الفصل الخامس

الأمراض الفيرويدية المتسببة عن مجموعة PSTVd
فيرويدات من تحت مجموعة $PSTVd\ B_1$

ا ـ فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس ـ مرض الدرنة المغزلية فى البطاطس

Potato spindle tuber viroid

ينتشر مرض الدرنة المغزلية فى البطاطس فى كل من الولايات المتحدة الأمريكية، كندا، روسيا، جنوب أفريقيا، الهند واستراليا. يسبب المرض خسائر كبيرة فى بعض المناطق ويعتبر أحد أكثر الأمراض المهلكة للبطاطس. يهاجم المرض معظم الأصناف وينتشر بسرعة وفى كثير من الحالات يكون مترافقا مع بعض الأمراض الفيروسية. يهاجم المرض الطماطم ولكن يبدو (إقتصادياً) أنه ذو أهمية قليلة على محصول الطماطم.

الأعراض:

تظهر نباتات البطاطس قائمة ومتقزمة، الأوراق والفروع الجانبية تنمو على زاوية حادة، قواعد الأوراق تكون منحنية كالمنجل ويلاحظ نكروزز على حواف ونصل الورقة. تكون الأوراق صغيرة وقائمة والوريقات تكون ذات لون أخضر غامق وأحياناً يظهر عليها إلتفاف والتواء (شكل ٣٩).

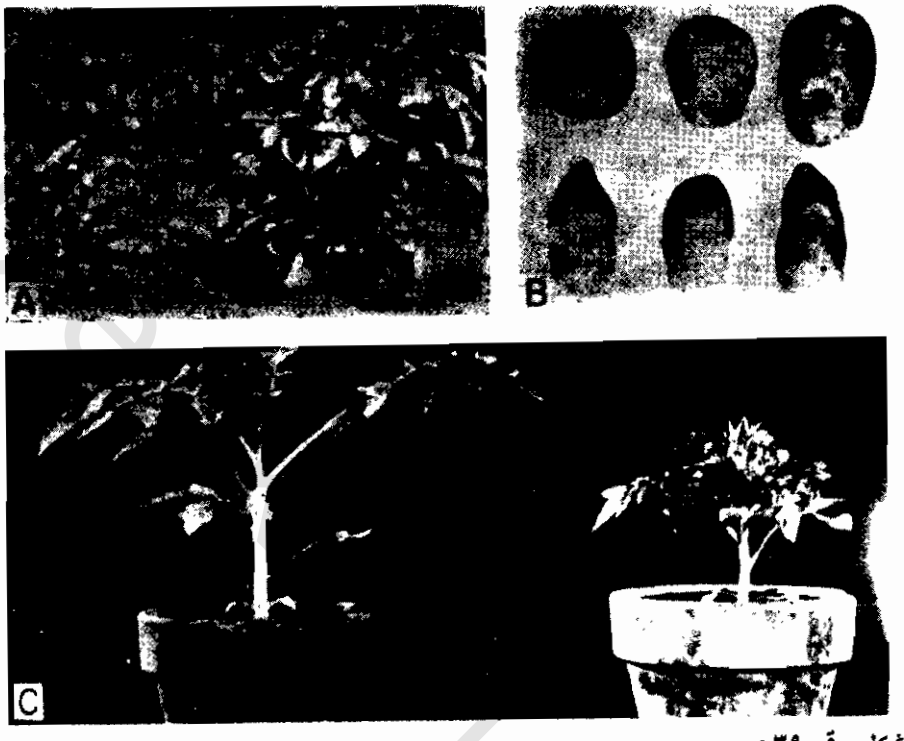
openkanar.com

تكون الدرنات متطاولة ذات شكل مغزلى نموذجى أو تأخـذ شكل المضرب doll - Shaped ، أحياناً تكون الدرنات ذات منتصف أسطوانى ونهايات وتدية وتكون الدرنات أكثر نعومة وذات جلد أكثر ضعفاً وتتشقق أحياناً وتكون ذات لحم رهيف طرى. تكون عيون الدرنة أكثر عدداً وأكثر وضوحاً إلا أنها تكون منخفضة قليلاً، تكون الدرنات مشوهة. ينخفض الانتاج إلى حد كبير يصل ٢٥ ٪ فأكثر، ينخفض عدد وحجم الدرنات الناتجة كثيراً، بعض النباتات لا تعطى درنات أبداً.

أما نباتات الطماطم القابلة للإصابة فتكون متقزمة وتتدلى الأوراق وتكون ذات عروق غائرة أكثر منه فى الحالة الطبيعية مع وجود نكروزز (موت وتحلل الأنسجة) فى الأعناق والعروق ونصل الورقة. تكون نباتات الطماطم المصابة ذات قمة متوردة.

تكون الأعراض أكثر وضوحاً وشدة عندما تنتج عن السلالة الشديدة. كذلك تكون الأعراض أكثر وضوحاً فى طور الإصابة الثانى (الإصابة الثانوية) حيث تلتحم الأوراق السفلى أحياناً. فى بعض الظروف الجوية وفى بعض الأصناف تكون الأعراض الناتجة عن الإصابة بالسلالة الشديدة شبيهة لتلك المتسببة عن السلالة المعتدلة، ولكن أعراض السلالة الشديدة تتميز بوضوحها وشدة إنتشارها.

إختبر نشاط أنزيمات الببتايديز فى نباتات الطماطم السليمة والمصابة بالفيرويد PSTVd فوجد أن Leu - P - nitroanilide كانت حوالى ثلاثة أضعاف نشاطها وسبعة أضعاف كميتها فى النباتات المصابة عنها فى النباتات السليمة وإن كمية الأملاح، الكبريت، الكلور، الكالسيوم، الزنك والمنغنيز أعلى فى النباتات المصابة عنها فى السليمة أما المغنيسيوم والنحاس والفسفور والالمنيوم والسلكون فلم تتأثر بالإصابة.



شكل رقم ٣٩ :

أعراض متسببة بواسطة فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس. (A) نباتات بطاطس مريضة على الشمال متقزمة ونموها قائم. (B) درنات مريضة، فى الأسفل مغزلية الشكل وصغيرة مقارنة بالدرنات السليمة العلوية. (C) نباتات طماطم على الشمال سليمة وعلى اليمين مريضة بعد عشرون يوم من الحقن بفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس.

الكائن الممرض :

يتسبب هذا المرض عن فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس Potato Spindle Tu-ber Viroid ويكتب باختصار (PSTVd) وقبل سنة ١٩٩٣ كان يكتب (PSTV)، إلا أن علماء الفيرويد إتفقوا على إضافة حرف (d) وذلك لتمييزه عن الفيروسات حيث أن الفيرويدات المكتشفة أصبحت كثيرة. تصنيف الفيرويد مذكور فى الجزء الأول من الكتاب.

هذا الفيرويد هو أول فيرويد عرف وحددت نيوكليتيداته وقد درس دراسة وافية جداً وإن جميع دراسات الفيرويدات كانت تطبق على هذا الفيرويد. إبتدأت الأبحاث على هذا الفيرويد من قبل العالم Diener سنة ١٩٧١ حيث أن العالم Diener هو الأب الروحى لعلماء الفيرويد وإن فيرويد PSTVd هو الأب الروحى فى دراسات الفيرويدات كلها.

الفيرويد هو RNA معدى وهو ذو وزن جزيئى منخفض حوالى ١٠٠٠٠٠ دالتون. إن RNA لهذا الفيرويد يتكون من ٣٥٩ نيوكليتيدة (ذكر بعض العلماء أن سلالات من هذا الفيرويد تكون ٣٥٦ وسلالات أخرى ٣٦١) به عديد من القواعد المزدوجة. يتكون الفيرويد من خيط مفرد من RNA مستقيم أو دائرى. يظهر الفيرويد النقى بتصوير الميكروسكوب الالكترونى على شكل خيط قصير طوله ٥٠ نانوميتر وله سمك يماثل سمك DNA مزدوج الخيط (شكل رقم ١ فى الجزء الأول من الكتاب).

تبقى العصارة المأخوذة من النباتات المصابة قادرة على إحداث العدوى بعد تخفيف ١ : ١٠٠ و ١ : ١٠٠٠. وكذلك يحتفظ بحيويته عند تسخين المستخلص النباتى لمدة عشرة دقائق على ٧٥ ـ ٨٠°م. إن الفيرويد سريع التثبيط فى العصارة المستخلصة من النباتات المصابة، ولكن يمكن إبقاء قدرته على إحداث العدوى عن طريق معاملة العصارة بالفينول حيث أن الفينول يثبط نشاط أنزيم Ribonuclease الذى يحطم RNA الفيرويدى.

الانتقال:

ينتقل الفيرويد ميكانيكياً وينتشر بشكل أساسى بواسطة السكاكين المستعملة فى تقطيع التقاوى للبطاطس السليمة والمصابة، وأثناء العمليات الزراعية وطرق الجمع. كذلك ينتقل الفيرويد عن طريق حبوب اللقاح والبذور الحقيقية وعن طريق عديد من الحشرات من ضمنها المن، نطاطات الأعشاب. يبدو أن النقل بالحشرات غير أساسى لهذا الفيرويد.

أشكال الفيرويد PSTVd :

كما هو معروف فإن الفيرويدات هى مخلوقات ممرضة ذات وزن جزيئى منخفض تتكون من جزئ RNA دائرى مغلق احادى الخيط. إن لفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس شكلان الأول مستقيم والثانى دائرى. أفادت كثير من الأبحاث بأن الشكل المستقيم من RNA الفيرويدى له نفس العدوى التى تتسبب عن الشكل الدائرى من RNA الفيرويدى. ووجد أيضاً أن الشكل المستقيم له ثبات أقل منه فى الجزيئات الدائرية. كذلك فإن الأشكال المستقيمة تحتوى 5`- Phos-phate وبالتالى فإن كثيراً منها لم تكن منتجة بواسطة أيونات معدنية كعامل مساعد للهيدرولسز من الجزيئات الدائرية. والشكل المستقيم يتكون من تجمع يحتوى أى واحدة من أربعة نيوكليتيدات على نهايتها 5`. مثل هذه المعلومات تدل على أن الجزيئات المستقيمة الطبيعية لم تنتج بواسطة إنشطار الجزيئات الدائرة عند موقع نيوكليتيدة محدد، ولكن يمكن أن تنتج إما بواسطة الإنشطار العشوائى أو بواسطة الإنشطار ضمن مناطق خاصة فى الجزئ الدائرى مختلف القابلية لأنزيم Nuclease.

لقد عزلت الأشكال الدائرية والمستقيمة من هذا الفيرويد ونقيت من نسيج نبات طماطم مصاب بالفيرويد PSTVd وإن كلا الشكلين فى حد ذاتهما لم يمكن تمييزهما بالميكروسكوب الألكترونى ولكن إلى حد ما يمكن تمييزهما عن طريق electrophoretic mobilities على Denaturing Polyacrylamide gels وعن طريق مقدرة الشكل المستقيم وليس الدائرى بأن يحدث له فسفرة على موقع نهاية 5` بواسطة ATP (γ - P^{32}) و T_4 - Polynucleotide Kinase. ولقد أمكن إثبات أن الفيرويد PSTVd يمتلك هذين الشكلين أيضاً عن طريق تحليلات التهجين والحيوية. ويبين جدول رقم ٢٦ أن كلا الشكلين من الفيرويد لهما نفس الحيوية والكفاءة فى إصابة نباتات الطماطم وكذلك لهما أيضاً نفس الحيوية فى إصابة **Gynura aurantiaca**.

جدول ٢٦ : يبين حيوية الشكل المستقيم والدائرى لفيرويد PSTVd على نباتات الطماطم.

شكل الفيرويد المختبر	عدد النباتات التى يظهر عليها أعراض على عدد النباتات المحقونة بتركيز من RNA نانوغرام / مللتر							
	٥٠	١٠	٥	١	٠,٥	٠,١	٠,٠١	٠,٠٠١
فيرويد دائرى	5/5	4/4	5/5	3/5	2/5	1/5	1/5	-
فيرويد مستقيم	5/5	2/3	3/5	2/5	3/5	1/5	0/5	-
فيرويد دائرى	-	6/6	-	3/6	-	0/5	0/5	0/6
فيرويد مستقيم	-	6/6	-	3/6	-	0/5	0/5	0/6

من الأبحاث المتلاحقة والمتكررة فى هذا الموضوع تبين أن الشكل المستقيم للفيرويد من المحتمل أن يكون مرتبطاً فى الطبيعة مع الشكل الدائرى وأن عملية الربط هذه تكون فعالة نسبياً. أجريت دراسات كثيرة لمعرفة تأثير الطرق المختلفة فى تحضيرالفيرويد واستخلاصة على تكوين الشكل المستقيم للفيرويد. ونظراً لأن كلا الشكلين الدائرى والمستقيم قد وجدا فى الأنسجة المستخلصة بأى طريقة من طرق الاستخلاص الأربعة، فإن هذا يدل على أن الأشكال المستقيمة توجد بذاتها وأن وجودها لم يكن صناعياً نتج من تأثير أى واحد من تلك الإجراءات. زيادة على ذلك فإن وجود الأشكال المستقيمة لم يكن معتمداً على نوع العائل الذى يتناسخ فيه الفيرويد ولا على طول المدة التى يبقى فيها النسيج مصاب ولا على استعمال سلالة معينة من PSTVd فى اللقاح. ولقد تبين أن الشكل المستقيم يزداد تجمعه فى الأنسجة بزيادة وقت التحضين ويصبح مساوياً لمستويات الشكل الدائرى من الفيرويد بعد ٢٤ ساعة من التحضين. يلاحظ ذلك فى جدول ٢٧ .

جدول ٢٧ : تأثير طول مدة التحضين على تجمع الشكل الدائرى والمستقيم من فيرويد PSTVd فى خلايا نسيج نبات البطاطس.

طول فترة التحضين بالفسفور المشع	٪ شكل دائرى	٪ شكل مستقيم
٤ ساعة	٧٧	٢٣
١٢ ساعة	٦٥	٣٥
٢٤ ساعة	٤٦	٥٤

وهناك تجارب تدل نتائجها على أن جزيئات الشكل الدائرى والمستقيم كل منها يبقى منفرداً أو أن جزيئات الشكل الدائرى تبنى أولاً ثم بعد ذلك تتجمع جزيئات الشكل المستقيم كنتيجة لإنشطار الجزيئات الدائرية، ولكن على أية حال فإن المستوى الكلى للشكل المستقيم نادراً ما يساوى مستوى الشكل الدائرى ولا يكون أعلى منه. عند استعمال أنزيم RNA ligase يمكن أن يحدث توازن بين المستويين.

ولقد ثبت أيضاً بإن معظم الجزيئات المكونة لتجمعات الشكل المستقيم ليست هى الفيرويد المستقيم طبيعياً ولكنها ناتجة من الإنشطار الذاتى من أشكال ال multimeric على مواقع محددة وتتجمع قبل أن يتم اللحام إلى أشكال دائرية. هناك مستوى منخفض من النسبة المئوية لـ G ومستوى على من U فى الشكل المستقيم.

هناك عدة ملاحظات تدل على أنه ليست عروة اليد اليمنى هى الموقع الفريد للإنشطار ذلك للأسباب الآتية:ـ

١ ـ هناك ٧٪ من جزيئات الشكل المستقيم تحتوى 5`- terminal G residue.

هذه النيوكليتيدة ليست موجودة فى عروة اليد اليمنى من الشكل الدائرى.

٢ ـ إن عدداً من ال minor spot موجودة فى طريقة تحليل بصمة الإصبع فى الشكل المستقيم وغير موجودة فى الشكل الدائرى.

٣ ـ الخمسة بقع التى تمثل عروة اليد اليمنى من الفيرويد (بصمة الإصبع) تظهر معلمة بدرجة عالية أكثر مما يتوقعه الباحث أن توجد فى الجزيئات المتشكلة بواسطة الإنشطار العشوائى.

٤ ـ عند التحليل فإن البقع المتعلقة بمجموعة النيوكليتيدات القصيرة أو الطويلة والتى من المتوقع أن تكون ضمن عروة اليد اليمنى التى فى أجزاء من RNase T_1 تكون غير واضحة فى التحليل.

٥ ـ إن الأجزاء المحتوية RNase T_1 فى ذراع اليد اليمنى والعروة تكون موجودة فى بصمة الإصبع للشكل المستقيم.

يمكن القول بأن نهاية ساق اليد اليمنى وعروة الشكل الدائرى تحتوى تتابع يشبه تتابع بروموترجين rDNA. وبالتالى يمكن القول بأن RNA Polymerase I المعتمد على DNA يمكن أن يتدخل فى بناء الفيرويد.

هناك مواقع أخرى للإنشطار فى PSTVd حددت بتفاعلات كثيرة وتبين أن مواقع الإنشطار هى ١٧٧ ـ ١٨٢، ١١٣ ـ ١١٤، ٨٠ ـ ٨١، ٣٣٤ ـ ٣٤٠، ٣٠٠ ـ ٣١٢، ٢٧١ ـ ٢٧٥.

حركة المسبب فى النبات:

إن ظاهرة إنتقال الفيروسات مسافة طويلة خلال اللحاء فى النباتات المصابة قد درست بتعمق ولقد تأكد بأنها عملية موجبة تقع فعلاً. أما ظاهرة إنتقال

الفيرويدات لمسافة طويلة فى النباتات المصابة هى أيضاً تكون خلال اللحاء، مع أن هذا الموضوع قد حصل على قليل من الاهتمام.

كما نعرف فإن الفيرويدات هى جزيئات من RNA معدية ذات وزن جزيئى منخفض أحادية الخيط مكونة دوائر مغلقة ذات درجة عالية من تزاوج القواعد الداخلية. ولقد وجد أن هذه الفيرويدات تتحرك من الساق المحقون أو الورقة المحقونة إلى المناطق المرستيمية فى النبات، عندئذ تكون الخلايا فى جميع الأوراق الحديثة أصبحت مصابة خلال تكشفها.

فى هذا المجال أجريت تجاب على إنتقال الفيرويد PSTVd لتحديد سيره فى نباتات الطماطم وتبين أن الفيرويد يتحرك لمسافة طويلة عن طريق اللحاء وبالتالى فإنه يشابه فى هذا المجال حركة الفيرس.

عند الحصول على مستخلص حمض نووى منقى جزئياً من نباتات طماطم مصابة بالفيرويد PSTVd ثم يخفف فى ٠,١ مول Na_2HPO_4 ثم يحقن (فى أعلى وريقة من الساق) لأول ورقة حقيقية من أوراق بادرات الطماطم ثم تحضن النباتات على درجة ٣٠°م ثم يكشف عن وجود الفيرويد على فترات متباعدة فى أجزاء مختلفة من النبات بطريقة Dot - blot - hybridization.

ولقد تبين أن الفيرويد PSTVd يمكن أن يكتشف أولاً فى قمم الأفرع وفى ورقة فوق الورقتين اللتين تقعان فوق الورقة المحقونة وذلك بعد سبعة أيام من الحقن. وفى تجربة أخرى حيث الأوراق إختبرت للكشف عن الفيرويد بعد ٣، ٦، ٩ و ١٢ يوم من الحقن، فقد أمكن اكتشاف الفيرويد فى القمم بعد ستة أيام من الحقن. ومن المهم أن نذكر هنا أن الورقة الواقعة فوق الورقتين اللتين تقعان فوق الورقة المحقونة أصبحت جزء من قمة الفرع فى النبات بعد ١ ـ ٤ أيام من الحقن. وبالتالى فإن الفيرويد PSTVd يتضاعف إلى مستوى يمكن اكتشافه فى القمة أكثر منه فى الأوراق الأخرى. بعد ١١ يوم من الحقن يمكن اكتشاف الفيرويد فى

الورقة الموجودة فوق الورقة المحقونة. وبعد ٢ ـ ٤ أسابيع يمكن أن يكتشف فى الورقة المحقونة نفسها. لقد سبب الفيرويد ظهور أعراض فى نباتات الطماطم بعد أسبوعين من الحقن. إن الوريقات المحقونة لم تختبر روتينياً لأن اللقاح المتبقى فى الوريقات يمكن أن يكتشف بعد خمسة أيام من الحقن. وبعد ثلاثة أسابيع من الحقن أمكن اكتشاف الفيرويد فى جميع الوريقات فى الورقة المحقونة.

إن إنتشار الفيرويد PSTVd فى أوراق بادرات الطماطم المحقونة (ثلاثة إلى أربعة طور ورقى) قد تحدد بعد شهر من الحقن. النباتات التى فيها الورقة الثالثة فوق الفلقات كانت قد حقنت أظهرت وجود الفيرويد فى الجذور، فى الورقة المحقونة وفى جميع الأوراق الواقعة فوق الورقة التى حقنت، ولكن ليس فى الورقتين الموجودتين تحت الورقة المحقونة. ومن ناحية أخرى فإن النباتات التى فيها الورقة الأولى فوق الفلقات كانت قد حقنت، أظهرت وجود الفيرويد فى جميع الأوراق بالإضافة إلى الجذور. من الدراسات السابقة يمكن القول بأن: ـ

١ ـ إن الفيرويد PSTVd عنده المقدرة على أن يتحرك من الورقة المحقونة واصلاً إلى قمة الفرع فى النبات ويتضاعف إلى مستويات يمكن اكتشافه فى حدود ستة أيام بعد الحقن.

٢ ـ إن الفيرويد PSTVd يكتشف أولاً فى قمة الفرع وفى الأوراق المجاورة للقمة، ثم بعد ذلك فى الأوراق الأخرى بين الورقة المحقونة وقمة الفرع وفى الأوراق الملاصقة له وأخيراً فى الورقة المحقونة نفسها.

٣ ـ الفيرويد PSTVd غير قابل للاكتشاف فى الأوراق تحت الورقة المحقونة.

هل الفيرويد يسير خلال اللحاء؟؟

نظراً لأن نواتج عملية التمثيل الضوئى تسير فى اللحاء وتنتقل من الأوراق الكاملة الإنفراد إلى أعلى حيث تصل الأوراق الحديثة التكشف وإلى قمة الفرع ثم إلى أسفل إلى الجذر، ونظراً لأن هذه الأنسجة هى التى يمكن أن يكتشف فيها

فيرويد PSTVd فى الأوقات المبكرة، فقد أجريت تجربة لتنظيم حركة الفيرويد عن طريق إعادة توجيه سير نواتج عملية التمثيل الضوئى وهذه التجربة كالآتى:-

ظللت ورقة تحت الورقة المحقونة فى وقت الحقن فى ستة نباتات وذلك لتوجيه سير نواتج عملية التمثيل الضوئى فى هذه الورقة. بعد ٢٠ و٢٣ يوم من الحقن إختيرت أوراق من كل من الثلاثة نباتات وجمعت وإختبرت بإختبار- Dot - blot hybridization. وعلى النقيض من نتائج التجارب التى أجريت على الأوراق غير المظللة، فإن الأوراق المظللة تحتوى PSTVd ولكن الأوراق التى تحت الأوراق المظللة لا تحتوى فيرويد. وبالتالى فإن تظليل الأوراق التى تحت الأوراق المحقونة لم يمنع الفيرويد من إختراق إما قمة الفرع أو الأوراق التى فوق تلك الأوراق المحقونة وهذا يؤدى إلى حركة الفيرويد فى الاتجاه السفلى مع نواتج التمثيل الضوئى.

عندما ظللت الأوراق المحقونة لم يكن هناك فيرويد يمكن اكتشاف حركته إلى أسفل، بينما على فترات زمنية من الإختبار فإن حركة الفيرويد فى الأوراق بين القمم والأوراق المحقونة قد تأخر عندما كانت الأوراق المحقونة مظللة. كذلك فإن تغطية الأوراق المحقونة والتى تؤدى إلى وقف حركة نواتج التمثيل الضوئى فى هذه الأوراق أيضاً أدت إلى تأخير دخول الفيرويد فى الجهاز الوعائى فى النبات بالإضافة إلى تأخير تكاثر الفيرويد فى الأوراق المحقونة. هذا الأخير يمكن أن يعزى إلى المستوى المنخفض فى النشاط التمثيلى فى مثل هذه الأوراق.

مع أن الفيرويد ينتقل إلى أسفل ويصل الجذور بالإضافة إلى إنتقاله إلى أعلى ويصل القمة النامية، فإن تأثير تظليل أوراق مختلفة فى النباتات المحقونة على حركة الفيرويد فى نسيج الجذر لم تختبر، بينما حركة الفيرويد إلى الجذور تكون متعارضة مع قلة الحركة فى الأوراق التى تحت الورقة المحقونة. هذا يتفق مع نظام حركة نواتج التمثيل الضوئى فى اللحاء من الأوراق كاملة الانفراد إلى الأوراق المتكشفة فى الجزء العلوى من النبات وإلى الجذور. عندما عكس إتجاه الحركة فى اللحاء عن طريق منع البناء الضوئى فى ورقة معينة فإن التأثير على حركة كل من الفيرس

والفيروويد يمكن ملاحظتها. هذه النتائج كلها تتفق مع الحركة السريعة الجهازية للفيرويد من الورقة المحقونة إلى النسيج ذو الكفاءة العالية فى النمو عبر اللحاء وهذا نفس طريق الفيروسات.

إما عن توزيع السلالتين المعتدلة والشديدة فى أجزاء النبات، فإن جدول رقم ٢٨ يبين مدى تجمع الفيرويدات فى أجزاء النبات المختلفة، ويوضح الجدول أن تجمع السلالة الشديدة يكون فى الأوراق أكبر قليلاً منه فى السلالة المعتدلة وكذلك فى عيون الدرنات أما فى نموات العيون فإن السلالة المعتدلة كانت متجمعة بشكل أكبر.

جدول ٢٨ : اكتشاف السلالة المعتدلة والشديدة فى أجزاء النبات المختلفة فى سبعة أصناف من البطاطس فى طور الإصابة الثانى:

الصنف	السلالة المعتدلة				السلالة المعتدلة			
	أورق	درنات	عيون	نموات عيون	أورق	درنات	عيون	نموات عيون
Azalia	5/8	+	1/5	-	5/8	+	6/6	-
Dryf	5/6	+	4/4	-	6/8	غير موجود	6/6	-
Pola	6/8	+	6/6	-	0/8	غير موجود	0/6	-
San	8/8	+	6/7	12/12	6/8	+	14/14	3/8
Sokola	7/7	+	9/9	27/30	4/7	+	1/8	20/20
Tarpan	6/8	+	6/6	10/10	8/8	+	8/8	25/25
Uran	8/8	+	5/5	15/15	5/8	+	4/4	2/6

يمثل الكسر عدد النباتات الموجود فيها الفيروويد على عدد النباتات المختبرة

+ تعنى الفيروويد موجود. (–) لم تختبر.

تأثير المسبب على التكاثر الجنسى والانتقال خلال البذور الحقيقية فى البطاطس:

لقد تبين أن إصابة نباتات البطاطس بالفيروويد PSTVd يؤثر على التكاثر الجنسى فى النباتات. إن الزيادة المطلقة أو النقصان المطلق فى هذه العملية يعتمد على

الجينوتايب وعلى وضع الإصابة فى الأبوين المستعملين فى الزراعة. وبشكل عام فإن أصناف البطاطس المستعملة والمصابة بالفيرويد عند عمل تلقيح بينهما وهما مصابان هذا يؤدى إلى زيادة معنوية فى عقد الثمار، زيادة وزن البذور وزيادة فى إنبات البذور. عندما يكون الأب (الملقح) مصاب فإن عدد الثمار العاقدة يشابة الكنترول أو أقل وكان هناك زيادة فى عدد البذور فى كل ثمرة. إن هذه الحقيقة التى ذكرت بزيادة عقد الثمار وإنبات البذور التى تحدث، تفسر بأن هناك ميكانيكية للفيرويد PSTVd فى البقاء الدائم فى الطبيعة والذى يتناقض مع إصابات الفيرس للنبات حيث أن هذ العمليات تنخفض بشكل واضح فى نباتات العائل.

يبدو أن فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس يتكيف بشكل كبير جداً للبقاء الدائم والإنتشار خلال البذور الحقيقية فى البطاطس، زيادة على ذلك فإن العلاقة الضعيفة بين ظهور الأعراض على البادرات والمقدرة على الكشف عن الفيرويد جعل اكتشاف البذور الملوثة من الصعوبة بمكان. إن إختبارات البذور الحقيقية فى البطاطس أظهرت أن إنتقال الفيرويد خلال البذور يكون نسبة ١٠٠ ٪ بعد أن تكون هذه البذور قد حفظت على درجة حرارة ٤°م لمدة ١٢ سنة. أما تأثير الفيرويد على عدد البذور فقد وجد أنه إذا كانت الأم سليمة والأب مصاب يكون هناك خفض فى عدد البذور بنسبة ٤٦ ٪ أما إذا كانت الأم مصابة والأب سليم فيحدث زيادة فى عدد البذور بنسبة ٦٦ ٪. أما إذا كانت الأم مصابة والأب مصاب يحدث خفض فى عدد البذور بنسبة ٦٢ ٪.

أما بالنسبة لوزن البذور فإذا كانت الأم سليمة والأب مصاب ينخفض وزن البذور بنسبة ٥٠ ٪ أما إذا كانت الأم مصابة والأب سليم يزيد وزن البذور بنسبة ٢٦ ٪. وعندما تكون الأم مصابة والأب مصاب ينخفض وزن البذور بنسبة ٠,٢٥ ٪.

لقد تم اكتشاف فيرويد PSTVd فى حبوب اللقاح فى كثير من أصناف البطاطس المزروعة وذلك باستعمال طريقة R - PAGE. إن تلقيح ازهار النباتات السليمة بحبوب لقاح حاملة للفيرويد أدى إلى إصابة الأوراق الموجودة فى قاعدة

النورة، الأوراق القمية والدرنات. وبإجراء التحليل فى ثمار البطاطس(الثمار الحقيقية) تبين أن هناك إصابات متفرقة فى كل من السبلات، جلد الثمرة ولب الدرنة. أما البذور المأخوذة من كل ثمرة كانت ٣٥ ـ ٦٦ ٪ مصابة بالفيرويد وإن نسبة الإصابة فى البذور لم تختلف باختلاف الصنف ولم تتأثر بموقع النورة أو بعدد الثمار المتكونة فى نفس النورة.

سلالات الفيرويد:

إن لفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس سلالتين، إحداهما شديدة Severe والأخرى معتدلة Mild. تختلف السلالة المعتدلة عن السلالة الشديدة فى ثلاثة نيوكليتيدات متغيرة فقط. توجد السلالة المعتدلة فى الطبيعة عشرة أضعاف وجود السلالة الشديدة. إن تحديد وجود السلالة المعتدلة يتطلب حقن أولى فى نباتات الطماطم بالسلالة المجهولة، يتبع ذلك الحقن بالسلالة الشديدة. إن غياب تكشف الأعراض فى النباتات المحقونة يعتبر دليلاً على وجود السلالة المعتدلة. هذا الإجراء بطئ ويحتاج حوالى ٥ ـ ٧ أسابيع ويتطلب تنمية نباتات الطماطم على درجات حرارة عالية وتوفر سلالة شديدة لاستعمالها فى الحقن.

إن طريقة Polyacrylamide gel electrophoresis استعملت على نطاق واسع لتعريف وتحديد وجود جزيئات الفيرويد فى مستخلص الحمض النووى من النبات، إلا أن طريقة R - PAGE وهى Return polyacrylamide gel electrophoresis استحدثت لوصف الفيروسات والفيرويدات ذات RNA الدائرى. إن هذه الطريقة تستطيع أن تكشف عن فيرويد PSTVd فى عينة تحتوى ٨٠٠ بيكوغرام (البيكوغرام يساوى واحد من مليون مليون غرام) من الفيرويد.

لقد أمكن عزل السلالتين عن بعضهما البعض بطريقة R - PAGE، حيث أن الحمض RNA الفيرويدى يهاجر أو ينتقل أكثر بطئاً من الأحماض النووية الأخرى فى المستخلص. إن حركة حزم الفيرويد من العينات المحتوية السلالة الشديدة تكون

٣ – ٤ ملم أبطء فى الاتجاه المنعكس Return direction من تلك المحتوية على سلالات معتدلة. إن التحضيرات الممزوجة من السلالة الشديدة والسلالة المعتدلة المختلفة تنفصل إلى حزمتين محدودتين جيداً والتى توضح الهجرة المختلفة بين السلالة الشديدة والسلالة المعتدلة. إن الأصل المأخوذ منه المستخلص من الأعضاء المختلفة (درنات، براعم، مدادات وأوراق) أو أنواع النباتات المختلفة (طماطم، بطاطس) **Scopolia sinensis** لا يؤثر على سلوك الهجرة فى سلالات الفيرويد. إن هذه الطريقة مؤكدة تماماً مع أكثر من عزلة شديدة وتكون قادرة على عزل وتحديد العزلة المعتدلة من العزلات الشديدة للفيرويد خلال بضع ساعات إذا ما قورنت مع الطرق الأخرى التى تحتاج إلى أسابيع. فى هذه الطريقة تعرض جزيئات الفيرويد إلى ظروف دنتره وهذا يؤدى إلى الحصول على فصل عن طريق بطء الحركة لجزيئات الفيرويد.

