمح باستمرار احتفاظه بالقدرة على إحداث الإصابة بالفيرس.

وتقدر نقطة التخفيف النهائى بسحق أوراق نبات مصاب (فى هاون صينى) مع كمية قليلة من محلول منظم buffer مناسب، ثم تحضير سلسلة من التخفيفات من العصير الخلوى تتراوح من 10^{-1} إلى 10^{-8} بفارق 10^{-1}. يحضر كل تخفيف برج التخفيف السابق له جيدًا. ثم يؤخذ منه ملليلتر واحد ويخفف بـ ٩ مل من المحلول المنظم. تستخدم هذه المستويات من العصير الخلوى الأصلى والمخفف فى عدوى عائل مناسب. ويفضل أن يكون

من العوائل التى يُحدِث فيها بقعًا موضعية. وبناء على نتيجة الاختبار .. يحدد أقصى تخفيف يستمر معه الفيرس فى إحداث الإصابة.

هذا .. ولم يعد مقبولاً الاعتماد على تلك الطرق بصورة مطلقة بسبب التباينات الكثيرة التى تصاحبها.

ثالثاً: اختبارات الصفات الكيميائية والفيزيائية للفيرس

تعتمد اختبارات الصفات الكيميائية والفيزيائية على خصائص محددة، ومن أمثلتها ما يلى:

١ – معامل الترسيب sedimentation coefficient ومعامل الانتشار diffusion coefficient.

٢ – النطاق الطيفى لامتصاص الأشعة فوق البنفسجية **ultraviolet** absorption spectrum.

٣ – خصائص حركة الانتقال فى الحقل الكهربائى **electrophoretic** mobility.

٤ – الطرد المركزى الفائق ultracentrifugation:

لكل فيرس خصائص مميزة له تتعلق بعملية الطرد المركزى الفائق.

٥ – الفحص بالمجهر الإليكترونى لأجل تحديد حجم الفيرس وشكله (عن **Hull** ٢٠٠٢).

يُتعرف على حجم الفيرس وشكله بواسطة الميكروسكوب الإليكترونى، ويستخدم لذلك تحضيرات نقية، أو شبه نقية semi-purified من الفيرس، الأمر الذى يتطلب عدة دورات من الطرد المركزى السريع والبطئ، يعقبها طرد مركزى يعتمد على الكثافة Centrifugation Density. ويمكن كذلك إجراء الفحص باستخدام العصير الخلوى للنبات. وللتفاصيل الخاصة بهذه الطريقة .. يراجع Green (١٩٨٤).

رابعاً: الطرق التى تتضمن الأنشطة البيولوجية للفيرس

إن من أهم طرق الفحص والتحاليل التى تتضمن الأنشطة البيولوجية للفيرس، ما يلى:

١ – اختبارات العدوى أو القدرة على الإصابة :

من بين اختبارات العدوى أو القدرة على الإصابة infectivity assays، ما يلى :

أ – الاختبار الكمى المعتمد على البقع المحلية Quantitative assay based on local lesions.

يتعين – فيما يتعلق باختبار البقع المحلية – أن يؤخذ فى الاعتبار، ما يلى:

(١) توجد تباينات كبيرة بين أوراق النوع النباتى الواحد فى عدد البقع المحلية التى يمكن أن تظهر عليها، بسبب أمور كثيرة، مثل: عمر النبات، وعمر الورقة، والحالة الغذائية للنبات، ودرجة الحرارة السابقة للحقن والتالية لها، وشدة الإضاءة السابقة للحقن والتالية لها، وفصول السنة التى يُجرى فيها الحقن، والوقت من النهار عند إجراء الحقن.

وفى كل الحالات، فإن التباينات فى عدد البقع المحلية المتكونة تكون أقل بين النصفين المتقابلين للورقة الواحدة عما بين الأوراق المختلفة.

