

الفصل السادس

فيرويدات تحت مجموعة B₂ و B₃

أولاً : فيروسات تحت مجموعة B₂

١ - فيروسات التفاح

Apple Viroids

مقدمة :

يهاجم التفاح من قبل فيروسين هامين هما ١ - فيروس ندب الجلد في التفاح Apple Scar Skin Viroid ويكتب باختصار ASSVd ٢ - فيروس تنقط التفاح Dapple Apple Viroid ويكتب DAVd .

إن فيروس ندب الجلد في التفاح ASSVd هو العامل المسبب لمرض ندب الجلد في التفاح وهو عبارة عن جزيء RNA دائري مفرد الخيط معدى يتكون من سلسلة طولها ٣٣٠ نيوكليتيده. أما الفيروسات الأخرى القرية له وذات حجم مشابه لحجمه وتهاجم أشجار التفاحيات فهي فيروس تنقط التفاح DAVd وفيروس الجلد الصدأ في الكمثرى Pear Rusty Skin Viroid (PRSVd). إن هذه الفيروسات الثلاثة ASSVd ، DAVd و PRSVd هامة إقتصادياً على التفاح والكمثرى في الصين واليابان، ولكن عائلها الطبيعي محدود في التفاحيات. بذلت

محاولات لنقل هذه الفيرويدات إلى العوائل العشبية إلا أنها لم تنجح. طرق التشخيص الحالية لهذه الفيرويدات تتضمن:-

- ١ - الأعراض التي تظهر على الثمرة.
- ٢ - تحليل الحمض النووي المعزول بواسطة طريقة RGE.
- ٣ - تهجين الجزيء بمنقب ASSVd cRNA معلم بالفسفور المشع.

يحتاج هذه الفيرويدات إلى وقت طويل لتصل إلى مستويات يمكن اكتشافها بها في عوائلها المصابة عن طريق الأعراض. إن هذا التأخير في إظهار الأعراض الذي يحتاج تقريباً ١ - ٣ سنوات بعد الحقن لكي يمكن إظهار أعراض ASSVd و DAVd في بادرات التفاح المحقونة، وتحتاج من ٥ - ٦ سنوات حتى تظهر الأعراض في الثمار. زيادة على ذلك فإن هذه الفيرويدات التي تصيب ثمار التفاحيات توجد بكميات قليلة جداً تكاد تكون آثار فقط في الأشجار المصابة ويختلف تركيزها بشكل كبير حسب اختلاف الأنسجة، هذا الاختلاف يتراوح أحياناً ما بين ١٠ - ١٠٠ ضعف.

إن سرعة تكبير (في المعمل) أجزاء من تنابعات جينوم DNA أو نسخ، هي الآن ممكنة مع تخصص عال جداً ودقة باستعمال Taq I DNA Polymerase في تفاعل سلسلة البولي ميريز PCR. إن هذه الطريقة قد تبين بأنها ذات قيمة في تحسين التشخيص في كل من أمراض الإنسان الوراثية مثل مرض أنيميا الخلايا المنجلية وفيرس نقص المناعة في الإنسان وغيرها.

أ - مرض ندب الجلد في التفاح

Apple Scar Skin Disease

يتسبب هذا المرض عن فيروس ندب الجلد في التفاح (ASSVd) Apple Scar Skin Viroid ويعتبر هذا المرض شديد الخطورة على التفاح *Malus domestica*،

ويتميز بظهور لون منقط وتشقق وتشوه في الثمرة. الأعراض النموذجية تكون على شكل ندب موزعة على جلد الثمرة، إذا كانت هذه الندب كثيرة وشديدة هذا يؤدي حدوث تشقق في جلد الثمرة، إذا كثرت الشقوق وزاد عمقها تسبب تشوه الثمرة. يبدو أن المرض نادر الحدوث في الولايات المتحدة الأمريكية ولكنه واسع الانتشار ومن الأمراض الخطيرة جداً والمهلكة للتفاح في اليابان والصين. ظهر المرض في ميسوري سنة ١٩٥٦. الأعراض تظهر فقط على الثمار وبالتالي فإن الأشجار المتكاثره عن مصدر شجرى مصاب يمكن أن يمضي على إصابتها عدة سنوات قبل أن تلاحظ أعراض المرض. وبالتالي فإنه من المهم أن تكون مصادر التكاثر خالية من المسبب المرضي ASSVd. ولسوء الحظ فإن الإختبارات البيولوجية لهذا الفيروس تتطلب إظهار الأعراض في الحقل وهذا يحتاج عدة سنوات ليكتمل، إلا أن الإختبارات الحديثة المتطورة باستعمال منقبات حمض نووى، يمكن فيها أن يكتمل الإختبار خلال بضعة أيام. هناك عدة أسباب تجعل استعمال الكواشف البيولوجية السريعة للفيروس ASSVd مفيدة وهذه الأسباب هي: -

- ١ - إن أماكن الإختبارات في كثير من أقطار العالم لا تكون مجهزة بأدوات استعمال منقبات حمض نووى.
- ٢ - إن فهرسة كواشف خشبية لا تزال مطلوبة للكشف عن كثير من الفيروسات الأخرى والعوامل المسببة المرضية الأخرى في التفاح، وإن توفر الكاشف الخشبي السريع للفيروس ASSVd يمكن أن يكون مفيد وملائم.
- ٣ - إن مثل هذه الكواشف يمكن أن تزودنا بتأكيدات حيوية للإختبارات المعملية.

إن الأشجار المصابة بالفيروس ASSVd من التفاح المزروع Red Delicious والنوع Stark's Earliest و Sugar Crab تعتبر كاشف لهذا الفيروس وتظهر عليها الأعراض على شكل تدلى الأواق إلى أسفل عندما تنمو في الصوبا الزجاجية.

الأعراض على الثمار:

إن الثمار المتكونة على الأشجار المحقونة بالفيرويد ASSVd يتكشف عليها تشقق يبدأ بالقرب من الكأس بعد حوالى شهرين من تلقيح الأزهار (شكل ٧١). لم يلاحظ أية أعراض على الثمار من الأشجار المحقونة بالفيرس (لاستبعاد الفيرس كمسبب مرضي) ولا على الأشجار المستعملة كتنرول وخالية من الفيرويد. كثير من الأشجار التي طعمت بالبرعم والتي من المفروض أنها تحمل بدايات زهرة لم تعط أزهار نتيجة الإصابة بالفيرويد وبالتالي فإن ٧٪ فقط من الأشجار التي طعمت بالبرعم ومحقونة بالفيرويد أنتجت ثمار وجميع هذه الأشجار ظهر عليها أعراض المرض.

الأعراض على المجموع الخضرى:

الإصابة الطبيعية التي تظهر فى الحقل لا تكون إلا على الثمار، أما فى التجارب التي تجرى على النباتات الكاشفة فيمكن أن يظهر عليها أعراض على المجموع الخضرى وهى بهذه الحالة تساعد كثير جداً فى الاختبارات الحيوية، وعدم الإنتظار لسن الإثمار.

أولى الأعراض ملاحظة فى الأشجار المحقونة بالفيرويد ASSVd هو تدلى الورقة وهذا يظهر واضحاً فى أشجار الكواشف التي ذكرناها سابقاً وهى Stark's Earliest و Sugar Crab، بعد ستة إلى ثمانية أسابيع من الحقن. الأوراق الكاملة تتجدد وتلتف لأسفل مع إنحناء قمة الورقة جهة عنق الورقة وبالتالي تشكل نقطة قمة الورقة ونقطة القاعدة قطاع من شكل دائرة أو حرف C شكل ٧٢. يظهر التفاف فى الفروع الجانبية، مع إطالة مدة الحضانة يظهر مناطق ميتة متحللة على السطح السفلى للعرق الوسطى للورقة. يصعب تمييز الأعراض بين الثلاثة عزلات الخاصة بالفيرويد.

تأثير الحرارة والفترة الضوئية على حدوث وتكشف الأعراض:

إن درجات الحرارة المنخفضة وطول الفترة الضوئية تشجع حدوث وتكشف ظاهرة تدلى الأوراق وتزداد شدة المرض في الأشجار المحقونة بالفيرويد ASSVd في جميع أشجار Stark's Earliest ومعظم أشجار Sugar Crab. تظهر أعراض تدلى الورقة خلال ٥٨ يوم عندما تنمو الأشجار باستمرار تحت إضاءة وحرارة ١٨م (جدول ٤٩). أما عندما تنمو على ٢٨م تتضح الإصابة جيداً على الصنف Stark's Earliest ولكن تظهر على أعداد قليلة من Sugar Crab حيث تعبر بالأعراض المنظورة. أيضاً فإن قليلاً من الأشجار المزروعة فقط تظهر تدلى الأوراق على هذه الحرارة وتحت ١٤ ساعة إضاءة.

لم يتكشف على أى من الأشجار المحقونة أعراض تدلى الأوراق عندما نمت على ٢٨م وتحت فترة قصيرة من ساعات الإضاءة، أو على ٤ ساعات إضاءة وأى درجة حرارة (جدول ٤٩). هذه الأعراض لم تظهر على أشجار الكنترول.

يظهر بقع شاحبة ويحدث تشوه من جانب واحد على أوراق الأشجار المحقونة بالفيرويد في النوع Sugar Crab المستمر في النمو على درجة ١٨م وفترة إضاءة ٤ ساعات يومياً، وعلى أية حال فإن نفس الأعراض تلاحظ عند إصابة الأشجار بالفيروس الكامن لهذا النوع من الأشجار.

تأثير الحرارة وفترة الإضاءة على معيار ASSVd في أشجار التفاح:

لقد حصل نتيجة إيجابية للتهجين بين منقب ASSVd cRNA ومستخلصات العرق الوسطى لعنق الورقة من أشجار تفاح نامية على ١٨ ساعة إضاءة ودرجة حرارة ٢٨م. إن تقدير المعيار النسبي للفيرويد مبنياً على كثافات إشارات التهجين في المقارنة مع المعايير الداخلية المعروفة تؤدي إلى القول بأن طول النهار له تأثير قليل أو عدم تأثير على معيار ASSVd.

يبدو أن معيار الفيرويد ينخفض على درجات الحرارة العالية. تلاحظ تفاعلات قوية في إختبارات التهجين blot - hybridization في جميع أجزاء الورقة على درجة ١٨م ولكن فقط في الأوراق الوسطية والسفلى على درجة ٢٨م. لم يلاحظ أي

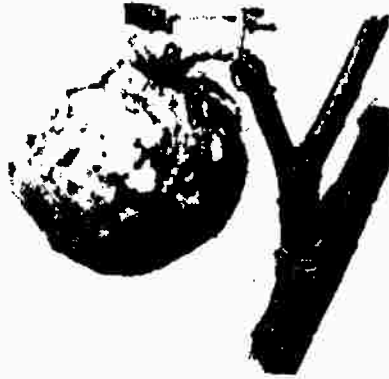
تفاعلات ظاهرة ولم يحصل عليها مع نسيج من أشجار نامية على ٢٨ م. جميع عزلات ASSVd تفاعلاتها متشابهة. لم يلاحظ تفاعلات إيجابية من مستخلصات من عنق الورقة المصابة بالفيروس الكامن أو أشجار الكنترول غير المحقونة.

تأثير نوع النسيج على معيار الفيرويد ASSVd :

عينات الفيرويد المخضرة من العرق الوسطى في الأوراق وقواعد الأوراق يبدو أنها تشخيصياً أكثر دقة في إختبارات Dot - blot hybridization من التحضيرات المأخوذة من نصل الورقة وذلك لأنها تنتج تفاعلات أشد قوة. إن المستخلصات من أعناق الأوراق المصابة بالفيرويد والتي قد حدث لها تخفيف هوائي على درجة حرارة الغرفة العادية تتفاعل تقريباً بنفس القوة في إختبار Dot - blot مع منقّب ASSVd cRNA كما في مستخلصات من أعناق أوراق مقطوفة حديثاً.

جدول ٤٩: تدلى الورقة كتعبير للأعراض المرضية على شجرة التفاح من Stark's Earliest و Sugar Crab المحقونة بعزلة من فيرويد ASSVd المأخوذ من أشجار رد دلشص المصابة بمرض ندب الجلد وفيرويد تنقر التفاح وعزلة Heiya اليابانية ونامية على ظروف إضاءة وحرارة مختلفة.

طول اليوم بالساعة	درجة الحرارة (ملوية)	عدد الأشجار التي ظهر عليها أعراض تدلى الورقة / العدد الكلى للأشجار المحقونة		
		Stark's Earliest		
		Sugar Crab		
		تدلى التفاح	العزلة اليابانية	ندب الجلد
		Heiya		
		تدلى التفاح	العزلة اليابانية	ندب الجلد
٢٤	٣٨	٥/٥	٥/٥	٥/٥
	٢٨	٥/٥	٥/٥	٥/٥
	١٨	٥/٥	٥/٥	٥/٥
١٤	٣٨	٥/٥	٥/٥	٥/٥
	٢٨	٥/٥	٥/٥	٥/٥
	١٨	٥/٥	٥/٥	٥/٥
٤	٣٨	٥/٥	٥/٥	٥/٥
	٢٨	٥/٥	٥/٥	٥/٥
	١٨	٥/٥	٥/٥	٥/٥



شكل رقم ٧١:

أعراض الإصابة بفيروس ASSVd على ثمرة تفاح ذات عمر ثلاثة شهور.



شكل رقم ٧٢:

أعراض تدلى الورقة على بادرات تفاح ذات عمر شهرين محقونة بفيروس ندب جلد التفاح
يلاحظ في اليمين أعراض إنحناء الورقة في قمة البادرة وأخذها شكل حرف C. البادرة في
اليسار سليمة.

يتبين لنا مما سبق أن فيرويدات ثمار التفاح يمكن أن تكتشف بسهولة فى أقل من شهرين وذلك عن طريق حقنها فى أشجار خشبية كاشفة تحت ظروف نمو متحكم بها، بالمقارنة باحتياجها إلى ٢ - ٣ سنوات إذا بقيت تحت ظروف الحقل العادية. هذه الطريقة يمكن أن تستعمل فى إعطاء شهادة بأن النباتات الخشبية يمكن أن تستعمل كواشف لاكتشاف الفيروسات أيضاً. هذه النتائج يمكن أن تؤكد بواسطة إختبارات cRNA hybridization لنسيج عنق الورقة، وعلى العكس من ذلك فإن هذه الاختبارات للكشف السريع يمكن أن تزود التأكيدات البيولوجية للمرض، حيث يستعمل تكنيك اكتشاف الحمض النووى بالتهجين فى المعمل.

لقد تم الحصول على الأعراض المرضية بسهولة خلال شهرين فى نسيج الثمار والمجموع الخضرى، وعلى أية حال فإن فائدة إختبار الثمرة قد توقف وذلك نظراً لانخفاض النسبة بين البراعم الزهرية والبراعم الخضرية المتكونة فى الأشجار المحقونة بالفيرويد من الصنف Stark's Earliest وكذلك بواسطة التكنيك غير الملائم للتمييز بين البراعم الزهرية والبراعم الخضرية (فى الفصول الساكنة) الأكثر شيوعاً.

مع أن الكواشف للفيرويد ASSVd المذكورة سابقاً لها وظيفة فى الحصول السريع على معلومات تشخيصية فإن طريقة Dot - blot hybridization تتطلب وقت أقل وتسمح بالكشف عن الفيرويد وتتابعاته الخاصة فى مستخلص الأنسجة والذى من الصعب توقعه بالنسبة للكواشف فى الأشجار الخشبية مثل الثمرة والبذرة والمجموع الخضرى.