اكتشاف السلالة المعتدلة فى بذرة حقيقية واحدة للبطاطس:

إن البذور الحقيقية للبطاطس قد استعملت على نطاق واسع وأصبح عليها طلب كبير فى زراعات البطاطس فى البلاد النامية وذلك بسبب سهولة إنتقالها وتخزينها وخلوها من الكائنات الممرضة التى تصيب البطاطس مع استثناء بعض الفيرسات وفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس. إن البذور الحقيقية للبطاطس قد إستعملت فى الصين منذ سنة ١٩٧٢.

ينتقل فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس بكفاءة عالية عن طريق البذور فى كثير من العوائل النباتية من ضمنها **Solanum tuberosum**. إذا ما تصادف وجود هذا الفيرويد فى بذرة حقيقية واحدة للبطاطس أو فى إنبوبة اللقاح أو الأجزاء النباتية أثناء عمليات التربية، عندئذ فإن تبادل البذور الحقيقية للبطاطس بين منتجى وزراع البطاطس فى الأقطار المختلفة يتطلب سرعة الكشف عن وجود هذا الفيرويد فى البذرة. إن بادرات البطاطس الناتجة من زراعة بذور حقيقية للبطاطس والمعروف أنها مصابة ١٠٠ ٪ بالفيرويد لا يظهر عليها كلها أعراض الإصابة بالفيرويد. فى بعض

الحالات فإن هذا الفيرويد يمكن أن يكتشف فقط فى النباتات ذات عمر ٢ ـ ٣ أسابيع والنامية من بذور حقيقية مصابة وإذا كانت النباتات ذات عمر أكبر من ذلك فإنه يصعب اكتشاف الفيرويد فيها وبالتالى فإن تشخيص الفيرويد المبنى على الأعراض لوحدها يكون صعب.

إن كشف الفيرويد فى بذرة حقيقية مفردة للبطاطس كان فى السابق يتطلب الحصول على مستخلص الفيرويد من البذرة ثم يحقن هذا المستخلص فى نباتات طماطم **L. esculentum** يتبع ذلك استعمال طريقة PAGE. إن هذه الطريقة تستعمل عدد محدود من العينات وتحتاج إلى وقت طويل. أما طريقة تهجين الحمض النووى تستطيع أن تكشف الفيرويد فى بذرة مفردة من بين ١٦ بذرة أو تستطيع أن تكتشف الفيرويد من عينة تحتوى بذرة مصابة من بين ٨٠ بذرة سليمة.

أما طريقة R - PAGE فقد أجرى عليها بعض التحويرات للتمييز بين السلالة الشديدة والمعتدلة الموجودة فى بذرة حقيقية فى البطاطس. ونظراً لأن كمية البذور المتحصل عليها من الحقول المزروعة بالبطاطس والمصابة بالفيرويد تختلف فى نسبة الإصابة فقد أمكن اكتشاف الفيرويد فى بذرة مفردة ساكنة أو بذرة مفردة قد نمت. وتبين أن البذرة المفردة الساكنة تحتوى ٠,٨ ـ ١٠ نانوغرام من RNA الفيرويدى فى البذرة الواحدة. وقد أمكن بطريقة R - PAGE اكتشاف الفيرويد فى مستخلص بذرة مفردة مخفف ١ : ١٦ يعنى حوالى ٥٠٠ بيكوغرام.

إن البذور المنبتة والبذور الحقيقية للبطاطس النامية فى المعمل على درجة ١٩°م أظهرت معدلات متشابهة فى نقل الفيرويد عن طريق البذور. لم يكن هناك تغير فى اكتشاف الفيريد فى البادرات النامية من بذرة حقيقية مفردة نامية لمدة ٤ ـ ١٠ أسابيع. فى العينات المختلطة من بذور حقيقية سليمة وأخرى مصابة بالفيرويد فقد أمكن اكتشاف الفيرويد فى بذرة واحدة من بين ٩٠ ـ ١٠٠ بذرة سليمة. إن استعمال طريقة R - PAGE هى قريبة الشبه فى النتائج المتحصل عليها من طريقة تهجين الحمض النووى.

المدى العائلى:

إن أمراض النبات المتسببة عن فيرويدات من الممكن أن تقاوم عن طريق ادخال أصناف مقاومة للمرض، هذه الفكرة أدت إلى إجراء أبحاث كثيرة عن مدى قابلية أو مقاومة الأصناف المختلفة من البطاطس للإصابة بالمرض. لقد أجريت إختبارات على ٨١ نوع من البطاطس لمعرفة تفاعلها مع الفيرويد فوجد أن الخمسة أنواع المذكورة فيما يلى هى مقاومة للمرض: ـ

1 - **Solanum guerreroense**

2 - **S. hjertingii**

3 - **S. multidissectum**

4 - **S. acaule** بعض الطرز فقط

5 - **S. berthaultic**

كذلك فإنه لم يوجد أى صنف منيع Immune ضد الإصابة بفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس وباستثناء الأنواع المذكورة فإن جميع الأصناف تظهر أعراض الإصابة بالمرض. هناك ٣٨ نوع من البطاطس تصاب بالفيرويد ولكنها تكون Symptomless. كذلك يوجد بعض الطرز تكون مقاومة للفيرويد عندما يجرى لها حقن بواسطة العصارة ولكنها تصبح قابلة للإصابة إذا حقنت بالتطعيم. لا يوجد أى صنف تابع للنوع **Solanum tuberosum** ذو مقاومة عالية للمرض. يصيب الفيرويد معظم أنواع العائلية الباذنجانيـة، أما العائل المشخص له فهو نـبات الطماطم **Lycopersicon esculantum** Rutgers.

تثبيط الفيرويد:

عند أخذ أجزاء النبات المصابة بفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس PSTVd وكذلك أنسجة الدرنة المصابة وتعريضها مرات متكررة للتجميد والإذابة تحت

ظروف متحكم بها (-١٨°م إلى - ٢٠°م) ثم ٥°م فإن الفيرويد يفقد من هذه الأنسجة ووجد أنه يختفى بسرعة أكثر فى نسيج الدرنة منه فى العروش. إن درنات ١٧ صنف بطاطس أظهرت نفس النتيجة ولكن بشئ من الاختلاف. فى ٧ أصناف من بين ١٧ صنف فإن الفيرويد إنخفض وجوده بشكل معنوى بعد المعاملة بالتجميد والإذابة مرة واحدة. فى ٦ أصناف من بين ١٧ صنف فإن الفيرويد يمكن أن يسترجع حيويته ويسبب أمراض ثانية بالرغم من تعرضه للتجميد والإذابة. أما عند تعريض درنات البطاطس المصابة بالفيرويد إلى درجة حرارة من ١٣,١°م إلى - ١٥,١°م هذا يؤدى إلى التخلص التام من الفيرويد فى الدرنات.

إن فيرويد PSTVd مقاوم لدرجات الحرارة المرتفعة والمنخفضة وتغيرات pH البيئة. درجة الحرارة المثبطة للفيرويد في العصارة تقع ما بين ٧٥ ـ ٨٠°م أما فى تحضيرات الفيرويد تكون ٩٩ ـ ١٠٠°م. درجة التخفيف القصوى ٥ × ١٠$^{-٤}$ ملغ / مللتر. إن حيوية العصارة فى نباتات الطماطم المصابة بالفيرويد يمكن أن يحتفظ بها لمدة أربعة أيام على درجة ٢٠°م و ١٠ أيام على درجة حرارة ٤°م. أما عصارة نباتات البطاطس تدوم لمدة ٣، ١٠ أيام بالترتيب بالنسبة للطماطم. أما الفيرويد نفسه RNA فيبقى محتفظ بحيويته لمدة ٤٠ ـ ٤٥ يوم على ٢٠°م ولمدة ٥٠ ـ ٦٠ يوم على ٤°م. عند تخزين الأجزاء النباتية المصابة بالفيرويد وكذلك تحضيرات RNA لمدة طويلة على (ـ٢٠)°م فلا يبقى الفيرويد حياً فى النبات.

وجد أن أفضل تركيز للفيرويد فى نباتات الطماطم يكون عند نموها على درجة حرارة ٣١°م ويكون التركيز أقل عند نموها على درجة حرارة ٢٣°م وعلى شدة إضاءة مختلفة. إن تقصير فترة الإضاءة لمدة ١٧ ـ ١٨ ساعة يومياً لا تؤثر على بناء الفيرويدات فى النبات، أما على ٣١°م فإن الأعراض التى تكون شديدة إذا تعرضت لإضاءة منخفضة تنخفض شدة الأعراض هذه وتتأخر فى الظهور ثانية. أما على درجة ٢٣°م فإن الأعراض تتأخر أسبوعين إذا كانت الإضاءة منخفضة أو مرتفعة. لاتظهر الأعراض إذا وصلت درجة الحرارة ١٥°م فى الليل. إن الأعراض التى تكون

على شكل نكروزز فى الأوراق تظهر بشكل واضح فى درجات الحرارة المتوسطة أكثر منه عندما تكون درجات الحرارة عالية هذا يشابه الإصابة الفيروسية.

يمكن تثبيط الإصابة بالفيرويد PSTVd عن طريق استعمال DNA Oligonucleotide. لقد أمكن إجراء تهجين بين مجموعة نيوكليتيدات قصيرة وفيرويد PSTVd فى مخلوط معدى. عندئذ تثبطت إصابة الفيرويد بنسبة ٧٥٪. عندما تكون مجموعة النيوكليتيدات القصيرة مكملة للنيوكليتيدات ٧٩ ـ ١١٠ من الفيرويد. وإن التثبيط الكلى للإصابة الفيرويدية لوحظت عند استعمال مجموعة نيوكليتيدات قصيرة مكملة للنيوكليتيدات ٤٢ ـ ٢٨ فى نفس المولر زيادة من DNA فوق PSTVd، مع أن ٢٠٠ ضعف مولر زيادة كانت كافية للتثبيط الكامل للإصابة بالفيرويد PSTVd.

إن مجموعة النيوكليتيدات القصيرة هذه تخفض الإصابة بالفيرويدات بنسبة ٨٣٪ عندما يتم التهجين على درجة حرارة ٣٠°م. أما مجموعة النيوكليتيدات القصيرة المحتوية ٢٢ و ١٥ قاعدة متوافقة مع مراكز ٤٢ ـ ٦٢ و ٦٣ ـ ٧٨ تظهر تأثير معنوى فى خفض الإصابة على درجات الحرارة المرتفعة جداً.

كما وأن DNA مضاد المعنى المكمل للنطاق الخاص بالمرضية (نيوكليتيدات ٤٢ ـ ٧٨) فى الخيط العلوى من الفيرويد PSTVd يثبط حيوية الفيرويد عندما يحصل لها تهجين فى المعمل لعمل معقد DNA / RNA هذا التثبيط لوحظ فى النباتات السليمة وفى بروتوبلاست النبات.

٢ ـ فيرويدات الحمضيات

Citrus Viroids

أ ـ وصف وتصنيف (تقسيم) فيرويدات الحمضيات

مقدمة:

إن أهمية حدوث الأمراض الفيرويدية فى الحمضيات قد تم تحديدها منذ تعريف فيرويد إكسوكورتز الحمضيات كنوع ممثل لهذه المجموعة التى هى عبارة عن حمض نووى RNA ممرض. وحتى سنة ١٩٨٥ بقى فيرويد اكسوكورتز الحمضيات CEVd هو الفيرويد الوحيد المعروف جيداً والمعروف أنه يؤثر على الحمضيات. كذلك فإن أبحاثاً كثيرة قد ذكرت بأن هناك مرض يصيب الحمضيات اسمه مرض ككسيا Cachexia وذلك سنة ١٩٨٣، إلا أن هذا المرض كان معروفاً منذ سنة ١٩٢٥ واعتبر أنه مرض فيروسى ثم أثبتت الأبحاث بعد ذلك بأنه مرض فيرويدى. وكان يسمى فى السابق مرض زايلوبوروسز Xyloporosis وينتشر فى منطقة حوض البحر الأبيض المتوسط.

ظهرت بعد ذلك تقارير حديثة تفيد بأن هناك فيرويد مميز عن كلا الفيرويدين السابقين ولكنه يحدث أعراض مرض اكسوكورتز متوسطة إلى شديدة على الاترج أو السترون **Citrus medica** وبالتالى سمى Citron Variable viroid ويرمز له (CVaVd) وذلك منذ سنة ١٩٨٥. ثم بعد ذلك تم تعريف أعداداً أخرى من الفيرويدات التى تصيب الحمضيات، بعضها وصف على أنه سلالة بسيطة من CEVd والبعض الآخر حدد على أنه فيرويد منفصل.

بعد الدراسات المستمرة على فيرويدات الحمضيات ثبت بأنها مجموعة كبيرة من الفيرويدات أكثر منها فى أى مجموعة نباتية أخرى. ولقد قدر عدد هذه الفيرويدات حوالى ١٢ فيرويد وهى مقسمة إلى خمسة مجموعات وذلك اعتماداً على حجم الجزئ، تماثل تتابع النيوكليتيدات وتفاعل العائل. إن التقدم فى تعريف هذا العدد الكبير من فيرويدات الحمضيات قد تم نتيجة معرفة عائل مشخص جديد وهو الاترج **Citron medica** حيث أن هذا العائل عنده المقدرة بأن يكون عائل عام لجميع فيرويدات الحمضيات. إن البادرات الحساسة لطراز من السترون (الاترج) وهو نوع Arizona 861 - S1 قد عمل كحاوية أولية لفهرسة مرض الاكسوكورتز وذلك لمدة عشرة سنوات منذ سنة ١٩٧٧. هذا الطراز من الاترج يكون أيضاً عائل بدون أعراض Symptomless لفيرويد ككسيا فى الحمضيات.

إن الأبحاث القديمة التى كانت تجرى على مرض اكسوكورتز الحمضيات كانت تذكر أعراض المرض بأنها تشوهات فى قلف الشجرة وإنفصاله عن الساق وتشققه، هذه الأعراض تظهر على الأصل، ويظهر تقزم ملحوظ فى الأشجار النامية على برتقال ثلاثى الأوراق **Poncirus trifoliata** وأصول ليمون (**Citrus limo-nia**) Rangpru. وهكذا فإن الاختلافات فى درجة التقزم وتكون القشور ووقت ظهور هذه الأعراض التى كانت تذكرها الأبحاث القديمة أدت إلى القول بأن هناك سلالات مختلفة من مسبب مرض اكسوكورتز الحمضيات.

إن تطور ظهور الإختبارات الحيوية باستعمال الاترج **Citrus medica** وحساسيته العالية وسرعة تكشف الأعراض عليه أدى إلى التنازل الفعلى عن البرتقال ثلاثى الأوراق ذو النظام الكلاسيكى فى فهرسة المرض كما وأن ظهور تنوعات من الأعراض على الاترج تتراوح من تقزم شديد تدلى الأوراق وتجعدها ونكروزز والتفاف عنق الورقة بالإضافة إلى نكروزز العرق الوسطى والتلون البنى لقمه نصل الورقة، كلها إعتبرت أدلة مشخصة للإصابة بمرض اكسوكورتز الحمضيات.

الأعراض الحقلية كانت دائماً تصنف على أساس أعراض بسيطة، متوسطة أو شديدة فقط وذلك على أساس تفاعل الاترج. فى معظم الحالات فإن هذا التصنيف لم يتأكد عن طريق حقن البرتقال ثلاثى الأوراق لتثبيت الأعراض الكلاسيكية لمرض اكسوكورتز الحمضيات.

بعد نقل العزلات الشديدة لمسبب المرض إلى عوائل عشبية مثل-**Gynura auran tiaca** فإن العامل المسبب أمكن عزله ووصفه بأنه يتكون من حمض نووى RNA به ٣٧١ نيوكليتيدة وسمى فيرويد اكسوكروتز الحمضيات-The citrus exo (CEVd) cortis viroid. عند حقن الاترج بتحضيرات نقية من فيرويد CEVd المأخوذ من نبات **Gynura** دائماً يظهر عليه أعراض التقزم الشديدة، تدلى الأوراق وتجعدها، هذه الأعراض توصف بها العزلات الشديدة. أما مصادر العدوى التى تسبب تفاعل بسيط أو معتدل مع الاترج لا يمكن أن تنقل إلى نبات **Gynura**.

واعتماداً على نتيجة الأبحاث التى أجراها **Schlemmer et al** سنة ١٩٨٥ والعالم **Duran - Vila et al** سنة ١٩٨٦ فإنهم قد ضموا على الأقل ثلاثة فيرويدات مميزة تسبب أعراض بسيطة ومتوسطة على الاترج، إلا أنهم قد ذكروا بأن تحليل الأعراض الحقلية كلها بواسطة تتابع طريقة PAGE قد أظهرت بأنها تحتوى من واحد إلى خمسة فيرويدات.

أما باستعمال طرق الكشف الأكثر تقدماً فى أبحاث الفيرويدات وباستعمال طرق تحليل الكروماتوغرافى السليليوزية CF - 11 والتهجين الجزيئى لمنقب خاص بفيرويد الحمضيات أمكن وصف عدداً من فيرويدات الحمضيات من مصادر حقلية ومن مجموعات فيرويدية أخرى فى أسبانيا وكاليفورنيا وكانت هذه الفيرويدات الموصوفة تحدد اعتماداً على الصفات الفيزيائية والحيوية وقد ذكرت بأنها خمسة مجموعات محددة.

تطابق فيرويدات الحمضيات فى عزلات الاكسوكورتز:

Identification of Citrus Viroids In Exocortis Isolates

إن نتائج الأبحاث التى قام بها Duran - Vila et al سنة ١٩٨٦ تدل على أن العوامل القابلة للانتقال المرافقة مع مرض اكسوكورتز الحمضيات يمكن أن تضم عائلة من الفيرويدات عدا عن CEVd وأن حجوم هذه الفيرويدات تتراوح من ٢٧٥ ـ ٣٧١ نيوكليتيدة. عندما حضر خليط صناعى من تحضيرات حمض نووى من أترج (سترون) بعزلات منتقاه ثم عرضت للتحليل بطريقة تتابع PAGE، ظهر أن هناك ثمانية فيرويدات على الأقل عدا عن فيرويد CEVd وفيرويد الأترج المتقلب Citron Variable Viroid (CVaVd). ولكى تختبر صفات هذه الفيرويدات، تؤخذ مزارع نقية من هذه العزلات حيث توجد طبيعياً ويمكن أن تتناسخ فى عوائل عشبية خاصة أو عن طريق electron - elution لشريحة فيرويد مفردة بعد عملية d PAGE. هذه الأحماض النووية للفيرويدات وصفت وحددت باستعمال الطرق الآتية:ـ

١ ـ يمكن اكتشاف الأشكال الدائرية والمستقيمة بواسطة طريقة d PAGE.

٢ ـ مقارنة معدلات الهجرة للأشكال الدائرية.

٣ ـ تحديد إنجذابها فى طريقة CF - 11 سليليوز.

٤ ـ تقدير تماثل تتابع نيوكليتيداتها باستعمال التهجين الجزيئى عن طريق المنقب cDNA للفيرويدات الخاصة.

بعد إجراء هذه الطرق على الفيرويدات تبين أنها تتكون من خمسة مجموعات. المجموعة الأولى هى مجموعة CEVd أما المجموعة الثانية فهى مجموعة فيرويدات الحمضيات رقم I وتسمى CVd - 1 وهذه المجموعة تشمل فيرويدين الأول 1a والثانى 1b. أما المجموعة الثالثة فهى مجموعة فيرويدات الحمضيات رقم II

وتسمى CVd - II وهى تشمل أيضاً II a ، II b وإن هذا الأخير كان يسمى فيرويد ككسيا للحمضيات Citrus Cachexia Viroid ويرمز له (CCaVd). أما المجموعة الرابعة فهى تشمل أربعة فيرويدات CVd - IIIa ، IIIb ، IIIc ، IIId. أما المجموعة الخامسة فهى تسمى مجموعة الحمضيات رقم IV وتضم فيرويد واحد فقط. وبالتالى يكون هناك عشرة فيرويدات تصيب الحمضيات كما هو ظاهر فى جدول رقم ٢٩.

جدول ٢٩ : مقارنة بين الصفات الفيزيائية للفيرويدات الحمضيات.

المجموعة	الفيرويد	عدد النيوكليتيدات	النسبة المئوية للايثانول التى فيها تبدأ الفيرويدات فى الفصل		تفاعل التهجين مع متقلب cDNA			
			٢٥٪	٢٠٪	CEVd	CVd - Ib	CCaVd	ASBVd
CEVd	CEVd	٣٧١	—	+	++++	-/+	—	—
CVd - I	CVd - Ia	٣٤٠	—	+	—	++++	—	—
	CVd - Ib	٣٣٠، ٣١٨	—	+	—	++++	—	—
CVd - II	CVd - IIa	٣٠٥، ٣٠٢	+	—	—	—	++++	—
	CVd - IIb	٣٠٠، ٢٩٩	+	—	—	—	++++	—
CVd - III	CVd - IIIa	-	+	—	—	—	—	—
	CVd - IIIb	٢٩٠	—	+	—	—	—	—
	CVd - IIIc	٢٨٥	—	+	—	—	—	—
	CVd - IIId	٢٨٠	—	+	—	—	—	—
CVd - IV	CVd - IV	٢٧٥	+	—	+	—	—	—

ملاحظات على الجدول: ـ

١ ـ الفيرويد الذى أمامه رقمين عن عدد النيوكليتيدات يدل الرقم الأول على الأبحاث القديمة والرقم الثانى مأخوذ من الأبحاث الحديثة.

٢ ـ يتم تحديد القواعد اعتماداً على حركة الفيرويدات فى ال PAGE .

٣ ـ التفاعل النسى مع cDNA حدد بواسطة Electrolbot hybridization. تبدأ بمعدل (+) إلى أعلى مستوى (++++) مبنى على التقدير المنظور لكثافة الشرائح Autoradiograph عند مقارنتها مع تركيز الفيرويد، كما يلاحظ بعد الصبغ بمادة بروميد الإيثيديوم قبل ال electrotransfer.

تعريف مجموعات فيرويدات الحمضيات :

Definition of Citrus Viroid Groups

١ ـ مجموعة CEVd :

هذه المجموعة تمثل مجموع الفيرويدات (العزلات، التنوعات، الأشكال) التى تتبع فيروید اكسوكورتز الحمضيات. إن فيروید اكسوكورتز الحمضيات CEVd هو العامل المسبب لمرض اكسوكورتز الحمضيات وهو أكبر فيرويدات الحمضيات إنتشاراً وأكثرها دراسة وتحديداً وله تنوعات تتابع ذات نيوكليتيدات تتراوح من ٣٧١ إلى ٣٧٥. وهو أكثر فيرويدات الحمضيات سهولة ودراسة وله مدى عوائلى واسع أكبر من بقية فيرويدات الحمضيات كما هو فى جدول ٣٠ وهو يسبب تقزم شديد، تدلى الأوراق ونكروزز على أشجار الاترج المحقونة به وسوف نتكلم عن المرض بالتفصيل فيما بعد إن شاء الله.

حالة شاذة لفيروید CEVd :

هناك تنوع غير عادى لفيروید اكسوكورتز الحمضيات اكتشف سنة ١٩٩٣ من قبل العالم J.S. Semancik ورفقاءه وذلك أثناء عملهم على **G. aurantiaca**. وجد هذا الفيروید عندما استعمل مصدر لقاح من **G. aurantiaca** وإستعمل لحقن هجين طماطم ناتج من تلقيح الطماطم-**Lycopersicon esculentum** X **L.** peruvia-num. وجد أن هذا التنوع يحتوى ٩٢ نيوكليتيدة إضافية على النيوكليتيدات الأصلية فى CEVd. وحيث أن الوضع الطبيعى لفيروید CEVd يحوى ٣٧١ نيوكليتيدة فيصبح التنوع الجديد به ٤٦٣ نيوكليتيدة وسمى هذا النوع- CEVd D92 والذى يظهر صفات الشكل المستقيم والدائرى للفيروید ويحوى تتابع مكرر مرتين للمسافة بين نطاق V و T_2 وهذا التكرار يساوى ٩٢ نيوكليتيدة. هذا الفيروید يعطى أعراض بسيطة جداً أقل من الأعراض المعتدلة تظهر على **Gynura**. عند مقارنة هذا الفيروید (مقارنة تتابع وتركيب CEVd - D92) مع فيروید

كادانج ـ كادانج ظهرت تشابهات فى المناطق المولدة للتكرار الطرفى الذى يحدث طبيعياً، مما يؤدى إلى الاقتراح إلى إمكانية تحديد الموقع المفضل لإعادة الاتحاد فى RNA بين الفيرويدات.

إن الطريقة الصحيحة لتولد CEVd - D92 غير معروفة، وعلى أية حال فإن اللقاح الأصلى هو CEVd تنوع t ويكتب (CEVd t) إختبر بواسطة هجين طماطم. إنه من غير الممكن تقليد أو الحث على إنتاج هذه المجموعة ٩٢ الزيادة فى تنوع CEVd. هناك عاملان يبدو أنهما أساسيان فى تخليق وإحداث CEVd - D92 هما: ١ ـ هجين الطماطم الناتج من تلقيـح **L. esculentum** مع **L. peruvianum**. ٢ ـ وجود عزلة CEVd مختارة بواسطة ذلك العائل من بين تجمعات CEVd المنتجة فى نبات **Gynura**. إن الطماطم الهجين ليست هى النقطة الأساسية فقط فى إشتقاق CEVd - D92 ولكنها تلائم تكاثر وتجمع تنوع ال ٤٦٣ نيوكليتيدة أكثر منه فى أل CEVd.

إن السلالة CEVd - D92 لم تعرف أبداً منذ ما يزيد عن ٢٠ سنة من الأبحاث المستمرة على فيرويد CEVd فى الجينيورا، زيادة على ذلك لم يكن هناك دليل على تناسخ هذه السلالة عندما كان يخلط CEVd و CEVd - D92 كمصدر لقاح فى الجينيورا. مع ذلك فإنه من الممكن القول بالنقل المنفصل لهذه السلالة فى الجينيورا عندما يستعمل اللقاح الأولى كمصدر نقى من هذه السلالة. هذا يمكن أن يدل على أن تخليق الزيادة الطرفية فى CEVd لا يكون محدوداً أو أنه حادث غير عادى ولكن إلى حد ما فإن هذا التناسخ والتجمع لهذا التنوع يكون معرضاً إلى منافسة غير ملائمة مع CEVd فى بعض العوائل.

فى عملية إصابة الجينيورا بالسلالة CEVd - D92 يظهر تغيرات مرضية بسيطة جداً وتكون على شكل نكروزز يتقاطع مع العرق الوسطى فى الورقة، وهذا يمثل أبسط أنواع التفاعل المذكورة لأى عزلة من الفيرويد CEVd فى الجينيورا. إن وجود نفس تتابع النيوكليتيدات كما فى CEVd والذى يحدث تفاعل شديد من

الأعراض مع زيادة فى العدد الكلى للنيوكليتيدات يؤكد مرة ثانية أهمية التكوين فى تعبيرات النشاط الحيوى فى الفيرويدات. ولكن يبقى السؤال المحير وهو لماذا تحدث أعراض بسيطة من هذه العزلة؟؟.

إن تتابع النيوكليتيدات فى السلالة CEVd - C تختلف عن السلالةCEVd - A فى أربعة قواعد فقط هى رقم ٢٦٤، ٢٧٨، ٣٠١، ٣١٣. لقد استعملت السلالة C كمرجع لدراسة تتابع العزلة الجديدة CEVd - D92 وذلك نظراً لأن كلا العزلتين مأخوذة من نفس أصل المصدر وتكاثرت فى الجينيورا **Gynura**. كما وأن تتابع السلالة الجديدة تشارك سلالة A على مواقع تركيبية متساوية فى ثلاثة نيوكليتيدات هى أرقام ٢٦٤، ٢٧٨ و ٣٠١ وهى من الأربعة مواقع المميزة للسلالة A عن السلالة C. وبالتالى فإن الاختلافات بين عزلات الفيرويد CEVd تكون أقل حد ممكن.

يجب أن نعطى أهمية لحقيقة أن كلا التتابعين فى سلالة A وسلالة C قد حدد من قبل عشرة سنوات (١٩٨٣) وذلك عن طريق التتابع المباشر للحمض RNA وأن هذه الطريقة وهذا الوقت قد يكون له بعض الأخطاء. وعلى أية حال فإن تتابعات ثلاثة أرباع الطول الكامل لكلونات العزلة الجديدة كانت مثالية وبالتالى تدل على درجة عالية من التماثل فى تجمعات العزلة الجديدة مقوية العلاقة القريبة مع التتابعات المذكورة للسلالة A مع تلك التى فى السلالة C.

بمعاينة المناطق ذات التتابع المتكرر فى العزلة CEVd - D92 يلاحظ أن أربعة نيوكليتيدات متسلسلة هى AGCU تسبق مباشرة بداية ونهاية التكرار العلوى على نهايات ١٣٢ إلى ١٣٥ و ١٧٩ إلى ١٨٢ بالترتيب، هذه المواقع تدعم النموذج المتوقع حين حدوث تأثيرات فجائية لـ RNA Polymerase فى عمل نسخ متقطع، كما قد إقترح عند حدوث التكرار الطرفى الموجود فى فيرويد CCCVd. إن أهمية هذه النيوكليتيدات الأربعة فى العروة النهائية من نطاق T_2 قد ظهرت عند فقد الحيوية للفيرويد بعد إزالتها من التتابع، وبالتالى فإن التعبيرات البيولوجية

لفيرويد CEVd يمكن أن تستبدل بشدة بواسطة إما غياب أو تكرار هذه الأربعة قواعد وهذا يبنى إقتراحاً عن أهمية القواعد فى تجهيز الحمض RNA.

إن التتابع المتكرر فى CEVd - D92 يبدأ تقريباً على حد اليد اليمنى بالضبط من منطقة Pr ضمن نطاق V وهو موقع هام يتدخل فى إعادة تنظيم RNA بين الفيرويدات، وبالتالى فإن المرضية يمكن أن تتغير بشكل مثير فى غياب التتابعات الأساسية فى نطاق P أو التغيير العال فى منطقة Pr من نطاق V.

إن تحريك أو تعبئة نطاق T تفهم ضمناً من دراسة تماثل تتابع الفيرويد وصفات الفيرويد المتوقع. إن إتجاه تكرار T_2 فى فيرويد CCCVd وكذلك كما حدث فى CEVd من تضاعف يمكن أن يهدف إلى مواقع التجهيز المشجع فى تغييرات RNA فى نطاقات T بين الفيرويدات وبالتالى يمكن أن تكون مهمة فى إعادة الاتحاد والتطور فى جزئ الفيرويد.

قياساً على ظهور السلالة الجديدة D92 لفيرويد اكسوكورتز الحمضيات فإن التتابع المتكرر المتشابه فى نطاقات V و T_2 فى الفيرويد CCCVd يجب أن لا ينظر إليه الآن وكأنه ظاهرة غريبة. إن التطابق الموجود بين التركيبين يؤدى إلى القول بأن حوادث مماثلة فى تجهيز الفيرويد يمكن أن تحدث فى المستقبل فى التنوعات الكبيرة. كذلك فإنه عند مقارنة CCCVd والسلالة الجديدة CEVd - D92 يظهر أن هناك مواقع خاصة ظاهرة ذات أهميـة والتى يمكن أن تكون هامة جداً فى تجهيز RNA أو تعكس بسهولة أية مناطـق يمكـن أن يظهر فيها ارتباك فى التركيب.

٢ ـ مجموعة CVd - 1 :

وجد أنـه بعد تحليل عـزلات الاكسوكورتز فى كل من إسبانيا وكاليفورنيا تبين وجود فيرويد CVd - 1a بنفـس electrophoretic mobility (كما فى

الفيرويد 1 - RNA الذى ذكر فى أبحاث سابقة وأنه مسبب مرض للحمضيات) فى سبعة عزلات من بين ٣٧ عزلة مختبرة. عندما عرضت العزلات المختارة إلىCo electrophoresis - كمخلوط صناعى تحت ظروف دنترة، لم يلاحظ إختلافات فى معدل الهجرة فى عزلة CVd - 1a المأخوذة من مصادر مختلفة. وعلى النقيض من التفاعل الشديد المحدث بواسطة CEVd فى الأترج (السترون) وحيث أن أشجار السترون المحقونة بالفيرويد CVd - 1a نقى قد أظهرت التواء ملحوظ فى نصل الورقة وذلك كاستجابة للمواقع التى فيها نكروزز فى العرق الوسطى للورقة على السطح السفلى، على ١ ـ ٣ ورقات فقط من النباتات المحقونة.

إن التركيب الأساسى لمكونات عزلة فيرويد CVaVd (فيرويد السترون المتقلب وهو (Citron Variable Viroid) عند إجراء تحليل لها وجد أنها تهاجر بسرعة أكثر قليلاً من CVd - 1a وبالتالى عرفت على أنها CVd - 1b. هذه العلاقة المفهومة ضمناً مبنية على الحجم الذى حصل عليه بالاعتماد على معدلات متشابهة من الازالة لـ CVd - 1a و CVd - 1b من سيليلوز CG 11 وإن كلا الفيرويدين له مدى عائلى مقتصر على الاترج (السترون) كما فى جدول ٣٠.