(٢) توجد خصائص مميزة للمنحنى الذى يعبر عن العلاقة بين تركيز اللقاح الفيروسى وعدد البقع المحلية المتكونة، كما يلى (شكل ٢–٤):

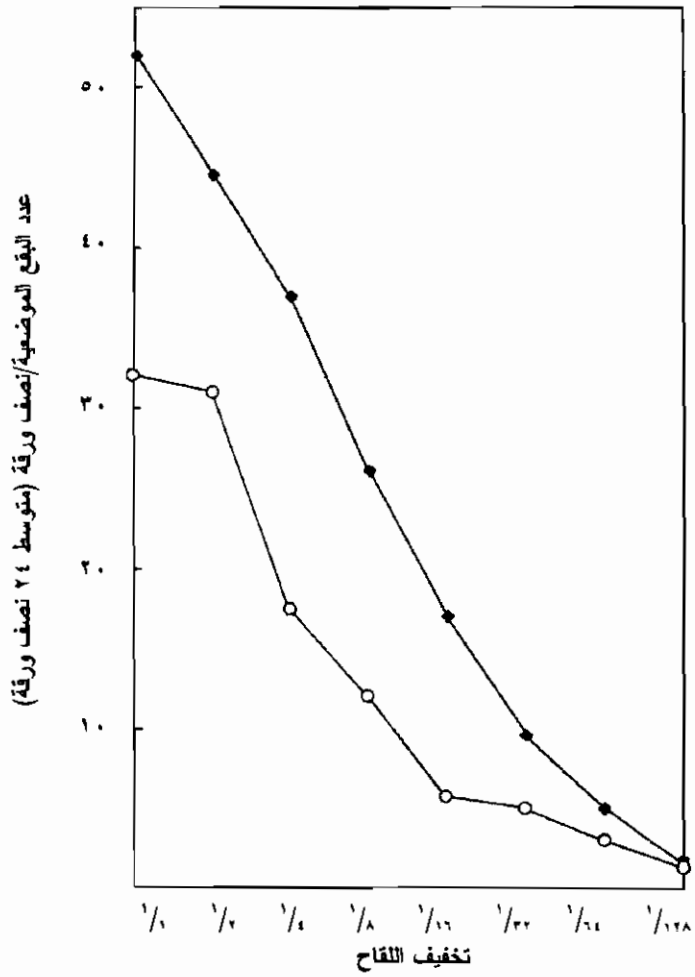
(أ) عندما يكون تركيز الفيرس عاليًا لا يؤدى التخفيف البسيط إلى إحداث تغيرًا يذكر فى عدد البقع المحلية المتكونة.

(ب) فى وسط المنحنى يترتب على تخفيف تركيز الفيرس انخفاضًا مقابلاً فى عدد البقع المحلية.

(جـ) وعندما يكون تركيز الفيرس شديد الانخفاض لا يترتب على التخفيف الإضافى للقاح الفيروسى تغيرًا إضافيًا يذكر فى عدد البقع المحلية المتكونة.

(٣) العلاقة بين عدد البقع المحلية وتركيز جزيئات الفيرس القادرة على إحداث الإصابة :

حتى مع أخذ التباينات من ورقة لأخرى فى الاعتبار. ومع الالتزام بمنتصف منحنى التخفيف. فإن عدد البقع المتكونة لا يمكن ترجمته – مباشرة – إلى جزيئات فيروسية قادرة على إحداث الإصابة infective virus content.



شكل (٢-٤): منحنى العلاقة بين شدة تخفيف اللقاح الفيروسى وعدد البقع المحلية المتكونة المنتجة بواسطة فيروسين: المنحنى (■) لفيرس **Tobacco bushy stunt (TBSV)** فى *Nicotiana glutinosa*، والمنحنى (o) لفيرس موزايك التبغ **Tobacco mosaic (TMV)** فى *N. glutinosa* (عن **Hull ٢٠٠٢**).

ب - الاختبارات التى تعتمد على النسبة المئوية للنباتات المصابة:

تُجرى الاختبارات التى تعتمد على النسبة المئوية للنباتات المصابة - لدى الحقن بالفيرس - حينما لا يوجد عائل يُحدث به الفيرس المعنى إصابات موضعية. وكذلك فى حالات نقل الفيرس بالنواقل vectors المختلفة.