إن الأعراض المنظورة وتفاعلات التهجين لمستخلصات عنق الورقة من الأشجار المختبرة، تدل على أن معيار الفيرويد ASSVd يتناقض بارتفاع درجة الحرارة خاصة بالقرب من قمة الشجرة. هذه الملاحظة تؤدى إلى القول بأن الأشجار الخالية من الفيرويد يمكن الحصول عليها من أشجار مصابة تحت درجات الحرارة العالية وباستعمال طريقة تكاثر القمة (كما فى فيرويد اكسوكوتز الحمضيات). مع أن

الفيرويدات تميل لأن تكون متحملة كثيراً للحرارة، إلا أن هذا الفيرويد ASSVd وفيرويد اكسوكورتز الحمضيات يمكن استبعادهما من النباتات بإطالة مدة تعرضهما للحرارة ٣٨م ثم بعد ذلك تؤخذ قمم الفروع ويجرى لها إكثار للحصول على نباتات خالية من الفيرويد. إن فيرويد ASSVd يتجمع أكثر ما يمكن على درجة حرارة ١٨م.

لقد ثبت بأن فيرويد ASSVd يتكون من ٣٣٠ نيوكليتيده و ليس له علاقة بأى من الفيرويدات الأخرى.

ب - مرض تنقر التفاح

Dapple Apple Disease

إن مرض تنقر التفاح هو مرض مشوه للثمرة كان أول وصف له سنة ١٩٥٦ فى مزارع التفاح فى مقاطعة نيوهام بشير New Hampshire ووصف فى كولبيا سنة ١٩٦١. يظهر المرض على شكل نقر مختلفة المساحة على الثمرة وقد تأخذ شكل بقع كبيرة وتنشوه الثمرة إذا كان الفيرويد المسبب مقترناً مع فيرويد ASSVd. أعراض المرض واضحة لا لبس فيها إذ تكون التنقرات ذات لون مختلف قليلاً عن لون جلد الثمرة وتكون النقر متوزعة على سطح الثمرة، قد يحدث التباس مع مرض النقرة المرة فى التفاح المتسبب عن حالة فسيولوجية مثل نقص الكالسيوم والاضطرابات المائية فى التربة، إلا أن مرض النقرة المرة يجعل جلد الثمرة مثل جلد وجه الإنسان الذى اصابه جدري وشفى منه (فى المراحل الأخيرة من إصابة ثمار التفاح).

تبين أن مسبب المرض ينتقل بالتطعيم وذلك منذ سنة ١٩٥٨. المرض ينتشر فى كندا، اليابان، بريطانيا، وإيطاليا. ولقد ذكر أنه قريب الشبه مع مرض ندب الجلد فى التفاح. ولقد ذكر وصف لهذا المرض فى كل من الولايات المتحدة والصين

واليابان. إن المدى العائلى لهذا المرض محدود فى أشجار التفاحيات. متوسط الوقت الذى يلزم للتعريف السليم لهذا المرض بواسطة الأعراض على الثمار عند تطعيم الأشجار الخشبية التى تستعمل كاشف للمرض هو ثلاثة سنوات.

مسبب المرض:

يتسبب هذا المرض عن فيروس تنقر التفاح (DAVd) Dapple Apple Viroid وهو يتكون من حوالى ٣٣٨ نيوكليتيده (لم يتأكد الرقم بعد). لقد تبين وجود نوعين من RNA لهما وزن جزيئى منخفض مترافق مع الأحماض النووية المستخلصة من الثمرة المصابة بمرض ندب الجلد أو من نسيج القلف ولكن ليس من الأنسجة السليمة وإن RNA الأصغر دائرى. إن حقن بادرات التفاح بالحمض النووى الكلى غير المجزأ المأخوذ من نسيج مريض تبين أنه يحتوى RNA ذو حركة فى الهجرة الكهربائية تشبه الحمضين المرافقين للمرض من RNAs.

ولقد تبين أن الأحماض النووية المعزولة من أنسجة التفاح المريضة بمرض تنقر التفاح فى شمال أمريكا أعطت نتائج إيجابية مع منقب ASSVd cRNA وأن فيروس تنقر التفاح (DAVd) ينتشر جهازياً فى بذور التفاح وفى الثمرة والقلف والورقة وفى أنسجة الجذر. إن أفضل طريقة سريعة لاكتشاف الفيروس هى منقب SP6 generated ASSVd cRNA وهذه الطريقة تكشف أيضاً عن فيروس ASSVd فى الأحماض النووية المستخلصة من النسيج المصاب.

من الدراسات الحديثة التى أجريت على فيروس تنقر التفاح فى كل من أمريكا وكندا، تبين أنه فيروس له تماثل تام وشديد التشابه مع فيروس ندب الجلد فى التفاح المنتشر فى اليابان وهناك عدة إصابات تدل على التطابق التام بين فيروس DAVd وفيروس ASSVd وهذه الاباتات هى:

- ١ - إن ASSVd cRNA المعلم بالفسفور المشع يتهجن مع RNA من نسيج مصاب بالفيروس DAVd وليس مع RNA من نسيج غير مصاب.

٢ - يحصل على إشارات قوية من التهجين مع RNA من الأنسجة المصابة فى أمريكا وكندا لمرض تنقر التفاح.

٣ - استعمال RNase بطريقة معينة يزيل الهجن التى حصل لها تزاوج غير ملائم.

٤ - RNA المهجن يكون بشكل أساسى موزع فى جزيئات محلول كلوريد الليثيوم والذى يميز الفيروسات.

٥ - إن مقارنة الحركة فى الهجرة الكهربائية للفيروس DAVd مع فيروس PSTVd يؤدى إلى القول بأن الفيروس DAVd يتكون من نيوكليوتيدات أقل بكمية بسيطة عن ٣٥٩ نيوكليوتيدة، هذا الحجم يكون متكامل مع حجم فيروس ASSVd الذى يتكون من ٣٣٠ نيوكليوتيدة.

٦ - إن كل من ASSVd و DAVd ينتشر جهازياً فى أشجار التفاح المصابة جدول ٥٠.

إن تحليل فيروس DAVd بطريقة Return gel electrophoresis يمكن أن تستعمل لكل من DAVd أو ASSVd من حيث التنقية والكشف والدراسات الأخرى. ويبدو من المعقول أن هناك سلالة من ASSVd تكون مرافقة لمرض تنقر التفاح فى شمال أمريكا.

الطريقة المفضلة لاكتشاف DAVd هى طريقة الكشف بالتهجين الجزيئى والتى تسمى Molecular hybridization detection method بالإضافة إلى الطرق البيولوجية، ولهذه الطريقة فوائد منها: -

١ - يتطلب التعريف الموجب للمرض بضعة أيام للعمل على النسيج المصاب، بالمقارنة نحتاج إلى أكثر من ثلاثة سنوات لاكتشاف الفيروس بالطريقة البيولوجية.

٢ - يمكن استعمال أنسجة مأخوذة من الورقة، القلف، الجذر، البذرة و / أو نسيج الثمرة فى هذه الطريقة أما فى طرق الكشف الحيوية فإن ثمار التفاح فقط هى التى تستعمل فى التشخيص.

٣ - إختبار cRNA دقيق ومتخصص وحساس جداً، وبالمقابل فإن أعراض الفيرويد ASSVd أو DAVd على ثمار التفاح تختلف بشكل كبير بين الأصناف المزروعة والمستعملة للكشف وتعتمد على ميثابولزم مركبات المواد الفيتولية فى الثمرة. بالإضافة إلى هذه الصعوبات فى الإختبارات الحيوية فإن وجود بعض فيروسات التفاح والعوامل المسببة تشوه الثمرة يمكن أن تجعل تشخيص هذا المرض المبنى على أعراض الثمرة فقط، غير دقيق.

٤ - إن إختبار cRNA يكون غير مكلف نسبياً ولا يحتاج إلى مساحات كبيرة، بينما الإختبارات البيولوجية مكلفة وتحتاج معامل ومساحات أكبر.

إن اكتشاف الفيرويد ASSVd أو DAVd فى بذرة التفاح والأنسجة الخضرية يؤدى إلى القول بأن الفيرويد يمكن أن ينتقل خلال هذه الأنسجة. إن النقل بالأجزاء الخضرية وبالبذور يمكن أن يكون مخاطرة صعبة بسبب أن الفيرويد يمكن أن ينتقل من الأصل الجذرى للتفاح النامى من بذرة مصابة أو أنسجة خضرية إلى أنواع القلم المستعملة بالتطعيم. وبسبب أن DAVd أو ASSVd ينتشر جهازياً فى أشجار التفاح المصابة، فمن المحتمل أن ينتقل إلى المزارع عن طريق أدوات التقليم والتطعيم الطبيعى للجذر.

ولقد وجد فى بعض التجارب أن مستخلصات الحمض النووى من نوع تفاح آسيوى أعطت إختبار موجب مع منقب cRNA ASSVd المعلم بالفسفور المشع. إن الفيرويد ASSVd والفيرويد DAVd تستطيع أن تهاجم هذا النوع من التفاح الآسيوى بالإضافة إلى كثير من الأنواع الآسيوية الأخرى بدون أن تسبب أعراض

مرئية فى ثمارها. هذه الفيروسات مجتمعة تستطيع أن تسبب ندب الجلد وتنقر وتشقق الثمار عندما تصيب مجموعة أصناف التفاح الأمريكية مثل رد دلشص وماكنتوش. وبالتالي عن طريق استعمال هذا الاختبار فإن أصناف التفاح الغريبة يمكن أن تنقى بسرعة أكثر عند دخولها إلى أمريكا.

إن توفر منقبات عالية التخصص من ASSVd cRNA مع إجراءات استخلاص الحمض النووى واختبارات التهجين تجعل هناك مراقبة على الإنتشار العالمى للمرضيين المتسببين عن الفيروسين ASSVd و DAVd.

اكتشاف الفيروس ASSVd و DAVd فى مكونات البذرة والبراعم:

نتيجة التحليل للأحماض النووية بواسطة Northern blot hybridization للمستخلصات من أنسجة الثمار والبذور من أشجار التفاح المصابة طبيعياً وغير المصابة، كان هناك نتائج إيجابية لإشارات التهجين حصل عليها من جلد الثمرة ولحمها بالإضافة إلى البذور فى الثمار المصابة بفيروس ندب الجلد. النتيجة الإيجابية لإشارات التهجين حصل عليها دائماً من الأحماض النووية من البذور فى جميع أصناف التفاح المزروعة والمصابة بالفيروسين ASSVd ، DAVd والمظهرة أعراض، بالإضافة إلى البذور المأخوذة من أصناف الكمثرى المصابة بفيروس ASSVd.

جدول ٥٠: اكتشاف فيروس DAVd أو ASSVd من أنواع التفاح الآسيوى ومن أنواع تفاح محلية فى أمريكا عن طريق التهجين الجزيلى مع SP6 مولد منقلب ASSVd cRNA معلم بالفسفور المشع.

مصدر الأحماض النووية	نوع آسيوى ١	نوع آسيوى ٢ - ٢٤	أشجار مصابة بفيروس تفر التفاح نوع واحد	أشجار مصابة بفيروس تفر التفاح نوع ٢	أشجار مصابة بالفيروس ASSVd	أشجار كنترول
الأوراق	+	-	+	+	+	-
أوراق قديمة	+	+	+	+	+	-
قلف	+	+	+	+	+	-
أوراق حديثة جداً	+	+	+	+	+	-
جذور	+	+	+	+	+	-

الحمض النووى الكلى ٧٥ - ١٠٠ ميكو جرام / عينة، حلت بطريقة Dot blot hybridization وطريقة Northern blot hybridization. (+) تفاعل تهجين موجب، (-) تفاعل تهجين سالب.

ولقد ثبت أن الفيرويديين موجودان في أغلفة البذرة وتحت الغلاف البذري والفلقات والأجنة وكذلك في جميع مكونات البذرة. إن نسبة الفيرويدات في غلاف البذرة وتحت الغلاف أكثر منه في الفلقات والأجنة، وباستثناء حبوب اللقاح فإن جمع أجزاء الزهرة تحتوى فيرويد.

لاكتشاف الفيرويد في البرعم الخشبي، يؤخذ القلم (الطعم) المصاب بالفيرويد DAVd ويطعم على أصل تفاح ذو عمر سنة في بداية الخريف (أول سبتمبر) أو في أوائل الربيع من السنة القادمة، إما أن تزال قمم الأصل المطعم من فوق منطقة التحام الأصل بالطعم وذلك لإعطاء قوة للطعم لينمو إلى فروع جانبية محتوية DAVd المتناسخ أو أن تترك بدون إزالة وبالتالي فإن الفيرويد DAVd سوف يصيب الأصل النامي. تفحص نموات الطعم ونموات الأصل على فترات لاكتشاف DAVd بواسطة طريقة Northern blot hybridization. بعد شهرين يؤخذ عينة من قلف ونسيج ورقة من جميع الفروع النامية من القلم المطعم وتختبر. وجد أن جميع النموات الناتجة من القلم المطعم فيها فيرويد DAVd، ولكن الفروع النامية من الأصل لا يوجد فيها فيرويد أما عند إجراء الاختبار بعد أربعة شهور أخرى وجد ٢٥٪ إصابة في هذه الأجزاء وتزداد هذه النسبة كلما تقدم الزمن وبعد سنتين بالتمام وجد الفيرويد في جميع أجزاء الأصل، أى أن الأصل وجميع فروع الطعم أصبحت محتوية فيرويد DAVd.

بناءً على ما تقدم نستطيع أن نقول إن فيرويد ASSVd وفيرويد DAVd هي فيرويدات كامنة في البذور وبالتالي فهي أكثر ميلاً لأن تنتقل بالبذور (إلا أن هذا لم يثبت بعد بالتجربة). مع أن ثمار أشجار التفاحيات تصاب بكثير من الفيروسات وعوامل شبيهة بالفيروس، إلا أنه لم يثبت لأى من هذه الممرضات بأنه كامن في بذور التفاح والكمثرى باستثناء العامل المسبب مرض اصفرار العروق في الكمثرى. وبالتالي يمكن القول بأن كل من DAVd و ASSVd هما أول العوامل الممرضة الفيرويدية قد عرفا بأنهما يتواجدان في بذور ثمار التفاح.

إن اكتشاف هذين الفيرويديين فى بذور العائل يشبه اكتشاف فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس PSTVd فى بذور البطاطس الحقيقية، إلا أن إنتشار فيروس PSTVd فى مكونات البذور المصابة لم يحدد تماماً. إن ارتفاع نسبة وجود كل من ASSVd و DAVd فى أغلفة البذور وتحت الغلاف يؤدى إلى القول بأن معظم جزيئات الفيروس فى البذور المصابة يبدأ من تناسخ الفيروس فى بويضات الزهرة. كذلك فإن اكتشاف كميات قليلة جداً من الفيروس فى أجنة البذور المصابة يؤدى إلى القول بأن الفيرويدات الموجودة فى الجنين يمكن أن تكون قد نشأت من المبايض ولو من ناحية نظرية لغاية الآن.

كذلك فإن عدم وجود الفيروس فى حبة اللقاح، هذا يعنى أن الفيروس لا ينتقل عن طريق حبوب اللقاح كما أنه لا يتمركز فى حبوب اللقاح. وإن وجود الفيروس ASSVd أو DAVd فى الأشجار المنتجة ثمار من التفاحيات على الأقل لمدة سنتين متتابتين بالإضافة لاكتشاف الفيروس DAVd فى البادرات المصابة باستمرار لعدة سنوات من بعد اكتشافه الأولى، يؤدى إلى القول بأن هذه الفيرويدات دائمة فى الأنسجة المصابة ونظراً لأن الفيرويديين كامنين فى البذور وبالإضافة إلى احتمالية إنتقالهما بالبذور بالإضافة إلى استمراريتهما فى النسيج المصاب، كل ذلك يجعل فهرسة ثمار التفاحيات ضرورية لمعرفة إصابتها بالفيرويديين، مع أنه فى السابق كان ينظر إلى ثمار التفاح بأنها خالية من الفيروس والفيروس.