إن تماثل تتابع النيوكليتيدات بين CVd - 1a و CVd - 1b يقدر بواسطة التهجين الجزيئى بمنقب CVd - 1b cDNA. عند مقارنة عينات من الحمض النووى مأخوذ من الأترج المحقون بعزلتين من CVd - 1a وعينة نقية من CVd - 1b (استعملت العزلة CVaVd لتنقية CVd - 1b) أجرى لهما electrotransferred مباشرة من الجيل محتوياً ٨ مول يوريا وهجنت مع Randomly Primed P^{32} la-belled CVd - 1b cDNA فتبين أن العزلتين هما فيرويدين منفصلين CVd - 1a و CVd - 1b.

جدول ٣٠: إنتقال وكثافة الأعراض لفيرويدات الحمضيات فى كواشف خاصة بالفيرويد.

المجموعة	الفيرويد	الأعراض فى النباتات الكاشفة			
		الاترج	الخيار	الاقحوان	جانيورا
CEVd	CEVd	++++	+	++++	++++
CVd - I	CVd - 1a	++	–	–	–
	CVd - 1b	++	–	–	–
CVd - II	CVd - IIa	+	+++	++	–
	CVd - 1Ib	+	+++	++	–
CVd - III	CVd - 1IIa	+++	–	–	–
	CVd - 1IIb	+++	–	–	–
	CVd - 1IIc	+++	–	–	–
	CVd - 1IId	+++	–	–	–
CVd - IV	CVd - 1V	+++	+	–	–

ملاحظات:

++++ = شديد، +++ = متوسط، ++ = بسيط، + = حامل بدون أعراض (يتكاثر الفيروويد) – = بدون أعراض ولكن لا يتكاثر الفيرويد فى النبات.

فى دراسة اجراها Lilach Ashulin وزملائه فى مركز أبحاث بيت دجن فى اسرائيل سنة ١٩٩١ ذكر فيها أن الفيرويد CVd - 1b هو فيرويد منفصل عن مجموعة فيرويدات الحمضيات. ولقد وجدوا أن هذا الفيرويد يسبب تقزم أشجار الكريب فروت Grapefruit فى اسرائيل ويسبب إنحناء أوراق الحمضيات وسمى Citrus bent leaf Viroid ويرمز له (CBLVd) ولقد عزل ونقى من اوراق

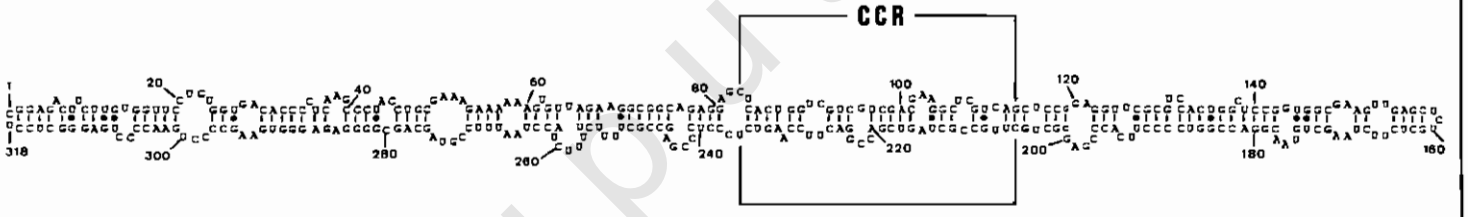
obeikandl.com

الافوكادو وبعد إتباع جميع طرق العزل والتتابع لهذا الفيرويد وجد أنه يتكون من ٣١٨ نيوكليتيدة (كان قد ذكر سابقاً أنه يتكون من ٣٣٠ نيوكليتيدة) وقد ذكروا أن هذه النيوكليتيدات فى خط مستقيم كما فى شكل ٤٠ ووجد أن به ٦٦٪ أزواج قواعد وقد صنفوا هذا الفيرويد مع تحت مجموعة ASSVd وذلك إعتماداً على مميزات المنطقة المركزية المحفوظة. فى حين أن جزء من منطقة النطاق P ومنطقة النهاية اليسرى تشبه فيرويد CEVd، وبالتالى ذكروا أن هذا الفيرويد هو أول فيرويد من تحت مجموعة ASSVd يصيب نباتات الحمضيات.

نقل فيرويد CVd - 1b إلى الأفوكادو:

لقد تم نقل الفيرويد CVd - 1b إلى الافوكادو بواسطة التطعيم غير المتوافق، حيث نقل هذا الفيرويد من **Citrus macrophlla** بالتطعيم إلى بادرات الافوكادو **Persea americana**. ولقد وجد أن النقل المستمر لهذا الفيرويد بالتطعيم غير المتوافق له مدى عائلى محدود فى بضعة طرز من الافوكادو. إن المستخلص المأخوذ من افوكادو مصاب بالفيرويد CVd - 1b كان فعال على السترون (الاترج) وأحداث إلتواء فى الأوراق وتشوه الثمرة. كان أول تقرير عن إنتقال هذا الفيرويد إلى عائل غير الحمضيات بواسطة Rivka et al سنة ١٩٩٢ فى اسرائيل. إن مستخلصات الحمض النووى والنسيج المطعوم من أفوكادو نوع WI المصاب بالفيرويد CVd - 1b كانت فعالة على الاترج. إن هذا الفيرويد أمكن اكتشافه فقط بواسطة طريقة تحليل sPAGE فى نباتات الاترج والتى حقنت ميكانيكياً أو طعمت بنسيج مأخوذ من أفوكادو مصاب بالفيرويد CVd - 1b. هذا يؤدى إلى القول بأن نباتات الأفوكادو لم تصبح شاذة أو أقل من أن تصاب بالفيرويدات الأخرى (عدا عن الفيرويد الخاص بها) الموجودة فى **C. macrophylla**. إن نباتات الأفوكادو المحقونة بعزلة تسمى GTD 225 - S (عزلة تحمل عوامل التقزم القابلة للانتقال بالتطعيم) وهى تابعة للفيرويد CVd - 1b فوجد أن تركيز الفيرويد فى أوراق الأفوكادو خمسة إلى عشرة أضعافه فى الأترج، هذا يجعل الأفوكادو مصدر جيد لدراسة الصفات الأخرى لهذا الفيرويد. ولقد وجد أن تشوه ثمار الأترج يمكن أيضاً أن يفسر كنتيجة للإصابة بهذا الفيرويد CVd - 1b.

```
  1   CGGAGACUUC UUGUGGUUCC UGUGGUGACA CCCCUCAAGC CCUACCUGCG   50
 51   AAAGAAAAAA GUGUUAGAAG GCGGCAGAGG AGCUGACUGG UCGUCGUCGA  100
101   CGAAGGCUCG UCAGCUGCGG AGGUUGGGGU CGACUGGCUC CGGUGGCGAA  150
151   GUUGAGCUCU GCUCUUCUAA GCUGUAACGG ACCGGUCCCC UUCACCCGAG  200
201   CGCUGCUUGC CGCUAGUCGA GCGGACUUCC AAGUCUCCCU CCCGAGCCGC  250
251   UUUUCUUUUC UACCUAAUUU CCGUAGCAGC GGGGAGAGGG UGAAGCCCCU  300
301   GAACCCCUGA GGGCUCCU                                    318
```



شكل رقم ٤٠ :

يبين تتابع النيوكليتيدات فى الفيرويد CVd-1b وكذلك ترتيب النيوكليتيدات من ١ ـ٣١٨

إن التطعيم غير المتوافق بين عوائل غير متوافقة قد ذكر سابقاً بأنه يستعمل لنقل الفيرويدات لنباتات كاشفة. واعتماداً على ذلك يمكن أن تمتد عوائل الفيرويد إلى محاصل نباتية مهمة إقتصادياً، ويمكن أن تزداد أهميته الاقتصادية ونحصل على فوائد علمية من حيث استعمال إختبارات النقل بالتطعيم غير المتوافق للبحث عن المدى العائلى للفيرويدات المعروفة على الأشجار المثمرة والمهمة إقتصادياً.

٣ ـ مجموعة CVd - II :

كما ذكرنا سابقاً فإن العالم Duran - Vila et al سنة ١٩٨٦ قد ذكروا بأن هناك مجموعة فيرويدية سموها RNA - II تكون مرافقة مع مصادر مختلفة من الفيرويدات. لقد وجد أن هذه المجموعة يمكن اكتشافها بتركيزات منخفضة جداً فى جميع مصادر الفيرويدات التى درست بالإضافة إلى حاملى الفيرويد بدون أعراض والتى من المحتمل أن تكون أشجار أترج سليمة.

عند تحليل أوراق نبات الأترج الذى يظهر عليه أعراض بسيطة تتمثل فى ظهور لون بنى خفيف فى قمة نصل الورقة وتتكشف فقط فى النباتات النامية تحت ظروف تغذية وحرارة مثلى، توحى بوجود فيرويد حمضيات CVd - IIa وهذا اكتشف بنفس الحركة فى أل electrophoretic كما فى RNA - II المذكور سابقاً. إن عمليات الاستبعاد باستعمال ٢ مول كلوريد الليثيوم واستبعاد الأحماض النووية باستعمال CF - 11 سيليلوز أظهرت أن CVd - IIa قد غسل على ٢٥ ٪ إيثانول STE. وبالتالى فإن الغسيل المستمر بمادة ethanol - STE 30% والاستبعاد بـ ٢٥ ٪ ايثانول STE سمح باكتشاف تحضيرات غنية بالفيرويد. بتحليل العينات التى أجرى لها electro - eluted بواسطة طريقة Sequential gel electrophoresis أظهرت وجود فيرويدات تتصف بالشكل الدائرى والمستقيم.

عندما حقن أترج إريزونا نوع S1 - 861 بفيرويد نقى من CVd - IIa حتى فى أنواع الأترج التى تكون غالباً غير مظهرة للأعراض، فقد أمكن إسترجاع الفيرويد

ثانية من النباتات المحقونة بعد ٣ شهور. كذلك أمكن ملاحظة تلون بنى بسيط جداً على قمة نصل الورقة عندما حضنت النباتات تحت ظروف مثلى من الحرارة وطول النهار. هذا العرض كان قد صنف على أنه أبسط أشكال مرض الاكسوكورتز عندما يتفاعل فى الأترج. عندما حقن CVd - IIa فى نباتات الخيار فإنه أظهر تقزم شديد وتدلى الورقة والتفافها ولون أخضر داكن مغطى الورقة غير ظاهر فى النباتات غير المحقونة. أمكن استرجاع الفيرويد ثانية من نباتات الخيار المصابة بعد ثلاثة أسابيع من الحقن.

فى التقرير الأصلى الذى ذكره Duran - Vila et al سنة ١٩٨٦ أنه حسب طبيعة الفيرويد المذكور فى RNA II لا يمكن أن يظهر بوضوح وأن إمكانية إحتواء العائل للفيرويد قدرت مبدئياً. وعلى أية حال عندما أخذت تحضيرات حمض نووى من بادرات أترج إريزونا 861، كانت متشابهة تحليلياً ولم يلاحظ أية شرائح لـ RNA فيرويدى. كذلك لم يمكن اكتشاف أحماض نووية RNAs فيرويدية بواسطة التحليل بطريقة PAGE فى تحضيرات من كلونات مختلفة تكاثرية لأترج أريزونا SI - 861.

إن المعلومات المتوفرة عن صفات الربط المختلفة للفيرويدات إلى السيليلوز والنتائج الملاحظة فى تجارب Duran - Vila et al سنة ١٩٨٨ توضح التقارير التى تذكر غياب RNA II فى تحضيرات الفيرويد نظراً لأن السيليلوز قد غسل بشدة بمادة STE 25% - ethanol وبالتالى ازالة CVd - IIa من تحضيرات الفيرويد، وبذلك فإن إفتراض أن RNA II هو فيرويـد للعائل يجب أن يلغى وأن الاسـم CVd - IIa يجب أن يستعمل لما كان يسمى سابقاً RNA II.

إن إعادة التحليل لعزلة CVaVd الذى قد وصـف أصـلاً بواسطة Schlemmer et al سنة ١٩٨٥ قد أظهر وجود فيرويد آخر هو (CVd - IIb) وهو ذو حركة electrophoretic مشابهة جداً إلى (لكن يختلف عن) CVd - IIa. باستمرار الأبحاث وجد أن CVd - IIb الذى هو فيرويد ككسيا (CCaVd) هو العامل المسبب

لمرض ككسيا Cachexia فى الحمضيات هذا ما أكد عليه Semanik et al سنة ١٩٨٨ وكذلك Duran - Vila سنة ١٩٨٨، وبالتالى أمكن القول بأن هناك فيرويدين الأول IIa وآخر مشابه جداً له هو IIb.

عند حقن نباتات الأترج بعينات من فيرويد CVd - IIb = CCaVd ويحضن تحت مدى متطرف من الظروف لا تظهر أى أعراض ولكن الفيرويد يمكن استرجاعه دائماً من النباتات المحقونة وغير مظهرة للأعراض خلال ٣ شهور بعد الحقن. كان أول استبعاد للفيرويد CCaVd الذى هو CVd - IIb من ايثانول- CF 11 cellu lose 25% جدول ٢٩ وأظهر أعراض نموذجية لتلك المتسببة عنCVd - IIa - على نباتات الخيار المحقونة. نتائج التهجين الجزيئى باستعمال منقب cDNA إلى CVd - IIb أكد بأن CVd - IIa و CVd - IIb فيرويدان منفصلان وبينهما تشارك بدرجة عالية من تماثل التتابع.

علاقة فيرويدات CVd - II مع فيرويد HSVd :

من الدراسات الحديثة التى أجريت على فيرويدات المجموعة الثانية من فيرويدات الحمضيات وعلاقتها مع فيرويد تقزم حشيشة الدينار Hop Stunt Viroid (HSVd) تبين أن هناك تسعة تنوعات تتابع لفيرويد HSVd، من هذه التسعة هناك ثلاثة تنوعات تصيب الحمضيات. إن تنوعات HSVd التى تصيب الحمضيات لها صفات فيزيائية وحيوية تشابه مجموعة II من فيرويدات الحمضيات CVd - II. وهذه المجموعة كما سبق وذكرنا تتكون من IIa العامل المسبب لمرض الاكسوكورتز البسيط فى الحمضيات و IIb العامل المسبب لمرض ككسيا Cachexia فى الحمضيات. تحت ظروف الحقل فإن فيرويدات IIa تحدث تشقق بسيط فى القلف فى البرتقال ثلاثى الأواق ولا تظهر أى تفاعل مع الماندلين ولا مع التانجالو. إن IIa تحدث تلون بنى فى قمة الورقة، تجعد عنق الورقة ونكروزز فى العرق الوسطى فى نباتات الأترج تحت ظروف الصوبا المتحكم بها.

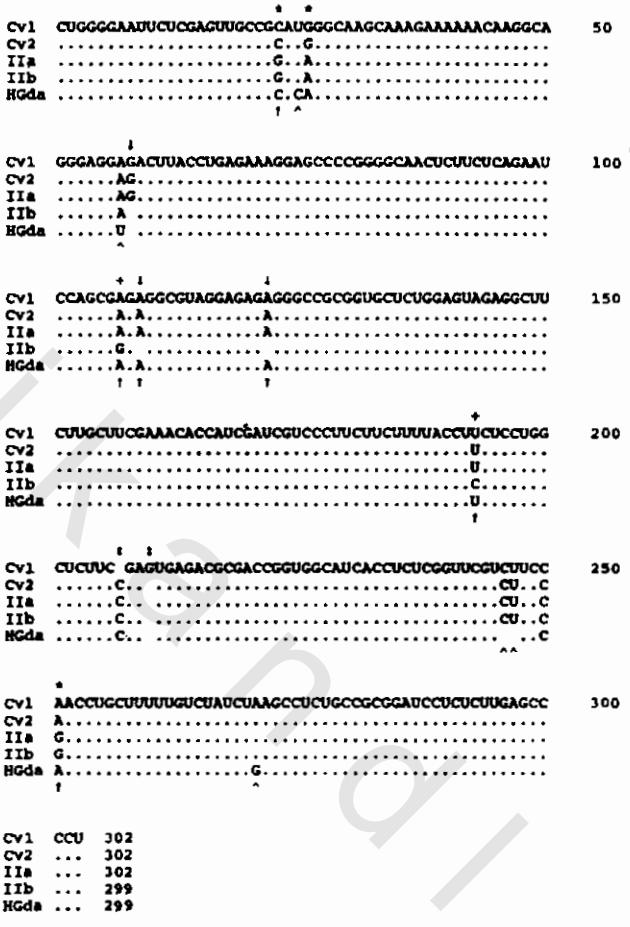
أما IIb فهو يسبب مرض ككسيا فى الحمضيات. تحت ظروف الحقل فإن هذا الفيرويد لا يسبب ظهور أعراض على البرتقال الثلاثى الأوراق ولكنه يسبب تصمغ، تنقر فى الخشب وتكتلات فى الماندرين والتانجالو أما فى الأترج وتحت ظروف الصوبا الزجاجية فإن IIb تتميز بإصابات مستترة (كامنة).

إن IIa و IIb تختلف فى الحجم عن بعضهما البعض ببضعة نيوكليتيدات، علاوة على ذلك فإنهما يسببان مرضين مميزين مختلفين على الحمضيات. التتابع فى كل من IIa و CVd - IIb يمكن أن يثبت علاقة كل منها بالآخر وعلاقتهما مع تنوعات HSVd الخاصة بالحمضيات والمذكورة فى اليابان، وتنوعات HSVd المترافقة مع العامل المسبب لتقزم الكريب فروت (HGda).

بإجراء عمليات التحليل المختلفة والحديثة تبين أن IIa قد تحدد بـ ٣٠٢ نيوكليتيدة مشابهة لاثنتين من تنوعات HSVd الخاصة بالحمضيات من اليابان وتشارك أكثر من ٩٩٪ من تماثل التتابع مع الفيرويدات اليابانية. هذه المجموعة من تنوعات HSVd ذكر أيضاً بأنها تسبب مرض اكسوكورتز بسيط على بعض أنواع الحمضيات. كما وأن IIa تختلف عن IIb عن طرق إلغاء ثلاثة نيوكليتيدات وتغيير مواقع إثنتين من النيوكليتيدات. هذه التغيرات يمكن أن تستعمل كعلامة لسرعة تشخيص IIb ولتمييزها عن IIa على مستوى النيوكليتيدات عن طريق تكبير جزء صغير فقط من جينوم الفيرويد. على موقع معين ضمن IIb تكون المنطقة المحتوية خمسة G ممتدة من نيوكليتيدة رقم ١٠٦ إلى رقم ١١٠ مزودة هذا التغيير بتناسق فى العزلات الأخرى للفيرويد IIb. أربعة من النيوكليتيدات المتغيرة تحدث فى الفيرويد فى النطاق المتغير وواحدة فى موقع ٥٨ فى نطاق المرضية فى الفيرويد. هذه التغيرات يمكن أن تغير التركيب الثانوى فى الفيرويد IIb وتؤثر على المرضية للفيرويد. هناك عزلات عديدة من IIb يجب أن يحدد تتابعها وتقارن لتحديد تأثير تغير التتابع على المرضية فى أنواع الحمضيات المتشابهة. إن دراسة التتابع يمكن أن

تؤدى إلى توضيح الصفات الحيوية المختلفة فى IIa و IIb فى عوائل الحمضيات المتشابهة. إن IIb و HGda على الرغم من حجمهما المتشابه فإنهما يمتلكان صفات بيولوجية مختلفة وأن هذين الفيرويدين تتشارك فى ٩٦٪ من تماثل التتابع. بسبب الحجم وتشابه التتابع بين HGda و IIb فمن الممكن الآن التمييز بينهما على مستوى النيوكليتيدة.

أما فيرويد IIb والذى هو فيرويد ككسيا للحمضيات فإنه يتكون من ٢٩٩ نيوكليتيدة (شكل ٤١)، والذى هو نفس طول تنوعات HSVd الخاصة بالحمضيات والمرافقة تقزم الكريب فروت الذى ذكر فى اسرائيل. (فى دراسة Duran - Vila سنة ١٩٨٨ ذكر بأن IIa فيه ٣٠٥ نيوكليتيدة وإن IIb فيه ٣٠٠ نيوكليتيدة). إلا أن تتابع النيوكليتيدات فى IIa و IIb تختلف عن تنوعات HSVd الخاصة بالحمضيات المعروفة فى اليابان والتى تسمى CV_1 و CV_2 وذلك باختلاف مواقع ثلاثة قواعد C - G فى موقع ٢٣، A - G فى موقع ٢٦ و A - G فى الموقع ٢٥١. أما IIb تختلف عن IIa عن طريق إختفاء G من الموقع ٥٨ و A من الموقع ١٠٩ و ١٢٢. كذلك فإن IIb تختلف أيضاً عن IIa فى مواقع قواعد مستبدلة A - G فى موقع ١٠٧ و U - C فى موقع ١٩٣. أما تنوعات HSVd المترافقة مع عامل تقزم الكريب فروت (HGda) ذكر أن بها ٢٩٩ نيوكليتيدة فى الطول وتشارك أيضاً نفس القواعد المستبدلة من G - A على موقع ٢٦ فى IIa و IIb. أما HGda فيختلف عن IIa و IIb عن ولكنه مشابه لتنوعات HSVd من اليابان عن طريق بقاء C على موقع ٢٣ و A على موقع ٢٥١. إن HGda مشابهاً لـ IIb عن طريق بقاء القاعدة المحذوفة G على موقع ٥٨ ولكن يختلف عن طريق بقاء A فى موقع ١٠٧، ١٠٩ و ١٢٢ وبقاء U فى موقع ١٩٣. إن HGda يختلف عن جميع ما ذكر سابقاً من فيرويدات الحمضيات عن طريق إختفاء C من موقع ٢٤٦، U من موقع ٢٤٧ واستبدال A - G فى موقع ٢٧١.



شكل رقم ٤١ :

التتابع الكامل لنيوكليتيدات فيرويدات الحمضيات IIa وككسيا، IIb. تنوع فيرويد تقزم حشيشة الدينار للحمضيات CV_1 وCV_2. إن تنوع فيرويد تقزم حشيشة الدينار من الكريب فروت مرافق مع عامل تقزم الكريب فروت HGda من اسرائيل. العلامات تدل على:

↕ = الاختلافات بين CV_1 و CV_2. أما(^) = الاختلافات فى تتابع HGda الذى لا يوجد فى الفيرويدات الأربع الأخرى.

* =إختلافات CVd - IIa و CVd - IIb مع CV_1 وCV_2.

↓ = ازالة من تتابع CVd - IIb عند مقارنته مع CVd - IIa.

+ = استبدال فى تتابع CVd - IIb عند مقارنتها مع CVd - IIa.

↑ = إختلاف بين HGda عند مقارنتها مع CVd - IIb.

مجموعة CVd - III :

إن تحليل عزلات الاكسوكورتز فى كاليفورنيا واسبانيا أظهر أن ٣٣ من أل ٣٧ عزلة مختبرة تحتوى فيرويدات ذات حركة فى الهجرة الكهربائية مشابهة لـ RNA - III. بتحليل عزلتين كل منهما لفيرويد مفرد من كاليفورنيا أظهر أن هذين الفيرويدين هما CVd - IIIa و CVd - IIIb وهما ذاتا حجم نموذجى ومماثل لـ ٢٩٠ نيوكليتيدة. الاستبعاد المستمر من CF - 11 cellulose، أدى إلى التعرف بأن CVd - IIIa هو أول فيرويد إستبعد بمادة إيثانول ٢٥ ٪، فى حين أن الفيرويد CVd - IIIb إستبعد باستعمال ٢٠ ٪ إيثانول. كان هناك فيرويدين آخرين هما CVd - IIIc و CVd - IIId حيث عزلا ونقيا من معقد عزلات من إسبانيا كان لهما معدل هجرة أسرع من CVd - IIIa و CVd - IIIb وثم إستبعادهما من CF - 11 cellulose باستعمال ٢٠ ٪ إيثانول كما فى جدول رقم ٢٩.

عند حقن الأترج بعينات نقية من CVd - IIIa ، IIIb ، IIIc أو IIId أظهرت تقزم معتدل ودرجات متعددة من تدلى الأوراق، نكروزز فى العرق الوسطى ونكروزز فى عنق الورقة. هناك فيرويدات مفردة أمكن استرجاعها ثانية من الأترج بعد الحقن بثلاثة شهور. لا يوجد عوائل أخرى غير أنواع الحمضيات يمكن أن تصيبها فيرويدات مجموعة CVd - III.

مجموعة CVd - IV :

هناك عزلة واحدة مفردة تسبب أعراض بسيطة إلى متوسطة مصدرها كاليفورنيا (E 80) تحتوى فيرويد CVd - IV وهى ذات هجرة كهربائية أكثر سرعة من أى عزلة فيرويدية من أى مصدر من الحمضيات لوحظت حتى سنة ١٩٨٨. إن الهجرة الكهربائية Co - electrophoresis لهذه العزلة مع عينات من CVd - III بها عزلات، أدت إلى القول بأن CVd - IV لها معدل هجرة أعلى من مجموعة CVd - III. قدر حجم الجزئ فى هذه المجموعة بحوالى٢٧٥ نيوكليتيدة. إن مجموعة CVd - IV أظهرت عدم التجانس مع منقبات مجموعة CVd - I و II وIII وأظهرت تجانس ضعيف مع CEVd cDNA.

عند حقن الأترج بتحضيرات نقية من CVd - IV أظهرت أعراض تقزم بسيط، نكروزز فى العرق الوسطى وتدلى الورقة. أما عند حقن نباتات الخيار فلم يظهر أية أعراض عليها، ولكن يمكن استرجاع الفيرويد ثانية خلال ٣ أسابيع بعد الحقن. يمكن أن تصنف مجموعة CVd - IV مع تلك الفيرويدات التى تزاح أو تستبعد من السليلوز فى ٢٥ ٪ ethanol STE.

العلاقة بين فيرويدات الحمضيات

Relationship Among Citrus Viroids

عند حقن أشجار الأترج (السترون) بمزارع فيرويد نقى أو مخلوط فيرويد صناعى من فيرويدات الحمضيات، فإن جميع الفيرويدات تتناسخ مستقلة بذاتها، ولقد تأكد ذلك بواسطة التحليل بطريقة PAGE للنباتات المحقونة.

إن دراسة الأعراض المحدثة بواسطة خليط من المعديات الفيرويدية ومقارنتها مع الأعراض المحدثة بواسطة فيرويدات مفردة أدى إى القول بحدوث تفاعلات حيوية أو تعاون Synergism بين هذه الفيرويدات. فمثلاً الأترج المحقون بالفيرويد- CVd Ia ، IIa و IIId أظهر تقزم بسيط إلى متوسط وتجعد شديد فى الأوراق عادة ما يكون مترافق مع الإصابة بفيرويد CEVd، بالإضافة إلى تدلى الورقة وتجعد عنقها وظهور نكروزز على نصل وعنق الأوراق وهذا ما توصف به مجموعة CVd - III و CVd - I ، وتختلف عن الإصابة بفيرويد CEVd فى كون الأعراض تتمثل فى صغر حجم الورقة، بينمـا أنصال الأوراق فى النباتات المصابة بكل من CVd - I وII و III كل على إنفراد كانت مشابهة لنباتات الكنترول غير المحقونة.

إن اللقاح الفيرويدى (المصدر الأصلى من كاليفورنيا E 821) والذى يحتوى CVd - Ia، IIa، و IIb و IIIb تحدث أعراض شديدة نوعاً ما مشابهة لتلك المحدثة بواسطة السلالات الشديدة المحتوية CEVd. هذه الأعراض كانت أيضاً أكثر شدة مما يمكن توقعه من إتحاد الأعراض المحدثة بواسطة كل واحد من هذه الفيرويدات

المشتركة، زيادة على ذلك حتى تحت ظروف الصوبا الزجاجية فإن الأعراض تزداد بشدة كبيرة خلال ظروف الصيف أو درجات الحرارة الأعلى وذات النهار الطويل، بينما النموات الحديثة النامية تحت ظروف الشتاء أو درجات حرارة أبرد ونهار قصير، يمكن أن تكون حاملة للفيرويد ولكن بدون أعراض، وبالمثل فإن الأعراض المرافقة لكل من CVd - IIIa و CVd - IV عند حقنها فى الأترج كل على إنفراد أدت إلى تفاعل بسيط غير مشابه أبداً للأعراض المتوسطة المحدثة بواسطة عزلات كاليفورنيا E 804 التى تحوى كلا الفيرودين.

مقالة العالمين Semancik و Duran - Vila عن فيرويدات الحمضيات*:

إن التحليلات المقارنة بين عينات من الحمض النووى المأخوذ من الأترج المحقون بمصادر حقلية عديدة مصابة بالفيرويدات قد أظهرت وجود الإنتشار الواسع لعديد من فيرويدات الحمضيات المميزة. إن فيرويد CEVd قد عرف ووصف وصفاً تاماً وذكر بأنه يتكون من ٣٧١ قاعدة نيوكليتيدة وقد اكتشف اصلاً من أشجار الحمضيات التى تظهر أعراضاً شديدة من التقزم وتقشر القلف. إن العوامل المسببة للأعراض المتوسطة والبسيطة على الأترج قد اكتشفت وعرفت حديثاً.

كذلك فإن ظهور الأعراض المتوسطة والبسيطة على نباتات الأترج المحقونة قد ثبت بأنها مترافقة مع واحد أو أكثر من الفيرويدات الأصغر من فيرويد CEVd. إن التحليل بطريقة PAGE والانجذاب على الكروماتوغرافى السليلوزية CF - 11، والمدى العائلى والتهجين الجزيئى قد دعم فكرة تقسيم فيرويدات الحمضيات إلى خمسة مجموعات. كذلك فإن ظهور الأعراض التى يحدثها كل فيرويد أو مجموعة فيرويدات عند حقنها فى نباتات الأترج، أيضاً قد دعمت هذه الفكرة.

* ملاحظة: هناك علماء كثيرون درسوا فيرويدات الحمضيات هم ١ ـ N. Duran - Vila ٢ ـ C.N. Roistacher ٣ ـ R. River - Bustamant ٤ ـ J.S. Semancik ٥ ـ R. Flores ٦ ـ J.M. Belles.

إن الاصطلاح المستعمل والذى يذكر فيه اسم فيرويد الحمضيات فقط، فإن هذا لا يدل على فيرويد معين، لذا يجب أن يكون اسم فيرويد الحمضيات CVd متبوعاً برقم المجموعة التى ينسب إليها وحجمه النسبى داخل المجموعة، حيث أن المجموعات أعطيت أرقاماً I، II ، III و IV وضمن هذه المجموعات أعطيت نسباً لحجم الفيرويد مثل a ، b، c، d. هذه التعبيرات، الأرقام والحروف يجب أن تقترن باسم كل فيرويد للحمضيات ويستمر ذلك حتى يثبت له اسم غير هذا الاسم، كما حاول بعض العلماء فى اسرائيل أن يثبتوا ذلك بالنسبة لفيرويد CVd - Ib. لذلك عند ذكر اسم فيرويد معين بأنه العامل المسبب لمرض مميز فيجب أن يضاف إليه اصطلاح وصفى أكثر إيضاحاً. وبالتالى فإنه لغاية سنة ١٩٩١ فإن فيرويد إكسوكورتز الحمضيات وفيرويد ككسيا Cachexia فقط يمكن أن يشار إليهما كمسببات أمراض منفصلة.

إن فيرويد اكسوكورتز الحمضيات CEVd والتنوعات القريبة جداً له ذات ٣٧١ – ٣٥٧ نيوكليتيدة والتى وصفت من قبل Visavader و Symon سنة ١٩٨٣، ١٩٨٥ تشكل مجموعة مستقلة من فيرويدات الحمضيات. هذه المجموعة تشمل العوامل المسببة المرضية لمرض اكسوكورتز الحمضيات وكذلك الأمراض المشابهة جداً له ولا تميز عنه إلا بشئ بسيط، وتشمل العوامل التى تظهر صفات مشتركة وتشابه فى حجم الجزئ والمدى العائلى والتماثل المتقارب فى التتابع. وبالتالى فإن مجموعة فيرويد اكسوكورتز الحمضيات يصعب التمييز بين عزلاتها أؤ سلالاتها إلا بالاختبارات الحيوية وإتباع طرق العزل المختلفة وسنذكرها فى آخر المقال.

أما مجموعة CVd - I فإنها تشمل فيرويدين من فيرويدات الحمضيات أصغر من فيرويد اكسوكورتز بمقدار ٣٠ ـ ٤٠ نيوكليتيدة، وهما CVd - Ia و CVd - Ib. هذين الفيرويدين لهما حجم جزيئى يقارب ٣٣٠ ـ ٣٤٠ نيوكليتيدة ودرجة عالية من تماثل التتابع وتحدث نكروزز على العرق الوسطى للورقة يكون بسيط جداً

وذلك عند حقنها فى نباتات الأترج. ومن المحتمل أن الفيرويد الأصغر وهو- CVd Ib والذى وجد لغاية الآن فى عزلة من CVaVd فى كاليفورنيا يمكن أن يمثل تنوع غير معتبر من الفيرويد CVd - Ia.