٢ – استعمال العوائل الدالة indicator hosts فى التعرف على الفيرس:

تعطى العوائل الدالة أعراضًا واضحة ومحددة ومميزة لدى عدواها بالفيرس المعنى، ويتعين البحث عن تلك العوائل – لكل فيرس – بين مختلف الأنواع والأصناف النباتية، وحتى بين سلالات الصنف الواحد. وغالبًا ما تجرى الاختبارات فى الصوبات الزجاجية. وتتوفر قوائم بالعوائل الدالة لكثير من الفيروسات النباتية الهامة.

٣ – الاعتماد على مدى العوائل فى التعرف على الفيرس:

كان مدى العوائل host range من أوائل الدلائل التى اعُتمد عليها فى التعرف على الفيروسات، ومازال له أهمية فى بعض الحالات، ولكن يتعين أن تؤخذ بعض الأمور فى الاعتبار حتى لا نتوصل من هذا الاختبار إلى نتائج مضللة، كما يلى:

أ – الحالات التى تُصاب فيها النباتات بالفيرس دون أن تظهر عليها أية أعراض، والتى يمكن اكتشاف تواجد الفيرس فيها بإجراء اختبارات طرق الانتقال (لعائل آخر يعرف بقابليته للإصابة بالفيرس)، مثل التطعيم، وميكانيكيًا، وبالنواقل vectors المختلفة ... إلخ.

ب – التباينات التى يمكن أن تحدث فى حالة اختبارات النقل الميكانيكى.

جـ – التباينات التى يمكن أن تحدث من جراء حقن أنواع نباتية كثيرة تتباين أصلاً فى احتياجاتها البيئية للنمو.

د – تباين سلالات الفيرس الواحد فى مدى عوائل كل منها.

٤ – الاعتماد على طرق الانتقال الفيروسى فى التعرف على الفيرس:

يعد تحديد الوسائل التى ينتقل بها الفيرس فى الطبيعة أمرًا بالغ الأهمية. ليس فقط لتحديد هوية الفيرس، وإنما كذلك لدراسات التربية لمقاومة الفيرس. فضلاً عما لذلك من أهمية بالغة فى التعرف على أكثر الوسائل فاعلية فى مكافحة الفيرس. ولذا .. فإننا نتناول موضوع انتقال الفيروسات إلى النباتات بالتفصيل فى موضع آخر من هذا الكتاب.

٥ – الاعتماد على التغيرات السيتولوجية التى تحدثها الإصابات الفيروسية فى التعرف عليها.

٦ – الاعتماد على تباين الأعراض التى تظهر على بعض الأنواع النباتية عند حقنها بمخلوط من فيروسين أو أكثر.

٧ – الاعتماد على تباين الفيروسات فى مقدرتها على الاحتفاظ بقدرتها على إحداث الإصابة بعد تخزينها لفترات مختلفة (عن Hull ٢٠٠٢).

خامساً: الطرق التى تعتمد على خصائص البروتين الفيروسى

تتبع الطرق السيرولوجية فى التعرف على خصائص الغلاف البروتينى الفيروسى.

وتعتمد الطرق السيرولوجية على التفاعل بين بروتين أو بروتينات (تسمى أنتيجينات) فى المسبب المرضى مع أجسام مضادة لها تُنتج فى الفقاريات عند حقنها بتلك البروتينات.

يُستعمل المصطلح immunoglobulin – أحيانًا – كبديل لمصطلح الجسم المضاد antibody، إلاّ أن الجسم المضاد هو على وجه الدقة جزئ يرتبط مع أنتيجين معروف، بينما تُشير الـ immunoglublins إلى هذه المجموعة من البروتينات بغض النظر عما إذا كانت مواقع الارتباط فيها معروفة، أم غير معروفة.