لفهرسة البرعم الخشبى budwood للفيرويديين ASSVd أو DAVd يمكن أن يتم ذلك عن طريق إتحاد الطرق البيولوجية والجزيئية. يجب أن يجرى الحقن بالبرعم أو التطعيم بالقلم فى الخريف أو الربيع ويسمح له بالنمو وذلك لزيادة معيار الفيروس فى النسيج المصاب ثم بعد ذلك تفحص أنسجة القلب أو ورقة من البرعم النامى لاكتشاف الفيروس بطريقة التهجين الجزيئى لمستخلص الحمض النووى بـ ASSVd cRNA المعلم بالفسفور المشع. ويسبب أن ASSVd و DAVd دائمة

الوجود في الأجزاء النباتية المصابة ولأنها منتشرة جهازياً في النسيج المصاب فإن الاختبارات السابقة الذكر يمكن أن تجرى على نسيج مجموع من نموات فصل النمو الأول ثم على ما بعد ذلك من نموات.

جـ - مرض تغضن ثمرة التفاح

Apple Fruit Crinkle Disease

يتسبب هذا المرض عن فيروس يسمى فيروس تغضن ثمرة التفاح Apple Fruit Crinkle Viroid ويكتب (AFCVd). لغاية سنة ١٩٩٤ لم يذكر أن المرض ينتشر خارج اليابان. تظهر أعراض المرض على شكل تغضن في جلد الثمرة وتبدو وكأنها تميل إلى شيء من التكرمش إذا كانت الإصابة شديدة. ينتقل هذا المرض بالتطعيم. للفيروس حجم جزئى أكبر من حجم فيروس ندب الجلد في التفاح ويقارب من حجم فيروس تنقر ثمار التفاح. الأبحاث الأولية أعطت لهذا الفيروس رقم ٣٤٠ نيوكليتيده إلا أن هذا الرقم تقريبى ولم يتأكد بعد. إن فيروس AFCVd لا يتجهجن مع ASSVd cDNA. يمكن نقل الفيروس إلى بادرات التفاح بواسطة Electro Pho-retically Purified Preparations طريقة Razer - Slash. إن هذا الفيروس يتميز فى جميع صفاته عن فيروسى التفاح ASSVd و DAVd.

٢ - فيروسات الكمثرى

Pear Viroids

تصاب أشجار الكمثرى *Pyrus communis* بثلاثة فيروسات مختلفة وهى :-

- 1 - Pear Blister Canker Viroid = (PBCVd)
- 2 - Pear Rusty Skin Viroid = (PRSVd)
- 3 - Apple Scar Skin latent Viroid = (ASSLVd)

الفيروس الذى استطعنا أن نتحصل على معلومات عنه هو الفيروس الأول، أما الفيروس الثانى والثالث فلم أستطع الحصول على ما يكفى من معلومات لتوضع فى هذا الكتاب إما لقلة الأبحاث وإما لقصور منى وإما لكليهما معاً.

مرض البثرة المتقرحة فى الكمثرى

Pear Blister Canker Disease

مقدمة:

هناك أمراض كثيرة تسبب تشوهات واضطرابات فى قلف أشجار الكمثرى وصفت فى أوروبا وأمريكا، ومن ضمن هذه الأمراض، مرض البثرة المتقرحة فى الكمثرى الذى وصف سنة ١٩٦٠، ومرض القلف الخشن فى الكمثرى الذى وصف سنة ١٩٥٧، مرض تشقق ونكروزز اللحاء فى الكمثرى الذى وصف سنة ١٩٦٥ و ١٩٦٧ ومرض جدري القلف measles الذى وصف سنة ١٩٦١. ولقد ذكر أن حوالى ٥٪ من الكمثرى المزروعة فى أوروبا تحمل أى من هذه الأمراض، وكثير من الأصناف تكون حاملة للمرض بدون إظهار أعراض إما أن تكون Carrier أو Tolerant.

من المفترض أن جميع هذه الأمراض تتسبب عن فيروسات ولكن نتيجة الأبحاث تبين أن بعض هذه العوامل المسببة متحملة للحرارة يعنى لا يمكن استبعاد المسبب بالحرارة، ونظراً لأن الفيروسات أقل تحملاً للحرارة من الفيروسات وبالتالي اعتبرت هذه الأمراض متسببة عن فيروسات، هذا من ناحية منطقية فقط ولا بد من إجراء طرق الكشف كلها بعد ذلك لإثبات ما يقال.

أعراض المرض:

يظهر المرض على شكل بثرات صغيرة على قلف الساق، تزداد فى العدد والحجم وتتكشف إلى تشققات فى بداية الربيع، تظهر الأعراض على بادرات الكمثرى ذات عمر سنتين، إذا كانت الإصابة شديدة يمكن أن تموت البادرات أو الأغصان أو كليهما معاً. الأشجار التى تبقى حية وعليها إصابة ينخفض إنتاجها من

الثمار عنه فى الحالة الطبيعية. إذا كانت الإصابة خفيفة تكون الأعراض قليلة أقل من أن تقشر القلف وتصلبه، وإذا كانت الإصابة شديدة تظهر الأعراض على شكل تقشر القلف بشكل كبير وهذا العرض يحدث التباس مع أعراض الإصابة الفطرية.

تظهر الأعراض على الساق فقط أما الثمار والأوراق فلا يظهر عليها أية أعراض. تبدأ الأعراض فى الظهور فى السنة الثانية بتشققات خارجية على سطح القلف وفى الابديرمز ثم بعد ذلك تتحول إلى تشققات كثيرة ومنتشرة على الساق شكل ٧٣. تتعمق التشققات حتى تكاد تسبب فى سقوط مساحات من القلف وقد تسبب موت الشجرة أحياناً أو ينخفض نموها وتعيش لمدة قصيرة.

أهم الأنواع والتى هى حساسة وكاشفة لهذا المرض هى أشجار الكمثرى *Pyrus communis* A. 20 حيث تظهر الأعراض النموذجية على هذا الصنف وتتميز بأن تكون على شكل قشور.



شكل رقم ٧٣:

أعراض الإصابة بفيرويد PBCVd . البثرة المتقرحة فى قلف الكمثرى.

مسبب المرض:

يتسبب هذا المرض عن فيروس يدعى (PBCVd) Pear Blister Canker Vir-oid. شكل ٧٤ يبين التركيب الثانوى لهذا الفيروس. إن فيروس PBCVd هو RNA دائرى يتكون من ٣١٥ نيوكليوتيدة. وتركيبه العام يتكون من ٩٩ قاعدة G (حوالى ٣١,٤٪) و ٩٢ قاعدة C (٢٩,٢٪) و ٥٤ قاعدة A (١٧,١٪) و ٧٠ قاعدة U (٢٢,٢٪)، وبالتالي فإن محتوياته من G + C حوالى ٦٠,٦٪. مشابهاً بذلك الفيروسات الأخرى باستثناء فيروس ضربة الشمس فى الافوكادو ASBVd. وكذلك فإن هذا الفيروس مثل بقية الفيروسات الأخرى لا يعمل تشفير لأى بروتينات.

إن التركيب الثانوى الأكثر ثباتاً للفيروس PBCVd هو الشكل المتفرع مع طاقة حرة 365.7 KJ / md - إن الفحص للتركيبات البديلة ضمن ١٠٪ من قيمة أقل طاقة حرة أظهرت أنه لا يوجد للفيروس شكل شبه عصوى.

فى التركيب الثانوى المفترض لهذا الفيروس فإن ٦٧,٦٪ من نيوكليوتيداته هى أزواج وأن نسبة GC ٦٤,٤٪ و AU ٢٢,٤٪ و GU ١٣,٢٪. كذلك فإن هذا الفيروس يحتوى تتابع CCR والذى يميز أفراد تحت مجموعة B₂ والتى يطلق عليها اسم apscaviroids (تعنى مجموعة فيروس ندب الجلد فى التفاح (ASSVd) وهذا الاصطلاح وضعه Elena سنة ١٩٩١ ليجمع الفيروسات التى تشابه فيروس ندب الجلد فى التفاح فى معظم صفاتها فى مجموعة واحدة سماها apscaviroids وهذه المجموعة ذكرناها فى التصنيف فى الجزء الأول من الكتاب بأنها تحت مجموعة B₂. أما الفيروسات التى تشابه فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس فسماها مجموعة Pospiviroids وذكرنا اسمها فى الجزء الأول من الكتاب تحت مجموعة B₁.

من التركيب السابق لفيروس PBCVd يتبين عدم وجود U الموجودة على نهاية 3' من CCR فى الخيط السفلى من الخمسة فيروسات الأخرى التى تمثل تحت مجموعة B₂ (apscaviroids) وهى :-

ASSVd = Apple Scar Skin Viroid

GYSVd = Grapevine Yellow Speckle Viroid

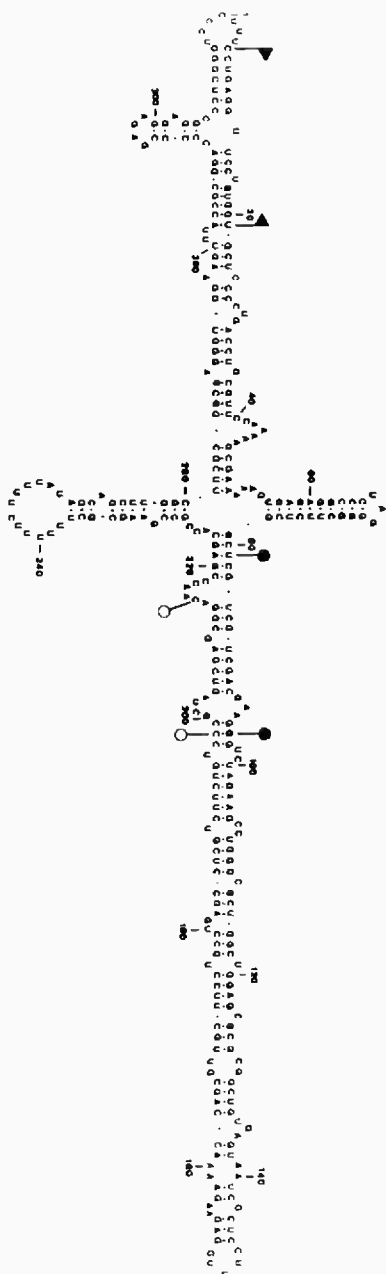
GIBVd = Grapevine IB Viroid

AGVd = Australian Grapevine Viroid

CBLVd = Citrus Bent Leaf Viroid

إن تتابع الفيرويد PBCVd منطبق مع الخيط العلوى من حيث CCR وإن ١٢ مركز المحيطية الجانبية على أى جانب والذي يمثل مجموع ٤٠ نيوكليتيدها عند المقدر لتشكل تركيب متعاكس Palindromic مع إما نفس التتابع من جزئ آخر من PBCVd أو من منطقة أخرى multimeric لجزئ الفيرويد، هذا التتابع لأربعين قاعدة يستطيع أن ينشئ ويشكل تركيب عروة. كلا الصنفين من التركيب ذكرت لأفراد أخرى من apscaviroids، بالإضافة إلى تحت مجموعة الفيرويدات التى يمثلها PSTVd (Pospiviroids) مثل CCVd (Cocaviroid) و hop stunt viroid و 1 Coleus blumei (Cb1Vd)، ولقد افترض على أنها تلعب دوراً فى تجهيز وسيطات الفيرويد Oligomeric بالإضافة إلى الخيط العلوى والسفلى فإن منطقة CCR فى الفيرويد PBCVd تستطيع بكفاءة أن تتخذ شكل صليبي كما فى بعض أفراد apscaviroids شكل ٧٤.

كذلك فإن الفيرويد PBCVd له منطقة حفظ طرفية-TCR) Terminal Con- served region تبدأ من موقع ٥ إلى ٢١ وتكون من CCUGAGGUUCCUGUGGU وهذه المنطقة محفوظة فى جميع أفراد pospiviroids و apscaviroids فى مواقع مشابهة. كذلك فإن هذا الفيرويد كما فى بقية الفيرويدات النموذجية غنى بتتابع الأدينين Adenine فهو من هذه الناحية يتضمن ١٣ مركز من ضمنها ١٠ ادينين بين موقعى ٤٢ و ٤٥ وهو كذلك غنى فى تتابع اليوراسيل Uracil ففيه ١١ قاعدة يوراسيل فى موضعى ٢٣٧ و ٢٤٧.



شكل رقم ٧٤ :

التركيب الثانوى المتوقع لفيريد PBCVd. منطقة TCR محددة بالإعلام ومنطقة CCR فى الخيط العلوى محددة بدوائر سوداء أما فى الخيط السفلى محددة بدوائر غير مطموسة.

مقارنة فيروس PBCVd مع فيروسات أخرى:

يتميز فيروس PBCVd بأن فيه تماثل تتابع كلي عال متشابه مع فيروس GIBVd و CBLVd. (٥٢,٤% للأول و ٥٠,٦% للثاني). إن التشابه بين هذا الفيروس وبين الفيروسات الأخرى يتضمن بالإضافة إلى ال ٣٣ موقع النموذجي من CCR العلوية والسفلية الموجودة في جميع أفراد تحت مجموعة ASSVd و ١٢ موقع في TCR فإن هناك تتابعات أخرى عديدة متوزعة بطريقة سمتية على نفس الخط في هذه الفيروسات. كذلك فإن فيروس PBCVd يحوى أيضاً مناطق والتي هي ذات علاقة للتتابع الموجود في الفيروسات الأخرى. هذه العلاقة التتابعية تدل على أن فيروس PBCVd له تركيب معين يتكون من تتابع فريد عن الفيروسات التي تنتمي إلى تحت مجموعات الفيروسات الأخرى. إن الجزء الأيسر من هذا الفيروس يماثل فيروسات تحت مجموعة فيروس الدرنه المغزلية في البطاطس، بينما الجزء الأيمن يشمل منطقة CCR فيه مناطق تشابه تلك الموجودة في فيروسات تحت مجموعة B₂. هناك إمتدادات قصيرة من المراكز تقع بين مركز ١٦٦ و ٢٥٧ تظهر تماثل متطابق مع ASBVd و فيروس CTiVd و PLMVd.

الصفات العامة للفيروس:

إن تتابع النيوكليوتيدات الكامل للفيروس PBCVd يبين أنه جزئ دائري يمتلك عناصر تركيبية مشتركة مع الفيروسات النموذجية الأخرى، إنه يحوى CCR مشابه لما هو في مجموعة apscaviroids ولكن يفتقر إلى النهاية الطرفية -3' التي فيها U في الخيط السفلي والموجودة في الأفراد الأخرى من تحت هذه المجموعة. وبالتالي فإن التتابع المحفوظ من ال CCR في تحت مجموعة apscaviroids تنخفض إلى ٣٣ موقع من النيوكليوتيدات، ١٦ منها متعلق بالخيط العلوى و ١٧ للخيط السفلى. كذلك فإن الفيروس PBCVd يحتوى ال TCR الموجودة في تحت مجموعة pospiviroids وتحت مجموعة apscaviroids ومنطقة غنية بالادين في الموقع العادى على الجانب الأيسر من الخيط العلوى. وعلى أية حال فإن هذه

المنطقة الأخيرة ليست أزواج قواعد مع التابع الغنى باليوراسيل الموجود في الخيط المقابل في التركيب الثنائي للفيروس PBCVd من موقع ٢٣٧ إلى ٢٤٧ بالمقارنة مع تلك الموجودة في الفيروسات النموذجية.