إن التقرير الأولى عن فيرويد يرمز له (CVaVd) كفيرويد متميز بسبب إحداثه تفاعل متوسط شبيه بالاكسوكورتز على الأترج كان قد بنى على الاكتشاف الذى حدث لفيرويد جديد يتكون من ٣٣٠ نيوكليتيدة عن طريق الصبغ بمادة برومايد الايثيديوم. الاسم المذكور Citron Variable Viroid كان قد إبتكر لوصف الطبيعة المتغيرة لتعبيرات الأعراض التى تنتج تحت ظروف بيئية مختلفة. وفى إعادة التحليل لعزلة CVaVd فقد تبين أنه بالإضافة إلى الفيرويد ذو ال ٣٣٠ نيوكليتيدة الأكثر انتشاراً فإن هناك ثلاثة فيرويدات أخرى أمكن اكتشافها فى عزلة CVaVd. ونظراً لأن الاسم المعطى للفيرويد Citron Variable Viroid كان قد بنى على تعبيرات حيوية معينة للعزلة التى تحتوى تركيب يتكون من أربعة فيرويدات مميزة، فيبدو الآن أنه من غير الملائم إظهار أى من هذه الفيرويدات الأربعة كعامل مسبب للتعبيرات المرضية بدون إختبار جميع احتمالات الاتحادات لمكونات CVaVd. زيادة على ذلك فإن الحقن بتحضيرات نقية من فيرويد يتكون من ٣٣٠ نيوكليتيدة يحدث تفاعل أعراض توصف بأنها إنحناء فى الأوراق هذا يشبه CVd - Ia. مع هذه المعلومات الجديدة عن عزلات CVaVd فنحن نقترح أن الاصطلاح الخاص وهو CVaVd يجب التخلى عنه وأن الفيرويد الذى يتكون من ٣٣٠ نيوكليتيدة لعزلة CVaVd يجب أن يعرف على أنه CVd - Ib.

إن الفيرويدات الأصغر التى تهاجر بسرعة أكثر من مجموعة CVd - I الموجودة والتى تظهر دائماً وكأنها سلسلة متصلة لحدوث الفيرويدات طبيعياً، هذه الهجرة الكهربائية المتقاربة جداً جعلت تمييز مجموعات CVd - II، CVd - III وCVd - IV من الصعوبة بمكان. مع ذلك فإن مجموعة CVd - II يمكن تمييزها

ببعض الصفات مثل خصائص الانجذاب للسيليلوز CF - 11، الأعراض المحددة جيداً على الخيار والدرجة العالية من تماثل التتابع فى النيوكليتيدات. إن العلاقة بين مكونات هذه المجموعة وأمراض الاكسوكورتز والككسيا فى الحمضيات قد ذكرناها بالتفصيل فى مقال آخر. زيادة على ذلك فإن العلاقة القوية مع فيرويد تقزم حشيشة الدينار Hop stunt Viroid (HSVd) وفيرويد الثمرة الباهتة فى الخيار والفيرويد الجديد الذى عزل من الأترج وعلاقته مع HSVd كل ذلك له تأثير كبير فى تحديد فيرويدات الحمضيات.

هناك فيرويدات عديدة تهاجر فى d PAGE فى المنطقة الضيقة المحددة بواسطة CVd - II (حوالى ٢٩٠ ـ ٣٠٠ نيوكليتيدة) ومجموعة CVd - IV (حوالى ٢٧٥ نيوكليتيدة). إن الأعراض المميزة لتجعد عنق الورقة متبوعاً بحدوث نكروزز والتى تظهر بوضوح على نبات الأترج المحقون بمجموعة CVd - III يمكن أن تستعمل كمميزات أولية للمجموعة CVd - III. إن جميع أفراد هذه المجموعة تحدث درجات مختلفة من تجعد عنق الورقة ونكروزز حيث أن هذا النكروزز بعد ذلك يمتد ويصل إلى العرق الوسطى ويصبح واضح بدرجة كبيرة وأحياناً يؤثر على العروق الثانوية. كذلك فإنها تسبب تدلى الورقة ويظهر على الورقة بشكل عام مظهر الورقة الساقطة وذلك نتيجة لانحناء عنق الورقة، كل هذه الأعراض تظهر فى نباتات الأترج. إن المدى العائلى لهذه الفيرويدات يمثل بشكل محدود فى الحمضيات، وهى لا تظهر تماثل تتابع مع مجموعات CEVd، CVd - I أو CVd - II.

إن النتائج الأولية لإختبارات تماثل التتابع لمجموعة CVd - III يدل على أنها مجموعة متماثلة خاصة مميزة. ولكى نحصل على صفات أخرى كثيرة متوقعة لهذه المجموعة يجب إجراء إختبارات تهجين أخرى. نظراً لأن هذه الفيرويدات تدخل أو تتواجد بعيار منخفض فى الأترج المصاب فإن إختبارات التماثل لا يمكن إجراؤها ما لم يتوفر كميات كافية من هذه الفيرويدات.

أما فيرويدات المجموعة IV فهى ذات هجرة كهربائية أسرع من كل المجموعات السابقة، وبالتالى فإنها تكون ذات فيرويدات أصغر ويمكن القول بأنها أصغر الفيرويدات التى تصيب الحمضيات وهذه المجموعة تحتوى فرد وحيد (لغاية ١٩٩٠) هو الذى يمثل هذه المجموعة. إنه يشارك فى بعض صفات CEVd أكبر فيرويدات الحمضيات. إن نبات الخيار هو العائل الشائع الذى يحمل الفيرويد IV ويتكاثر فيه بدون إحداث أعراض ظاهرية (أيضاً يشبه تفاعل CEVd مع الخيار). إن المعلومات المتحصل عليها من عمليات التهجين تدل على قليل من تماثل التتابع. وعلى أية حال فإن الأترج المحقون بتحضيرات نقية من CVd - IV تظهر أعراض تدلى الورقة العشوائى ونكروزز فى العرق الوسطى ولكن لا تظهر التقزم الشديد ولاتجعد الورقة التى تميز الإصابة بالفيرويد CEVd.

نعود الآن لمجموعة CEVd والتى وعدنا أن نتكلم عنها فى بداية هذا المقال. لقد تأكد أن أفراد مجموعة فيرويد اكسوكورتز الحمضيات CEVd تكون مترافقة مع مرض الاكسوكورتز كما ذكر لأول مرة سنة ١٩٤٨ من قبل العالم Fawcett & Klotz. إن الفيرويد المعروف جيداً والذى يتكون من ٣٧١ إلى ٣٧٥ نيوكليتيدة يمكن أن يعزل من أشجار الحقل المظهرة أعراض الاكسوكورتز المميزة. ونظراً لأن معظم مصادر الحقل تحتوى واحداً أو أكثر من الفيرويدات بالإضافة إلى CEVd، فإن السؤال الذى يبرز الآن هو هل CEVd بنفسه هو المسئول عن مجموعة الأعراض المرضية الكلية؟؟. لا يمكن تحديد ذلك بشكل كامل.

إن الأشكال البسيطة من المرض التى تتميز عن طريق تقشر القلف وبدون تقزم أو يكون هناك تقزم بدون تقشر للقلف، هل هذه الأعراض راجعة بسبب الإصابة بالفيرويد CEVd لوحده أو أنه غير مسئول لوحده فى الحقل عن هذه الأعراض أو هل هناك فيرويدات من مجموعات الحمضيات الأخرى تشارك فى ذلك؟؟. هذا السؤال يحتاج إلى دراسات كثيرة تطبيقية فى الحقل.

هناك تجارب على عوامل التقزم القابلة للانتقال بالتطعيم Graft - transmissible dwarfing agents قد حصلنا على نتائج منها، هذه النتائج أظهرت أنه لا يوجد عزلات محددة مسببة للتقزم البسيط أو المتوسط موجودة ضمن CEVd ولكن ضمن فيرويدات أخرى، هناك فيرويد آخر من الممكن أن ينتقل إلى الأقحوان وبالتالى من المحتمل أن يكون له علاقة مع مجموعة CVd - II. على أية حال فإن وجود التفاعلات الكاملة بين فيرويدات الحمضيات لا تسمح، ما لم يحدد محتوى الفيرويد، باستنتاجات مبنية على مميزات جزيئية لعزلات حقلية. وبالتالى فإنه فقط فى كفاءة الأشجار المحقونة بفيرويدات منفصلة وفيرويدات متجمعة سوف تتحدد علاقة تأثير المسبب وتحديده من بين الفيرويدات المختلفة للحمضيات وأخذ الأعراض بعين الأعتبار فى ذلك التحديد.

وبشكل مختصر يمكن القول بأن المعلومات المتوفرة لدينا تزودنا بالقواعد الكافية لفهم جيد وتحديد لمرض الاكسوكورتز. الأعراض البسيطة لا يمكن اعتبارها دليل تشخيصى لمرض الاكسوكورتز. مع أن الإختبار الحيوى للأترج يمكن أن لا يستخدم لوقت طويل لايجاد إثبات إيجابى لوجود فيرويد اكسوكورتز الحمصيات، إلا أنه يبقى أكثر قيمة لفهرسة العائل لهذا الفيرويد. كما وأن العلاقة بين فيرويدات الحمضيات والتعبيرات الكلاسيكية لمرض الاكسوكورتز الذى يظهر تفاعل على شكل تقشر القلف على الأصول الحساسة يجب أن تكون مقنعة فى الاختبارات الحقلية للفيرويدات المختلفة التى تستعمل كمزارع نقية بالإضافة لاستعمال مخلوط من الفيرويدات فى الحقن.

بعد أن إنتهى هذا المقال العلمى المقدم من أكبر عالمين من علماء فيرويدات الحمضيات فإن المؤلف لا يستطيع أن يقول سوى أن التقدم العلمى السريع وإنتشار أبحاث الفيرويدات فى كل مكان هو الذى يحدد مدى دقة هذه المعلومات ومدى إستمرار صحتها فى المستقبل ودعنا ننتظر.

فوائد الفيرويد «ترافق الفيرويدات مع أعراض التقزم القابل للإنتقال بالتطعيم»

Association of Viroids With Graft - Transmissible Dwarfing Symptoms

من المعروف أن الفيرويدات والفيروسات تسبب أضراراً كبيرة فى النباتات الاقتصادية تؤدى إلى خسائر كبيرة فلا يوجد أية فائدة منها. هناك استثناءان لهذه القاعدة، الاستثناء الأول هو احتمال التوصل إلى تطبيقات عملية ناجحة فى المقاومة بالتضاد Cross - Protection فى المستقبل القريب أو البعيد، وأما الاستثناء الثانى فهو خاص بالفيرويدات فقط وهو استعمالها فى الحصول على أشجار متقزمة فى الحقل وهذه الأشجار المتقزمة لها فوائد زراعية كثيرة، هذه الفكرة هى موضوع هذا العنوان.

هناك بعض الفيرويدات تسبب تقزم فى الأشجار بدون أن يكون هذا التقزم مترافقاً مع أضرار أخرى، هذا التقزم يكون ذو فائدة عملية للمزارعين، هذه الفيرويدات قابلة للانتقال بالتطعيم وتسمى عوامل التقزم القابلة للانتقال بالتطعيم ومنها سلالات عديدة.

هناك فى منطقة New South Wales فى إستراليا أجريت تجارب على بعض العزلات المأخوذه من عزلات عوامل التقزم القابلة للانتقال بالتطعيم Graft - transmissble dwarfing agents (GTD agents) والتى تقلل حجوم الأشجار الناتجة من بعض طرز البرتقال الناتجة من برعم **Citrus sinensis** مطعوم على برتقال ثلاثى الأوراق **Poncitrus trifoliata** وبدون أن يكون لها تأثيرات ضارة. مثل هذه الأشجار المتقزمة تكون ذات فائدة إقتصادية حيث أن تكاليف العمليات الزراعية مثل الرش والجمع تكون أقل من تكاليف الأشجار الكبيرة الضخمة، وكذلك فإن الأشجار المتقزمة يمكن أن تزرع بكثافة أكثر وبالتالى تعطى إنتاج أكثر فى السنوات الأولى

من الإنبات، زيادة على ذلك يكون هناك كفاءة أكثر فى الاستفادة من الماء فى الرى والأسمدة. وبالتالى يمكن القول بأن التقزم القابل للانتقال بالتطعيم (GTD) هو عبارة عن تفاعل بين العائل والكائن الممرض تكون النتيجـة فيه لصالح المزارعين.

إن التطبيقات التجارية لهذه العملية GTD قد بدأت فى استراليا ولكن يجب أن لا نأخذها مباشرة بل يجب أن نتأكد من تعريف هذه العوامل الممرضة بالضبط والعوامل التى تؤثر على تفاعلها مع العائل وهل هذه العوامل الممرضة تحدث هذا التفاعل باستمرار دون أن يكون عرضياً وهل الظروف البيئية السائدة لها تأثير فى هذه العوامل أم لا. إذن نحن نتكلم عن هذا الموضوع من ناحية علمية أما من ناحية تطبيقية فى بلادنا أو أى بلاد أخرى فهذا يحتاج إلى أبحاث تقرر ذلك.

إن أعراض التقزم فى أشجار الحمضيات المطعومة على أصول البرتقال ثلاثى الأوراق قد عزيت إلى فيرويد اكسوكورتز الحمضيات CEVd فى الولايات المتحدة واستراليا وذلك بسبب أن الاكسوكورتز يسبب تقشر قلف الأصل بالإضافة إلى التقزم وكذلك فإنه ينتقل بالتطعيم. وعلى أية حال فإن الأشجار المتقزمة بدون أن يحدث لها تقشير نتيجة الإصابة بالفيرويد قد لوحظت فى استراليا وايطاليا وأمكن نقل هذه الأعراض بالبرعم من الأشجار الاسترالية إلى غيرها بدون أن يحدث أعراض تقشر. إن معظم عزلات GTD المستعملة فى بساتين الفاكهة فى استراليا من النوع الذى يحدث تقزم بدون تقشير.

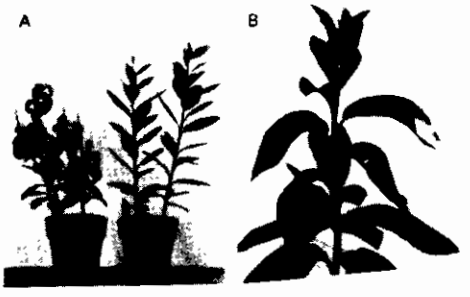
هناك دليل أولى مادى تفصيلى يدل على أن CEVd يكون مترافقاً مع التقزم فى حالة العزلات GTD غير المقشرة. إن خمسة من ستة عزلات أعطت تفاعل تجعد الورقة فى السترون **C. medica** الكاشف لفيرويد CEVd. كما أمكن عزل ستة عزلات من التى تحدث تقزم بدون تقشير للقلف من أشجار البرتقال وتبين بعد النقل المتكرر أنها دائماً مرافقة لأعراض التقزم بدون تقشير. يلاحظ أعراض هذه العزلات فى شكـل ٤٢. ولغايـة الآن لم يحـدد تتابع هـذه العـزلات أو عدد

نيوكليتيداتها وهل هى مقتصرة على فيرويد CEVd لوحده فقط أم أنها مشتركة مع فيرويدات أخرى من المجموعات المختلفة لفيرويدات الحمضيات. هناك عزله واحدة تسبب التقزم والتقشير معاً.

إن نتائج هذه الأبحاث تدل على أن الفيرويدات تكون دائماً مترافقة مع التقزم فى أشجار البرتقال. وقد وجد أن بعضاً منها يسبب أعراض تجعد الأوراق فى السترون (الأترج). أحياناً فإنه يمكن أن تطعم الأشجار بالبرعم إلا أنها لا تعطى أعراض التقزم المميزة للعزلة، يعود ذلك إما إلى عدم وجود الفيرويد فى جزء البرعم المأخوذ كطعم للأصل أو عدم ملائمة الظروف سواء جوية أو حيوية لتناسخ الفيرويد.

ذكرنا سابقاً أن هناك عزلة تعطى أعراض تقزم مع تقشر على البرتقال ثلاثى الأوراق هذه العزلة أعطيت رقم ٣٣. أما العزلتين ٣٥٣٥ و ٣٥٣٦ فهى تعطى تقزم بدون تقشر ولكن عند حقنها فى السترون تعطى أعراض نموذجية لفيرويد CEVd على السترون و **Gynura** والطماطم (هذه العزلات الثلاثة تسمى S - isolates) ولكن أعراضها تكون أبسط من أعراض السلالة CEVd - A.

أما الأربعة عزلات الأخرى تسمى M - isolates وهى ٣٥٣١، ٣٥٣٢، ٣٥٣٨، ٣٥٣٩ عند حقنها فى السترون تعطى أعراض تجعد الأوراق البسيطة ويتأخر كثيراً هذا التكشف (تكشف الأعراض) بالمقارنة مع تفاعلات CEVd. هذه العزلات لا تعطى أية أعراض على ال **Gynura** أو الطماطم. لقد وجد أنه من الصعوبة بمكان تمييز عزلات M - isolates عن بعضها البعض إلا أنها متميزة عن S - isolates هذا يؤدى إلى القول بأنها إما أن تكون أشكال معتدلة من CEVd والتى من الصعب تمييزها عن بعضها البعض أو أنها تتبع فيرويد منفصل عن فيرويد ال CEVd.



شكل رقم ٤٢ السفلى :

تفاعل عزلات S - isolates على الطماطم والجينيورا.

A : نباتات طماطم محقونة بالعزلة 033 . أعراض تقزم متوسطة على الشمال أما اليمين غير معامل.

B : نبات جاينيورا محقونة بالسلالة 033 مسببة أعراض تجعد معتدلة.

النباتات الموجودة داخل المستطيل تظهر أعراض الإصابة بسلالة CEVd - A تحت نفس الظروف.

شكل رقم ٤٢ العلوى :

A : نباتات سترون مظهرة أعراض شديدة للإصابة بعزلة GTD على اليسار

مقارنة مع نباتات غير مظهرة للأعراض على اليمين.

B : أعراض معتدلة منتجة بالعزلة 3532.

ب ـ أمراض الحمضيات الفيرويدية

١ ـ مرض اكسوكورتز الحمضيات (تشقق الحمضيات)

Citrus Exocortis Disease

يعتبر مرض تشقق القلف فى أشجار الحمضيات عالمى الإنتشار ويهاجم البرتقال ثلاثى الأوراق و Rangur ، Citrango وأنواع أخرى من اليوسفى والليمون الحلو، بعض أنواع ليمون الاضاليا و الترنج. إن كلاً من البرتقال وليمون الاضاليا والكريب فروت وأشجار الحمضيات الأخرى المطعومة على أصول حساسة لمرض تشقق القلف تظهر إنخفاضاً فى النمو يتراوح من نسبة بسيطة إلى نسبة تصل ٥٠٪ ويخفض الإنتاج بنسبة تصل ٤٠٪.

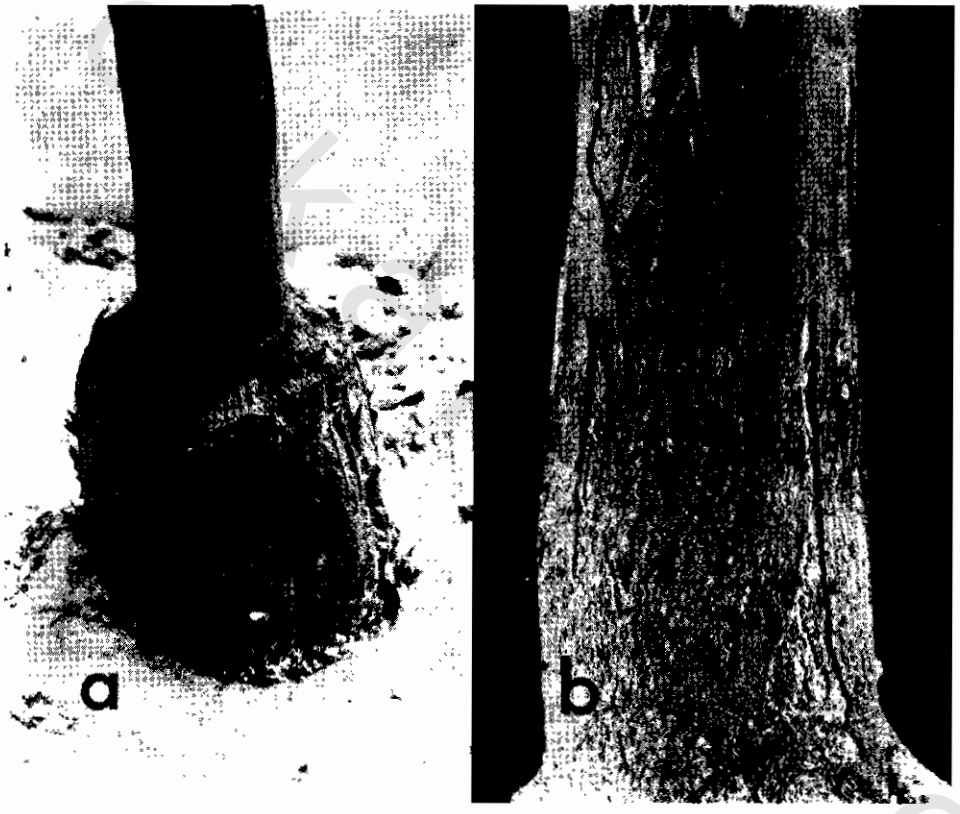
الأعراض:

يظهر على النباتات المصابة الحساسة للمرض تشققات عمودية فى القلف وتكون ضيقة، وتخطيطات رفيعة عمودية على القلف الخارجى المفكك جزئياً والتى تعطى القلف مظهر التقرح أو المظهر الحرشوفى (شكل ٤٣). نظراً لأن كثيراً من النباتات القابلة للإصابة بالمرض مثل البرتقال ثلاثى الأوراق، تستعمل أساساً أصول لتطعم عليها أشجار حمضيات أخرى، وبسبب أن الطعوم تعطى نمو ضعيف على مثل هذه الأصول وبسبب الأصول الحرشوفية واسعة الاستعمال، فإن المرض أعطى اسم القورمة الحرشوفية Scaly butt. إن النباتات المصابة الحساسة للمرض يمكن أيضاً أن يظهر عليها تلطخات صفراء على السيقان الحديثة المصابة، بعض أنواع الترنج يظهر عليها التفاف الأوراق والسيقان إلى الداخل وتشقق واسوداد أعناق وعروق الورقة. تظهر جميع النباتات المصابة، بشكل عام، متقزمة هذا التقزم يتراوح من نسبة بسيطة إلى مدى كبير وتعطى إنتاج منخفض. شكل ٤٤.

الكائن الممرض:

يتسبب هذا المرض عن فيرويد تشقق قلف الحمضيات Citrus Exocortis Viroid ويكتب باختصار CEVd (وقبل سنة ١٩٩٢ كان يكتب بدون إضافة حرف d). يبدو أن الفيرويد يشابه ظاهرياً فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس وهو يتكون من حمض نووى RNA ذو خيط واحد يتألف من ٣٧١ نيوكليتيدة أما سلالاته فتتكون من ٣٧٠ ـ ٣٧٥ نيوكليتيدة ويكون ذو وضع (شكل) دائرى أو مستقيم، وهو لا يشابه فيرويد الدرنة المغزلية فى كثير من الصفات.

ينتقل الفيرويد بسهولة من الأشجار المريضة إلى الأشجار السليمة عن طريق سكاكين التطعيم، مقصات التقليم أو أدوات القطع الأخرى. ينتقل بواسطة الأيدى ويمكن أن ينتقل بواسطة الحيوانات القارضة والحافرة. ينتقل الفيرويد أيضاً بواسطة الحامول وينتقل بواسطة العصارة إلى كل من الجنسين **Gynrua** و **Petunia** وإلى نباتات عشبية أخرى. يحتفظ الفيرويد بمقدرته على الإصابة وهو على صفائح السكاكين الملوثة لمدة لا تقل عن ثمانية أيام. عندما ينقى الفيرويد جزئياً فإنه يبقى قادراً على إحداث الإصابة على درجة حرارة الغرفة العادية لعدة شهور. إن درجة الحرارة المميتة لهذا الفيرويد فى العصارة المستخرجة حوالى ٨٠°م لمدة عشرة دقائق، ولكن الفيرويد المنقى جزئياً يبقى قادراً على إحداث العدوى حتى بعد أن يغلى لمدة ٢٠ دقيقة. يبقى أيضاً الفيرويد حياً بتسخين السكاكين الملوثة فترة قصيرة فى اللهب فى مشعل البروبان (درجة حرارة النصل حوالى ٢٦٠°م) وفى السكاكين المغمورة فى الكحول والمسخنة فى اللهب. يبقى الفيرويد أيضاً حياً على السكاكين الملوثة المعاملة بمعظم المطهرات الكيماوية الشائعة باستثناء محلول صوديوم هايبوكلورايت.



شكل رقم ٤٣ :

تقشر القلف والتشقق المتسبب عن فيرويد الاكسوكورتز فى الحمضيات.

A :نمو محدود للبرتقال الحلو وتقشر القلف على أصول برتقال ثلاثى الأوراق.

B : تشقق ساق الليمون الحلو.

شكل رقم ٤٤:

أعراض فيروید الاكسوكورتز على السترون ـ الشمـال، سترون غير محقون. أما اليمين، أشجار سترون مصابة بفيرويد اكسوكورتز الحمضيات، يلاحظ التفاف الأوراق ومراحل مبكرة من تشقق القلف.

تكشف المرض:

يبقى الفيروید حياً فى معظم أشجار الحمضيات وفى كثير من العوائل العشبية وينتقل إلى نباتات الحمضيات عن طريق التطعيم بالبرعم أو أنواع التطعيم الأخرى (التطعيم بالقلم) وينتقل أيضاً بواسطة أدوات القطع الملوثة أو الآلات الزراعية الآخرى. يبدو أن الفيروید يدخل بوضوح فى عناصر اللحاء وينتشر فيها فى جميع أجزاء النبات. يبدو أن الفيروید يكون مترافقاً مع الأنوية والأغشية الداخلية من خلايا العائل، وهذا يؤدى إلى اضطرابات فى الأغشية البلازمية. مع أن الفيروید يبدو وأنه

فاقد القدرة على أن يعمل جزيئات ناقلة messenger molecules أو أن يعمل كحمض نووى مستقل، إلا أنه يسبب تغيرات عديدة فى ميتابولزم النباتات المصابة هذه التغيرات تشمل زيادة فى الأكسجين الممتص وفى التنفس وأيضاً فى محتوى السكريات، وفى بعض الأنزيمات تحدث تغيرات ملحوظة وكذلك أيضاً فى عديد من الأحماض الأمينية.

المقاومة:

يمكن مقاومة مرض تشقق قلف الحمضيات فقط عن طريق إكثار أشجار المشتل الخالية من هذا المرض من أصول مؤسسة مشهود بصحتها وخلوها من المرض واستعمال التطعيم بالبرعم النظيف الخال من المرض. وكذلك المشاتل يجب أن تكون خالية من المرض وإتباع عمليات زراعية نظيفة. يجب أن تطهر الأدوات بين كل قطعتين فى نباتات مختلفة وذلك بغمر الأدوات فى محلول ١٠ ـ ٢٠ ٪ صوديوهايبوكلورايت.

المدى العائلى (الكواشف):

يصيب الفيرويد بالإضافة إلى مدى واسع من أصناف الحمضيات، النباتات الآتية:ـ

1 - **Tagetes patula.** 2 - **Lycopersicon esculantum** 3 - **Gynura aurantica**

4 - **Chrysanthemum morifolium** 5 - **Persea americana** 6 - **citron medica.**

تأثير فيرويد اكسوكورتز الحمضيات على تركيب الأزهار والثمار فى الأترج:

يستعمل نبات السترون (الأترج) **Citrus medica** كنبات كاشف لفيرويد اكسوكورتز الحمضيات. تجرى عملية تكاثر الأترج عن طريق تنمية بادرات

الصنف Arizona 861 وعقل أو نباتات صغيرة مطعومة بالبرعم من طراز S - 1 كلاهما يستعمل باستمرار كاف لتكنيك الفهرسة ولكن فى الوقت الحاضر يفضل إستعمال عقل من S - 1.

إن أعراض الإصـابة بفيروید اكسوكورتـز الحمضيات على سترون أريزونا 861 أو S - 1 تشمل الإصفرار ثم تدلى الأوراق الحديثة والمتكشفة الجديدة، تفلن العرق الوسطى (يظهر بقع فلينية) والعروق الجانبية الكبيرة على السطح البطنى للورقة ويظهر بقع عمودية مستقيمة على الساق.

فى ربيع سنة ١٩٨٥ أخذت عـقل من السترون S - 1 مصابة بعزلة شديدة من فيروید اكسوكورتز الحمضيات إحتفظ بها فى الصوبا الزجاجية لأكثر من سنة. هذا الاحتفاظ أعطى فرصة للعقل المصابة بـأن تزهر وتعقد الثمار هذه الحالات لم تلاحظ قبل ذلك. عند فحص وملاحظة تركيبـات الأزهار والثمار فى النباتات المصابة تبين ظهـور أوضاع غير طبيعية فى هذه الأعضـاء لم تكـن ملاحظة من قبل ولـم تذكر المراجـع بأنها ترافـق الإصابـة بفيـرويد اكسـوكورتز الحمضيات.

لقد وصف الشكل الخارجى لازهار الحمضيات السليمة وهو ظاهر فى شكل ٤٥. فى الازهار السليمة الطبيعية يتفتح التويج بنظام التفتح القاعدى وتبقى قواعد البتلات ملتصقة مع قاعدة الكأس حتى بعد التلقيح. أما فى النباتات المصابة فإن معظم الأزهار تتميز عن طريق بقاء التويج سليماً قبل أو أثناء أو بعد التلقيح ولا تتفتح البتلات طبيعياً، وبدلاً من التفتح الطبيعى تبقى ملتحمة فى قمة التويج وينطلق التويج بأكمله من القرص الزهرى كلما تكشف وكبر المبيض. تنفصل البتلات عند قاعدة التويج وأحياناً تتسع تدريجياً إلى حد ما بحيث تأخذ شكل النجمة، وبسبب جفاف النصف العلوى من التويج فإنه يشكل غطاء على شكل

فنجان يغطى النهاية القلمية فى الثمار غير الناضجة بحيث يبقى عدة شهور (شكل ٤٥، B).

مع أنه لا يوجد دراسات تشريحية على هذه الأوضاع، إلا أنه يحدث اضطرابات فى تركيب الزهرة وفى تكشف المبيض ويظهر ثمار ناضجة وأخرى غير ناضجة ولكن كليهما بنضج غير طبيعى. مع أن الكأس فى الأزهار المصابة يظهر وكأنه طبيعى التركيب، إلا أنه يكون أضيق من الوضع الطبيعى وهذا يؤدى إلى الافتراض بأن الكأس يكون أكثر التصاقاً مع الجزء العلوى من القرص الزهرى شكل (٤٥، C) أكثر مما هو موجود فى الأزهار العادية السليمة. وفى الحقيقة فإن هذا الالتصاق قد يكون محكم جداً ومقيداً للتكشف الطبيعى للبويضات والمبيض. كلما تكاثرت الخلايا وتوسعت تأخذ مكان فى عملية تكوين الهسبريديم الناضج شكل ٤٦. يبدو أن هذا الانطباق يكون مركزاً على قمة السبلات وبالتالى يحدث تقريباً فى منتصف البويضات أو المبيض إنقباض يكون هذا الانقباض شديد أحياناً وبسيط أحياناً أخرى (شكل ٤٧) ويكون دائماً مساوياً لتأثير تحليق شديد فى الحالات الشديدة. الاستجابة النهائية لتأثير هذا التحليق تكون بحيث تأخذ الثمرة الشكل المشوه بدرجات مختلفة ويكون ذلك على شكل الساعة الرملية (شكل ٤٧) وهو أكثر الأعراض شيوعاً. يكون النصف القلمى للثمرة أصغر من المنتصف الساقى للثمرة وفى بعض الحالات يكون أكثر كثيراً. أيضاً فإن بعض الثمار يكون موجهاً بشكل قائم على المحور، البعض الآخر من الثمار ينحرف عن هذا الوضع القائم عن النصف القلمى ثم تنحنى الثمرة عن المستوى المتعامد. تكون الثمار المصابة بشكل عام أصغر من الثمار السليمة وتميل لأن تأخذ اللون الأصفر قبل النضج. أما الثمار المصابة بشدة يمكن أن تأخذ ربع حجم الثمار العادية. إذا عمل مقطع طولى أو عرضى فى الثمار المصابة يبدو واضحاً أن البويضات تكون قد أصيبت (شكل ٤٨). وعلى أية حال فإن الثمار المصابة تكون صغيرة ومشوهة ويمكن أن تحتوى

أكثر من ١٠٠ بذرة صغيرة بدائية والتى لن تتكشف إلى بذور طبيعية مهما طال بها الزمن. وعلى النقيض من ذلك فإن الثمار المصابة بشكل معتدل عندما تصل إلى طور النضج تصل إلى طول حوالى ١٠ سم ويكون فيها ٢٠٪ من البذور سليمة، هذه البذور تكون جاهزة للإنبات وتنتج نباتات سليمة بدون ظهور أعراض. أما البقية الباقية من البذور والتى هى ٨٠٪ لن تنمو أكثر من ٢ ملم وهذه البذور البدائية لن تتكشف إلى بذور عادية كما سبق وذكرنا. جميع المحاولات التى تبذل لتسهيل إنبات البذور المأخوذة من نباتات مصابة بشدة بفيرويد اكسوكورتز الحمضيات أو بعزلات معتدلة منه فشلت فى إنتاج نبات سواء فى التجـارب المعمليـة أو فى الطبيعة. الثمار السليمـة S - 1 يكون فيها عديداً من البذور الحيوية والتى تنمـو فعلياً بنسبة ١٠٠٪. وبالتالى فإن توقف نمو البذور فى سترون S - 1 يبدو وأنه مظهر مهم فى تفهم أوضاع البذور الشاذة لأن هذه البذور يجب أن تكون مصابة بدرجة كبيرة وبالتالى فإنها على الأقل تشارك ولو جزئياً فى غياب أو الانخفاض الكبير فى حدوث الانتقال بالبذور للفيرويد CEVd.