إن الأجسام المضادة تُفرَز بواسطة B lymphocytes، وهى عائلة كبيرة من الجليكوبروتينات glycoproteins التى تشترك – فيما بينها – فى تركيب مميز وصفات وظيفية خاصة.

أما الأنتيجينات فهى – عادة – جزيئات كبيرة أو أجسام تتكون من – أو تحتوى على – بروتين أو عديدات التسكر، وتعد غريبة على أنواع الفقاريات التى تحقن فيها.

ويمكن الحصول على السيرم المنيع لكثير من الفيروسات من:

ATCC (American Type Culture Collection)
12301 Parklawn Drive
Rockville
Maryland 20852
USA

ويحضر السيرم المنيع باستخدام تحضيرات نقية أو شبه نقية من الفيرس.

ويمكن استخدام الأرانب فى إنتاج السيرم المنيع بالطريقة التالية:

يجب أن تكون الأرانب المستخدمة فى إنتاج السيرم المنيع Antiserum كبيرة الحجم، وأن تكون آذانها كبيرة وذات عروق واضحة.

تستخدم حقن (سرنجات) بحجم ملليلتر واحد مع ضرورة أن تكون إبرتها دقيقة. تملأ الحقنة بتحضير الفيرس، ويطرد منها الهواء، ثم تُحقن بها الأرانب داخل العرق الذى يمتد بطول السطح العلوى للأذن بمحاذاة الحافة، وعلى مسافة ٣-٤ مم منها. ولا تفيد محاولة استخدام العروق الأخرى برغم أن بعضها يبدو أكبر حجمًا.

وفى حالة إعطاء الأرانب سلسلة من الحقن فإنه يفضل إعطاء الأولى منها قرب نهاية الأذن، ثم تعطى الباقيات فى مواضع متتالية تقترب من قاعدة الأذن تدريجيًّا.

وبعد مرور أسبوعين من الحقن .. تتم إسالة دم الأرنب من الأذن الأخرى بعمل قطع صغير فى العرق الحافى بالقرب من قاعدة الأذن باستعمال مشرط حاد. وفى حالة عمل سلسلة من القطوع لإسالة مزيد من دم الأرنب فإنه يفضل عملها فى مواضع متتالية تقترب من طرف الأذن تدريجيًّا.

يجمع الدم فى أنبوبة اختبار، ويترك لعدة ساعات حتى يتخثر، ثم يفرغ السيرم المنيع ويوضع فى جهاز طرد مركزى للتخلص من أية خلايا دم حمراء قد تكون متبقية فيه.

وجدير بالذكر أن هذا السيرم المنيع لا يكون معقمًا، ولذا .. يجب تخزينه فى ظروف جيدة تمنع النمو البكتيرى فيه (Smith ١٩٧٧).

وأكثر الإختبارات السيرولوجية استخدامًا ما يلى:

١ - اختبار الترسيب الدقيق Microprecipitation test فى أنابيب اختبار صغيرة.

٢ - اختبار أوشترلونى Ouchterlony agar gel double diffusion test فى أطباق بترى.

٣ - اختبار المناعة المرئى بالميكروسكوب الإليكترونى Immunosorbent electron microscopy (ISEM).

٤ – اختبار المناعة المرتبط بالإنزيمات Enzyme-linked Immunosorbent assay (اختصارًا: إليزا ELISA).

يمكن إجراء الاختبارات السابقة باستخدام العصير الخلوى العادى، أو الرائق، أو الفيرس النقى.

ولمزيد من التفاصيل عن الاختبارات السيرولوجية التقليدية .. يراجع Ball (١٩٦١).

سادسًا: الطرق التى تعتمد على خصائص الحامض النووى الفيروسى

تقدمت كثيرًا الطرق التى تعتمد على دراسة خصائص الحامض النووى الفيروسى، مثل نوع الحامض النووى، وحجمه، وحركته فى المجال الكهربائى، وكيفية الانقسام وخصائص أخرى كثيرة كيميائية وفيزيائية (عن Hull ٢٠٠٢).