إن الصفة الغريبة لهذا الفيروس هي عدم وجود تنوعات تتابع له. إن هذه الظاهرة تتكرر في حالات معينة مع الفيروسات التي تخضع لعمليات تصفية في العائل، في هذه الحالة يمكن أن تختفى ظاهرة تنوعات التابع، أما هنا فلا يخضع الفيروس لمثل هذه التصفية وبالتالي فإن هذه الصفة متأصلة فيه. إن تماثل التتابع الملاحظ في PBCVd يمكن أن يكون دلالة على تركيب قوى أو / و وظيفة إجبارية. إن شرح التتابعات الإضافية الموجودة في عزلات أخرى للفيروس PBCVd والتي تحدث تفاعل مشابه في شجرة الكمثرى الكاشفة A20 ستساعد في توضيح هذا السؤال مستقبلاً إن شاء الله.

ونظراً لأن الأجزاء المختلفة من PBCVd أيضاً تظهر تماثل ملحوظ مع فيروسات من تحت مجموعات أخرى يؤدي إلى القول بأن هذا الفيروس قد نشأ عن طريق إعادة الاتحاد في RNA، هذه الاحتمالية قد فرضت للفيروسات الأخرى. في غالبية الحالات فإن إعادة الاتحاد يبدو أنها تتدخل في تغيير قطع بين الفيروسات التي تتبع إما لنفس تحت المجموعة أو لأخرى قريبة العلاقة بها. وعلى أية حال فإن إعادة الاتحاد بين الفيروسات من تحت المجموعات المختلفة ملاحظة بشكل خاص في بعض أفراد apscaviords. إن العائل المتعاون في دعم تناسخ الفيروسات المختلفة يمكن أن يسمح في تغيير RNA. وقد ذكر في هذا المجال ما يحدث في الكمثرى من عزلة فيروس pear - HSVd وفيرويديين آخرين مشابهيين في الحجم والتتابع للفيروس ASSVd. وعلى أية حال فإن PBCVd يبدو أنه قد نشأ بواسطة إعادة الاتحاد بين هذه الفيروسات، بالإضافة إلى عوائل مختلفة من الكمثرى تخدم كوسيط إحتياطي لفيروسات مميزة وتسمح بحوادث إعادة الاتحاد بينها.

أخيراً فإن التركيب الثانوى المتفرع على أقل طاقة حرة متحصل عليها للفيروس PBCVd تدل على أن هذا الفيروس لا يتطابق مع التركيب شبه العصى. إن هذا الوضع ليس فريداً للفيروس PBCVd بل يمكن أن يحدث هذا الشيء لأفراد كثيرة من تحت مجموعة apscaviroids حيث أنها تحدث شكل متفرع باستثناء AGVd تحت ظروف معينة. إن تكوين الشكل المتفرع قد افترض أيضاً لكثير من الفيروسات من ضمنها ASBVd وفيروس تقزم قمة الطماطم TASVd وفيروس PLMVd وغيرها.

العوامل المشخصة :

إن طريقة PAGE وطريقة Northern blotting ذات فائدة كبيرة فى سرعة اكتشاف الفيروس، بينما فى النباتات الكاشفة يحتاج الفيروس إلى يومين حتى ينتقل من اللقاح إلى النبات. مع أن نبات الخيار يستطيع أن يبقى ويساند تكاثر الفيروس PBCVd إلا أنه ليس عامل مشخص جيد لأنه لا يتفاعل ويعطى أعراض واضحة مع الفيروس. إلا أن العائل المشخص هو ما ذكر فى أول هذا الموضوع وهو الكمثر *Pyrus communis* A20. وجد أن الفيروس لا يتكاثر فى *Gynura* ولا فى الطماطم ولا الأقحوان.

للفيروس ثلاثة عزلات متماثلة هى P2098T، P1914T و P49T.

٣- فيروسات العنب

Grapevine Viroids

مقدمة :

هناك عدة فيروسات وكائنات أخرى شبيهة بالفيروسات ذكر بأنها تهاجم أصناف العنب والأصول النباتية التي يطعم عليها العنب. وإن عمليات الحصر التي تؤدي إلى تقدير إنتشار هذه المسببات المرضية خلال مدى واسع من المصادر المدروسة جيداً أظهر بأن الفيروسات موجودة في جميع النباتات المختبرة في استراليا، فقط بعض البادرات تبين أنها خالية من الفيروسات وهذا يرجع لعدم إنتشار الفيروس خلال البذور.

إن هذا الإنتشار الواسع لجزيئات الفيروس من المحتمل أن يكون نتيجة لعدة عوامل والتي تعرف بأنها مناسبة لانتقال الفيروس والعوامل الممرضة الشبيهة بالفيروس وهذه العوامل تشمل التكاثر الخضرى المستمر للعنب على زمن طويل وأجيال متتابعة، الاستعمال المستمر للأصول ذات الكفاءة العالية والتي هى مصابة بالفيروس، استعمال المواد النباتية بطريقة غير صحيحة واحتمالية الانتقال الميكانيكى عن طريق الأدوات الزراعية خلال التقليم والجمع.

تعرض شجيرات العنب *Vitis vinifera* للإصابة بالعديد من الأمراض تظهر هذه الأمراض على شكل التفاف الأوراق، تبرقش الأوراق، تفلن القلف وتنقر الخشب، النقط الصفراء. تنتشر هذه الأمراض فى معظم زراعات العنب فى العالم وتسبب خسائر إقتصادية هامة. كانت تعزى هذه الأمراض إلى مسببات فيروسية وذلك

بالاعتماد على طرق نقلها وبسبب الأعراض التي تحدثها وتشبه تلك المتسببة عن فيروسات. بعد الدراسات العديدة تبين أن مسببات هذه الأمراض هي فيروسات.

إن أول التقارير التي كانت تشير إلى وجود الفيروسات في العنب كانت سنة ١٩٨٤، حيث ذكر العالم Sano et al في اليابان أنه أمكن عزل فيروسات من العنب. كذلك سنة ١٩٨٥ ذكر Flores et al في أسبانيا أن كثير من نباتات العنب مصابة بالفيروس وقد أمكنه عزل بعض الفيروسات من العنب وفي سنة ١٩٨٦ ذكر في كاليفورنيا ظهور أعراض مرضية بالفيروس في نباتات العنب. بعد ذلك إنتشرت الدراسات على فيروسات العنب.

لقد أجريت دراسات عديدة على فيروسات العنب واكتشفت فيروسات عديدة في مناطق جغرافية مختلفة وكان يعطى لهذه الفيروسات أسماء مختلفة حتى أن الفيروس الواحد في منطقتين مختلفتين يعطى إسمين مختلفين. إن إنتشار الأبحاث وكثرة اكتشاف فيروسات على العنب جعل من الصعوبة بمكان حصر هذه الفيروسات مع كثرة هذه المسميات، مما حدى بالمؤتمر الدولي العاشر لدراسة الأمراض الفيروسية والأمراض الشبيهة بالفيروس على العنب المسمى International Council For The Study of Viruses And Virus - Like Diseases of The Grapevines (ICVG) المنعقد في اليونان سنة ١٩٩١ وكذلك المؤتمر الدولي لدراسة الفيروسات (ICTV) International Committee On Taxonomy of Viruses سنة ١٩٩٢ بتحديد أسماء الفيروسات التي تصيب العنب في خمسة أنواع، بغض النظر عن جميع الأسماء السابقة أو الأماكن الجغرافية التي اكتشفت فيها والأسماء هي: -

- ١ - مجموعة الفيروسات التي هي عزلات من فيروس اكسوكورتر الحمضيات ويرمز لها g - CEVd
- ٢ - مجموعة الفيروسات التي هي عزلات من فيروس تقزم حشيشة الدينار ويرمز لها g - HSVd

٣ - مجموعة الفيروسات التي تصيب العنب الاسترالي وتكتب AGVd

٤ - مجموعة الفيروسات التي تسبب مرض النقطة الصفراء فى العنب Yellow Speckle وهى تسبب أمراض واضحة على العنب وتتكون من فيروسين :-

أ - فيروس النقطة الصفراء فى العنب رقم ١ ويكتب باختصار GYSVd - 1

ب - فيروس النقطة الصفراء فى العنب رقم ٢ ويكتب باختصار GYSVd - 2

المجموعة الأولى يمثلها فيروس واحد هو فيروس اكسوكورتز الحمضيات عزلة العنب CEVd - g وكذلك المجموعة الثانية يمثلها فيروس تقزم حشيشة الدينار عزلة العنب HSvd - g. إن هذين الفيروسين لم يذكر أنهما يسببان أعراض واضحة على العنب ولكنها تعزل من العنب المصاب بالأمراض.

كذلك فإن المجموعة الثالثة لا تسبب أعراض واضحة على العنب وهى عبارة عن فيروس منتشر فى استراليا بشكل كبير وهو يعزل من جميع نباتات العنب التى يظهر عليها أعراض مرضية. هناك محاولة من بعض العلماء بإضافة فيروس آخر لهذه المجموعة يعزل من الخيار إلا أنه لغاية ١٩٩٤ لم يوافق على إضافة هذا الفيروس. أما المجموعة الرابعة فهى تشمل الفيروسات التى تسبب مرض النقطة الصفراء فى العنب وتكون أعراضها ظاهرة.

لقد أجمعت المؤتمرات الدولية أن فيروسات العنب لا تنمى هذه المجموعات بغض النظر عن التوزيع الجغرافى أو المسميات القديمة.

أما من حيث التصنيف فإن المجموعة الأولى والثانية، تتبع فيروسات المجموعة B وتحت مجموعة B₁ الذى يمثلها فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس PSTVd. أما فيروسات المجموعة الثالثة والرابعة فهى تتبع فى التصنيف فيروسات تحت

مجموعة B₂ الذى يمثلها فيروس ندب الجلد فى التفاح والذى يكتب ASSVd. إن جدول ٥١ يبين هذه المجموعات وبعض صفاتها.

جدول ٥١: يبين مجموعات فيروسات العنب وبعض صفاتها.

اسم الفيروس الحالى	عدد النيوكليوتيدات	مجموعة التصنيف	المرض على العنب	عائلة العنبى	بعض الأسماء القديمة
CEVD - g	٢٧١	تحت مجموعة B ₁	لم تذكر أعراض على العنب	الطماطم	GVs
HSVd - g	٢٩٧	تحت مجموعة B ₁	لم تذكر أعراض على العنب	الخيار	GV3
AGVd	٢٦٩	تحت مجموعة B ₂	بدون أعراض	الطماطم والخيار	—
GYSVd - 1	٢٦٧	تحت مجموعة B ₂	نقطة صفراء	غير محدد	GVF, GV1
GYSVd - 2	٢٦٢	تحت مجموعة B ₂	نقطة صفراء	غير محدد	GV2, GV1B

١ - فيروس العنب عزلة فيروس تقزم حشيشة الدينار

Hop Stunt Viroid - Grapevine HSVd - g

لقد أمكن عزل فيروس من زراعات العنب فى اليابان وكان أصل هذه الزراعات مستورداً من أوروبا الغربية وأستراليا وأمريكا بالإضافة إلى الزراعات الأصلية فى اليابان، ولقد وجد هذا الفيروس فى ٢٨ نوع من العنب من بين ٣٢ نوع إختبرت أى بنسبة ٨٨٪. إن هذا الفيروس عبارة عن عزلة من فيروس تقزم حشيشة الدينار. إن هذه العزلة من الفيروس لها مدى عائلى وتسبب أعراض فى نباتات الخيار مشابهة تماماً لتلك التى يسببها فيروس تقزم حشيشة الدينار HSVd. إن تتابع النيوكليوتيدات فى هذه العزلة سواء المأخوذة من فرنسا أو ألمانيا أو هنجاريا أو اليابان متشابهة تماماً وهى تشكل جزئ دائرى يتكون من ٢٩٧ نيوكليوتيدة. إن هذا التتابع الموجود فى هذه العزلة يختلف عن ذاك التتابع الموجود فى الفيروس الأصلى لتقزم حشيشة الدينار HSVd بنيوكليوتيدة واحدة فقط، وتقل عن عزلة HSVd - c (عزلة الخيار) بستة نيوكليوتيدات وفيها ١٥ نيوكليوتيدة مختلفة. هذا الفيروس هو HSVd - g فيه

٩٥٪. تماثل تتابع. إن هذا الفيروس أطلق عليه فيروس تقزم حشيشة الدينار عزلة العنب وذلك لأنه يعزل دائماً من العنب الذى تظهر عليه بعض الأعراض المرضية واعتماداً على ذلك فقد إقترح بأن العنب هو مصدر فيروس تقزم حشيشة الدينار فى اليابان.

يؤثر هذا الفيروس على أعناب الخمر فى جميع أنحاء العالم سواء كانت أصول أو مطعومة. إذا حقنت هذه العزلة فى نباتات الخيار فإنه يظهر على الخيار أعراض تقزم وشفافية عروق وتتجمع الأوراق، يحدث ذلك بعد ٣ - ٤ أسابيع من الحقن، أما عند حقن هذه العزلة فى حشيشة الدينار فإن ظهور الأعراض يتأخر أسبوع عن أعراض العزلة الأصلية من فيروس تقزم حشيشة الدينار.

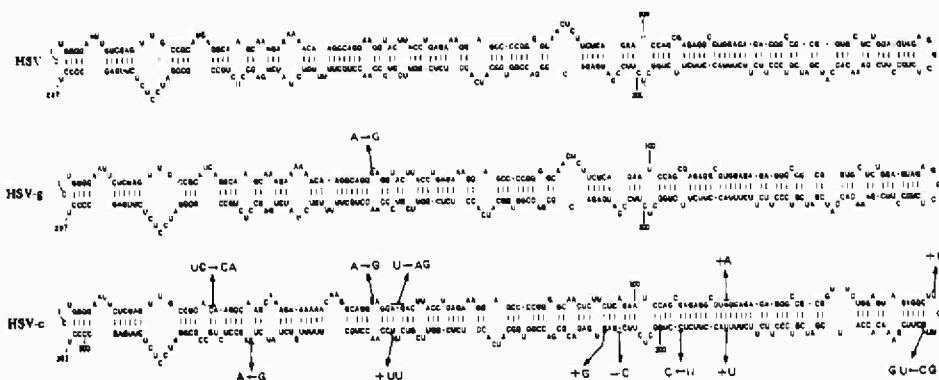
كما ذكرنا سابقاً فى هذه العزلة مشابهة فى عدد النيوكليوتيدات لفيروس تقزم حشيشة الدينار فهى تتكون من ٢٩٧ نيوكليوتيدة وتبلغ نسبة تماثل التتابع فيها ٩٩٪ بالنسبة للعزلة الأصلية HSVd، و ٩٥٪ بالنسبة لعزلة الخيار HSVd - c، إلا أن عزلة HSVd - g تقل بستة نيوكليوتيدات عن عزلة الخيار (شكل ٧٥). تختلف عزلة العنب عن الفيروس الأصلي HSVd فقط فى موقع الأدينين على مركز ٥٤ فى HSVd ويصبح جوانين فى عزلة العنب. كذلك فإن عزلة العنب تختلف عن عزلة الخيار فى ١٥ نيوكليوتيدة، إلا أن موقع ٥٤ فى عزلة الخيار يشبه عزلة العنب فى كونه جوانين. وبالتالي يمكن القول بأن التركيب الثانوى المقترح لعزلة العنب يشبه تماماً تركيب الفيروس الأصلي HSVd.