إن هذه الأعراض المذكورة سابقاً لم تؤثر على أى نوع تجارى يزرع من الحمضيات ويصاب بالفيرويد CEVd. وفى الحقيقة فإن قوة الشجرة بالإضافة إلى حجم الثمار ونوعيتها لا يبدو بأنها تتأثر عندما يكون الفيرويد موجوداً فى أصول متحملة للمرض. كذلك لم يلاحظ أى من هذه الأعراض المذكورة سواء على أشجار سترون S - 1 السليمة النامية من عقل أو الأشجار المحقونة بفيرويد Citron Variable Viriod والذى تتميز الإصابة به على شكل أعراض على المجموع الخضرى تكون بسيطة، مع ذلك تكون مشابهة للأعراض المنتجة بواسطة CEVd، وبالتالى فإن التعبيرات بالأعراض المرضية المذكورة فى الأزهار والثمار يمكن أن يعتقد بأنها متخصصة بالإصابة بالفيرويد CEVd.

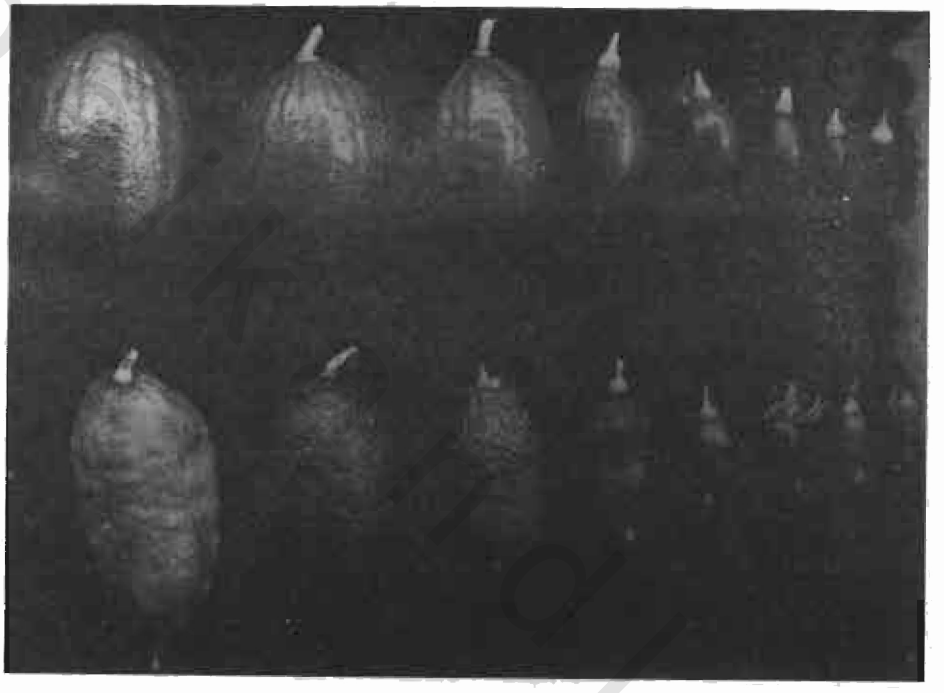
شكل رقم ٤٥ :

A : زهرة سترون سليمة طبيعية.

B : زهرة غير طبيعية للسترون من نباتات مصابة بفيرويد CEVd .

C : المدقة (اليسار) مرتبطة مع الكأس وقاعدة قرص الزهرة غير الطبيعي من زهرة سترون مصابة بالفيرويد وغير طبيعية. (أما اليمين) فإنه نفس التركيب لزهرة سليمة. الأسهم تشير إلى شفة الكأس.

obeikandl.com



شكل رقم ٤٦ :

العلوى: تطور نمو ثمار السترون السليمة من اليمين إلى اليسار.
السفلى: نفس تطور الثمار ولكن مصابة بفيروويد اكسوكورتز الحمضيات.

شكل رقم ٤٧ :

أمثلة من التشوهات والاضطرابات التى تحدث فى ثمار السترون فى مراحل إصابة مختلفة.
تعبيرات مرضية للفيروويد اكسوكورتز الحمضيات.

شكل رقم ٤٨ :

A : مقاطع طولية فى ثمار الحمضيات مصابة بالفيرويد CEVd مظهرة مراحل مختلفة من درجات التشوه ونقص فى عدد البذور وحيويتها مع زيادة شدة التشوه.

B : مقطع طولى فى ثمار سليمة .

التغيرات فى جدار الخلية نتيجة الإصابة المرضية :

تتميز الخلايا البرانشيمية الحديثة فى قمم الأوراق من النباتات السليمة **Gynura aurantiaca** بجدر خلوية ذات مقطع جانبى منتظم وسماكة منتظمة (شكل ٤٩، b) كما ينعكس ذلك بواسطة المقارنة فى (شكل ٥٠). إن جدر الخلية فى مناطق المقارنة فى الأوراق المصابة بالفيرويد CEVd تتشوه بشكل كبير منتجة شكل غير منتظم فى الخلايا فى هذه المناطق من النسيج المصاب. المقاطع الجانبية لجدر الخلية المتناظرة تظهر متجعدة وذات سمك غير منتظم (٤٩، a، c). على المقابل من هذه الجدر الخلوية الشاذة يظهر أحياناً حزم عريضة متوجهة فى منطقة الصفيحة المتوسطة حتى فى الحالات التى يكون فيها جدار الخلية نفسه غير مشوه، هذه التغيرات فى جدار الخلية عادة ما تؤدى إلى تشوه فى التركيب وقساوة فى الخلايا نفسها. كذلك فإن الإصابة الفيرويدية يمكن أن تغير شكل البلاستيدات الخضراء والأنوية.

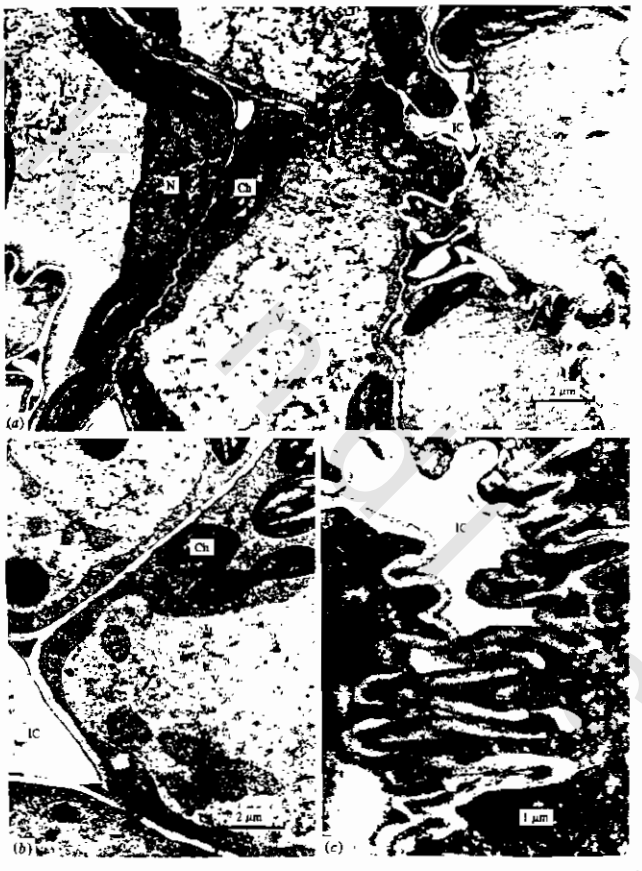
التغيرات المرضية فى الأغشية الخارجية للبلازمودسيماتا :

Pathological Changes of Plasmalemmasomes

إن ال Plasmalemmasomes سوف نرمز لها بحروف (PMS) هى عبارة عن بروزات من ال Plasmalemma فى السيتوبلازم وتسمى أيضاً الغشاء الخارجى للبلازماليما. وهى تظهر بحيث تكون طبقة من الأغشية مضاعفة وتتكون من

البلازماليما Plasmalemma وتونوبلاست وهذه التركيبات PMS توجد بشكل عام فى جميع أنواع الخلايا الحديثة المتكشفة شاملة عناصر الأنابيب الغربالية ـ القصيبات ـ الخلايا المرافقة والخلايا البرانشيمية فى اللحاء والخشب والخلايا الكولنشيمية فى الميزوفيل والابيديرمز.

قبل أن نتكلم عن تأثير الفيرويد على ال PMS نذكر الوضع السليم لهذه المناطق ثم نقارن ذلك مع الوضع فى حالة الإصابة بالفيرويد.



شكل رقم ٤٩ :

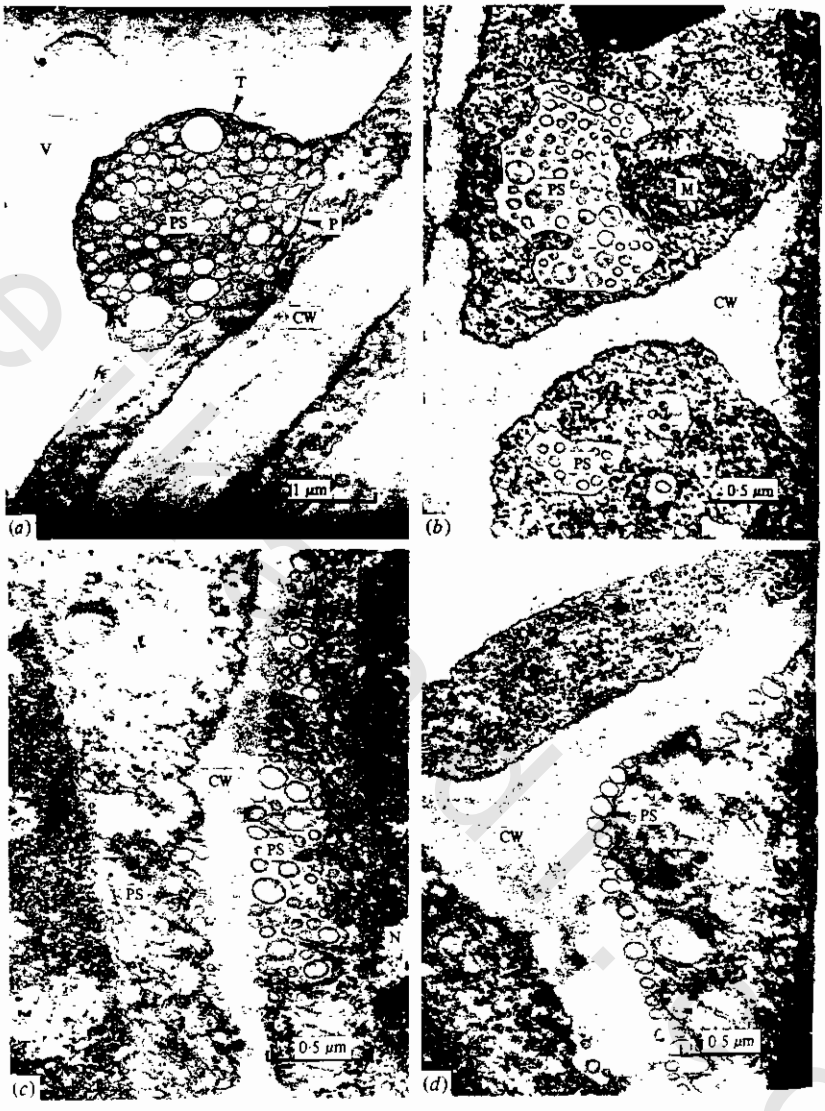
صورة الكترونية للخلايا البرانشيمية من نسيج ورقة سليمة (b) ومصابة بالفيرويد CEVd شكل (a, c) على نباتات G. aurantiaca . Ch = كلوروبلاست. IC= فجوات بين خلوية. N = نواة. V = فجوة فى خلية النبات.

١ ـ ال PMS فى النسيج السليم:

يمكن تقسيم ال PMS بالاعتماد على التركيب الداخلى إلى نوعين مميزين، الأول يسمى حوصلى والثانى أنبوبى، كلاهما موجود فى نبات **G. aurantiaca** السليم. يتميز النوع الحوصلى بوجود حويصلات داخلية مصفوفة بانتظام، متوسط قطرها ٩٠ نانوميتر وتكون مملوءة بمواد متغايرة بشكل بسيط. تتشكل هذه التراكيب بحيث تكون وسيطات ذات أشكال مختلفة من الشكل الكروى المنضغط أو تتكون بشكل تركيبات منبسطة بين البلازماليما وجدار الخلية وهذه تكون سهلة الاكتشاف. ويمكن أن تكون موجودة بشكل آخر بحيث تكون على شكل طبقات مضاعفة أو مفردة من الحويصلات توجد فى الخلايا الحديثة حيث يلاحظ زيادة فى سماكة الجدار فى الخلية. يمكن أن يظهر فى المقاطع المتسلسلة فى الخلايا أن ال PMS يمكن أيضاً أن تتواجد بشكل منفصل عن جدار الخلية وحرة فى السيتوبلازم.

أما ال PMS الأنبوبية فهى تتصف بأنها مجموعة مفككة من تركيب الأنابيب الداخلية. هذه الأنابيب تكون بشكل عام مصفوفة بطريقة مكثفة ومتوسط قطرها ٥٠ نانوميتر. فى كثير من أل PMS الأنبوبية فإن جزءاً من التركيب الداخلى يصبح مقلوباً إلى كثافة الكترونية وحبيبات Paramural. هذا يعنى أن ال PMS تكون محببة. هذه المادة ذات الكثافة الالكترونية يمكن أيضاً أن تصبح موزعة فوق مساحة كبيرة من البلازماليما وجدار الخلية وهذا يؤدى إلى القول أن ال PMS تكون فارغة وذات تركيب منتكس ببطء. كثيراً من ال PMS تظهر ذات أغشية داخلية عديدة الطبقات.

هناك ملاحظتين يجب الاهتمام بهما فى هذا الموضوع، الأول: ـ إن ال PMS الحويصلية والأنبوبية لا يتواجدان فى وقت واحد فى نفس العينة النباتية. الثانية: ـ ضمن العينة النباتية الواحدة فإن المناطق المختلفة يمكن أن يكون بها إختلافات واضحة فى عدد وتوزيع هذه ال PMS وبالتالى فإن سلسلة من المقاطع الرقيقة يمكن أن تجرى فى المكان وغالباً يصعب اكتشاف ال PMS، إلا أنه بعد



شكل رقم ٥٠ :

صورة الكترونية دقيقة للبلاسماليماسومز الوعائية فى أنسجة سليمة من نباتات **G. aurantiaca**. تكون الأوعية مقفلة فى شكل دائرى (a) الذى يمكن أيضاً أن توجد ضمن السيتوبلازم (b). فى المناطق التى زاد فيها سمك جدار الخلية تكون الأوعية مرتبة بتضاعف (c) أو طبقات مفردة (d). CW = جدار الخلية. M = ميتوكندريا، P = بلازماليما، Ps = بلاسماليماسوما، T= تونوبلاست، V = فجوة.

إجراء عدة مقاطع فإن هذه التركيبات يمكن أن تظهر ثانية ولكن ليس أكثر من ستة منها يمكن أن تلاحظ فى المقطع الواحد. ولكى نحصل على معلومات كثيرة عن هذه ال PMS يكون ذلك فقط إذا أجرى عدد كبير من المقاطع الرقيقة من نباتات مختلفة تحت الأختبار.

أل PMS فى نسيج الورقة المصابة بالفيرويد CEVd :

إن ال PMS فى نسيج الورقة المصابة بالفيرويد CEVd تختلف بشكل كبير فى شكلها وتركيبها الداخلى عن تلك الموصوفة فى الأوراق السليمة. فى جميع الحالات حيث أن التركيب الداخلى الحوصلى يمكن أن يتحقق ويرى بالتجربة فتظهر هذه التركيبات فى الخلايا المصابة بعدم إنتظام واضح فى حجومها ـ شكلها وعددها. بسبب هذه الانحرافات فإن الشكل الكلى لـ PMS يصبح أيضاً غير منتظم.

أما ال PMS الأنبوبية فى الأوراق المصابة يظهر فيها إضطربات كثيرة فى الأنابيب الداخلية والتى يبدو وكأنها مطحونة مع بعضها. العناصر التركيبية يكون لها كثافة الكترونية ثقيلة، وبالتالى فإن ال PMS الأنبوبية المشوهة يكون بسهولة أن ترى قريبة من أكثر جدر الخلية نفاذية وقريبة من السيتوبلازم.

يلاحظ فى كثير من الأحيان نوع واحد من ال PMS مشوهاً فى النباتات المصابة بالفيرويد ويصعب اكتشاف إنتشار التركيبات الداخلية من ال PMS بين البلازماليما وجدار الخلية كما هو فى النسيج السليم. يجب التأكد أنه فى الإصابة الفيرويدية فإن الأوراق الحاملة أعراض يظهر فوق جدار الخلية فيها مناطق تبدو سليمة وكذلك فوق ال PMS، هذا يدل على أنه فى الأوراق ذات مظهر الإصابة العام فإن مناطق من النسيج السليم يمكن أن تتواجد على سطح الورقة.

لا تظهر تغيرات محدثة بواسطة الإصابة الفيرويدية فى تركيب كل من الأنوية، الميتوكوندريا، الرايبوسومات، المكروسومات وجهاز الغشاء السيتوبلازمى. أحياناً فإن

بلاستيدات خضراء مع أجسام غير منتظمة ذات كثافة الكترونية تتواجد فى الأوراق المريضة. ومن المهم أن نذكر هنا أن هذه الانحرافات تمثل أيضاً أكبر الأعراض الخلوية فى نباتات **G. aurantiaca** المصابة بفيرويد الثمرة الباهتة فى الخيار.

تأثير الإصابة بفيرويد اكسوكورتز الحمضيات على إنتاج الاثيلين:

إن فيرويد اكسوكورتز الحمضيات يمكن أن ينتقل إلى نباتات الطماطم و **Gynura**. كلما تقدم المرض فإن الأعراض تتميز بالتقزم وتدلى الورقة وتشوهها. أعراض الإصابة الفيرويدية فى الطماطم تفترض حدوث اضطرابات فى عمليات تنظيم الاثيلين لنمو وتكشف الأوراق. لقد إفترض بأن الاثيلين يدخل فى تكشف استجابة النبات العائل للفيرويدات. لقد وجد أيضاً أن الإصابة بفيرويد CEVd تحدث زيادة فى إنتاج الاثيلين فى نبات **G. aurantiaca** وكذلك يكون هناك زيادة إنطلاق الاثيلين فى نباتات الطماطم وهذا يتسبب عن زيادة الحث على إنتاج- 1) aminocyclopropane - 1 - carboxylic acid ويرمز له ACC وحيث أن ACC وسيط فى إنتاج الإثيلين كما فى:

$$\text{Methionine} \longrightarrow \text{SAM} \longrightarrow \text{ACC} \longrightarrow \text{Ethylene}$$

إن مركب SAM هو S - adenosylmethionine.

كذلك فإن ACC يمكن أن يمثل إلى شكل متحول غير طيار Non - Volatil يعرف فى عديد من الأنسجة على أنه N - malonyl ACC. إن أعراض الإصابة والتعبيرات التى تظهرها النباتات المصابة تبدأ من قمة الأوراق المتدلية فى الأوراق القمية والتى لا تلبث أن تتجعد وتتشوه بشدة كلما تدخلت الإصابة الفيرويدية مع عملية التكشف الطبيعية. يمكن تلخيص تأثير الفيرويد على إنتاج الأثيلين فى الآتى: ـ

١ ـ إن التفاعل الجهازى لنباتات الطماطم ونباتات **Gynura** مع فيرويد CEVd يكون متبوعاً بزيادة ليس فقط فى إنتاج الاثيلين ومستويات ACC ولكن

أيضاً يكون متبوعاً بزيادة تجمع أل ACC المتحول كما يحدث فى بناء الاثيلين فى أوراق الدخان المصابة بفيرس موزايك الدخان، الذى يحدث تفاعل الحساسية الفائقة.

٢ ـ إن تشجيع بناء ال ACC يمكن أن يعتبر نتيجة للزيادة الثابتة فى إنتاج الاثيلين، هذا الثبات يكون فى المستوى المضطرد من ACC الحر ومن زيادة تجمع ACC المتحول.

٣ ـ إن زيادة تجمع ACC المتحول يؤدى إلى القول بأن هذا يكون أقل هجرة من الزيادة الكبيرة فى كمية ACC المنتجة بواسطة الإصابة الفيرويدية.

٤ ـ خلال الأعراض المبكرة يزداد بناء ال ACC ويبقى ثابتاً خلال تشكف الأعراض ولكن لا يكون هناك إختلافاً فى كفاءة الانقلاب فى ال ACC إلى أثيلين بين الأنسجة السليمة والمصابة بالفيرويد.

٥ ـ فى أوراق نباتات الطماطم المظهرة أعراض جهازية للإصابة بالفيرويد يكون هناك تشجيع على إنتاج مستويات عالية من ACC وتشجيع على إنتاج الاثيلين فى نسيج ورقة الطماطم.

٦ ـ الفيرويد CEVd يسبب زيادة فى إنتاج ACC فى أوراق الطماطم ويسبب تشوهات فى جدار الخلية وتغير فى تركيب هذا الجدار ويمكن أيضاً أن يحدث تغير فى الغشاء البلازمى وهذا يكون له دور فى إنتاج ACC حيث ذكر Anderson et al سنة ١٩٨٢ أن أل Cellulysin وبقايا الجدار المهضوم للخلية تستطيع أن تشجع زيادة إنتاج الاثيلين.

علاقة البولى أمين مع الإصابة بفيرويد CEVd وهل يمكن استعمال ال Putrescine فى مقاومة CEVd ؟؟

أجريت تجارب على مستويات البيوترسين Putrescine، سبيرميدين Spermidine والسبيرماين Spermine (وهى أكثر مركبات البولى أمين إنتشاراً فى أنسجة النبات)

فى أنسجة النبات المصابة بالفيرويد CEVd أو المعاملة بنترات الفضة أو مركب الايتافون (2 - chloroethyl phosphonic acid) مقارنة مع النباتات غير المصابة. وكذلك درس تأثير مثبطات بناء الاثيلين أو فعله على مستويات البولى أمين وكذلك تأثير الإضافات الخارجية من البولى أمينز على مجموعة الأعراض المرضية المتسببة عن الفيرويد CEVd ونشاط ال Protease المحدث بواسطة المعاملة بأيونات الفضة فوجد ما يلى: ـ

١ ـ تسبب الإصابة الفيرويدية زيادة فى إنتاج الاثيلين فى نباتات العائل وتشجع تجمع ما يسمى PR proteins (Pathogenesis related) وإن الزيادة فى إنتاج الاثيلين تفوق نقص محتويات ال Putrescine فى النباتات.

٢ ـ معاملة نباتات **Gynura** بمادة $AgNO_3$ أو الايتافون تنتج تأثيرات مشابهة لتلك المحدثة بواسطة الإصابة بالفيرويد CEVd متضمنة زيادة فى إنتاج الاثيلين. إن التأثيرات المشابهة لتأثيرات الفيرويد المتسببة عن أيونات الفضة تعزى لمقدرتها على اطلاق الاثيلين المصنع فى نباتات **Gynura**. إن زيادة إطلاق الاثيلين يقلل كمية ال Putrescine.

٣ ـ هناك تأثيرات مشابهة تنتج بواسطة الايتافون والمركبات المطلقة للاثيلين.

٤ ـ إن مجموعة الأعراض الشبيهة بأعراض الفيرويد والمتسببة عن نترات الفضة فى نباتات **Gynura** قد أوقفت بواسطة مثبطات بناء الايثيلين AVG (aminoethoxyvinyl glycine ومثل amino oxy acetic acid أو Co^{2+} أو بواسطة مثبطات فعل الاثيلين Norbornadiene حيث تمنع استنزاف ال Putrescine بدون أن تؤثر على بناء الايثيلين، هذا يدل على أن العلاقة بين زيادة بناء الاثيلين ونقص البتروسين ليس بسبب المنافسة البنائية لمادة S - adenosylmethionine. وقد وجد أن الاثيلين والبولى أمين تشترك فى بناء ال S - adenosylmethionine ببادئ مشترك فى طريقة بناء الاثيلين والبولى أمين.

٥ ـ يحدث نقص فى مستوى ال Putrescine فى أنسجة الورقة المصابة بالفيرويد أو المعاملة بنترات الفضة أو الايتافول ولم يكن هناك تأثير معنوى على مستويات كل من Spermidine أو Spermine وهذا يؤدى إلى القول بدخول البولى أمين فى تفاعل العائل مع الفيرويد. إن هذا الخفض فى محتوى إل Putrescine هو خطوة إشارية فى تحويل سلسلة تفاعل تؤدى إلى استجابة النبات للإصابة. هذا يمكن أن يستنتج مما وجد بأن تعويق النقص فى مستوى ال Putrescine خلال الإضافات الخارجية من بعض المركبات تمنع التعبيرات المنتجة بواسطة الفضة والتى تشبه أعراض الفيرويد (مثل تشوه الورقة، تثبيط نمو الجذر، تجمع PR proteins وتشجيع تحليل البروتينات المرافقة مع استجابة النبات).

إن زيادة إنتاج الاثيلين تكون مسئولة عن النقص فى مستوى الPutrescine وهذا قد تأكد مع نتائج الأبحاث التى ذكرت بأن أنزيم-Arginine decar boxylase، الأنزيم الرئيسى المسئول عن بناء ال Putrescine فى النباتات قد تثبط بواسطة الاثيلين بتركيزات فسيولوجية.

٦ ـ إن تكشف الأعراض الشبيهة بأعراض الفيرويد وإنتاج بروتينات متعلقة بالمرضية والزيادة فى نشاط ال Protease المحدث بواسطة أيونات الفضة كلها اوقفت بواسطة الإضافة الخارجية من ال Putrescine.

فى النهاية نستطيع أن نجاوب على هذا السؤال الذى هو عنوان هذه المقالة وهو هل يمكن استعمال ال Putrescine فى مقاومة الفيرويد؟؟ نستطيع أن نقول نعم ولكن الأبحاث المستقبلية هى التى نتائجها ستوافق معنا أم لا.

إحداث بروتينات لها علاقة بالمرضية بواسطة CEVd :

لقد وجد أن البولى ببتايد Polypeptide المرافقة للإصابة الفيرويدية ليست متخصصة بالفيرويد ولكنها تنتج من التغيرات التى يحدثها المرض فى ميتابولزم العائل. هذه الحقيقة شجعت الباحثين على البحث عن بروتينات من الممكن أن يكون لها دور فى الاستجابة المرضية.

لقد أمكن اكتشاف عشرة PR Protiens فى نباتات الطماطم المصابة بفيرويد CEVd واحد منها ذو تأثير حامضى والتسعة الآخرين ذات تفاعل قاعدى. إن هذه البروتينات يمكن إنتاجها بواسطة (باستثناء رقم عشرة C 10) معاملة أوراق الطماطم بنترات الفضة أو بمحلول الايتافون. وهى كذلك تنتج مترافقة مع أعراض التحلل الموضعى والأعراض الجهازية والإصابة الفيرويدية. ولقد ثبت بأن تجمع هذه البروتينات لا علاقة له بتحلل الخلية النباتية أو موتها. كما وأن حقيقة أنه لايوجد PR Protiens فى أنسجة الورقة الملاصقة لتلك المعاملة بالايتافون يدل على أنه لا البروتينات نفسها ولا أية أنواع كيماوية أخرى تشجع تكوين PR Protiens حيث أنها تهاجر من مكان الجرح إلى الأنسجة السليمة بكميات يمكن تقديرها. وبالتالى فإن تأثير الايتافون فى الطماطم موضعى جداً فى حين أنه فى الدخان يكون جهازى، لذلك فإن المعاملة بالايتافون تحدث أعراض شبيهة بأعراض الفيرويد وتشجع تراكم PR Protiens. هذا يؤدى إلى القول بأن الايثيلين داخل فى تكشف تفاعل النبات وتكوين PR - Proteins بعد الإصابة بالفيرويد CEVd واستجابة للمعاملة بأيونات الفضة.

ولقد ثبت بأنه لا يوجد علاقة خاصة بين إنتاج PR Protiens وتفاعل الفيرويد مع العائل، زيادة على ذلك فإن هذه البروتينات كلها تتكون فى النباتات التى وصلت طور الشيخوخة وأنها وسيطات فى إنتاج الايثيلين. بعض هذه البروتينات مقاوم للهضم بأنزيمات Trypsin و chymotrypsin - ∝.

تأثيرات مضاد الفيرويد Ribavirin :

بالرغم من الأهمية الاقتصادية والأضرار التى تحدثها الأمراض الفيرويدية والتقدم الكبير فى علم الفيرويدات إلا أنه لا يوجد طرق علاجية فعالة لمقاومة الإصابة الفيرويدية لغاية ١٩٩٤ (حسب معرفة المؤلف). ظهرت بعض التقارير أهمها إثنان فقط تبحث المقاومة الكيماويـة للأمراض الفيرويدية. الأول بحث فى استعمال بعض المواد الكيماوية فى مقاومة مرض الدرنـة المغزلية هذه المادة اسمها Piperonyl butoxide ويرمز لها ($C_{19}H_{30}O_5$). وكذلك إقترح استعمال مادة putrescine فى

مقاومة فيروید اکسوکورتز الحمضيات. ولقد ذكر العالم Conejero سنة ١٩٨٢ طريقة فى مقاومة مرض اكسوكوتز الحمضيات تعتمد على استعمال نترات الفضة والاثيلين ولكن لم يكتب لها النجاح لعدة إعتبارات.

أما التقرير الثانى عن المقاومة الكيماوية للفيرويدات تكلم عن استعمال مادة الرايبافارين Ribavirin واسمه الكامل (1 - B - D - ribofuranosyl - 1, 2, 4 - triazol - 3 - carboxamide) - هذا المركب ذو تأثير واسع ضد الفيروسات وقد تبين أن له تأثيراً مثبطاً لتناسخ أعداد ال DNA فى النبات والحيوان وكذلك RNA الفيروسى سواء فى المعمل أو فى الطبيعة. ولقد أجريت دراسة لتحديد مدى قدرة هذه المادة فى حفظ أو التأثير على الإصابة بفيرويد CEVd فى نباتات **G. aurantiaca**.

لقد وجد أن استعمال ال Ribavirin على النباتات المظهرة أعراض إبتداءً من يوم ٢٥ بعد الحقن أدى إلى خفض تدريجى فى شدة الأعراض فى كثير من الأوراق المتكونة حتى تلك المتكونة بحوالى ٣ أسابيع بعد إبتداء المعاملة، أظهرت قليل وأحياناً لم تظهر أعراض. جميع التركيزات المستعملة من أل Ribavirin بين ٣٠ – ١٤٠ ملغ / لتر كانت ذات فعالية متساوية على الفيرويد. أما عند الرش بمادة Tween (كنترول) لم يظهر لها تأثير على تكشف أو نمو النبات (شكل ٥١).

إن الشفاء من المرض وقلة التأثيرات السامة عند المعاملة بال Ribavirin يعود ذلك إلى غياب مكونات بعض البروتينات التى عادة ما تكون مترافقة مع المرض مثل P_2 و P_1 وكذلك غياب أى تغيرات فى سلوك البروتين التى يمكن أن تعزى إلى شدة المرض وإجهاد النبات.

فى تجارب أخرى استعمل فيها ال Ribavirin على النباتات بثلاثة أيام قبل الحقن ففى هذه الحالة فإن هذه المادة أوقفت تكشف أو حدوث المرض وظهرت النباتات سليمة ولم يمكن استرجاع الفيرويد ثانية ولم تثبت له أية حيوية. يمكن أن يفسر ذلك عن طريق عدم وجود زيادة فى ال P_2 و P_1 عديدات الببتايد.

أما المعاملة بتركيزات أقل من ٣٠ ملغ / لتر فإنها لم تكن فعالة، بينما

السمية Phytotoxicity وتقزم وتدلى الورقة تحدث مع المعاملات على تركيزات ١٦٠، ١٨٠ و ٢٠٠ ملغ / لتر.

يمكن تلخيص ما سبق بأن المعاملة بمادة Ribavirin تسبب خفض شديد في محتوى الفيرويد في أنسجة العائل. ونظراً لأن الحيوية والمرضية لجزيئات الفيرويد خارج النبات لم تتأثر بواسطة التعريض المباشر لمادة Ribavirin وبالتالى فإن التأثير يكون بسبب تأثير هذه المادة على عملية تناسخ الفيرويد.

مع أن الميكانزم الدقيق لفعل مادة Ribavirin غير معروف بالضبط، إلا أنه يمكن القول بأن فعل هذه المادة يمنع بناء الحمض النووى الفيرويدى عن طريق تثبيط بناء نيوكليتيدات الجوانين Guanine. ونظراً لأن CEVd غنياً نسبياً بهذه النيوكليتيدات Guanosine فمن الممكن تخيل أن ال Ribavirin يؤثر على تناسخ الفيرويد بأكثر شدة من تأثيره على إنتاج الحمض النووى فى العائل. هذا يمكن تأكيده بالاعتماد على حقيقة أن المادة المذكورة تخفض بشدة مستويات الفيرويد بدون إحداث تأثيرات سامة.