من الصعوبة تمييز الأعراض على الخيار المتسببة عن العزلات الثلاثة (العنب - الخيار وحشيشة الدينار) إلا أن عزلة العنب أكثر قريباً وعلاقة مع الفيروس الأصلي HSVd من عزلة الخيار.

هناك تفسيرات عديدة لوجود عزلة من الفيروس HSVd تهاجم العنب، بعض هذه الاقتراحات تقول إن الأصل هو فيروس يصيب العنب ومنه نشأت سلالة

تصيب حشيشة الدينار وذلك لأن العنب قد دخل اليابان قبل حشيشة الدينار وأن كلاهما يزرع في مناطق متقاربة وبالتالي يمكن أن يكون الأصل هو فيروس العنب ومنه نشأ فيروس حشيشة الدينار. كذلك هناك من يؤكد هذا الكلام ويقول إن بعض الدول الأوروبية فيها سلالة العنب بدون أن يكون فيها زراعات حشيشة الدينار.

لا ينتقل هذا الفيروس عن طريق البذور وبذلك لا يمكن اكتشافه في البادرات الحديثة الناجمة عن زراعة البذور. يمكن التخلص من الفيروس عن طريق استعمال (FSAC) Fragmented shoot apex culture حيث يمكن الحصول على شتلات خالية من الفيروس بهذه الطريقة.



شكل رقم ٧٥:

تتابع النيوكليوتيدات والتركيب الثانوي المقترح في كل من HSVd - g، و HSVd - c. النيوكليوتيدات المختلفة عن HSVd مشار إليها بأشهر.

ب - فيروس العنب عزلة فيروس اكسوكورتز الحمضيات

Citrus Excocortis Viroid - Grapevine CEVd - g

لقد ذكر العالم Flores سنة ١٩٨٥ أن شجيرات العنب يمكن عزل فيروسات كثيرة منها وذكر أن بعض هذه الفيروسات هو سلالة من فيروس اكسوكورتز الحمضيات. باستعمال طريقة التحليل PAGE لمستحضرات أحماض نووية حصل عليها من عدة أصناف من العنب مصابة بأمراض فيروسية مختلفة، بعد تنقية هذه الفيروسات المرافقة وجد فيها فيروس مشابه لفيروس اكسوكورتز الحمضيات. لقد أثبت العالم Flores et al سنة ١٩٨٥ أن هناك فيروسات تستخلص من العنب هذه سلالة من سلالات فيروس اكسوكورتز الحمضيات وسماها عزلة العنب-Citrus Excocortis Viroid - Grapevine cocortis Viroid - Grapevine وتكتب باختصار g - CEVd.

اكتشاف الفيروس:

بتحليل الأحماض النووية المأخوذة من عديد من أصناف العنب تبين وجود جزيئات من RNA صغيرة مستقيمة ودائرية والتي ينطبق عليها وصف الفيروسات. عند حقن نباتات *Gynura aurantiaca* ببعض تحضيرات الحمض النووي المأخوذة من العنب أدى إلى ظهور أعراض نموذجية للأعراض التي يحدثها فيروس اكسوكورتز الحمضيات CEVd وبعض الفيروسات الأخرى، ولكن باستعمال الهجرة الكهربائية وجد أن هذه الأعراض متسببة عن CEVd لوحده. وبدراسة مقارنة للهجرة الكهربائية ظهر نموذجين للفيروسات النموذج الأول جزيئاته شبيهة بالفيروس أطلق عليه اسم فيروس العنب السريع (GVd - f) وهو أسرع في حركته في الهجرة الكهربائية من فيروس CEVd تحت الظروف الطبيعية أما تحت ظروف الدنترة فإنه يسلك سلوك مشابه لما يظهر في الجيل من RNAs المستقيمة بينما لا يوجد اختلاف ملحوظ في حالة الأشكال الدائرية.

أما النموذج الثاني فهو عبارة عن فيروس حصل عليه من نباتات *G. aurantiaca* نتيجة لحقنها بحمض نووي من مستخلصات مأخوذة من العنب وسمى فيروس العنب البطيء (GVd - f). وهذا الفيروس يهاجر مشتركاً مع CEVd في كل نظام من أنظمة الهجرة الكهربائية المستعمل في التحليل.

إن الفرق في حركة الهجرة الكهربائية بين GVd - s و GVd - f يمكن أن يوضح بافتراض أن GVd - s ذو وزن جزيئي أكبر من GVd - f، إلا أن اختلاف الحجم هذا لم يكتشف في حالة الأشكال الدائرية تحت ظروف الدنترة، قد يكون ذلك بسبب إنخفاض حركة الأشكال الدائرية من الفيروس تحت هذه الظروف. الاختلافات في التركيب (البنية) عدا عن الحجم يمكن أيضاً أن يزدونا بأساس لسلوك إزدواج الهجرة الكهربائية لكل من GVd - s و GVd - f.

كذلك فإن النتائج المتحصل عليها من دراسات التهجين أظهرت أن هناك تماثل تتابع متقارب جداً بين GVd - s و GVd - f وهذا متناسق مع عدم وجود اختلاف مميز في حجمهما وتشابه نوع الأعراض التي يحدثانها في *G. aurantiaca*. ومن ناحية أخرى لم يمكن اكتشاف تماثل بين GVd - f وبين الفيروس CEVd وهذا أيضاً كان متناسقاً مع عدم القدرة على الانتقال للشكل GVd - f إلى العوائل العشبية المشخصة للفيروس CEVd وهو العائل *G. aurantiaca*.

هنا يبرز السؤال الآتي هو هل GVd - f و / أو GVd - s العامل المسبب لأمراض العنب؟؟. إن أعراض التفاف الورقة وتفلن القلف وتنقر الساق، النقطة الصفراء، التقرح، موزايك العروق ونكروز العروق هي أمثلة للأمراض التي تصيب العنب والتي مسبباتها لم تحدد بعد وهل يفترض بأنها فيروسات أم فيروسات. نظراً لأن بعض هذه الأمراض ينقل بالتطعيم وأعراضها تشبه الأعراض المتسببة عن فيروسات في نباتات أخرى فقد يفترض بأنها تنسب عن فيروسات.

إلا أن الأبحاث المستمرة على العنب أثبتت أن هذه الأمراض تسبب عن

فيرويدات وهذه الفيرويدات تتشارك مع بعضها لإحداث هذه الأعراض فقد أمكن عزل خمسة فيرويدات من نباتات العنب المصابة بهذه الأمراض. نرجع إلى السؤال الأول وهو هل GVd - f و / أو GVd - s الذى يساهم مع أخواته الفيرويدات فى إحداث المرض. نتيجة التحليل والفحص وجد أن الشكل GVd - f ليس له علاقة ببعض هذه الأعراض حيث أنه وجد فى النباتات السليمة وفى النباتات المصابة فى أصناف كثيرة من العنب وبالتالي ليس له علاقة بمرض التفاف الأوراق والنقطة الصفراء فى العنب. وبالتالي يمكن القول بأن GVd - s هو العامل المسبب لكثير من الأعراض التى تظهر على نبات العنب وهو المسبب لمرض النقطة الصفراء فى العنب.

دراسات تتابع النيوكليتيديات والصفات الحيوية للشكل GVd - s أثبتت أنه يتكون من (٣٧١) نيوكليتيده وأن صفاته متماثلة وقرية الشبه من صفات فيرويد اكسوكورتز الحمضيات وبالتالي أطلق على هذا المسبب المرضى إسم عزلة فيرويد اكسوكورتز الحمضيات المسببة أمراض العنب.

جـ - فيرويد العنب الأسترالى

Australian Grapevine Viroid

مقدمة:

إن فيرويد العنب الأسترالى (AGVd) يتكون من ٣٦٩ نيوكليتيده وهو فيرويد فيه صفات غريبة عن الفيرويدات النموذجية. هذا الفيرويد فيه أقل من ٥٠٪ تتابع مشابه لأى من الفيرويدات الأخرى المعروفة. بغض النظر عن أن تتابعه الكامل يمكن تقسيمه إلى مناطق كل منها بتتابع عال مشابهاً بذلك لقطع من فيرويد اكسوكورتز الحمضيات CEVd، فيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس PSTVd، فيرويد ندب الجلد فى التفاح ASSVd وفيرويدات النقطة الصفراء فى العنب. إن فيرويد AGVd يحتوى المنطقة المركزية المحفوظة كاملة لمجموعة فيرويد ASSVd

وبالتالى يعتبر فرداً من هذه المجموعة. يبدو أن فيرويد AGVd قد نشأ من ظاهرة إعادة الاتحاد فى كثير من RNAs الداخلة فى الفيرويدات الأخرى. إن طريقة تكاثر العنب خضرياً والتي فيها تؤخذ العقل من شجيرات العنب السابقة وهذه من التى قبلها وهكذا فمن الممكن أن يكون قد حدث إصابات متضاعفة متسببة عن عدة فيرويدات لهذه الشجيرات خلال تاريخ زراعتها الطويل وهذه الفترة الطويلة قد تكون سمحت لإعادة الاتحاد بين الفيرويدات المختلفة وأدت إلى نشوء هذا الفيرويد.

لقد عزل فيرويد العنب الاسترالى AGVd أساساً من الأعناب التى تزرع فى استراليا وهو منتشر بشكل كبير هناك وأول اكتشاف كان له فى إستراليا وبالتالى أطلق عليه اسم فيرويد العنب الاسترالى. عند وجود هذا الفيرويد فى شجيرات العنب يؤدي إلى حدوث مجموعة من الأعراض المرضية التى ذكرناها فى الفيرويد السابق، إلا أن أهم الأعراض المميزة والتى أطلقت على هذا الفيرويد هى النقطة الصفراء فى العنب. إن عزل هذا الفيرويد من الأعناب التى فيها مرض النقطة الصفراء فى العنب لا يعنى وجوده لوحده فى العنب وإنما يشترك معه فى إحداث هذه الأعراض فيرويد البقعة الصفراء فى العنب رقم ١ ورقم ٢ والتى تسمى Grapevine Yellow Speckle Viroid (GYSVd - 1 , GYSVd - 2) وكذلك يشترك معه عزلات اكسوكورتر الحمضيات CEVd - g وعزلة فيرويد تقزم حشيشة الدينار HSVd - g. يمكن تمييز هذا الفيرويد عن بقية الأربعة فيرويدات الأخرى بواسطة الهجرة الكهربائية فى الجيل وكذلك بواسطة قدرته على التناسخ فى الخيار والطماطم وعدم قدرته على التهجين مع منقبات فيرويدات أخرى. إن التركيب الكامل للفيرويد AGVd يظهر أنه جزئى مركب طبيعياً والذى يمكن أن يكون قد نشأ من إعادة الاتحاد من فيرويدات أخرى وهذه الظاهرة معروفة بين الأحماض النووية وتسمى Recombination.

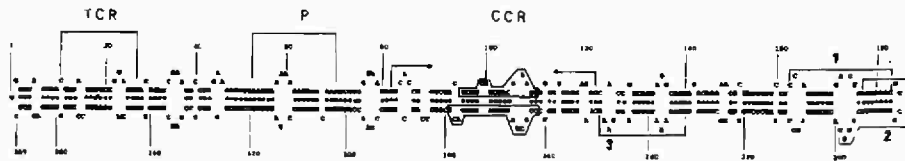
تتابع النيوكليوتيدات الكامل للفيرويد AGVd :

إن تتابع النيوكليوتيدات فى الفيرويد وتركيبه الثانوى المقترح يظهر فى شكل ٧٦. إن فيرويد AGVd هو جزئى دائرى من RNA يتكون من ٣٦٩ نيوكليوتيدة

وهذه النيوكليوتيدات موزعة كالآتي: C ١٠٣ بنسبة ٢٧,٩٪، G ١١١ بنسبة ٣٠,١٪، A ٧٦ بنسبة ٢٠,٦٪ و U ٧٩ بنسبة ٢١,٤٪. وإن نسبة C + G تساوى ٥٨٪ وهى تتشابه فى كثير من الفيرويدات. وكما هو معروف بالنسبة لكل الفيرويدات فإنه لا يشفر لأى بروتين.

إن التركيب الأولى للفيرويد AGVd يترتب بحيث يسمح بتكوين أعلى درجة من تزاوج القواعد كما فى شكل ٧٢. الشكل الناتج يكون شبه عصوى نموذجى للفيرويدات. من مجموع القواعد فإن ٦٩٪ من هذه القواعد هى أزواج والمراكز المتزاوجة تتكون من GC ٥٤,٧٪ و AU ٢٩,٧٪ و GU ١٥,٦٪. عند مقارنة فيرويد AGVd مع فيرويدات أخرى مثل ASSVd الذى هو من مجموعته تبين أن AGVd يحتوى أكبر عدد من قواعد الأزواج غير المتقاطعة الممتدة وبالتالي يبدو بأنه أكثر التراكيب الثانوية ثباتاً.

كما فى جدول ٥٢ هناك إختلاف مفرد واحد فى التتابع وجد فى كلون cDNA والذى فيه الموقع رقم ٥٥ قد حذفت منه النيوكليوتيدة. من الممكن أن مرور AGVd خلال نبات الخيار لتنقيته كان له تأثير تصفية فى إستبعاد تنوعات التتابع فى هذا الفيرويد، فى حين أن فيرويدات العنب الأخرى 1 - GYSVd وكذلك 2 - GYSVd فيها العديد من تنوعات التتابع.



شكل رقم ٧٦ :

التركيب الثانوى المقترح لفيرويد AGVd. المراكز المحدودة بصناديق هى المنطقة المركزية المحفوظة فى الخيط العلوى والسفلى من فيرويد ASSVd. تشير الأسهم إلى التتابع الذى يمكن أن يكون تركيب متعكس. الأرقام ١، ٢، ٣ تشير إلى البرايمر المستعمل.

جدول ٥٢ : تعاقب ازواج القواعد فى فيروسات مجموعة الفيرويد ASSVd .

التكرار فى الفيرويدات				طول منطقة ازدواج القواعد
AGVd	GYSVd - 2	GYSVd - 1	ASSVd	
٦	٦	٤	٤	٤
٥	٥	٥	٤	٥
٣	٣	١	١	٦
١	—	—	١	٧
٢	—	—	—	٨
—	—	—	١	٩
١	—	—	—	١١
١٠١	٦٧	٤٧	٥٨	مجموع ازواج القواعد فى المناطق المذكورة أعلاه
٣٦٩	٣٦٣	٣٦٧	٣٣٠	عدد النيوكليوتيدات الكلى

تركيب النطاقيات فى الفيرويد AGVd :

إن المنطقة المركزية فى الفيرويد AGVd (كما فى شكل ٧٦) تشمل جميع التتابعات المحفوظة فى مجموعة فيروسات ASSVd . هذه المنطقة المحفوظة تتكون من ١٦ مركز فى الجزء السفلى و ١٨ مركز فى الجزء العلوى من التركيب الثانوى للفيرويد وهى إبتداءً من رقم ٩٥ إلى رقم ١١٠ فى الخيط العلوى وإبتداءً من رقم ٢٦٢ إلى ٢٧٩ فى الخيط السفلى . هناك مركزين غير متوافقين محددين فى المنطقة المحفوظة السفلية فى الفيرويد ASSVd (موقع ٢٢٩ و ٢٢٨) وكذلك فى فيرودين آخرين من هذه المجموعة، وهذا راجعاً إلى بعض الأخطاء فى طباعة

الكمبيوتر الذى استعمل فى دراسة تتابع ASSVd. وبالتالي فإن المنطقة المركزية المحفوظة كلها CCR فى الفيروس ASSVd هى نفسها فى كل من 1 - GYSVd و 2 - GYSVd وفى AGVd.

إن التابع المحفوظ العلوى فى الفيروس AGVd والثلاثة عشر مركزاً المحيطية الجانبية على أربعة جوانب (٤٢ مركز) عندها القدرة لأن تعمل تزاوج قواعد مع نفس التابع من ٤٢ مركز موجوداً فى جزئ آخر من AGVd أو فى أى منطقة من جزئ Multimeric من AGVd ليشكل تركيب متعاكس Palindromic وقد اقترح أن هذا الارتباط يشكل مواقع إنشطار لوحدة طول فى الفيروسات. إن التابع ال ٤٢ مركز فى AGVd والمراكز المماثلة لها فى الخيط السفلى يمكن أن تنفرد وتكون شكل صليب فى الفيروس.

نطاقات المرضية والأطرف:

Pathogenicity and Terminal Domains

يبدأ نطاق المرضية فى هذا الفيروس من المركز ٥٣ ويمتد إلى مركز ٧٠ فى الخيط العلوى. هذا التابع يشابه نطاق المرضية فى الفيروسات الأخرى. إن تتابع AAAGAAAA موجود فى نطاقات المرضية فى معظم فيروسات تحت مجموعة B₁ وهو موجود فى الفيروس AGVd من مركز ٥٣ إلى مركز ٦١. عند مقارنة نطاق المرضية فى فيروس AGVd مع الفيروسات الأخرى نجد أنه أكثر انتظاماً فى قواعد الأزواج وفيه عروة واحدة فقط. إن ثبات تتابع أزواج القواعد فى نطاق P فى الفيروس AGVd يتوافق مع قلة حدوث التغيرات المرضية فى النباتات العشبية وهذه الظاهرة ملاحظة أيضاً فى فيروس PSTVd حيث أن زيادة ثبات أزواج القواعد فى تتابع نطاق P يرتبط مع نقص الشدة المرضية للفيروس.

أما المنطقة الطرفية اليسرى للفيروس AGVd فهى تشمل تتابع ١٧ نيوكليوتيدة من مركز ١١ إلى ٢٧ والتى تكون محفوظة فى مواقع نموذجية أو مشابهة لمعظم

الفيروسيدات الأخرى. علاوة على ذلك فإن جميع الفيروسيدات ذات الحجم الجزئى الذى يقارب من ٣٦٠ نيوكليتيده تحتوى هذا التتابع، بينما تلك التى هى أقل من ٣٠٠ نيوكليتيده تفتقر إلى هذا التتابع. إن دور هذه المنطقة الطرفية المحفوظة TCR فى تناسخ الفيروسيد والمرضية غير معروف (١٩٩٢).

مقارنة الفيروسيد AGVd مع الفيروسيدات الأخرى:

إن الفيروسيد AGVd يظهر أقل من ٥٠٪ من تماثل التتابع الكلى الذى يتشابه مع أى من الفيروسيدات المعروفة الأخرى. إن أعلى تتابع متشابه لوحظ هو ٤٩٪ يحدث بين AGVd وأى من فيروسيدات مجموعة ASSVd أو CEVd. إن التماثل بين AGVd و GYSVd - 1 يشمل ٣٤ مركز متطابق فى المنطقة العلوية والسفلية من CCR والتى توجد فى كل أفراد مجموعة ASSVd. وبالتالي فإنه فى خارج CCR فإن الفيروسيد AGVd فيه تماثل تتابع أعلى مع فيروسيد CEVd منه مع GYSVd - 1.

مع أن تماثل التتابع الكلى بين AGVd و CEVd هو فقط ٤٩٪، إلا أن هناك مناطق معينة فى هذين الفيروسدين فيهما تماثل تتابع تام واصطفاف هذه المناطق يكون على نفس الخط بالنظر للتركيبات الأولية لجزيئات هذين الفيروسدين. إن الإستثناء الوحيد هو تتابع من ٢١ مركز والتي تشكل نصف المنطقة العلوية CCR فى الفيروسيدات من مجموعة PSTVd. هذا التتابع المحفوظ يحدث على جانب اليد اليمنى من CCR السفلى فى الفيروسيد AGVd.

إن الجزء العلوى من AGVd يحتوى مناطق بالإضافة إلى CCR والتي تكون غالباً أكثر قرباً وعلاقة مع التتابعات فى ASSVd. وأخيراً فإن هناك مجموعة من تسعة مراكز بين نطاق P و TCR فى الفيروسيد AGVd وهى من ٣٥ - ٤٣ والتي توجد فى المناطق المماثلة من الفيروسيد GYSVd - 1.

بالنظر إلى جميع هذه التتابعات المتماثلة، تقريباً فإن جميع تتابعات الفيروسيد AGVd يمكن أن تفسر عن طريق وجود علاقة تتابع فى CEVd، ASSVd، GYSVd - 1.

وفى ال CCR فى مجموعة الفيرويد PSTVd وهذا يدل على أن AGVd مركب من تتابعات مكونة من ١٢ مجموعة محددة.

د - فيرويدات النقطة الصفراء فى العنب

Grapevine Yellow Speckle Viroids

مقدمة :

كان أول ذكر لمرض النقطة الصفراء فى العنب سنة ١٩٧٢ فى استراليا وذلك من قبل العالم Tayler. إن النقطة الصفراء مرض يصيب العنب وهو واسع الإنتشار فى المناطق المروية فى استراليا حيث يزرع معظم أنواع عنب الزبيب والخمور. تكون أعراض المرض عبارة عن نقط صغيرة وبثرات صفراء منتشرة فوق سطح الورقة، وهذه الأعراض تكون سائدة فى شهور الصيف الحارة فى النباتات المصابة. مع أن المرض شبيهة فى أعراضه مع الأمراض الفيروسية فى الطبيعة، إلا أنه لم يمكن عزل أجزاء فيروسية من الأنسجة المريضة وبذلك إقتراح بأن هذا العامل المسبب للمرض هو فيرويد وذلك قبل العالم Bovey ورفقاه سنة ١٩٨٠ وكذلك Flores et al سنة ١٩٨٥.

إن مرض النقطة الصفراء فى العنب Grapevine Yellow Speckle Disease قد تبين بأنه يتسبب بشكل مستقل عن فيرودين مختلفين يعرفان باسم:

(GYSVd - 1) Grapevine Yellow Speckle Viroid - 1

(GYSVd - 2) Grapevine Yellow Speckle Viroid - 2

إن كلا الفيرودين عضوين فى تحت مجموعة فيرويدات B₂ التى يمثلها فيرويد ندب الجلد فى التفاح ASSVd وفيها ٧٣٪ تماثل تتابع. إن كلا الفيرودين الأول والثانى قد اكتشفا فى الأعناب المظهرة للأعراض المرضية وغير المظهرة للأعراض فى أعناب استراليا بالإضافة لوجودهما بوضوح فى الأنسجة غير المظهرة للأعراض فى أعناب كاليفورنيا.

أولاً: فيروس النقطه الصفراء فى العنب رقم ١

Grapevine Yellow Speckle Viroid - 1 (GYSVd - 1)

لقد عزل RNA وحيد الخيط دائرى من نباتات العنب المصابة بمرض النقطه الصفراء وسمى هذا الحمض باسم فيروس النقطه الصفراء فى العنب رقم ١ وهو يحتوى ٣٦٧ نيوكليتيده وعنده المقدرة على أن يكون تركيب ثانوى شبه عصوى الذى تتصف به الفيرويدات. إن هذا الفيرويد فيه ٣٧٪ تماثل تتابع مع فيروس ندب الجلد فى التفاح ASSVd وعنده بعض تماثل التتابع مع فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس PSTVd. إن تتابع فيروس GYSVd وصف بأنه مناسب مع تراكيب النطاقات الموصوفة فى PSTVd، إلا أن هذا الفيرويد يفتقر إلى تتابع المنطقة المحفوظة فى PSTVd. بدلاً من ذلك هناك تتابع محفوظ فى المنطقة المركزية فى الفيرويد 1 - GYSVd والتي عندها الكفاءة لتشكيل عروة ساق وتركيب متعاكس Palindromic ثابت مثل الذى تفعله المنطقة المركزية المحفوظة فى مجموعة PSTVd. هذه الصفات التركيبية تؤدي إلى الاقتراح بأن هناك منطقة محفوظة مركزية مختلفة لكل من 1 - GYSVd و ASSVd.

صفات الفيرويد 1 - GYSVd :

لقد تحدد بأن الحمض النووى المعزول من أصناف العنب المصابة بمرض النقطه الصفراء يتكون من خيط مفرد دائرى RNA. إن هذا الخيط يهاجر كخيط مفرد RNA تحت ظروف الدنترة. كما فى RNAs الدائرية الأخرى المعزولة من العنب فإن إنتاج 1 - GYSVd منخفض تقريباً فهو يعطى حوالى ١ ميكوغرام فيروس من كل كيلو غرام نسيج ورقة.

يتكون الفيرويد من ٣٦٧ نيوكليتيده وهى كالآتى G : C ٥٣٪ ، A : U ٢٦٪ و G : U ٢١٪ وإن نسبة G + C تساوى ٦٠٪.

مطابقة الفيرويد 1 - GYSVd مع نموذج نطاقات الفيرويدات:

إن فيرويد 1 - GYSVd يمتلك ٣٧٪ تماثل تتابع بالنسبة للفيرويد ASSVd. تكون المراكز المتماثلة في كلا الفيرودين غير عشوائية التوزيع ولكنها تحدث في مجموعات من أزواج القواعد في التركيب الثانوي في كلا الفيرودين. كذلك فإن هناك أيضاً بعض التماثل بين 1 - GYSVd و ASSVd مع أفراد من مجموعة PSTVd والذي تحدد في ثلاثة مجموعات من القواعد.

إن مقارنة التتابع بين 1 - GYSVd و ASSVd من ناحية ومجموعة PSTVd من ناحية أخرى يبين أن 1 - GYSVd يتطابق مع نموذج نطاقات الفيرويد المفترض من قبل Keese and Symone سنة ١٩٨٥ وهو يتكون من T₁، T₂ وهما نطاقي الطرف الأيمن والطرف الأيسر ويعتبران متغيران بين الفيرويدات المختلفة ثم نطاق P وهذا النطاق يتعلق بمرضية الفيرويد ثم نطاق C وهو المنطقة المركزية المحفوظة وهي ضرورية لتجهيز وتناسخ الفيرويد. نطاق V وهي منطقة عالية الاختلاف في التتابع.

هناك مسافة ممتدة تتكون من ١٧ مركز موجودة في منطقة T₁ من التركيب الثانوي للفيرويد 1 - GYSVd. لا يوجد تتابع في المنطقة المفترضة للنطاق T₂ تشارك مع فيرويدات من مجموعة PSTVd، ولكن هذه المنطقة محددة بواسطة إمتدادات لتتابع مشترك للفيرودين 1 - GYSVd و ASSVd. أما نطاق P فإن هناك ١٩ مركزاً من تتابع Oligopurine في هذا الفيرويد تقع بين مركز ٦١ و ٩٠ وهي ذات جزء غنى بالادينين يقع بين ٦٣ و ٧٣. في التركيب الثانوي المفترض من الفيرويد 1 - GYSVd فإن التتابع الغنى بازواج القواعد من الأدينين يتركب مع تتابع U في الخيط المقابل في مراكز ٢٩٩ - ٣٠٩. أما نطاق C، فإن فيرويد 1 - GYSVd مثل فيرويد ASSVd لا يحتوى تتابع منطقة C الشائع في جميع الفيرويدات الأخرى من مجموعة PSTVd. وعلى أية حال فإن هناك ١٦ مركز محفوظة في منطقة شبيهة لموقع المنطقة المركزية المحفوظة في PSTVd. هذه التتابعات تتدخل بكفاءة في تكوين تركيبين والتي تشابه تلك التي في منطقة C في مجموعة PSTVd.

إن الجزء العلوى من منطقة C فى فيروس GYSVd - 1 تستطيع بكفاءة أن تتخذ تكوين ساق عروة بسة عشر قاعدة محفوظة كلية مغطية قمة التركيب. المراكز المحيطة الجانبية بالتتابع المحفوظ كلية تشارك فى الساق فى الفيروس. لقد افترض أن تركيب ساق العروة يتدخل فى الانتقال بين التركيب الطبيعى للفيروس والتركيبات الهامة فى تناسخ الفيروس.

فى الفيروس GYSVd - 1 هناك ٣٦ مركزاً تتدخل فى تكوين تركيب ساق العروة. هذه الستة وثلاثون مركزاً عندها المقدرة على تكوين تركيب متعكس ثنائى مع جزئ آخر من GYSVd - 1 فى شكل مستقيم. إن هذا التركيب الثنائى المزدوج يمكن أن يتكون ضمن جزيئات GYSVd - 1 ألى Multimeric. إن الستة عشر مركزاً المحفوظة تماماً تشكل القلب المركزى فى هذا الجزء الثنائى. بناءً على ذلك يمكن القول بأن الفيروس GYSVd - 1 والفيروس ASSVd لهما منطقة محفوظة مركزية فريدة عن بقية الفيرويدات.

أما نطاق V فإنه يمتد بين مركز ١٢٢ و ١٤٥ وهو إمتداد قصير من حلزون مكون من أوليجوبيورين وأوليجوبايرمدين.

ثانياً: فيروس النقطة الصفراء فى العنب رقم ٢

Grapevine Yellow Speckle Viroid - 2 (GYSVd - 2)

كان هذا الفيروس سابقاً يسمى GVd 1B وهو مثل فيروس النقطة الصفراء فى العنب رقم ١ GYSVd - 1 يمكن أن ينتقل إلى شجيرات العنب الخالية من الفيرويدات عن طريق الحقن الميكانيكى وكل من الفيرودين يحدث أعراض مرض النقطة الصفراء فى العنب. عند تنقية الفيروس GYSVd - 2 من أصناف العنب كما فى طريقة Rezaian et al سنة ١٩٨٨ وإجراء طرق التحليل المختلف تبين أن الفيروس له تركيب ثانوى شبه عصوى (شكل ٧٧).

إن فيروس GYSVd - 2 يتكون من ٣٦٣ نيوكليوتيدة تتكون من ٦٨ A، ٧٧ U، ١٠٦ G و ١١٢ C. وبالإجمال ٦٧٪ من نيوكليوتيداته أزواج قواعد وأزواج القواعد هذه ٣٣٪ A : U و ٥٥٪ G : C و ١٢٪ G : U. هناك إختلاف فى التابع لوحظ بين كلونات cDNA للفيروس GYSVd - 2. التغيرات كانت $A \rightarrow G$ على مواقع ٣٠٠ و ٣٢٨، $C \rightarrow U$ على المواقع ٣٤٤ و $U \rightarrow C$ على موقع ٣٦٠. وهناك حذف على موقع ٨.

إن تتابع الفيروس GYSVd - 2 قورن مع تتابعات الفيروسات المعروفة الأخرى باستعمال برنامج الكمبيوتر الذى وضعه Wilbur & Lipman سنة ١٩٨٣. إن درجة التشابه بين مختلف تركيب النطاقات فى الفيروس GYSVd - 2 والفيروسات المعروفة الأخرى فى جدول ٥٣. إن هذا الفيروس يحتوى تتابع فى منطقته المركزية مشابه تماماً لذلك الموجود فى 1 - GYSVd و ASSVd. إن التتابعات المركزية فى 2 - GYSVd مختلفة تماماً عن تلك الموجود فى تحت مجموعة B₂ من الفيروسات والتي تعطى زيادة فى التأكيد عن وجود إختلاف بينهما.