شكل رقم ٥١ :

استعمال ال Ribavirin فى مقاومة فيرويد اكسوكورتز الحمضيات الذى يهاجم نباتات G. aurantiaca. a = نباتات مصابة غير معاملة، b = نباتات مصابة بالفيرويد ومعاملة بالرايبافارين. c = نباتات غير مصابة بالفيرويد ومعاملة بالرايبافارين. كان يستعمل الرايبافارين رشاً على الأوراق بنسبة ٥٠ ملغ / لتر إبتداءً من ظهور أعلى كثافة من الأعراض على النبات (٢٥ ـ ٣٠ يوم بعد الحقن) ويكرر الرش كل ٤ أيام لمدة ٢٠ يوم.

الوقاية بالتضاد فى فيرويد اكسوكورتز الحمضيات

١ ـ الوقاية بالتضاد بين سلالتين من فيرويد CEVd :

فى عمليات حصر أجريت لتعريف الصفات البيولوجية لعديد من عزلات فيرويد CEVd أخذت من مصادر حقلية، فتبين أن هناك عزلات تحدث تفاعل شديد من أعراض الاكسوكورتز فى نبات السترون وهو الأترج **Citron medica** مأخوذة من الحمضيات. فى حين أن هناك عزلة من الفيرويد تحدث أعراض معتدلة على نبات **G. aurantiaca** وقد اكشتفت هذه العزلة فى نبات السترون ووصفت بأنها سلالة معتدلة من الفيرويد CEVd على نبات السترون وذلك اعتماداً على حجمها وتماثل قواعدها واعطيت اسم CEVd - 129.

أجرى إختبار الوقاية بالتضاد بين العزلة CEVd - 129 كعزلة واقية (حافظة) ضد السلالة المتحدية وهى السلالة الشديدة من CEVd على نباتات **Gynura**. وجد أن السلالة المعتدلة من الفيرويد CEVd - 129 يمكن أن تكسب النبات وقاية مظهرية ضد السلالة المتحدية الشديدة. هذا التأثير الواقى يكون على درجات والتى يتراوح بين تأثير بسيط فى إظهار الأعراض من قبل السلالة الشديدة إلى وقف تام لظهور هذه الأعراض. إن مستوى هذه الوقاية يعتمد على طول الفترة بين الحقن بالسلالة المعتدلة والسلالة الشديدة. فى جميع الحالات فإن تأثير حفظ النبات بواسطة السلالة المعتدلة ضد السلالة الشديدة كان مؤقتاً وذلك نظراً لأن الأعراض وتركيز الفيرويد يزداد بشكل كبير بالنسبة للسلالة الشديدة كلما قلت الفترة بين الحقنتين والذى يعكس سيطرة هذه السلالة عند إجراء حقن مختلط من السلالتين فى وقت واحد، لذلك حتى تتم الاستفادة من هذه الظاهرة يجب إطالة الفترة بين الحقنة بالسلالة المعتدلة والسلالة الشديدة، حتى يكون هناك فرصة كافية لتناسخ السلالة المعتدلة.

٢ ـ الوقاية بالتضاد بين فيرويد CEVd وفيرويد PSTVd :

هناك دراسة لمعرفة تأثير الوقاية بالتضاد بين فيرويد اكسوكورتز الحمضيات CEVd وفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس PSTVd. أجريت عدة تجارب

علـى نبات G. aurantiaca ونباتات طماطم L. esculentum حيث حقن النباتين بسلالات شديدة من فيرويد CEVd وسلالات شديدة أيضاً من فيرويد PSTVd ثم لوحظت النباتات واكتشفت الفيرويدات بطريقة PAGE فوجد أنه عندما تحقن نباتات G. aurantiaca بالفيرويدين كل لوحده فإن هذه النباتات المحقونة يظهر عليها أعراض شديدة بواسطة CEVd وأعراض بسيطة بواسطة PSTVd وكذلك فإن CEVd يتجمع بمستوى أعلى منه فى حالة PSTVd، بينما عندما حقنت نباتات الطماطم بالفيرورين كل على حدة فإن كل فيرويد أعطى أعراض شديدة (إلا أن التفاعل كان أكثر شدة وكفاءة بواسطة PSTVd منه فى حالة CEVd) وكذلك فإن مستوى تجمع PSTVd كان أعلى بكثير منه فى حالة CEVd.

عند حقن نباتات G. aurantiaca بالفيرودين معاً فإن الأعراض التى تظهر تكون مميزة للفيرويد CEVd وهو الفيرويد الوحيد الذى يمكن اكتشافه فى النبات. أما عند حقن نباتات الطماطم بالفيرودين معاً فإن الأعراض الملاحظة على نباتات الطماطم تأخذ الأعراض النموذجية للإصابة بالفيرويد PSTVd وهو الفيرويد الوحيد الذى أمكن إسترجاعه ثانية من النبات.

ومن ناحية أخرى عندما حقنت نباتات G. aurantiaca بفيرويد PSTVd أولاً ثم حقنت بعد ذلك بمدة أسبوع بفيرويد CEVd، فإن أعداداً من النباتات أظهرت أعراض مميزة للإصابة الشديدة بالفيرويد CEVd وكلا الفيرويدين كان موجوداً فى المستخلص النباتى وهناك أعداداً أخرى من النباتات أظهرت أعراض السلالة المعتدلة للإصابة بفيرويد PSTVd وهو الفيرويد الوحيد الذى أمكن عزله منها. وعلى أية حال عندما قطعت قمم النباتات المحفوظة بالتضاد فإن الأفرع الجديدة أظهرت أعراض شديدة للإصابة بالفيرويد CEVd فقط وهو الفيرويد الوحيد الذى أمكن اكتشافه فى النبات. هذا يدل على أن كل من PSTVd و CEVd يتنافسان على عوامل محددة فى العائل تلزمهما فى التناسخ والحركة والتجمع وإن CEVd له قدرة تنافس أعلى فى G. aurantiaca من الفيرويد PSTVd والعكس صحيح بالنسبة لنباتات الطماطم عند حقنها بالفيرويد CEVd ثم بعد أسبوع تحقن بالفيرويد PSTVd.

٢ ـ مرض ككسيا فى الحمضيات
Citrus Cachexia Disease

مقدمة : ـ

كان أول ظهور لهذا المرض سنة ١٩٢٨ وكان أول وصف علمى له سنة ١٩٣٤ فى فلسطين وذلك من قبل كل من Reichert و Perlberger على الليمون الحلو **Citrus limettiodes** وكان يطلق على المرض اسم Xyloporosis. يحدث هذا المرض بشكل أساسى على أصول الليمون الحلو وأشجار الشموطى للبرتقال الحلو. الأشجار المصابة تتدهور نوعاً ما وبالتدريج وتصبح غير منتجة خلال بضع سنين. قد يلاحظ أعراض بسيطة على بادرات الليمون الحلو. كذلك فإن المرض يصيب الماندرين Mandarin ولكن لا يصيب الليمون الحامض والكريب فروت. لوحظ المرض سنة ١٩٥٢ على أشجار **C. reticulata** المطعومة على **C. paradisi**.

يوجد مسبب المرض فى جميع مناطق زراعة الحمضيات فى العالم وهو أكثر أهمية فى مناطق البحر الأبيض المتوسط وفى بعض مناطق البرازيل والأرجنتين حيث يزرع الليمون الحلو وهو الأصل القابل للإصابة بالمسبب. أجريت دراسات عديدة على هذا المرض فى البرازيل والأرجنتين منذ سنة ١٩٥٧ . ذكر وجود المرض فى جنوب افريقيا سنة ١٩٥٨ . أما فى فلوريدا فكان أول ذكر له سنة ١٩٥٧ .

المرض واسع الإنتشار فى أصناف الحمضيات مثل الليمون الحلو، الماندرين، ليمون الماندرين، التانجالو وليمون **C. macrophylla** . ولقد ذكر أن قليل من بعض

أنواع الليمون الحامض والتانجور وأنواع أخرى من الحمضيات يتكشف عليها أعراض المرض إذا أصيبت بالمسبب المرضى. ظل المرض خطيراً فى كثير من بلدان حوض البحر الأبيض المتوسط حتى تم تغيير أصل الليمون الحلو واستعملت أنواع أخرى من الأصول. يكون تأثير المرض على أصول الليمون الحلو أقل على الأشجار النامية فى الأراضى الخفيفة ولكن بعض الباحثين ذكر فى إسرائل أن لا علاقة للأصل النامية عليه الشجرة بشدة ظهور الأعراض.

مع أنه لا يوجد معلومات كثيرة عن الأهمية الاقتصادية لأضرار هذا المرض، إلا أنه بشكل عام يسبب تدهور كبير للشجرة وضعف عام وإن الحقل الذى يظهر فيه المرض يتلف بنسبة ١٠٠ ٪ بعد خمسة سنوات من الإنتشار.

الأعراض:

إن تفاعل الحمضيات مع مرض ككسيا يؤدى إلى ظهور مجموعة من الأعراض تتراوح من التنقر البسيط أو المعتدل فى الخشب إلى مرحلة متقدمة من تقشر القلف واضطرابات فى تكوين الخشب، وتشرب الأنسجة المصابة بالتصمغ. من الصعب التمييز بين أعراض هذا المرض وأعراض الإصابة ببعض الفيروسات الأخرى وهذا يؤدى فى كثير من الأحيان إلى أخطاء فى التشخيص وإختلاف فى نتائج بعض الأبحاث. يجب عدم الاعتماد على تنقر الخشب لوحده كعلامة مشخصة للمرض، إلا أن كثير من الباحثين ذكروا بأن أولى الأعراض تظهر على شكل تنقرات فى الوجه الخارجى للخشب مع وجود نتوءات متبادلة على الوجه الكامبيومى فى القلف. يكون لون قاعدة النقرة وقمة النتوء مائل للبنى. هذه الأعراض تلاحظ على الأشجار من صنف الليمون الحلو بعد تطعيمها بالبرعم بمدة سنة. وفى المراحل المبكرة من الإصابة يمكن أن تظهر الأعراض على الأنسجة القريبة من إتحاد البرعم بالأصل. أخيراً تصبح الثقوب ملاحظة بوضوح وينخفض سطح القلف على شكل بقع أو شرائح، وكلما نمت الأشجار، كثيراً ما يظهر نمو غير منتظم (متفاوت) بين الطعم والأصل حيث تأخذ هذه المنطقة شكل

يشبه الركبة، وإن الخشب والقلف القريبان من الكامبيوم، يأخذان اللون البنى خاصة نقر الخشب والنتوءات المتبادلة فى القلف. ولقد فسرت هذه الظاهرة على أن النقر فى الخشب تكون كثيرة جداً وتقع قريبة جداً من بعضها البعض بحيث يبدو الخشب مثقباً على شكل غربال. فى هذا الطور من المرض غالباً ما تصبح الأشجار مصفرة وذات أوراق صغيرة الحجم وتزهر الأشجار بشدة وتعطى محصول ثمار أكثر من الوضع الطبيعى.

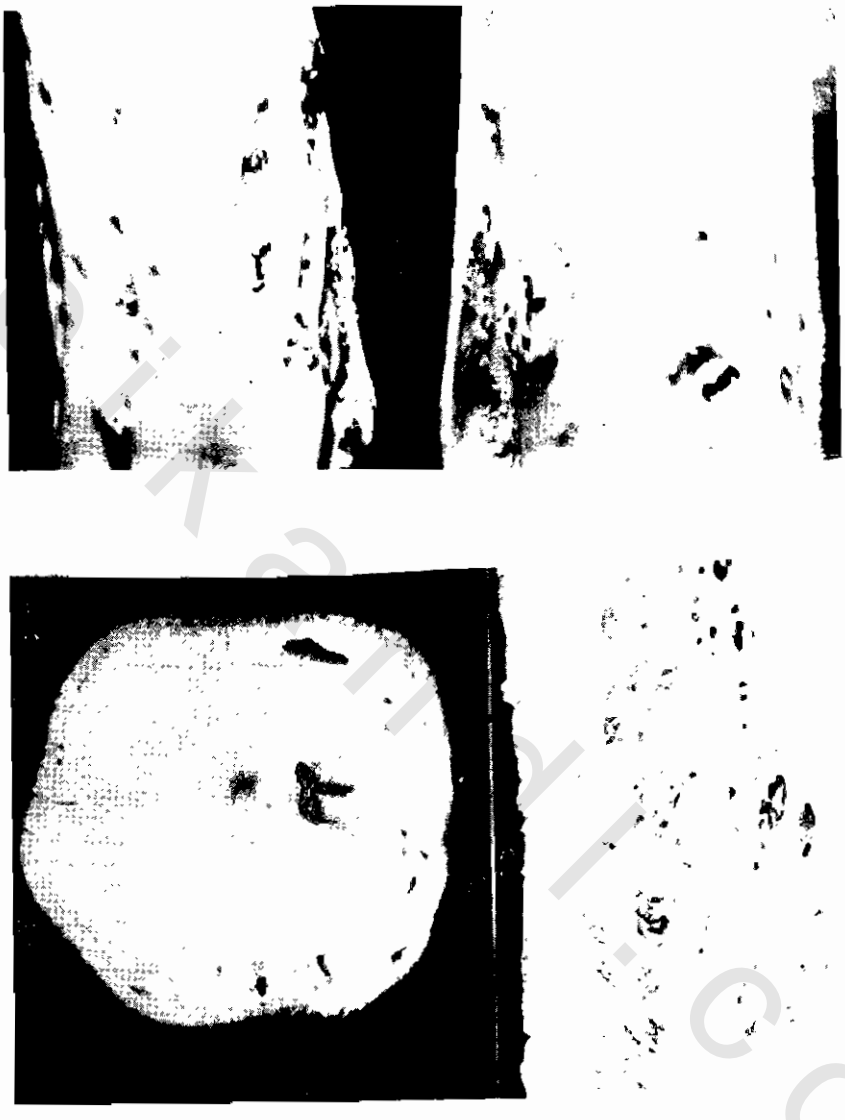
يبدأ الطور الثالث من المرض بظهور تلون بنى على بعض المناطق فى القلف، هذه الأجزاء المتلونة تمتد بشكل عام إلى ما يقارب نصف الساق. تلون القلف يكون متبوعاً بالتشقق والأجزاء الملونة من القلف تصبح مائلة للون الأسود تتشقق وتتقشر فى قطع صغيرة. يجف الخشب بالقرب من هذه المناطق ويتحلل ويصبح أسود اللون، عندما يصل المرض إلى هذه المرحلة، أعداداً كثيرة من الأفرع تذوى تدريجياً وببطء حتى تصبح الشجرة كلها قد هلكت. إذا عمل مقطع عرضى فى جذع شجرة ليمون حلو فى هذه المرحلة الأخيرة من المرض يلاحظ بطشاً أو شرائح ملونة وأنسجة غير متعضية فى الأجزاء الخارجية من الخشب شكل ٥٢. يلاحظ أحياناً ترسبات صمغية وتلون فى اللحاء والذى يظهر قبل تشقق القلف أو تسلخه. يمكن ملاحظة بقع صمغية بعد إزالة قطع القلف بشكل خاص فى أشجار Tangelos و Mandarins لا يلاحظ تلون فى اللحاء ولا وجود تصمغات على أشجار الليمون الحلو ولذلك لا يلاحظ تلون اللحاء فى أشجار Tangalos وهذا يعتمد على الصنف.

من بين ٤٥ صنف من الحمضيات حساسة للمرض فإن هناك نوعان فقط يتفاعلان مع المرض بدرجاته المختلفة كما فى شكل ٥٣. كما ذكر سابقاً فإن تنقر الخشب لا يستعمل لوحده كعامل مشخص للمرض ولكن تشرب الصمغ فى القلف فى بعض أنواع الحمضيات يمكن أن يتسبب عن الفيرويد وفى حالات قليلة عن بعض الفيروسات.

إنتقال المرض:

إن هذا المرض واسع الإنتشار فى معظم أنحاء العالم. يمكن أن ينتقل عن طريق التطعيم. يمكن أن ينتقل عن طريق البذور وعن طريق الحشرات القشرية.

شكل رقم ٥٢:
أعراض مرض ككسيا فى الحمضيات
A : تنقر بسيط فى الخشب.
b : بداية تقشر خارجى للقلف مظهر تجمع الصمغ.
c : مراحل متقدمة من المرض.
d : تأثير شديد فى منطقة إتحاد الطعم مع الأصل.



شكل رقم ٥٣ :

العلوى: الوجه الكامبيومى من جهة الخشب على الشمال والوجه الكامبيومى من جهة القلف فى اليمين كلاهما مصاب بفيرويد ككسيا.

السفلى: مقاطع عرضية وطولية لنبات التانجالو المصاب بفيرويد ككسيا مظهراً الأنسجة غير الطبيعية وترسبات الصمغ فى الخشب.

سبب المرض:

يتسبب هذا المرض عن فيرويد Citrus Cachexia Viroid ويكتب باختصار (CCaVd) وقبل سنة ١٩٩٢ كان يكتب بدون إضافة حرف d. يتبع هذا الفيرويد مجموعة فيرويدات الحمضيات الثانية CVd - II b ويتكون من ٢٩٩ نيوكليتيدة ويستعمل له نباتات الأقحوان، الخيار والأترج نباتات كاشفة. وقد تكلمنا عنه بالتفصيل فى موضوع فيرويدات الحمضيات.

تأثير درجات الحرارة على فيرويد ككسيا:

لقد تبين من أبحاث كثيرة أن الحرارة تؤثر تأثيراً كبيراً على حدوث الإصابة الفيرويدية، بالإضافة إلى الظروف المثلى لنمو الخلايا التى تحتوى الفيرويد فى المزرعة. إن تركيب الفيرويد ليس مقاوم للتثبيط بالحرارة فقط ولكنه أيضاً بشكل عام يتحمل درجات الحرارة المرتفعة الملائمة لتناسخ الفيرويد. هذه الصفات أصبحت تقريباً عوامل تشخيصية لإصابة النباتات بالفيرويد.

إن ملاحظة تأثير الحرارة على تجمع الفيرويد قد أجريت لمعظم الأجزاء فى أنواع النبات والتى تظهر استجابة مرضية للإصابة الفيرويدية. نظراً لأن الأترج يبقى بدون إظهار أعراض خلال الإصابة بفيرويد ككسيا بالمقارنة مع تجمع CEVd، الفيرويد الذى يحدث أعراض تقزم شديدة كإستجابة فى الأترج. عند تنمية نباتات الأترج المحقونة بفيرويد ككسيا والاكسوكورتز فى درجات حرارة من ٢٢ ـ ٣٨°م ثم تنقل إلى حرارة ١٧ ـ ٢٩°م (أقل درجة حرارة وأعلى درجة حرارة تنمو عليها الأشجار)، كان نمو الأترج غير المحقون معوقاً بنسبة ٥٠٪ تقريباً باستعمال نظام درجات الحرارة المنخفضة. كما وأن تحضيرات الحمض النووى من النباتات النامية تحت درجات حرارة منخفضة تظهر DNA Polydispersity فى الجيل أقل من تلك المأخوذة من النباتات النامية تحت درجات حرارة مرتفعة. كان هناك تركيزات أعلى من CEVd فى النباتات النامية تحت درجات حرارة عالية أكثر منه تحت درجات

الحرارة المنخفضة. هذا التفاعل يكون واضحاً بشكل خاص فى الجيل المصبوغ بالايثيديوم بروماید. إن تركيزات فيروید ككسيا تحت كلا الظرفين تبدو أساسياً متكافئة أو أكثر قليلاً فى النباتات النامية تحت الظروف الباردة. هذه الاستجابة غير شائعة فى كثير من الفيرويدات.

المقاومة:

يمكن إتباع طرق المقاومة المذكورة مع مرض اكسوكورتز الحمضيات فى الصفحات السابقة.

obeikandl.com

٣ ـ فيرويدات نخيل جوز الهند

أ ـ مرض كادانج ـ كادانج فى نخيل جوز الهند

Cadang - Cadang Disease of Coconut Palm

مقدمة:

كانت أول ملاحظة للمرض سنة ١٩٢٧ منذ الوقت الذى دمر فيه مرض كادانج ـ كادانج زراعات جوز الهند فى جزيرة San Migual وفى Albay. إعتبر المرض أكثر الأخطار تهديداً لجميع مصانع جوز الهند فى الفلبين. بدأ إنتشار المرض بشكل وبائى سنة ١٩٣٠، ومن بين ٢٥٠ ألف شجرة نخيل جوز الهند، بقيت عدة مئات فقط والباقى كله دمر تحت وطأة المرض. ظهرت أوبئة مشابهة فى مناطق أخرى من Bicol وبحلول عام ١٩٥٦ فإن نصف الأشجار المثمرة فى المنطقة كانت مصابة، وبالإجمال يمكن القول بأن مرض كادانج كادانج قد قتل حوالى ٣٠ مليون نخلة جوز الهند خلال الأربعين سنة الأخيرة فى الفلبين.

كلما ازداد تهديد المرض للمزارعين كلما إرتبطت به أبحاث الباحثين والعلماء للبحث عن مسببه وعن طريقة لحفظ الأشجار السليمة. لغاية سنة ١٩٨٠ نشر عن هذا الموضوع ٢٣٤ بحثاً وذلك بواسطة ١٢٣ باحث. وقد ثبت بأن المرض غامض وصعب الاكتشاف كما أنه مدمر. وبالرغم من الآراء العديدة والنظريات التى ظهرت عن هذا المرض، إلا أنه لم يظهر أى بحث مقنع يؤدى إلى توضيح سليم عن هذا المرض وذلك حتى منتصف السبعينات. وفى آواخر السبعينات ثبت بأن

مرض كاداتج ـ كاداتج هو مرض فيرويدى وتحدد مسببه وهذا أدى إلى حل مشكلة كبيرة نشأت مع نشوء المرض.

هناك مشاكل عديدة قابلت الباحثين فى هذا المرض حيث استمرت الأبحاث من سنة ١٩٣٠ إلى سنة ١٩٧٦ وقد ذكر كثير من الباحثين أن هذا المرض غامض ومحير. بعد اكتشاف المسبب تبين أن المشاكل التى كانت تقابل الباحثين فى هذا المرض هى: ـ

١ ـ طول الفترة اللازمة للحصول على بادرات من أشجار جوز الهند.

٢ ـ البادرات التى أقل من خمسة سنوات لا يظهر عليها أعراض المرض أبداً.

٣ ـ يصعب اكتشاف الإصابة فى الأطوار الأولى.

٤ ـ تستمر أعراض المرض على الشجرة مدة من ١٠ ـ ١٥ سنة.

٥ ـ يبدأ إثمار الأشجار وهى ذات عمر من ٥ ـ ١٠ سنوات.

٦ ـ تستمر الشجرة تعطى إثمار لغاية ٦٠ سنة على الأقل.

أعراض مرض كادانج ـ كادانج:

يستطيع الشخص المدرب ذو الخبرة أن يعرف بأن الشجرة أصبحت مصابة بهذا المرض عندما تبدأ فى حمل جوزات أصغر وأكثر استدارة (كروية) عن الوضع الطبيعى وذات خدوش أو تشققات شكل ٥٤. أما من النواحى الأخرى فإن الشجرة تظهر سليمة تماماً، وفى الحقيقة فإن عدد الجوزات المنتجة يمكن أن يكون أكثر قليلاً من الوضع العادى، ثم بعد ذلك فإن علامات المرض الأخرى لا تلبث أن تتداعى للظهور. يتكشف على الأوراق بقع صفراء والتى تظهر مائية فى إنعكاس الضوء شكل ٥٥. وهى لا تشبه البقع المتكونة عن الحشرات الماصة ولا البقع الناتجة عن بعض الفطريات، وليس لها مركز بنى، تصبح البقع أكثر عدداً كلما

تقدم المرض معطية ثلثى الجزء السفلى من قمة الشجرة المظهر المصفر بعد مدة من الزمن.

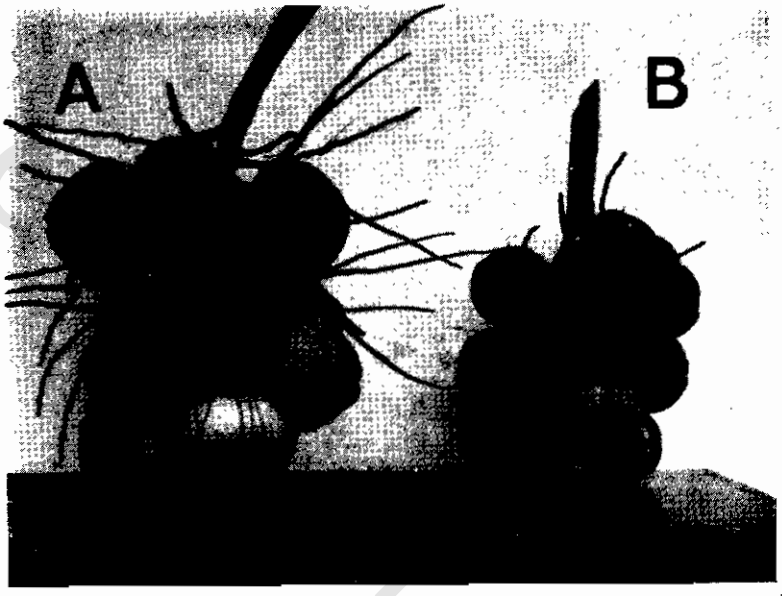
إنتاج الجوزات ينخفض ويتوقف بعد ٢ ـ ٣ سنوات من ظهور أول الأعراض. عناقيد الزهرة (العثاكيل أو الشماريخ) تصبح أصغر وذات قمم سوداء وغالباً ما تفشل فى الخروج كاملة من الغطاء المغلف لها شكل ٥٦. تبقى الألياف عادة متلاصقة مع قواعد السعف، مع أنه فى الأشجار السليمة يكون هذا الليف منفصلاً وبعيداً عن قواعد السعف. كلما تقدم المرض أكثر يصبح السعف أقصر شكل ٥٧. السعف الأكبر سناً فإنه يتدلى قبل أن يكتمل النمو والنضج ويسقط وتصبح قمة الشجرة صغيرة مقتصرة على باقة من السعف الأصفر القصير. لا تلبث أن تموت الأشجار بعد أن تصل هذا الطور. فى كثير من الحالات تتقزم الأشجار بشكل واضح وتظهر الشجرة فى حالة سيئة جداً من حيث قصر الأوراق وتدليها واصفرارها وعدم الإثمار وتموت الشجرة.

أما أعراض المرض الأكثر إنتشاراً فى منطقة جنوب غرب الباسفيك والتى تظهر علـى أشجار نخيـل الزيت ونخيـل جوز الهنـد، تكون الأعـراض على شكل بقع برتقالية على الأوراق والذى يسمـى فى الفلبين التبقع البرتقـالى الوراثى Genetic orange spotting (GOS).

الوقت الذى ينقضى بين ظهور أولى الأعراض وموت الشجرة يتراوح من ٣ ـ ١٥ سنة وبالمتوسط حوالى عشرة سنوات. يعتبر مرض كادانج ـ كادانج من أسهل الأمراض تشخيصاً وذلك بواسطة أعراضه الواضحة وبواسطة بطء تدهور الشجرة، وبالنسبة للمتخصصين بهذا المرض فإن أعراض المراحل المتقدمة للمرض لا تلتبس أبداً مع الأمراض الأخرى أو الاضطرابات الفسيولوجية المختلفة مثل زيادة الرى أو نقص التغذية.

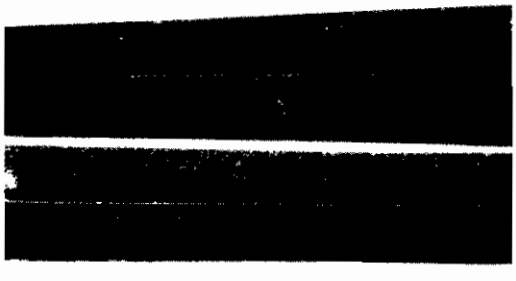
هناك صفة مميزة لهذا المرض وهى أن الأعراض تعتمد على عمر الشجرة.

النخلات (الأشجار) التى عمرها أقل من عشرة سنوات فإنها نادراً ما تصاب وتزداد نسبة الإصابة بالمرض كلما تقدم عمر النخلة حتى يصبح عمرها أربعين عاماً وعندها نسبة احتمال الإصابة تبقى ثابتة بعد هذا السن.



شكل رقم ٥٤ :

عناقيد من جوزات جوز الهند. A : سليمة. B : مصابة. يلاحظ الإستدارة وصغر الحجم والخدوش فى الثمار المصابة.



شكل رقم ٥٥ :

أعراض البقع المائية فى الأوراق المصابة من نخيل جوز الهند بمرض كاداخ ـ كاداخ.

شكل رقم ٥٦ :

أعراض مرض كاداغ ـ كاداغ فى النورة فى أشجار نخيل جوز الهند. اليسار سليمة أما الوسط واليمين مصابة يلاحظ اسوداد القمة وعدم خروج عثاكيل الأزهار.

obeikan.com

شكل رقم ٥٧ :

أعراض الإصابة بمرض كاداغ ـ كاداغ فى نخيل جوز الهند يلاحظ اصفرار وتقزم وصغر قمة الشجرة المصابة مقارنة مع الشجرة السليمة على اليسار.

أصل وإنتشار مرض كادانج ـ كادانج:

من أين أتى مرض كادانج ـ كادانج؟؟. هناك فرضيات تقول بأن المرض نشأ فى جزيرة San Miguel فى بداية الثلاثينات من هذا القرن ثم إنتشر إلى مناطق أخرى وبسرعة وتقدم فى خلال العشرين سنة الأخيرة. وعلى كل حال فإن التقارير القديمة والدراسات الحديثة على إنتشار هذا المرض تعارض وتنكر هذه النظرية. إن أول نشرة عن مرض كادانج ـ كادانج يقول فيها كاتبها إنه فى سنة ١٩٣١ زار منطقة الفلبين ولاحظ أن هذا المرض أكثر أهمية على أشجار جوز الهند فى جزيرة San Miguel وكان المواطنون يسموه مرض كادانج ـ كادانج. هناك بعض الباحثين الذين ذكروا أن اسم هذا المرض كان مؤلوفاً فى أواخر الأربعينات وأوائل الخمسينات بالنسبة للمواطنين. هذه الآراء تبين أن المزارعين حاولوا مقاومة هذا المرض إلا أنهم لم يفلحوا فى ذلك.

هناك أدلة أخرى ضد نظرية أصل نشـوء المـرض من جزيرة San Miguel وذكر أن المرض كان موجـوداً فى جميع مقاطعات Bicol وأنه لم ينتشر من جزيرة San Miguel.

الخسائر الاقتصادية:

إن أكبر خسائر إقتصادية حدثت فى أشجار جوز الهند نتيجة للإصابة بمرض كادانج ـ كادانج كان فى الخمسينات حيث ذكرت الاحصائيات سنة ١٩٦٠ أن مليون شجرة ماتت خلال سنة واحدة فى الفلبين أما الإحصاءات الحديثة سنة ١٩٨٢ تبين أن هناك حوالى ٥٠٠ ألف شجرة تفقد سنوياً من جميع مقاطعات الفلبين.

مسبب المرض:

منذ ملاحظة المرض سنة ١٩٢٧ بدأت الأبحاث لمعرفة مسبب المرض واستمرت حتى سنة ١٩٧٣ وعندها ذكر أن هذا المرض يتسبب عن فيرس وذلك اعتماداً

على طبيعة الأعراض ومقدرة المرض على أن ينتشر بشكل وبائى واستمرار المرض وتقدمه حتى بعد التسميد الجيد وعدم وجود بكتيريا أو فطر ممرض مرافق لهذا المرض. مع أن معظم الباحثين وافقوا على أن المرض يتسبب عن فيرس، إلا أنه لم يكن هناك دليل مقنع بأن هذا المرض معدى بالنسبةلأى من النباتات الأخرى. فشلت المحاولات التى أجريت لنقل مسبب المرض إلى أشجار أخرى سواء بالعصارة أو بالحشرات أو بأى طريقة أخرى.

مع كل هذه الحلقات من الفشل فى الأبحاث إلا أنها لم تؤخذ كدليل على أن المرض لا يتسبب عن فيرس، حيث أن هناك بعض الفيروسات النباتية يصعب اكتشافها بالمكيروسكوب الالكترونى وكثير من الفيروسات النباتية يصعب نقلها عن طريق العصارة النباتية. كذلك استعملت أنواعاً عديدة من الحشرات لنقل المسبب من الأشجار المصابة إلى الأشجار السليمة واستعملت ملايين الحشرات وآلاف البادرات لينقل إليها المرض ولكن لم يثبت نهائياً أن مسبب المرض ينتقل بالحشرات.

بعض الباحثين مثل Petzold سنة ١٩٧٤ ذكر أن هناك كائنات شبيهة بالركتسيا فى برانشيما اللحاء فى الأشجار المريضة ولكن ثبت خطأ هذا البحث ثم إتجه البحث عن النيماتود وعن نقص العناصر فى التربة ولكنها كلها فشلت فى تحديد مسبب المرض.