إن الفيروس GYSVd - 2 قريب الشبه جداً مع الفيروس 1 - GYSVd، حيث فيه ٧٣٪ تشابه كلى معه والذى يمكن أن يتسبب عنه Cross - hybridization والذى لوحظ بين الفيروسين. إن تركيب فيروس 2 - GYSVd يتوافق مع نموذج النطاقات المقترح من قبل Keese & Symons سنة ١٩٨٥ وفيه يمكن تحديد نطاق C، P و T₁ بسهولة. إن وجود نطاق V مشكوك فى موقعه بالضبط فى هذا الفيروس حيث أن حلزون Oligopurine : Oligopyrimidine يحتوى على الأقل ٣ أزواج قواعد GC كما حدد فى نموذج النطاقات وهذا غير واضح فى الموقع العادى بين منطقتى C و T₂. أما نطاق P فى هذا الفيروس فهو غنى باليورين فى الخيط العلوى وغنى باليوردين فى الخيط السفلى والذى يؤدى إلى تماثل تتابع عال نسبياً عندما يقارن نطاق P فى 2 - GYSVd مع نطاق P فى الفيروسات الأخرى.

إن الخيط العلوى من التتابع المركزى المحفوظ الموجود فى 1 - GYSVd و 2 - GYSVd و ASSVd هو تتابع متكرر معكوس. إن التتابع المتكرر المنقلب فى العشرة قواعد يحيط جانبياً بالخيط العلوى من التتابع المركزى المحفوظ فى GYSVd 2-، وإن هذه العشرة قواعد ذات التتابع المكرر المعكوس مشابهة تماماً لتتابع العشرة قواعد التى تحيط جانبياً بالتتابع المركزى المحفوظ فى 1 - GYSVd. وعلى أية حال فإن مركز A الموجود فى موقع ٨٧ من تتابع الفيرويد 2 - GYSVd ومركز U الموجود على موقع ١١٦ من تتابع الفيرويد نفسه قد تغيرت فى 1 - GYSVd الفيرويد إلى G و C بالترتيب.

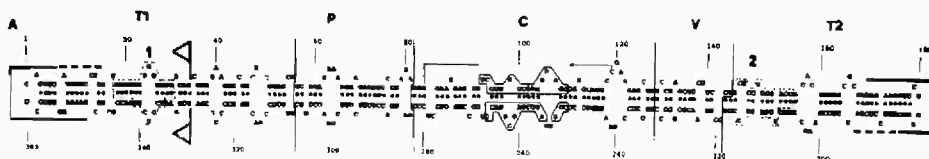
أما نطاق T_2 فى الفيرويد 2 - GYSVd فإنه بشكل عام يظهر قليل من تماثل التتابع مع نطاقات T_2 فى الفيرويدات الأخرى. وعلى أية حال هناك بعض التتابع المحفوظ بين نطاقات T_2 فى 2 - GYSVd و 1 - GYSVd و ASSVd. إن المراكز من ١٧٠ إلى ١٨٥ فى الجزء الطرفى من منطقة T_2 من الفيرويد 2 - GYSVd مكررة فى الجزء الطرفى من منطقة T_1 (مراكز ٣٥١ - ٦). إن التكرار فى منطقة T_1 غير كامل بسبب الثلاثة مراكز الزائدة عن ما هو موجود فى T_2 الموجودة فى مواقع ٣٥٦، ٣٥٧ و ٥. إن النهاية 3' فى كل تتابع مكرر محاطة جانبياً بواسطة منطقة غنياً باليوردين. إن التكرار المباشر على نهايات مناطق T ليس واضحاً فى الفيرويدات الأخرى.

هناك مجموعة من التتابع فى منطقة T_1 من الفيرويد 2 - GYSVd التى هى محفوظة وموجودة فى موقع مماثل فى كل من 1 - GYSVd و ASSVd، وعلى أية حال فإن مواقع ٣٣٩ فى 2 - GYSVd هو مركز فى ASSVd. وإن المراكز من ١٨ إلى ٣٠ هى أيضاً محفوظة فى عدد من فيروسات مجموعة PSTVd.

إن الفيرويد 2 - GYSVd فيه ٤٩٪ تماثل تتابع مع فيروس النبات الذكرى فى الطماطم TPMVd. إن تماثل التتابع العال بين TPMVd و 2 - GYSVd فى

الأصل بسبب مجموعة من ٦٩ مركز في نهاية اليد اليسرى من الفيرويد 2 - GYSVd والتي هي مماثلة إلى حد كبير مع المنطقة المشابهة لها في نهاية اليد اليسرى من الفيرويد TPMVd. وبشكل عام فإن نطاق T₁ في الفيرويد 2 - GYSVd فيه تماثل تتابع عال مع نطاقات T₁ في الفيرويدات CEVd، TPMVd، PSTVd. وهذا يزودنا بآليات أكثر لأهمية إعادة الاتحاد في RNA ودوره في تطور الفيرويد.

إن العالم Keese & Symons قد ذكرا سابقاً ملاحظات عن إعادة الاتحاد في الحمض النووي RNA بين أفراد فيرويدات تحت مجموعة B₁ التي يمثلها فيرويد الدرنه المغزلية في البطاطس وهذه الملاحظات تنطبق على الفيرويد GYSVd - 2.



شكل رقم ٧٧ :

تتابع النيوكليوتيدات والتركيب الثانوي المقترح لفيرويد 2 - GYSVd. يوضح كذلك أماكن النطاقات. الأسهم تشير (مرسومة فوق) المراكز المتكررة المقلوبة والتي تحيط جانبياً بالمنطقة المركزية المحفوظة [محصورة في خطوط سوداء غامقة]. الصناديق المكونة من نقط رقم ١ و ٢ تحتوي المراكز والتي هي أيضاً محفوظة في فيرويد ASSVd و 1 - GYSVd. التتابع المتكرر المباشر موجود في الأجزاء الطرفية من T₁ و T₂ في الفيرويد 2 - GYSVd ومشار إليها بخطوط سميكة، أما المناطق الغنية بـ U والتي تلف جانبياً على 3 في كل تكرار يشار إليها بشرطات سميكة، الأعلام تدل على حدود تتابع GYSVd₂ والذي يكون دائماً نموذجي كما هو موجود في فيرويد TPMVd.

جدول ٥٣ : يبين تماثل التتابع بين نطاقات الفيرويدات المختلفة .

% تماثل تتابع						الفيرويدات المستعملة في المقارنة المزدوجة	
النطاقات						٢	١
الكنى	T ₂	V	C	P	T ₁		
٧٣	٤١	٥٣	٨٦	٦١	٨٦	GYSVd - 1 - GYSVd - 2	
٤٦	٣٨	—	٥٩	٥٢	٤٠	ASSVd - GYSVd - 2	
٤٢	٤٥	—	٥٣	٤٦	٣٣	GYSVd - 1 - ASSVd	
٣٨	×	×	٣٠	×	×	GYSVd - 2 - HLVd	
٣٠	×	×	٢٢	×	×	ASSVd - HLVd	
٤٢	×	×	٢٨	×	×	GYSVd - 1 - HLVd	
٤٢	٢٧	—	٣١	٥٧	٤٨	GYSVd - 2 - PSTVd	
٤٢	١١	٢٤	٢٦	٤٦	٥٢	ASSVd - PSTVd	
٣٧	٢٦	—	٢٦	٤٦	٥٠	GYSVd - 1 - PSTVd	
٤٤	×	×	٥٣	×	×	HLVd - PSTVd	
٤٩	٣٦	—	٢٥	٥٩	٦٦	GYSVd - 2 - TPMVd	
٣٦	٢٨	—	٣٢	٤٦	٤٦	ASSVd - TPMVd	
٤٤	٣٦	—	٢٣	٤٢	٥٦	GYSVd - 1 - TPMVd	
٤٥	×	×	٥٤	×	×	HLVd - TPMVd	
٣٧	٢٤	—	٢٥	٣٨	٣٠	GYSVd - 2 - CSVd	
٤٤	٢١	—	٣٤	٤٤	٤٦	ASSVd - CSVd	
٤٠	٢٣	—	٢٢	٥٥	٣٠	GYSVd - 1 - CSVd	
٣٧	×	×	٦١	×	×	HLVd - CSVd	
٤٠	٢٣	—	٢٥	٥٠	٥٩	GYSVd - 2 - CEVd	
٤٠	٢٧	٢٨	٢٩	٤٠	٤٣	ASSVd - CEVd	
٤٠	٢٥	—	٢٥	٥٥	٥٢	GYSVd - 1 - CEVd	
٤٠	×	×	٦٩	×	×	HLVd - CEVd	
٤٢	٣٨	—	٢٦	٥٠	٤٦	GYSVd - 2 - TASVd	
٤٠	٣٤	—	٣٠	٥٢	٤٣	ASSVd - TASVd	
٤٠	٣٦	—	٢٦	٥٥	٤٩	GYSVd - 1 - TASVd	
٤٧	×	×	٦٨	×	×	HLVd - TASVd	
٣٤	٧	—	٢١	—	—	GYSVd - 2 - CCCVd	
٣١	٢٣	—	٢٨	٣١	—	ASSVd - CCCVd	
٣٠	٢٨	—	٢٧	٢١	١٩	GYSVd - 1 - CCCVd	
٥٠	×	×	٦٠	×	×	HLVd - CCCVd	
٣٤	١٦	—	٢٤	٤٠	٢٠	GYSVd 2 - HSVd	
٣٦	٢٦	—	٢٣	٤٠	٢٤	ASSVd - HSVd	
٣٨	٢٥	—	٢٣	٥٠	٢٨	GYSVd 1 - HSVd	
٤٢	×	×	٤٥	×	×	HLVd - HSVd	

(-) = لم يحدث قياس. (x) المنطقة المركزية المحفوظة هي المنطقة الوحيدة التي حدثت في HLVd واستعملت في المقارنة.

مقارنة بين GYSVd - 1 و GYSVd - 2 :

بدراسة تتابع الفيرودين المذكورين أعلاه كل على حدة تبين أن كل منهما يحتوى على تتابع مركزى متماثل وكلاهما موجود على شكل تركيب شبه عصوى وكلاهما ينتمى إلى تحت مجموعة B₂ التى يمثلها ASSVd. أما بالنسبة لحيوية كل من الفيرودين، فقد وجد أن كلا الفيرودين ينتقل إلى الطماطم أو الخيار. إن جدول رقم ٥٤ يبين حيوية كل من الفيرودين على بادرات العنب من حيث التناسخ وأحداث أعراض ظاهرية والانتقال.

إن استعمال نسخاً مبنية من RNA فى المعمل أظهر نسبة منخفضة فى إحداث الأعراض على النباتات، هذا يدل إما على تلوث اللقاح أثناء التحضير، أو الحقن بطريقة غير محكمة أو غير متحكم بها. كما وأنه ليست جميع النباتات المحقونة بالفيرودين أصبحت مصابة، وهذا قد يكون بسبب الاختلافات الوراثية للنباتات المختبرة حيث أنها مفتوحة التلقيح أى أن بادراتها مختلفة وراثياً أو إلى كفاءة طريقة الحقن الميكانيكى، كما أنه يمكن تفسير هذه النتائج بوجود تنوعات تتابع فى الفيرويدات.

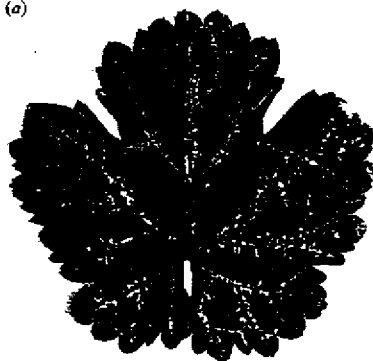
تعبيرات الأعراض :

كما هو ملاحظ فى جدول رقم ٥٤ فإن واحداً من أربعة نباتات حقنت بنسخ GYSVd - 1 موجب ذو معنى Dimeric تحتوى GYSVd - 1 monomeric. إن كلا من GYSVd - 1 و GYSVd - 2 يسبب أعراض مرضية على شكل نقط خضراء مصفرة دالة على مرض النقطة الصفراء الشديد والتى تلاحظ على طول العروق فى الورقة فى بعض الأوراق من النبات، وهذا يزودنا بدليل مباشر على أن كلا من الفيرودين يسبب مرض النقطة الصفراء فى العنب بمفرده أو مشتركاً مع الآخر ولكن بملاحظ شكل ٧٨ نجد أن الأعراض المتكونة على النباتات المحقونة بالفيرويد GYSVd 2 تكون أقل شدة من تلك المتسببة عن GYSVd - 1 وتكون مبعثرة كثيراً على سطح الورقة.

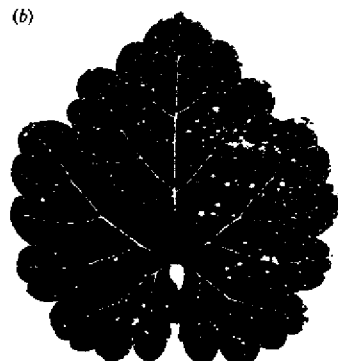
جدول ٥٤: حيوية الفيرويدات GYSVd-1 و GYSVd-2 المحقونة في نباتات عنب خالية من أى مسبب مرضى.

نوع اللقاح	كمية اللقاح فى كل نبات	عدد النباتات المحقونة	عدد النباتات المتكشف عليها		أعراض مرض النقطة الصفراء
			GYSVd-1	GYSVd-2	
١- GYSVd-1 نقى	٦ نانوغرام	١٦	٨	—	١
٢- مخلوط أحماض نووية فيها الفيرويد GYSVd-1	٣٤ نانوغرام	٥	٤	—	٢
٣- GYSVd-2 نقى	٦ نانوغرام	٩	—	٧	٤
٤- GYSVd-1 + GYSVd-2	٦ نانوغرام	٥	٣	٤	١
٥- نسخة موجبة GYSVd-1	٢٠٠ نانوغرام	٤	١	—	١
٦- نسخة سالبة GYSVd-2	٢٠٠ نانوغرام	٣	—	—	—
٧- كنترول	—	٩	—	—	—

(a)



(b)



شكل رقم ٧٨ :

أعراض مرض النقطة الصفراء على أوراق من العنب محقونة. a = أعراض شديدة متكونة من GYSVd-1 الفيرويد أما b = أعراض خفيفة متكونة عن الفيرويد GYSVd-2.

أما النباتات المحقونة بنسخ 1 - Dimeric GYSVd سالب ذو معنى لم يتكشف فيها الفيرويد 1 - GYSVd ولم يظهر عليها أعراض. عند ترك جميع النباتات المحقونة وغير المحقونة تحت ظروف الصيف الطبيعية لوحظت تعبيرات الأعراض المرضية لمرض النقطة الصفراء في العنب واضحة جداً. وبشكل عالم يمكن القول بأن مرض النقطة الصفراء في العنب تزداد شدة أعراضه بزيادة نشاط أى من الفيرودين وإن أعراض المرض على النباتات المحقونة تتراوح من شئ بسيط من البقع الصفراء الكرومية إلى حزم خضراء مصفرة على طول العروق. هذه الأعراض مشابهة للأعراض التى تحدث فى الحقل طبيعياً والتي تكون مختلفة الشكل واللون ضمن النبات الواحد من نفس النوع المزروع من العنب وبين المواسم المختلفة.