فى سنة ١٩٧٣ إتجه البحث عن الفيرويد كمسبب لمرض كادانج ـ كادانج وبعد محاولات عديدة وإتباع طريقة PAGE تبين أن المرض يتسبب عن فيرويد. كان أول تقرير عن وجود الفيرويد كمسبب لهذا المرض سنة ١٩٧٥ وذلك من قبل العالم Randles.

أخيراً ثبت أن مرض كادانج ـ كادانج يتسبب عن فيرويد سمى Coconut Cadanig - cadanig Viroid ـ ويكتب باختصار (CCCVd) أو ccRNAs.

جزيئات ccRNAs صغيرة جداً وذات صفات قريبة من صفات فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس. يتكون هذا الفيرويد من جزيئات RNA تكون دوائر مغلقة من RNA ذو خيط واحد وفيها مقاطع عديدة من القواعد المتكاملة والتى تشكل روابط هيدروجينية عبر الجزئ جاعلة الدوائر تنطوى وتعطى شكل ثنائى الخيط إلى حد ما. مثل هذا التركيب لا يوجد إلا فى الفيرويدات والفيروسايدات وغير معروف لأى جزيئات أخرى من RNA وهى تعطى الفيرويد صفات تكون متوسطة بين صفات RNA آحادى الخيط وثنائى الخيط. إن تسخين ccRNA تحت ظروف معينة Formamide يحطـم الروابـط الهيدروجينية عندئذ تفتـح الدوائر ويمكـن أن يلاحظ تحت الميكروسكوب الالكترونـى. هذه المعاملـة أظهرت أنه ليـس جميع جزيئات ccRNA دائرية ولكـن بعضها مستقيم وله طبيعة تركيب دبوس الشعر.

أشكال فيرويد CCCVd :

بالأبحاث المستمرة على فيرويد كاداغ ـ كاداغ فى أشجار جوز الهند تبين أن لهذا الفيرويد أربعة أشكال وهى: ـ

١ ـ CCCVd - 1 وهذا له نوعين سريع fast (f) وبطئ slow (s) ويكتب CCCVd - 1 - f أو CCCVd - 1 - s.

٢ ـ CCCVd - 2 وهذا له أيضاً نوعين سريع fast (f)وبطئ slow (s) ويكتب CCCVd - 2 - f أو CCCVd - 2 - s.

وفيما يلى شرح لاكتشاف وصفات هذه الأنواع.

بعد أن تم اكتشاف مسبب مرض كاداغ ـ كاداغ وتأكد أنه يتسبب عن فيرويد أو حمض نووى ccRNA تسابقت الأبحاث فى دراسة هذا المرض.

باستعمال طريقة التهجين الجزيئى والتى حساسيتها ١٠٠ ضعف حساسية طريقة الهجرة الكهربائية استعملت هذه الطريقة لدراسة ccRNA وتبين أن ccRNA

يتكون من ccRNA - 1 و ccRNA - 2 وإنهما متقاربين جداً من بعضهما البعض وهناك تشابه كبير جداً بينهما فى تتابع القواعد. وفى الدراسات التالية أمكن معرفة التتابع الكامل لقواعد ccRNA - 1 و ccRNA - 2 وأصبح من الواضح أن ccRNA - 2 يمثل ببساطة ارتباط جزئين من ccRNA - 1 فهى تمتلك (٥٠٠ نيوكليتيدة للثانى و ٢٥٠ نيوكليتيدة للأول، إلا أنه ثبت خطأ هذا التقدير) وكذلك تبين أن هناك علاقة قريبة جداً بين ccRNA وفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس حيث أن التركيب الثانوى لكل منهما متشابه جداً. وفى بعض المقاطع فإن تتابع القواعد فى كليهما يكون متماثل وذلك فى منطقة وسط الجزئ.

أظهرت الدراسات الأخرى أن كلاً من ccRNA - 1 و ccRNA - 2 يمكن أن توجد بشكلين مختلفين سمى الأول سريع fast والثانى بطئ slow وذلك بسبب إختلاف سرعتهما فى الهجرة الكهربائية فى الجيل. إن الأشجار المصابة بالمرض فى المراحل المبكرة جداً دائماً تحتوى الأشكال السريعة من ccRNA - 1 وccRNA - 2، بينما الأشجار المريضة فى الأطوار المتأخرة من المرض دائماً تحتوى الأشكال البطيئة. أما الأشجار ذات الأعراض المتوسطة، دائماً تحتوى الشكلين مع بعض، ولكن فى بعض الحالات النادرة يمكن أن تتواجد الأربعة أشكال مميزة فى سعفة واحدة (ورقة النخيل تسمى سعفه). لقد ثبت أن السعفات الحديثة والتى لا تظهر أية علامات للمرض بأنها تحتوى الأشكال السريعة من ccRNA - 1 و ccRNA - 2، بينما لم يكتشف أى من الأشكال السريعة فى السعفات المتقدمة بالسن. كلما تقدمت السعفه فى السن كلما تحولت الأشكال السريعة إلى أشكال بطيئة من الفيرويد (جدول ٣١).

إن التمييز بين الأشكال السريعة والبطيئة من ccRNA مهم جداً وذلك لمعرفة إنتقال المرض.

جدول ٣١: وجود الشكل السريع والبطئ من ccRNA فى سعفات نخيل جوز الهند المصاب بالمرض.

رقم السعفة على الشجرة من القمة	شكل الفيروويد قبل ظهور الأعراض	شكل الفيروويد عند بداية الأعراض	شكل الفيروويد فى الطور الأول من المرض	شكل الفيروويد فى الطور المتوسط	شكل الفيروويد فى الطور المتأخر من المرض
من ١ ـ ١٢	سريع	سريع	سريع + بطئ	بطئ	بطئ
من ١٣ ـ ١٦	سريع	سريع	سريع	بطئ	بطئ
من ١٧ ـ ٢٢	-	سريع	سريع	سريع + بطئ	بطئ

إنتقال مرض كادانج ـ كادانج والمدى العائلى للفيرويد:

يمكن أن ينتقل المرض عن طريق حقن بادرات جوز الهند بالحقنة الضاغطة لمستخلص RNA منقى من أوراق أشجار مصابة بالمرض. يكون النقل بهذه الطريقة بنسبة منخفضة حوالى ١٧ ٪ فقط. أجرى تحسين على هذه الطريقة حيث تحقن مستخلصات RNA المأخوذة من أوراق ذات إصابة حديثة وحيث أن هذه المستخلصات تحتوى الأشكال السريعة من ccRNA، وهذه الأشكال أكثر عدوى ونشاط فى إصابة الأشجار من الأشكال البطيئة. عندما استعمل ٢ ملغ مستلخص غير مفصل من Unfractionated RNA يحتوى شكل سريع كانت نسبة النجاح فى الحقن ١٠٠ ٪ أما عندما كان يحوى الشكل البطئ كانت نسبة الإصابة ٣٠ ٪ أما عندما كان يستعمل ١,٧ ملغ فيه شكل سريع كانت نسبة النجاح ٣٠ ٪. أما استعمال ١,٣ ملغ يحتوى شكل بطئ كانت نسبة الإصابة صفر ٪.

تحقن البادرات بحقنة ضاغطة وذلك لإدخال محلول RNA فى نسيج قمة البادرة حيث بدايات تكشف السعفات. يصعب إجراء الحقن إذا تعدت البادرة سن خمسة سنوات حيث أن قواعد السعفات تغطى على الأنسجة الطرية التى يتم فيها الحقن. بعد عملية الحقن تظهر الأعراض النموذجية بعد ١ ـ ٢ سنة من الحقن

وخلال مدة سنتين من الحقن يبدأ ظهور أعراض التقزم. عادة ما يتوقف إنتاج الجوزات كلية (لأن الشجرة حقنت قبل الإثمار) ولكن فى بعض الأصناف التى تعطى ثمار مبكراً فإن هذه الثمار يظهر عليها أعراض المرض النموذجية. بعد تقدم المرض وظهور المراحل الأخيرة يظهر سعفات قصيرة نموذجية الأعراض وتبقى الألياف ملتصقة مع قواعد السعفات. يكون تقدم المرض بطئ جداً فى الحقن الصناعى أكثر منه فى الحالة الطبيعية.

إن إنتقال المرض فى الطبيعة عن طريق الحشرات الناقلة يبدو أنه أكثر عوامل النقل احتمالاً، مع أن جميع المحاولات التى بذلت لنقل الفيرويد عن طريق الحشرات القارضة أو الماصة فشلت فى ذلك. ولقد وجد أن تجمع حشرة **Plesispa reichei** يكون بالقرب من الأشجار المريضة ١٦ ضعف وجودها بالقرب من الأشجار السليمة، وكذلك فإن حشرة **Octodonta angulosa** توجد بالقرب من الأشجار المريضة ٨٢ ضعف وجودها بالقرب من الأشجار السليمة، مع ذلك فإنه لغاية سنة ١٩٩٤ لم تحدد أية حشرة تنقل الفيرويد أو إذا كانت الحشرات ذات دور فى نقل الفيرويد.

المدى العائلى:

يمكن أن يهاجم الفيرويد عدة أنواع من وحيدات الفلقة منها:ـ

1 - **Areca catechu**

2 - **Corypha elata**

3 - **Adonidia merrillii**

4 - **Elaeis guineensis**

5 - **Chrysalidocarpus lutescens**

6 - **Oreodoxa regia**

صفات فيرويدات كادانج ـ كادانج:

إن الشكلين من CCCVd التى ترافق مرض كادانج ـ كادانج تتواجد على شكل سريع fast يرمز له f وبطئ slow ويرمز له s. إن اكتشاف هذين النوعين لا يتأثر

بتخزين الورقة أو بطريقة إستخلاص الحمض النووى. إن الفحص الجهازى للأشجار المصابة أظهر أن حدوث هذه الأشكال يتأثر بطور تكشف المرض فى الأشجار. إن الأشكال السريعة من كل ccRNA - 1 و ccRNA - 2 تكون سائدة فى الأطوار الأولى من المرض، بينما الشكل البطئ هو الوحيد الموجود فى الأطوار المتأخرة من المرض. فى بعض الأشجار يحدث تحول من الشكل السريع إلى الشكل البطئ فى السعفات التى حدث فيها تقدم كبير للمرض. إن كل من ccRNA - 1 السريع والبطئ كلاهما دائرى وتختلف فى الوزن الجزيئى وفيهما تشابه كبيـر فى تتابع النيوكليتيـدات. إن اللقاح الذى يحوى الشكل السريع أكثر حيويـة من الذى يحوى الشكل البطئ. يقدر الوزن الجزيئى بواسطة الميكروسكـوب الالكترونى بحوالى ١٠٠ ٠٠٠ دالتون للسريع و ١٥٠ ٠٠٠ دالتون للبطئ. كمـا وأن ccRNA - 1 يوجد بكمية أكبر من ccRNA - 2.

إن مرض كادانج ـ كادانج يختلف عن بقية الأمراض الفيرويدية فى نقطتين أساسيتين، الأولى: وجود نوعين من RNA مرافقة للمرض، الثانية التنوع المختلف فى هذين النوعين ويسمى electrophoretic variation. إن الاختلاف الكبير فى الحركة الكهربائية فى الجيل والوزن الجزيئى فى كل من ccRNA - 1 السريع والبطئ يعود لطول الوقت الذى خضعت فيه الشجرة للإصابة.

عند تخزين الورقة على ٤ْم على فترات لمدة ٩ أيام أو التجميد على فترات لمدة ٤ أيام قبل الاستخلاص بالطرق القياسية ليس له تأثير على الشكل فىccRNA - 1. إن الهجرة الكهربائية سواء فى s أو f على درجة الحرارة العادية أو ٦٠ْم فإن كل منهما يسير فى الحزمة الخاصة به وهذه تميز الأشكال الدائرية من ccRNA - 1.

إن الشكل ccRNA - 1 نوع f له محيط ١٠٧ نانوميتر أما نوع (s) فإن له محيط ١٢٣ نانوميتر وبالتالى فإن إختلاف التنوع فى الهجرة الكهربائية لا يعود للتركيب الثانوى أو لوجودهما على شكل دائرى أو مستقيم ولكن يرجع إلى إختلاف الوزن الجزيئى. فى جدول ٣٢ عزلات من ccRNA - 1 و ccRNA - 2 وبعض صفاتهما.

جدول ٣٢ : صفات بعض عزلات ccRNAs.

عدد النيوكليتيدات + طول التتابع المتضاعف في كل عزلة إن وجد								
نوع الفيرويد والعزلة	San Nasciso	Ligao 5	Ligao I T	Ligao 191D	Ligao 620 C	Ligao 14B	Tinambac	Baao 54
ccRNA - 1 - fast	–	–	٢٤٧ / ٢٤٦	٢٤٧ / ٢٤٦	٢٤٧ / ٢٤٦	٢٤٧ / ٢٤٦	٢٤٦	٢٤٦
ccRNA - 1 - slow	(٥٠) ٢٩٧	(٥٠) ٢٩٦	(٥٥) ٣٠١	(٥٠) ٢٩٦	(٥٠) ٢٩٦	(٥٠) ٢٩٦	–	(٤١) ٢٨٧
ccRNA - 2 - fast	–	–	٤٩٤ _ ٤٩٢	–	–	–	–	٤٩٢
ccRNA - 2 - slow	–	–	–	–	–	–	–	٥٧٤ (٤١)

ملاحظات: ـ

الرقم بين قوسين هو عدد النيوكليتيدات الإضافية على الطول الأصلي (التتابع المتضاعف).

الرقمين الذين بينهما (/) بمعنى أنهما خليط من عزلتين كل منهما لها عدد نيوكليتيدات الأول أو الثاني.

(–) تعني لا توجد عزلة تابعة لهذا الفيرويد.

إن عزلة Baao 54 هي الممثلة لفيرويد كاداغ ـ كاداغ في الأربعة أشكال ولكن هي المقصودة عندما يذكر فيرويد CCCVd وأحياناً يذكر اسم الفيرويد مختصر ويضاف أمامه رقم ٢٤٦.

إن الأشكال السريعة والبطيئة من ccRNA - 1 (٢٤٦ و ٢٨٧ نيوكليتيدة) والشكل السريع ccRNA - 2 (٢٩٢ نيوكليتيدة) كلها معدية. لم يكن هناك فرق معنوى بين حيوية الأشكال السريعة من ccRNA - 1 و ccRNA - 2 وبين الأشكال المستقيمة والدائرية من ccRNA - 1. إن الشكل السريع من ccRNA - 1 هو بشكل معنوى أكثر الأشكال مقدرة على إحداث العدوى. إن القطعة الزائدة المكررة ٤١ نيوكليتيدة خفضت حيوية وكفاءة الإصابة في ccRNA من ٦٨ ٪ إلى أقل من ٥ ٪. وبالتالي يمكن القول بأن جانب اليد اليمنى من الجزئ الأصلي للفيرويد تلعب دوراً معنوياً في الحيوية. يوجد الشكل البطئ في الأشجار المصابة فقط في وقت ظهور الأعراض على الورقة. أما في المراحل المبكرة من المرض فإن الشكل السريع فقط هو الذى يكون موجود، وبالتالي فإن هذا الشكل هو المسئول في الطبيعة عن إنتشار المرض، وبالتالي فإن الأشكال البطيئة يكون لها دور أولى في تكشف الأعراض، بينما الشكل السريع ccRNA - 1 - f يكون له الدور الأساسى

فى الحيوية وإنتشار المرض. إذن يمكن القول بأن الشكل السريع ccRNA - 1 - f هو الوحدة الأساسية المعدية لفيرويد كاداغ ـ كاداغ ويعتبر هو الممثل الوحيد لفيرويد كاداغ ـ كاداغ فى نخيل جوز الهند.

إن العزلة Baao 54 هى الممثلة للفيرويد ccRNA - 1 - fast وكذلك لـccRNA - 1 - s وإن الشكلين لـ ccRNA - 1 فيهما كثير من القواعد المزدوجة داخل الجزئ وتستطيع أن تشكل شكل شبه عصوى مثل بقية الفيرويدات.

إن ccRNA - 1 - fast فيه ٢٤٦ نيوكليتيدة أما الشكل البطئ فيه ٢٨٧ نيوكليتيدة. إن الشكل البطئ ccRNA - 1 - s يحتوى جميع التتابع وتركيب أصغر الأشكال ccRNA - 1 - fast ولكن يختلف عنه بإضافة تتابع مزدوج وتركيب ٤١ نيوكليتيدة من رقم ١٠٣ إلى ١٤٣ وهذه القطعة مضافة على نهاية اليد اليمنى من الجزئ الطبيعى للفيرويد أما التتابع المزدوج فهو على موقع ١٢٣ و ١٢٤ من ccRNA - 1 - f.

أما تتابع النيوكليتيدات فى ccRNA - 2 - fast فهو يحتوى ٤٩٢ نيوكليتيدة أما الشكل البطئ يحتوى ٥٧٤ نيوكليتيدة وهما perfect dimers لأشكال ccRNA - 1 السريع والبطئ. إن كلاً من ccRNA - 1 - f و ccRNA - 1 - s تحتوى على مواقع للانشطار بواسطة أنزيم Ribonuclease T_1 على اليد اليمنى مشكلة عروة دبوس الشعر بين المواقع ١٢٤ و ١٢٥ فى ccRNA - 1 - f وبين الموقع ١٤٥ ـ ١٤٦ فى ccRNA - 1 - s. كما وأن ccRNA - 2 به مواقع للانشطار، عند حدوث هذا الانشطار يعطى جزئين من ccRNA - 1.

تنوعات ccRNA البطئ ووقت حدوث الإصابة:

فى المراحل الأولى من مرض كاداغ ـ كاداغ فإن الأشكال السريعة فقط من ccRNA - 1 و ccRNA - 2 تكون موجودة فى الأشجار المصابة وبعد حوالى ٢٤ ـ ٣٠ شهراً من ظهور الإصابة، فإن الأشكال البطيئة من ccRNA - 1 و ccRNA - 2 تبدأ فى الظهور وتزداد بتقدم المرض حتى تختفى الأشكال السريعة

وتسود الأشكال البطيئة. هذه البيانات مع ما سبق من إثبات أن الأشكال السريعة أكثر عدوى وحيوية من الأشكال البطيئة تتفق مع الانتاج الجديد من فيرويدات كادانج ـ كادانج. ويمكن تلخيص ما سبق فى النقاط الآتية: ـ

١ ـ الشكل البطئ من ccRNA - 1 يختلف عن الشكل السريع بوجود تتابع مفرد مكرر مغروز فى الجزئ ويمكن أن يتولد ببساطة من الشكل السريع بواسطة ميكانزم التجهيز أو النسخ.

٢ ـ عزلات الشكل البطئ من ccRNA - 1 تختلف فى الحجم وفى التتابع المتكرر المغروز وهذا يؤدى إلى القول بانعزال الأصل فى هذه التنوعات البطيئة.

٣ ـ بينما معظم العزلات السريعة تحتوى تتابع مختلف على نهاية ١٩٨ ويتكون من معدلات مختلفة من النوع ٢٤٦ و ٢٤٧ فإن كلاً من العزلات التسعة البطيئة تحتوى تجمع مفرد متجانس إما مع أو بدون نهاية C فى موقع متجانس لنهاية ١٩٨ فى الشكل ccRNA - 1 - f ومع حجم واحد من تتابع متكرر.

إن هذه المعلومات تتفق مع توليد ccRNA ذو الأشكال البطيئة من ccRNA ذو الأشكال السريعة عن طريق تتابع مفرد نادر يحدث مرتين فى فيروبد كادانج ـ كادانج، وبالتالى فإن جميع جزيئات ccRNA البطيئة نشأت من جزيئات آباء مفردة سريعة وتكون تجمعت فى شكل معين.

طرق عزل ودراسة فيرويد كادانج ـ كادانج

نظراً للطبيعة المختلفة لهذا الفيرويد وإختلافه عن بقية الفيرويدات فضلنا أن نذكر الطرقة العملية لدراسته.

مصدر المادة المعدية:

تستعمل أشجار جوز الهند المصابة طبيعياً بفيرويد كادانج ـ كادانج كمصدر للعدوى. تؤخذ سعفه رقم ٦ (ذات عمر ٥ ـ ٦ شهور) أو سعفه رقم ٢٠ (ذات

عمر ١٨ ـ ٢٠ شهر) حيث أنها تحتوى على أكبر تركيز من ccRNA، السعفه رقم ٦ تكون غنية بالفيرويد الشكل السريع والسعفه رقم ٢٠ تكون غنية بالفيرويد الشكل البطئ. يؤخذ حـوالى ١ كغـم من الوريقات من كل سعفة. تنـزع الوريقات عن الحامل ويزال العرق الوسطى منها ثم تفرم الوريقات إلى قطع مساحة كل منها ١ سم^{2} ويستعمل سكين حاد.

استخلاص الأحماض النووية:

تستخلص الأحماض النووية من الأوراق وذلك بأن يؤخذ ٢٥٠ غرام من الأوراق المفرومة ثم تضرب فى خلاط مع ٧٥٠مللتر من محلول غير منتظم من ٠,١ مول سلفايت الصوديوم. يرشح المخلوط وينقى بواسطة آلة الطرد عن المركز سرعة ١٠٠٠٠ لفة لمدة عشرة دقائق. المواد الطافية من ٥ كغم أوراق تجمع ويضاف إليها Polyethylene glcol 6000 وذلك لترسيب الجزيئات الكبيرة Macromolecules. تجمع الكريات الصغيرة بواسطة آلة الطرد عن المركز وتستخلص مرتين بمادة SDS - phenol chlorophorm. ترسب الأحماض النووية من الطور المائى بإضافة ثلاثة أحجام من الايثانول. تجمع الكريات الصغيرة الناتجة بواسطة آلة الطرد عن المركز ويعاد استخلاصها بمادة SDS - phenol chloro-phorm. تجمع الأحماض النووية من الطور الثانى عن طريق الترسيب بالإيثانول. بعد ذلك يعاد تعليق الأحماض النووية فى ٠,١ مول أسيتيت الصوديوم ونصف حجم من ١٪ Cetyl trimethyl ammonium bromide يضاف لإعادة ترسيب الأحماض النووية. تجمع الكريات الصغيرة بالطرد عن المركز وتغسل أربعة مرات فى ٧٥٪ إيثانول محتوى ٠,١ مول أستيت الصوديوم. ثم بعد ذلك يعاد تعليق الكريات الصغيرة فى ٠,١ مول أستيت الصوديوم وتستبعد الأحماض النووية آحادية الخيط بالمعاملة بمادة كلوريد الليثيوم. الباقى من الأحماض النووية (تشمل RNAs الفيرويدى) يعاد ترسيبها عن طريق إضافة ثلاثة أحجام من الإيثانول. الكريات

الأخيرة من الحمض النووى يعاد تعليقها فى ٠,٠١ أستيت صوديوم، ٥٪ سكروز وذلك للهجرة الكهربائية.

فصل الأحماض النووية:

تفصل ccRNAs عن الأحماض النووية فى النبات بواسطة ثلاثة دورات من PAGE وهى الاسم المختصر لـ Poly acry lamide gel electrophoresis باستعمال الجيل المائل. فى الدورة الأولى تهاجر جميع مستخلصات الحمض النووى من الأوراق تحت ظروف غير مدنترة فى سمك ٣ ملم من ٥٠٪ جيل فى منظم Trie - borate (TBE). بعد الصبغ بمادة Toluidine blue و gel slices تحتوى ال RNAs المطلوبة. تقطع كل شريحة وتفرد على سمك ٣ ملم من ٥٪ جيل محتوياً ٨ مول يوريا فى منظم TBE. تهاجر حزمة RNA فى الجيل الأصلى أثناء الهجرة الكهربائية. بعد الهجرة الكهربائية، فإن الأشكال المستقيمة والدائرية تحدد بالصبغ وتفحص شرائح الجيل المحتوية على هذه الأشكال. كل شريحة تفرد على سمك ٣ ملم ٣,٣٪ جيل فى منظم TBE. وبعد الهجرة الكهربائية فإن حزمة RNA تكتشف بالغسيل أو الإزالة من قاعدة الجيل باستعمال جهاز الفصل Bio - Rad preparative apparatus. يجمع ال RNA بالترسيب مع ثلاثة حجوم من الايثانول محتوية ٠,١ مول اسيتات الصوديوم.

حقن بادرات جوز الهند:

يستعمل جوز الهند **Cocous nucifera L.** Tambolilid. تجمع الجوزات التى ستستعمل كتقاوى من ١٠٠ شجرة عشوائياً، هذه الأشجار يجب أن تكون ذات عمر ٢٥ـ ٣٠ سنة مفتوحة التلقيح. نفس الأشجار التى تؤخذ منها الجوزات تستعمل فى جميع التجارب اللاحقة. تحقن البادرات التى حصل عليها من الجوزات بمحقن ذو ضغط عال يسمى Panjet (معروف عالمياً خاصة فى لندن). التجربة الأولى تحقن البادرات ذات عمر ٣ شهور ثم تحفظ فى الظلام (شكل ٥٨) لمدة ٢٤ ساعة قبل الحقن بأربعة حقنات أخرى كل منها

١٠٠ ميكولتر فى قاعدة الانطلاقة الورقية الأولى ثم بعد ذلك تحفظ البادرات تحت الظل لمدة ٢ ـ ٣ أسابيع قبل نقلها إلى الحقل وتزرع على مسافات ٢م.

أما فى الطريقة الثانية (التجربة الثانية) فإن الجوزات التى تستعمل تقاوى تزال قشرتها جزئياً وحال بدء ظهور الريشة من القشرة وكذلك الجذور تحقن البادرات بالمحقن ويدخل ٢٥ ميكولتر لكل نمو. يستعمل أربعة جرعات تحقن فى قاعدة الريشة وأربعة جرعات للجذور. تحفظ البادرات المحقونة فى رمل رطب وفى الظل لمدة ٣ ـ ٤ أسابيع ثم تنقل وتزرع فى التربة فى أوعية بولى أثيلين وتحفظ فى الصوبا لمدة ٢ ـ ٣ شهور ثم تنقل إلى الأرض الدائمة.

إختبار البادرات المحقونة:

تجرى إختبارات التحليل للبادرات المحقونة لمعرفة وجود ccRNA المطلوب معرفته بعد ١ ـ ٢ سنة من الحقن وذلك بأخذ ١٠ غرام عينات من سعفات ذات عمر ٣ شهور ويجرى عليها عملية استخلاص الأحماض النووية وتقارن مع الإصابة الطبيعية. جدول ٣٣، ٣٤، ٣٥.

جدول ٣٣: يبين الانتاج المتوسط لفيرويد كادانج ـ كادانج النقى فى جوز الهند المتحصل عليه من الإصابة الطبيعية فى النبات.

نوع ccRNA	شكل RNA	إنتاج ccRNA ميكوغرام / كيلو غرام أوراق	
		متوسط	مدى
ccRNA - 1 - fast			
246 - 247 residues	دائرى	٦٨	٢٣ ـ ١٥٤
246 - 247 residues	مستقيم	٥	—
ccRNA - 1 - slow			
287 residues	دائرى	٧٧	٢٥ ـ ٢٨٠
301 residues	مستقيم	٨	٣ ـ ١٣
ccRNA - 2 - fast			
492 - 494	دائرى	٨	١ ـ ٢٥
ccRNA - 2 - slow			
574	مستقيم	٤	١ ـ ٥

جدول ٣٤ : حيوية الشكل السريع والبطئ لفيرويد كاداتج - كاداتج المنقى من أشجار مختلفة .

تركيز الشكل 1 ميكوغرام / ملتر	النسبة المئوية للبادرات المصابة بالحقن	
	شكل ١ سريع	شكل ١ بطئ
١٠٠	٥٠	صفر
٦٤	١٠	صفر
٢٥	١٠	صفر
١٠	٢٠	صفر
٥	٢٠	صفر
٠,١	١٠	صفر

تحقن عشرة بادرات كل مرة.

شكل رقم ٥٨ :

طريقة حقن بادرات جوز الهند بالحقنة Panjet الشكل العلوى A بادرات ذات عمر ٣ شهور. الشكل السفلى B بادرات حديثة الإنبات.

جدول ٣٥: مقارنة بين طريقتى الحقن (المذكورة فى طريقة العمل) الأولى والثانية فى البادرات ذات عمر ٣ شهور.

شكل ccRNA المستعمل فى الحقن	طريقة الحقن	
	الأولى	الثانية
ccRNA - 1 - f	٢/٥٠	٥/٣٤
ccRNA - 2 - f	١/٤٧	٣/٣٥
ccRNA - 1 - s	صفر/٥٠	٤/٢١
ccRNA - 1 - s + f	٢/٣٨	١٢/٢٣

ملاحظة:

الرقم يدل على عدد النباتات المصابة على عدد النباتات المحقونة.

ب ـ مرض تنانجاجا فى جوز الهند

Coconut Tinangaja Disease

كان أول ذكر لمرض تنانجاجا على أشجار نخيل جوز الهند **Cocos nucifera** سنة ١٩٧١ فى جزيرة Guam من جزر ماريانز فى المحيط الباسيفيكى. إقترح بعض العلماء أن مسبب هذا المرض مشترك مع مسبب مرض كاداغ ـ كاداغ على أشجار نخيل جوز الهند فى الفلبين حيث أن كلا المرضين يؤدى إلى تثبيط نمو وموت العائل قبل تمام النضج، ولكن مرض كاداغ ـ كاداغ قد نال قدراً كبيراً من الدراسة. الصفات المشتركة الأخرى لهذين المرضين تشمل بقع شاحبة على الأوراق، خفض كبير فى قمة الشجرة وانحطاط فى حيويتها، وتتأثر مدة البقاء للأشجار المصابة وتصبح ٢٥ سنة أو أكثر قليلاً (الوضع الطبيعى للأشجار تعيش ٦٠ سنة على الأقل). الاختلاف الوحيد الملاحظ فى الأعراض هو التأثير على إنتاج الجوزات، حيث أن مرض كاداغ ـ كاداغ يرافقه دائماً إنتاج جوزات أصغر أكثر استدارة (كروية) وتكون ذات خدوش أو تشققات أما مرض تنانجاجا إذا تقدم

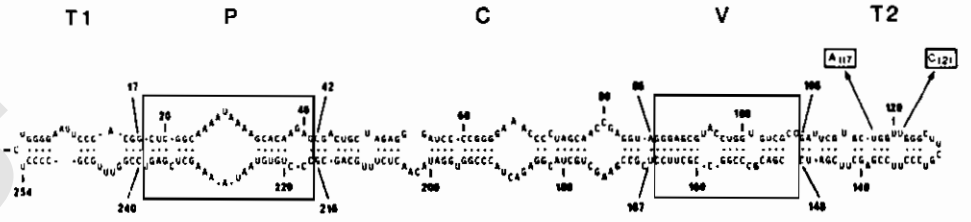
فى الأشجار فإنه يؤدى إلى ظهور جوزات صغيرة ذات قشور متطاولة محنطة بدون وجود نواة فيها.

وبالمثل كما فى مرض كادانج ـ كادانج فإن هذا المرض يتسبب عن فيرويد.

مسبب المرض:

يتسبب المرض عن فيرويد ويسمى فيرويد تنانجاجا Coconut Tinangaja Viroid ويكتب (CTiVd). لقد اكتشف الفيرويد فى تحضيرات الحمض النووى المأخوذة من أشجار نخيل جوز الهند المصابة بمرض تنانجاجا. مكونات RNA للفيرويد تشبه تلك الموجودة فى مرض كادانج ـ كادانج فى جوز الهند والذى يتسبب عن فيرويد CCCVd ولقد ذكر أن للفيرويد الجديد نفس صفة الهجرة فى الجيل تشابه تلك التى لأصغر شكل من أشكال CCCVd ذو أل ٢٤٦ نيوكليتيدة. زيادة على ذلك فإن تحضيرات الحمض النووى من الأشجار المصابة بالمرض تتهجن بكفاءة عالية مع cDNA (^3H) المجهزة للفيرويد CCCVd ذو أل ٢٤٦ نيوكليتيدة أكثر منه للحمض RNA للفيرويد CCCVd نفسه وبذلك إقترح بعض العلماء التسمية المشتركة لمسببى المرضين. إلا أن إختلاف الأعراض فى الجوزات أدى إلى جعل العلماء يتفقوا على أن هذا المرض يتسبب عن فيرويد غير فيرويد CCCVd الذى يصيب أشجار جوز الهند فى الفلبين.

إن أنواع RNA ذات الهجرة المتشابهة فى الجيل مع CCCVd - 246 نقيت من مستخلصات الحمض النووى وجهزت من أشجار جوز هند مصابة بمرض تنانجاجا ودرس التتابع بها بطريقة Direct RNA enzymic. فوجد أن ال RNA المنقى به ٢٥٤ نيوكليتيدة وأن هذا ال RNA مرافق دائماً لمرض تنانجاجا. أما التركيب الثانوى لهذا الحمض فهو مطابق لشكل التركيب الحلزونى والعصوى الشكل لفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس. وجد أن لفيرويد CTiVd سلالتين مختلفتين فى ٢ نيوكليتيدة وقد لوحظت هاتين السلالتين فى العزلات المختلفة من الأشجار. وهناك مقارنة بين هذا الفيرويد وفيرويدات أخرى فى جدول رقم ٣٦. وإن الشكل الوصفى لهذا الفيرويد مذكور فى شكل ٥٩.