كذلك لقد وجد أن 1 - GYSVd ينتشر فى جميع زراعات العنب فى أستراليا وحتى فى النباتات التى لا تظهر أعراض مرض النقطة الصفراء فى العنب. أما فيرويد 2 - GYSVd فإنه يوجد حيث يوجد 1 - GYSVd. وهناك استثناء حالة واحدة وهى النباتات التى أعيد تكاثرها من زراعة أجزاء من قمة الفرع فى مزرعة نسج حرارتها ٣٥م. هذه النباتات تظهر عليها أعراض مرض النقطة الصفراء ويحتوى 1 - GYSVd لوحده ولا تحتوى 2 - GYSVd. وعلى أية حال فإن تكاثر فيرويد 2 - GYSVd يكون مع ذلك منفصلاً عن تكاثر الفيرويد 1 - GYSVd حيث أنهما يمكن أن يتكاثرا مستقلين فى نباتات العنب.

يمكن الحصول على نباتات عنب خالية من الفيرويدات عن طريق إنتاج شتلات من مزارع القمة النامية حيث يؤخذ طول ٠,١ - ٠,٢ مليمتر من قمة فرع النبات تحتوى كتلة القمة النامية مع مبادئ ورقتين قميتين وتزرع فى المعمل حسب نظام مزارع النسج. يتكشف على هذه الأجزاء جذر وساق ثم يتبع معها جميع الإجراءات اللازمة للنمو حتى تصبح بادرة هذه البادرة تكون خالية من الفيرويد.

ثانياً: فيروسات تحت مجموعة B₃

فيروسات الكوليس

Coleus Viroids

مقدمة:

نبات الكوليس Coleus من نباتات الزينة يتبع العائلة الشفوية (Lamiaceae) أو Labiatae، نبات زينة له أوراق حمراء اللون مبرقشة. تنتشر زراعة هذا النبات في كل من البرازيل، كندا، اليابان، ألمانيا والولايات المتحدة الأمريكية ويأخذ ترتيب رقم عشرة في شهرته النباتية في الحدائق في أمريكا الشمالية. إن الصنف Amarelo هو أكثر الأصناف المزروعة عرضة للإصابة بالأمراض الفيروية تحت ظروف الحقل العادية وهو لا يظهر أعراض مرضية مرئية وذلك لأن لون الأوراق أصفر. أما الأصناف الأخرى مثل Frilled Fantasy فتظهر عليه أعراض الإصابة الفيروية على شكل شحوب الأوراق، كما يؤثر الفيرويد على نسبة الإنبات في البذور ويزيدها وقد تزيد نسبة الإنبات في البذور المصابة ٣٥٪، كما أن البذور المصابة بالفيرويد تنبت قبل البذور السليمة بحوالى ثلاثة أيام. ليس للفيرويد تأثير على حجم الورقة ولا على عدد الأوراق ولا على طول النباتات المصابة. أما في الأصناف الأخرى تكون الأعراض على شكل صبغات أرجوانية على الأوراق. هناك أصناف

أخرى تكون حاملة للفيرويد بدون ظهور أعراض مرئية. يمكن اكتشاف الفيرويد في النبات بعد ٢ - ٣ أسابيع من الحقن.

أولى الأمراض الفيرويدية على الكوليس لوحظت في البرازيل سنة ١٩٨٥ وذلك من قبل العالم Fonseca et al وذكر أول فيرويد يصيب الكوليس وكذلك وصفه العالم Lebowitz سنة ١٩٨٥ أثناء عمله على تربية نباتات الكوليس. أول فيرويد ذكر على الكوليس سمي فيرويد الكوليس الأصفر Yellow Coleus Viroid وسمى بهذا الاسم لأن الفيرويد كان أول مصدر له هو الصنف Amarelo وهو يعنى باللغة البرتغالية الأصفر، وبالتالي يصاب الصنف بالفيرويد ولا تظهر عليه أعراض الإصابة التي هي الشحوب الأصفر فكان الفيرويد متخصص مع هذا الصنف الأصفر ولكن بعد ذلك تبين أن جميع النباتات في الجنس كوليس تصاب بهذا الفيرويد في البرازيل وحيث أن الفيرويد إنتشرت إصابته في أصناف عديدة أصبح الفيرويد عام وسمى فيرويد أصفرار الكوليس Coleus Yellow (CYVd) Viroid. ولقد ظهر هذا الفيرويد في كندا سنة ١٩٩٠ على نباتات الكوليس نتيجة إنتقاله من البرازيل أو الولايات المتحدة ولقد درس دراسة وافية في كندا.

وفي سنة ١٩٩٠ ذكر العالم Spiker et al وجود فيرويد في نبات Colues blumi في ألمانيا وأخذ اسم مؤقت هو Coleus blumi Viroid (CbVd - 1) ولا يزال هذا الفيرويد تحت التجربة والدراسة.

أ - فيرويد إصفرار الكوليس

(CYVd) Coleus Yellow Viroid

مقدمة :

درس هذا الفيرويد دراسة وافية في كندا وقد إتفق الباحثون على أن هذا الفيرويد الذى فى كندا هو نفسه الذى ظهر فى البرازيل ويمكن أن يكون الفيرويد قد دخل كندا عن طريق البذور المصابة المستوردة من أمريكا خاصة منطقة كوستاريكا حيث

تتراوح الإصابة في أمريكا بنسبة ١٦ - ٦٨٪. وبسبب أن نباتات الكوليس في كندا أصلها من بذور متحصل عليها من اليابان وأقطار أوروبا، أجريت محاولات لتحديد فيما إذا كان الفيرويد قد إنتقل خلال بذور الكوليس.

ينتقل الفيرويد من نباتات الكوليس إلى نباتات الريحان *Ocimum sanctum* بالطرق الميكانيكية والتطعيم. البذور الناتجة من نباتات الكوليس المصابة والمختبرة بواسطة طريقة R - PAGE ظهر أنها تحتوى الفيرويد. وكذلك فإن الفيرويد موجود في البذور الساكنة حوالى ٣٢٥ ميكوغرام في كل بذرة، كذلك فإن البذور المنبتة حديثاً تحتوى على الفيرويد. تتراوح معدلات الانتقال فى النبات من ٧١,٤٪ فى النموات الحديثة من البذور إلى ٦٧,٣٪ فى البادرات. يوجد الفيرويد فى أجزاء الزهرة وفى إندوسبيرم بذور الكوليس ولا يوجد فى غلاف البذرة. من بين ١٦ جنس من نباتات الزينة التى إختبرت لمعرفة قابليتها للإصابة بفيرويد إصفرار الكوليس تبين أن جنسين فقط قابلان للإصابة بالفيرويد هما جنس *Colous* و *Hypocyrta*. كذلك إختبرت خمسة أصناف من الكوليس تنتشر زراعتها فى الحدائق لمعرفة قابليتها للإصابة بالفيرويد وهذه الأصناف هى - الأخضر - الأرجوانى - الأحمر - المخملى (القطيفى) والقرمزي فوجد أن هذه الأصناف كلها قابلة للإصابة بالفيرويد بإستثناء الصنف الأخضر فقط الذى لا يصاب.

إنتقال الفيرويد:

ينتقل الفيرويد ميكانيكياً وبالتطعيم إلى البادرات ويمكن اكتشافه فى البادرة بعد ثلاثة أسابيع من الحقن ولكن يكون التركيز منخفض فيها، يزداد التركيز بتقدم العمر ويصل إلى أعلى مستوى له بعد خمسة أسابيع من الحقن. كذلك يمكن نقل الفيرويد بالتطعيم على نوع واحد من نباتات الريحان *O. sanctum* وكانت نسبة نجاح الانتقال ١٣٪. أما الانتقال بالطريقة الميكانيكية على بادرات الريحان كانت بنسبة نجاح ٢٩,١٦٪. عند نقل الفيرويد بالتطعيم فإن النباتات المطعمة كان وجود

الفيرويد فيها فى فرعين فقط من بين ستة فروع، هذا يدل على التوزيع غير المنتظم للفيرويد فى النبات. وكذلك فإنه عند حقن البادرات الصغيرة بالفيرويد لم يظهر على هذه البادرات أعراض بعد ٣ أسابيع ولكن ظهرت الأعراض بعد ٨ - ١٠ أسابيع من الحقن. لم يكن هناك أعراض مرئية على النباتات المصابة. كذلك لم يمكن نقل الفيرويد إلى البطاطس أو الطماطم أو *S. sinensis* بواسطة التطعيم أو الحقن الميكانيكى.

طبيعة الفيرويد:

يتكون فيرويد الإصفرار فى الكوليس (CYVd) Coleus Yellow Viroid من حمض نووى RNA أحادى الخيط ويكون فى الهجرة الكهربائية أسرع من فيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس. أما عن إنتشار الفيرويد فى نبات الكوليس، فقد وجد أن الفيرويد يمكن اكتشافه فى الصنف الأرجوانى، القرمزى، القطيفى فى كل من أجزاء الزهرة، النورات الحديثة والأفرع المختلفة من نبات الكوليس جدول ٥٥. وكذلك فإن بذور هذه الأصناف الثلاثة تحتوى فيرويد. أما محتويات البذرة من الفيرويد، فقد وجد أن الصنف الأرجوانى يحتوى فيرويد فى البذور الكامنة (بنسبة ١٦ بذرة من ٢٤ بذرة) ٦٦,٦٪ من البذور تحتوى فيرويد. أما الصنف القرمزى والأخضر والقطيفى تنخفض فيها نسبة الفيرويد حتى تصل إلى الصفر فى الصنف الأخضر. أما بالنسبة لغلاف البذرة فلم يكتشف فيه الفيرويد فى أى صنف من أصناف الكوليس. أما الأندوسبيرم والجنين فيوجد فيهما الفيرويد فى الصنف الأرجوانى فقط بنسبة ٩٠٪ من البذور المختبرة. كذلك فإن وجود الفيرويد فى البذور المنبتة كان فقط فى الصنف الأرجوانى بنسبة ٧١,٤٢٪. أما عن وجود الفيرويدات فى البادرات كان أيضاً فى الصنف الأرجوانى فقط بنسبة ٦٧,٣٤٪.

جدول ٥٥: توزيع الفيرويد في النباتات الناتجة من تكاثر خضري.

أجزاء النبات	الأصناف المختبرة. عدد النباتات الموجبة للاختبار على عدد النباتات المختبرة			
	القטיפي	القرمزي	الارجواني	الأخضر
الفروع الحديثة	٢/٢	٤/٤	٢/٢	١/١ صفر
الأغصان	٧/٧	٥/٥	١٢/١٥	—
سبلات الأزهار	١/٢	٢/٢	٢/٢	٢/٢ صفر
بتلات الأزهار	١/٢	٢/٢	٢/٢	٢/٢ صفر
متوك الأزهار	١/٢	٢/٢	٢/٢	٢/٢ صفر
عضو التأنيث في الزهرة	١/٢	٢/٢	٢/٢	٢/٢ صفر
البذور الساكنة	٣/٥	٢/٥	٤/٥	٥/٥ صفر

لم يثبت وجود الفيرويد في بذور الريحان. إن كمية وجود الفيرويد في بذور الكوليس تقدر بحوالي ٣٢٥ ميكوغرام في كل بذرة وهذه النسبة العالية في البذور تجعل من السهل اكتشافه ودراسته فيها.

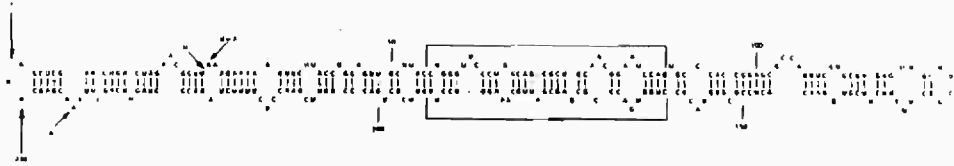
ب - فيرويد كوليس بليومس رقم ١

Coleus Blumei Viroid - 1

إن دراسة تتابع النيوكلييتيدات الكامل في فيرويد اصفرار الكوليس المعزول من *Solenostemon seutellarioides* أظهر أن هذا الفيرويد يتكون من ٢٤٨ نيوكلييتيدة والتي تأخذ شكل عصوي في التركيب الثانوي للفيرويد عندما تنثنى بأقل طاقة حرة. إن مقارنة تتابع فيرويد اصفرار الكوليس مع فيرويد كوليس بليومس رقم ١ (CbVd - 1) المعزول في ألمانيا بين أن هذين الفيرودين بينهما علاقة قريبة جداً. إن الاختلافات بين الفيرودين موجود في ثلاثة مواقع فقط هي: الموقع الأول في مركز ٢٥ حيث تزال منه قاعدة U، والموقع الثاني هو مركز ٢٦ حيث تستبدل

قاعدة U وتحلل محلها قاعدة A. أما الموقع الثالث فهو مركز ٢٤١ حيث تغرز قاعدة A. هذا يعنى أن الفيرودين فيها نفس عدد النيوكليوتيدات ٢٤٨ والاختلاف فى ثلاثة مواقع فقط ولقد صنف هذين الفيرودين فى تحت مجموعة B₃ من الفيرويدات.

إن فيروس إصفرار الكوليس (CYVd) كان أول وصف له على أنه فيروس كامن فى نبات *S. scutellarioides* وهذا الاسم مرادف لاسم *Coleus blumei* فى البرازيل. ولقد تم إختبار هذا الفيروس الموجود فى البرازيل والموجود فى كندا فوجد أنهما فيروس واحد. أما فيروس كوليس بلومى (CbVd - 1) فقد عزل من نفس النبات *S. scutellarioides* فى ألمانيا ودرس ترتيب نيوكليوتيداته بواسطة Spiker et al سنة ١٩٩٠. ووجد أنه مماثل لفيروس إصفرار الكوليس فى حجم الجزيء وأن التتابع الكامل للتركيب الثانوى للفيروس فى شكل ٧٩. وتحليل التتابع وجد أن الحمض النووى RNA للفيروس CYVd يتكون من ٢٤٨ نيوكليوتيدة بنسبة G + C إلى A + U تساوى ١,٢٣. وأن نسبة ٧١٪ من النيوكليوتيدات فى أزواج قواعد وهى ٥٤ زوجة من G مع C و ٢٩ زوج من A مع U و ٥ زوج من G مع U وأن التركيب الثانوى لهذا الفيروس الذى حدد حسب ما ذكر Zuker et al سنة ١٩٨٩ يكون لولبى (حلزونى) بشكل عصوى مشابه لبقية الفيروسات الأخرى. عند مقارنة تتابع نيوكليوتيدات الفيروس CYVd مع الفيروس CbVd - 1 تبين أنهما متشابهان بنسبة ٩٨,٩٪ من تزاوج النيوكليوتيدات، وأن الاختلاف فى ثلاثة مواقع كما ذكر سابقاً. كذلك وجد أن الطفرات كلها تتواجد فى جانب جزء اليد اليمنى من جزيء الفيروس، وإن اختلاف تتابع النيوكليوتيدات الذى هو ١,١٪ بين تركيب جزيئى الفيرودين لا يسبب أى إختلاف معنوى فى الشكل الثانوى للفيرودين. إن شدة القرب والتشابه بين الفيرودين يؤدى إلى القول بأن الفيرودين إما نشأ من مكان جغرافى واحد أو خرجا من عمليات تطور متشابهة الأصل.



شكل رقم ٧٩ :

رسم يبين ترتيب النيوكليوتيدات والتركيب الثانوي للفيروس CYVd المعزول من *S. scutellarioides*. النيوكليوتيدات المختلفة الملاحظة بين الفيرودين CYVd و 1 - CbVd مشار إليها بالأسهم. المنطقة المحاطة بمستطيل هي المنطقة المحفوظة المركزية.