شكل رقم ٥٩ :

تتابع النيوكليتيدات المفترض فى التركيب الثانوى لعزلتين من فيرويد CTiVd، الاختلاف الوحيد بينهما هو وجود U محل A فى الموقع ١١٧، ووجود U محل C فى الموقع ١٢١.

إن فيرويد CTiVd متقارب جداً مع فيرويد CCCVd - 246 حيث أن فيهما نسبة تتابع متماثل تقارب ٦٤ ٪. إن التماثل الكبير وليس التماثل الكامل بين CTiVd و CCCVd يمكن أن يفسر إمكانية حدوث cross - hybridization بين كلا ال RNAs وكذلك الاختلاف فى تعبيرات الأعراض بين المرضين.

جدول ٣٦ : تماثل التتابع بين نطاقات فيرويد CTiVd وبعض الفيرويدات المماثلة.

مقارنة CTiVd مع الفيرويدات المذكورة	٪ تماثل تتابع فى نطاقات					
	T_1	P	C	V	T_2	الكلى
CCCVd - 246	٦٨	٥٠	٦٦	٧٥	٥٩	٦٤
PSTVd	٢٨	٣٦	٦٣	٢٨	٣٦	٤٣
HSVd	٦٠	٣٩	٤٧	٣٢	٤١	٤٠
CEVd	٣٨	٣٨	٦٧	٤٠	٣٨	٤٦

بجانب التماثل بين CCCVd و CTiVd فإن هذا الأخير يحتوى عدة مناطق ذات تتابع وتركيب متماثل مع PSTVd ومتطابق مع نموذج النطاقات المفترضة للفيرويدات. وجد أن نطاق T_1 يحتوى تتابع متكرر من CCUC وهذه المجموعة تتكرر إبتداءً من ١ ـ ٢٥١. أما نطاق T_2 فإنه يحوى تكرار CCUUC فى نيوكليتيدات من ١٣١ إلى ١٣٥. أما نطاق P فى فيرويد CTiVd فهو غنى بالبيورين Purine فى الشريط العلوى وهو بذلك مشابهاً للفيرويدات الأخرى شاملاً سيادة تتابع الأدنين والذى هو عال القابلية للإنشطار بواسطة RNase U_2 خلال تفاعلات التتابع. أما الخيط السفلى فيه سيادة تتابع الأدنين كما فى CCCVd. الخيط السفلى فيه نطاق P بالنسبة للفيرويدات الأخرى غنى فى تتابع اليوردين Uridine وهذا يعكس ولو جزئياً مقدرة هذا الفيرويد على مهاجمة عوائل وحيدة الفلقةmonocotyledonous كما فى CCCVd مقابل العوائل ثنائية الفلقة فى الفيرويدات الأخرى.

وبالمقابل ففى الفيرويدات الأخرى، فإن الجزء من جزئ الفيرويد الأكثر حفظاً بين CTiVd و CCCVd متوافق مع أكثر النطاقات تغيراً وهو نطاق V فى بقية الفيرويدات. إحدى الاحتمالات أن نطاق V فى CCCVd يحتوى تتابعات أساسية للمضاعفة الجزئية للتتابع المفترضة لتنشأ من جديد أثناء إصابة أشجار جوز الهند بواسطة CCCVd. إن حدود هذه التضاعفات تحدث فى نطاق V وفى وسط نهاية العروة فى نطاق T_2 من CCCVd. إن الفيرويد CTiVd الذى يهاجم أشجار جوز الهند يمكن أيضاً أن يؤدى إلى إعادة إتحاد مماثلة فى RNA. إن الأشكال الدائرية والمستقيمة لفيرويد CTiVd مشابهة لتلك الموجودة فى CCCVd، إلا أن RNA المستقيم يكون تركيزه منخفضاً ولكن مساوياً فى حجمه لإحدى تنوعات CCCVd مع نهاية أول ٥٠ نيوكليتيدة.

للفيرويد CTiVd عزلتان والفرق الوحيد بين العزلتين المأخوذتين من أشجار مختلفة من جوز الهند هو تغير U مكان A فى الموقع ١١٧ وتغير U إلى C فى نهاية النيوكليتيدة ١٢١، بهذه المواقع يمكن التمييز بين العزلتين.

٤ ـ فيرويدات الأقحوان

Chrysanthemum Viroids

أ ـ مرض تقزم الأقحوان

Chrysanthemum Stunt Disease

مقدمة :

يعتبر مرض تقزم الأقحوان من أوائل الأمراض الفيرويدية المكتشفة وله تاريخ فى تطور الأبحاث الفيرويدية يشبه تاريخ الأبحاث التى أجريت على مرض الدرنة المغزلية فى البطاطس.

كان أول وصف لهذا المرض سنة ١٩٤٧ وذلك من قبل العالم Dimock ووصفه على أنه مرض معدى وذلك اعتماداً على تجارب النقل بالتطعيم. وفى سنة ١٩٤٩ ذكر العالم Olson أن العامل المسبب لهذا المرض ينتقل بواسطة حك الورقة بورقة أخرى مصابة، وهذا أكده علماء آخرون بحثوا فى هذا المرض منذ سنة ١٩٥٠ إلى سنة ١٩٥٣. ولقد وجد أنه من بين ٧٦ نوع نباتى مزروع من العائلة المركبة، كان هناك ٣٩ نوعاً فقط قابل للإصابة بهذا المرض. من هذه الأصناف سبعة (خمسة أصناف **Chrysanthemum** وصنفان **Senecio**) يتكشف عليها أعراض مميزة واضحة جداً. حاول كثير من العلماء استعمال إختبار البقع الموضعية Local lesions فوجدوا أن هذا الإختبار لا ينطبق على الأعراض المرضية لهذه النباتات إلا أنه فى سنة ١٩٦٨ فإن العالم **Lawson et al** اكتشف بقع موضعية نشوية على أوراق النباتات المحقونة من نوع **Senecio cruentus** بعد حقنها بعامل التقزم ولكنه وجد أن هناك إختلاف فى عدد البقع بين الحوامل الزهرية وبين الأوراق فى نفس

النبات السابق قال إن إستعمال هذه البقع فى دراسة المسبب يعوق الكشف عن الكميات الصغيرة فى تركيز عامل التقزم. ونظراً لعدم وجود العائل الملائم للإختبارات الحيوية وتشخيص المرض تأخر الكشف عن، ومعرفة طبيعة مسبب المرض. ذكر بعض الباحثين سنة ١٩٥٢ أن عامل التقزم غير طبيعى فى ثباته للحرارة ولم يفقد حيويته حتى بعد غلى المستخلصات المأخوذة من النباتات المصابة، وذكر أيضاً أن حيوية الفيرويد تعود إليه ثانية فى المستخلصات المعاملة بالكحول.

حاول العالم Hollings ومساعدوه سنة ١٩٦٤ تنقية عامل التقزم عن طريق الترسيب بمادة كبريتات الأمونيوم ثم استعمال آلة الطرد عن المركز المجزئة ثم المعاملة بمذيبات عضوية. كذلك حضرت مستخلصات الفينول لتحديد فيما إذا كان العامل المسبب للمرض يمكن نقله بهذه المستخلصات أم لا. وذكر نفس العالم أنه ولا أى من هذه المستخلصات كان معدياً. مع أن هناك أجزاء صغيرة جداً مشابهةلتلك الموصوفة لفيرس الذبول المتبقع فى الطماطم وجدت فى النباتات المريضة ولكنها لم توجد فى النباتات السليمة، إلا أنه لم يتوفر الدليل بأن هذه الأجزاء معدية. وفى سنة ١٩٦٨ استطاع نفس العالم المذكور إجراء عملية استخلاص من النباتات المريضة باستعمال ٠,١ مول منظم فسفاتى ثم معاملة المستخلص بمادة Chloroform butanol وحصل على عائم شديد العدوى. أما المستخلصات المحضرة فى ٠,٠٢ مول منظم فسفاتى لم تكن معدية. كانت الحيوية والمقدرة على العدوى موجودة فى الحبيبات الداخلية من اللب المتجانس والمعاد استخلاصه فى خلاط والمعامل بمادة Chloroform butanol والمنقى باستعمال السرعة البطيئة لآلة الطرد عن المركز، أما الجزء العائم من المادة التى تم استخلاصها لم تكن معدية.

ذكر العالم Holling أن حيوية عامل التقزم فقدت فى مستخلصات خام مكونة من ٠,٠٠٥ مول منظم فسفاتى معامل بـ RNase (3ug / m1) ولكن إذا كان المنظم ٠,٥ مول ونفس تركيز الأنزيم لا تفقد الحيوية.

استمرت الأبحاث فى هذا المجال حتى سنة ١٩٧١ حيث ذكر Lawson & Hearon أنه لا يوجد فيرس فى النباتات المتقزمة، عندئذ سارت الأبحاث فى هذا

المرض موازية للأبحاث على مرض الدرنة المغزلية فى البطاطس وكذلك مرض اكسوكورتز الحمضيات. بعد أن تم إكتشاف أن مرض الدرنة المغزلية فى البطاطس يتسبب عن فيرويد اتجهت الأبحاث عن فيرويد مسبب لمرض تقزم الأقحوان، وفعلاً ثبت أن هذا المرض يتسبب عن فيرويد وسمى فيرويد تقزم الأقحوان (CSVd) Chrysanthemum Stunt Viroid وذلك من قبل العالم Diener & Lawson سنة ١٩٧٣.

الأعراض:

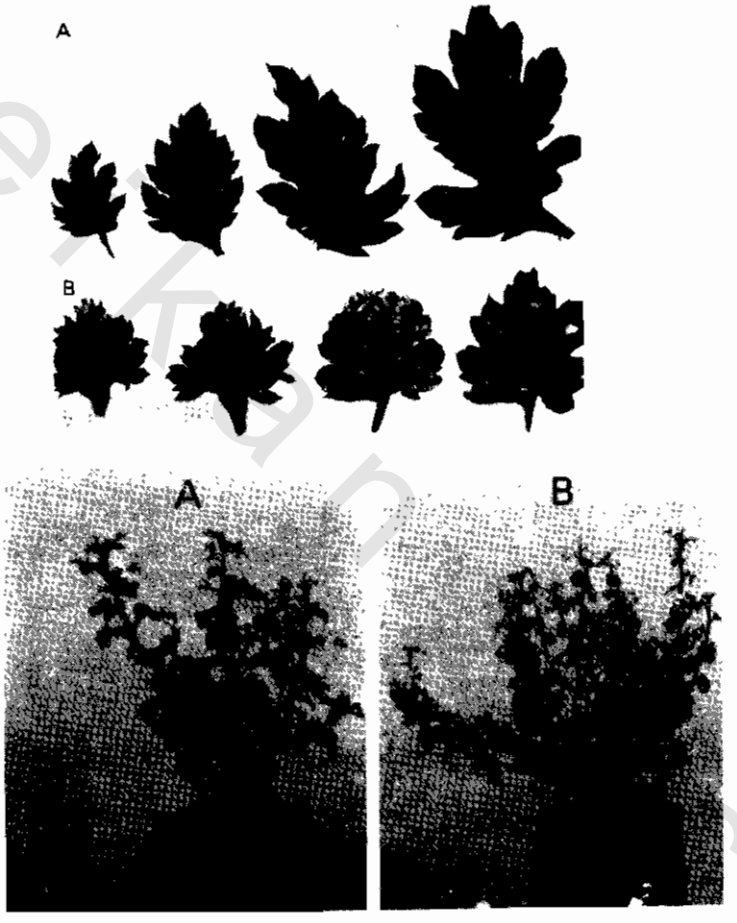
يوجد هذا المرض فى كل من الولايات المتحدة، كندا، Netherland، جنوب أفريقيا، ايطاليا والبرازيل. يسبب المرض خسائر تتراوح من نسبة بسيطة إلى نسبة عالية فى زراعات الأزهار وفى الأقحوان المزروع فى الحدائق وإذا لم تؤخذ الاحتياطات والمراقبة فيمكن أن يصل المرض إلى نسبة وبائية عالية.

تكون نباتات الأقحوان وازهارها أصغر من النباتات السليمة وأكثر شحوباً وذات نوعية أدنى بالمقارنة مع النباتات العادية، بعض الأزهار قد تظهر مائلة للون الأبيض (مبيضة). تتفتح الأزهار المريضة مبكراً عن الأزهار العادية بمدة ٧ ـ ١٠ أيام. غالباً ما تنمو البراعم الجانبية قبل الأوان وتنتج أعداداً كبيرة من الفروع والمدادات (شكل ٦٠). يظهر على بعض الأصناف ندباً بيضاء أو يظهر تلطخات صفراء على الأوراق. تكون العقل المأخوذة من النباتات المصابة ضعيفة التجذير وتظهر النباتات المصابة تغيرات فى الميتابولزم وفى بدايات الكامبيوم. غالباً ما تتقزم النباتات بعد إبتداء الإصابة بحوالى شهر أو أكثر وإن هذه الصفة (التقزم) تكون السائدة لغاية موت النبات ولذا سمى المرض باسم مرض تقزم الأقحوان.

الكائن الممرض:

يتسبب هذا المرض عن فيرويد تقزم الأقحوان (CSVd)Chrysanthemum stunt Viroid يتكون من ٣٥٤ ـ ٣٥٦ نيوكليتيدة وذلك حسب العزلات. ينتقل هذا الفيرويد عن طريق العصارة. نقطة التخفيف القصوى للفيرويد حوالى ١: ١٠٠٠٠، درجة الحرارة المميتة ٩٦ ـ ١٠٠°م لمدة عشرة دقائق. يحتفظ الفيرويد بمقدرته على إحداث إصابة لمدة شهرين فى العصارة ولمدة سنتين فى

الأوراق الجافة. ينتشر الفيرويد بسهولة فى العصارة المحمولة على الأصابع أو على السكاكين أو الأدوات الزراعية المستعملة أثناء العمليات الزراعية مثل التقليم، تشذيب النباتات، أخذ العقل، قطف الأزهار. لا ينتقل الفيرويد بالحشرات أو نواقل أخرى.



شكل رقم ٦٠ :

أعراض الإصابة بفيرويد تقزم الأقحوان على نبات الأقحوان.

العلوى: A: أعراض الأصابة بالفيرويد CSVd على أوراق الأقحوان مراحل مبكرة.

B: أعراض الإصابة بالفيرويد CSVd على أوراق الأقحوان مراحل متأخرة.

السفلى: A: نبات الأقحوان سليم. B: نبات الأقحوان مصاب بالفيرويد ويظهر عليه أعراض كثرة الفروع والتقزم.

يتحرك الفيروويد ببطء خلال النبات وغالباً ما يحتاج إلى ٥ ـ ٦ أسابيع ليتحرك خارج الورقة المحقونة ويصل الساق. تتشكف الأعراض الجديدة بعد ٣ ـ ٤ شهور من الإصابة. يبقى الفيرويد حياً أساساً فى النباتات المصابة التى يبدو أنها معمرة وتحمله إلى الموسم القادم. يمكن أن تتلوث النباتات أيضاً بالفيرويد من أجزاء النباتات الميتة.

يصيب الفيرويد كل من الأقحوان والطماطم ونبات **Gynura**.

كما فى بقية الفيرويدات فإن هذا الفيرويد له شكلان الأول دائرى والثانى مستقيم وإن هذين الشكلين قد إختبرا لمعرفة حيويتهما على نبات **G. aurantiaca** وإن جدول رقم ٣٧ يبين أن كلا الشكلين لهما كفاءة متساوية فى الإصابة، وهذا ما يؤدى إلى القول بالغاء ما كان يعرف بأن كفاءة الشكل المستقيم كانت ناتجة عن إختلاط الشكل الدائرى مع الشكل المستقيم. أمكن استخلاص ٢٠٠ ميكوغرام شكل دائرى من كل كيلوغرام من المادة النباتية الحية المصابة بالفيرويد وكذلك استخلاص ٣٥ ميكوغرام شكل مستقيم من كل كيلوغرام من المادة النباتية الحية المصابة بالفيرويد.

عند فحص مستحضرات نقية من فيرويد CSVd بالميكروسكوب الالكترونى فإن الجزيئات الدائرية المدنترة تشاهد مع بعض الجزيئات المستقيمة. تكون بعض الجزيئات المستقيمة أكثر سمكاً من الجزيئات الدائرية. الجزيئات الأطول والأقل سمكاً هى الأشكال المدنترة للشكل المستقيم المشكل بواسطة عملية ال nicking للجزيئات الدائرية خلال ١٥ ـ ٢٠ ثانية من التحضين فى ٩٨٪ Formamide على درجة ٦٠°م التى هى ضرورية للتفريد. أما بالنسبة للأشكال المستقيمة من الفيرويد فهى الأسرع هجرة فى الجيل.

جدول ٣٧ : نتائج إختبارات الشكل الدائرى والمستقيم من فيرويد تقزم الأقحوان على نبات G. aurantiaca.

شكل الفيرويد المختبر	تركيز الفيرويد المختبر (ميكروغرام / مل) حيوية الإصابة به ٪					
	٥	١	٠,٥	٠,١	٠,٠٥	٠,٠٠٥
شكل دائرى	٪١٠٠	—	٪١٠٠	—	٪٧٥	٪١٧,٨
شكل مستقيم	٪١٠٠	—	٪١٠٠	—	٪٨٢	—
شكل دائرى	—	٪٧٥	—	٪٦٠	—	٪١٧,٨
شكل مستقيم	—	٪١٠٠	—	٪٥٠	—	٪١٨

الأعراض التشريحية :

لدراسة الأعراض التشريحية لفيرويد تقزم الأقحوان، يستعمل أنواع من نبات الأقحوان حساسة للفيرويد وتكون كاشفة له بحيث أن أعراض الإصابة الفيرويدية تكون نموذجية على هذا النبات. ومن أهم الأصناف التى تعتبر كاشفة لهذا الفيرويد هو الصنف Bonnie Jean.

تجرى الدراسة التشريحية على نبات الأقحوان المصاب بالفيرويد بعد ظهور الأعراض عليه، إن التعبيرات المرضية بالأعراض تحدث بعد أربعة أسابيع من الحقن عندما تبدأ النباتات المحقونة بالفيرويد CSVd فى إظهار إنحناء شديد فى الساق. خلال الفترة من ٤ ـ ١٠ أسابيع بعد الحقن فإن النباتات غالباً ما تتقزم ويظهر تبقع وتبرقش على الأوراق العلوية وأخيراً على الأوراق السفلية. لا يلاحظ سلوك متناسق من الأعراض يتبع ذلك.

عندما يؤخذ جزء القمة المرستيمية من النباتات المحقونة بالفيرويد ويقارن شكلها غير الطبيعى مع تلك المأخوذة من النباتات غير المحقونة، يلاحظ بالمقارنة أن القمم المرستيمية فى النباتات المحقونة تكون ملتوية ومتقزمة وأحياناً مشوهة. يمكن اكتشاف الفيرويد CSVd بواسطة الهجرة الكهربائية فى الجيل بعد ٣ أسابيع من الحقن فى

جميع النباتات المحقونة أما النباتات غير المحقونة فلا يلاحظ الفيروويد فى مستخلصاتها.

لكى ندرس الأعراض التشريحية فى النباتات المصابة بالمرض يجب أن نقارن بين الصفات التشريحية للنباتات السليمة والمصابة. لذا يجب أن نذكر الآن الصفات التشريحية للنباتات السليمة ثم التغيرات التشريحية فى النباتات المصابة ونقارن بينهما.

تشريح النباتات غير المريضة:

عند عمل مقاطع طولية وعرضية فى الساق وفحصها لتحديد الوضع التشريحى لساق نبات الأقحوان صنف Bonnie Jean فإن تشريح الساق يشبه ما ذكره كل من Delaware وMandalay. المقاطع العرضية فى أنسجة العرق الوسطى للورقة فى مناطق القمة النامية والقاعدة أظهرت أن البشرة العلوية والسفلية كل منهما يتكون من طبقة مفردة من الخلايا. تكون الخلايا البرانشيمية السياجية Palisade متطاولة إلى مثلثة الشكل منضغطة فى ترتيبها. أما الميزوفيل الإسفنجى يكون فيه فراغات بين الخلايا ويتكون من خلايا غير منتظمة الشكل. أما الحزم الوعائية فتتكون من غلاف الحزمة، اللحاء، الكامبيوم الوعائى والخشب.

عند فحص سلسلة مقاطع طولية من مرستيم خضرى وآخر تكاثرى فإن المقاطع الوسطى من المرستيم التكاثرى تتكون من واحدة أو إثنتين من الطبقات الرقيقة وصف من الخلايا مكونة مرستيم العرق ومنطقة جانبية على كلا طرفى منطقة النسيج المتوسط. يختلف تشريح المرستيم التكاثرى عن المرستيم الخضرى فى عرض وإتساع القمة والذى من هذه المنطقة تنشأ مكونات الزهرة.

تشريح النباتات المحقونة بالفيرويد CSVd:

١ - الساق:

التغيرات التشريحية فى النباتات المصابة بالفيرويد CSVd تظهر بعد أربعة أسابيع من الحقن ولكن تكون أكثر وضوحاً فى العينات المأخوذة للفحص بعد ٧ أسابيع

من الحقن. تحدث أكثر التغيرات وضوحاً فى الجزء العلوى من النبات. يكون الكامبيوم الوعائى أكثر وأول الأنسجة المتأثرة ويبدو أن التغيرات فى الكامبيوم هى المسئولة عن التغيرات اللاحقة فى الأنسجة الأخرى. أما التغيرات التشريحية فى الخشب واللحاء والقشرة لا تكون شديدة مثل تلك الملاحظة فى الكامبيوم الوعائى. يلاحظ فى الجزء السفلى من النبات أحياناً خلايا متضخمة بين خلايا الألياف سميكة الجدار من غطاء الحزمة الوعائية، هذه الخلايا المتضخمة غالباً ما تكون خلايا ذات جدر مميزة بوضوح والأنوية فيها لا تكون دائماً واضحة أو مرئية.

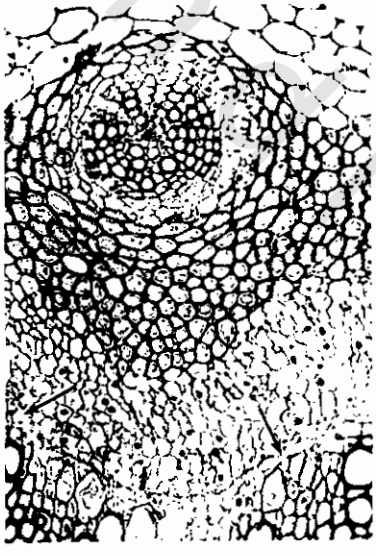
فى الجزء العلوى من النبات، فإن خلايا الكامبيوم فى الحزم الوعائية تظهر مشوهة ومن الصعب تمييزها عن خلايا اللحاء والخشب المجاورة لها. فى مناطق أخرى تظهر الخلايا فى الكامبيوم الوعائى كأنها مطحونة (شكل ٦١). الاختلال الوظيفى للكامبيوم الوعائى يكون واضح فى الحزم الوعائية فى النسيج المصاب، والبدايات الكمبيومية كثيراً ما تكون غير واضحة وتفتقر إلى الجدر الخلوية المميزة (شكل ٦٢). يحدث تحطيم للبدايات الكومبيومية بالإضافة إلى التميز غير الكامل فى البدايات الكمبيومية. وهذا يؤدى إلى تكوين نسيج يتكون من خلايا ذات جدر رقيقة تكون غالباً مستطيلة الشكل متعامدة فى صفوف. خلايا برانشيما الخشب غالباً ما تكون سهلة الصبغ ومتضخمة.

النباتات المصابة والتى تظهر أعراض خارجية بكثرة على جانب واحد من النبات، غالباً ما تظهر تغيرات تشريحية شديدة فى نفس الجانب من النبات. فى هذه المناطق يكون النسيج الوعائى قد أحتل بواسطة خلايا متضخمة، والأنوية فى هذه الخلايا متطاولة وقابلة للصبغ. يتجمع البكتين فى جيوب فى مركز النسيج المتضخم والذى ازداد عدده الموجود فى الأجزاء القمية فى الساق وبقايا النسيج الوعائى يلاحظ فى مركز هذه الجيوب.

فى المقطع الطولى فإن الكامبيوم الوعائى عادة يتكون من بدايات شاذة ولكن أيضاً تتميز بتكشف خلايا متضخمة. فى كثير من المقاطع فإن نسيج اللحاء يكون قابل للصبغ والإختبارات الهستوكيماوية للكالوس تكون موجبة. تظهر المقاطع

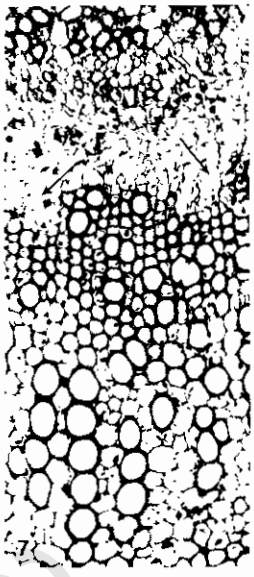
الطولية فى الأنسجة تغيرات تشريحية أقل شدة وتتكون من جيوب ذات مواد داكنة اللون (الصبغة) والتى تعطى إختبار موجب للبكتين. يظهر فى المقاطع الطولية أيضاً خلايا متضخمة من الخلايا البرانشيمية للخشب. هناك تغيرات تشريحية أخرى تشمل مناطق من خلايا متضخمة ومواد داخل الخلايا ذات لون داكن فى القشرة شكل ٦٣ . المواد ذات الصبغة الداكنة تعطى نتيجة موجبة لإختبار الصمغ الجرحى وفى بعض الحالات تعطى إختبار موجب للبكتين مستعملة إختبارات Orcinol و Iron absorption. تكون طبقة الابديرم احادية الخلية قد استبدلت فى بعض الأحيان بطبقة عديدة الخلايا أو غالباً بواسطة فجوات محتوية Wound gum وبكتين. التكاثر الخلوى لهذا النوع يكون واضحاً فى المقاطع الطولية.

فى بعض المقاطع يكون هناك كتلة من الخلايا مشابهة فى مظهرها تلك التى فى نسيج القمة المرستيمية تحل محل مكونات النسيج الوعائى. هذه المناطق غالباً ما تتصف بوجود خلايا ذات صبغة داكنة تحتوى أنوية كبيرة واضحة وتمتد خلال النسيج الوعائى فى القشرة.



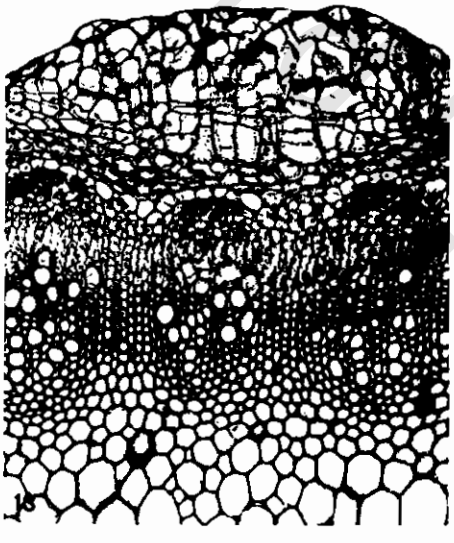
شكل رقم ٦١ :

مقطع يظهر التميز غير الكامل فى بدايات الكامبيوم وتحطيم وتكسر الخلايا فى الكامبيوم الوعائى فى ساق نبات الأقحوان المصاب بفيروبد CSVd (يلاحظ الأسهم). التكبير ٢٦٥ مرة.



شكل رقم ٦٢ :

مقطع يظهر الفجوات فى الكامبيوم الوعائى فى ساق نبات الأقحوان المصاب بفيرويد CSVd يلاحظ الأسهم. التكبير ٢٨٠ مرة.



شكل رقم ٦٣ :

مقطع عرضى فى ساق نبات الأقحوان المصاب بفيرويد CSVd يظهر تضخم الخلايا وزيادة عددها فى القشرة والمواد ذات الصبغة الداكنة. التكبير ١٦ مرة.

٢ ـ القمة المرستيمية:

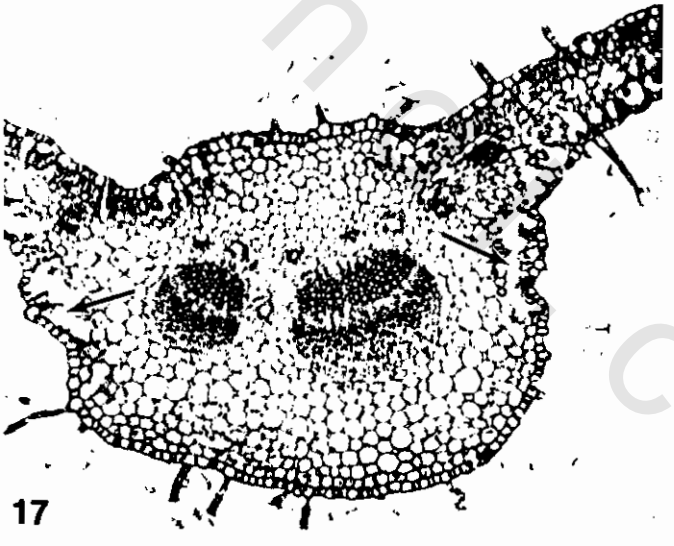
أكثر الاستجابات شيوعاً فى العائل عند الإصابة الفيرويدية تلاحظ فى المرستيمات الخضرية حيث تتكون فجوات عمودية تمتد خلال مرستيم العرق الوسطى والقمة. إن عدد وحجم هذه الفجوات يختلف من مرستيم إلى مرستيم. أما فى المرستيم التكاثرى فإن استجابة العائل للإصابة تكون كما ذكر فى المرستيم الخضرى وتلاحظ الفجوات بشكل عام. الخلايا فى نسيج المرستيمات التكاثرية من النباتات المصابة غالباً ما تكون أقل تماسكاً فى ترتيبها من ذلك الملاحظ فى النباتات غير المحقونة.

٣ ـ الأوراق:

التغيرات التشريحية فى الأوراق الحديثة ذات البثرات المصفرة تشمل تحطيم خلايا الميزوفيل شكل ٦٤. وإن الفجوات المتكونة غالباً ما تكون مرتبطة مع الجانب البعيد عن المحور مباشرة فى الجهة الداخلية للبشرة الخارجية السفلى. فى بعض مناطق صفحة الورقة يكون الابيدرمز السفلى منفصلاً عن بقية النسيج بواسطة هذه الفجوات، بينما فى مناطق أخرى فإن خلايا الميزوفيل المتطاولة تعمل جسر أو كوبرى يصل هذه الفجوات من الميزوفيل الاسفنجى إلى الابيدرمز السفلى. فى بعض المقاطع فإن خلايا الميزوفيل السياجية تكون أقل تلاحماً فى ترتيبها منها فى الأوراق من النباتات غير المصابة بالفيرويد.

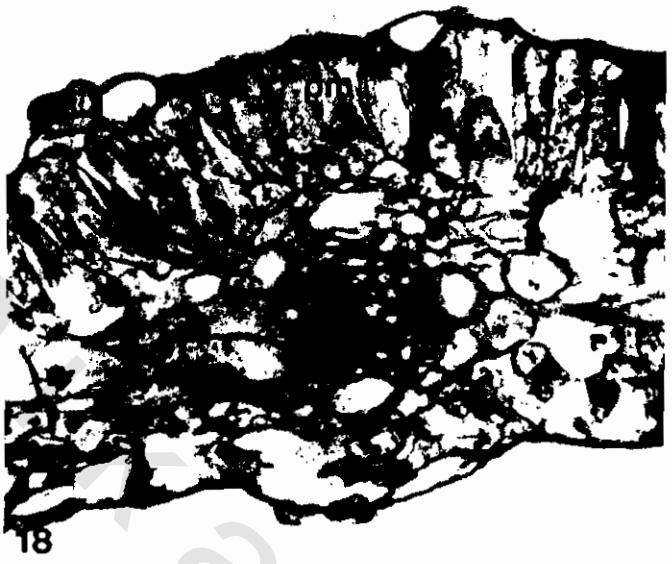
أما فى الأوراق التى التحمت فيها البقع الصفراء فإن خلايا الميزوفيل النسيجية تكون غير منتظمة الشكل والحجم وفى بعضها تكون الخلايا متطاولة شكل ٦٥. تكون طبقات الابديرمز دائماً غير واضحة فى الأوراق المظهرة أعراض شديدة. فى بعض المقاطع يكون هناك خلايا ميزوفيل مفردة متحطمة وتكون البلاستيدات الخضراء والأنوية أقل وضوحاً فى هذه الأنسجة منه فى خلايا الميزوفيل فى نسيج ورقة من نباتات غير محقونة. البلاستيدات الخضراء والأنوية تكون غير مميزة فى خلايا الميزوفيل فى النباتات المصابة.

يمكن القول بأن التغيرات التشريحية تدل على أنه يمكن أن يكون هناك فرق مميز بين التغيرات التشريحية الأولية والثانوية، التغيرات التشريحية التى تحدث فى الأنسجة المرستيمية والكامبيوم الوعائى ومرستيم الفروع يمكن اعتبارها تغيرات أولية. أما التغيرات التى تلاحظ فى الأنسجة الأخرى يمكن اعتبارها تغيرات ثانوية. إن ظهور الأنوية المتضخمة وتمزق النسيج المرستيمى يؤدى إلى القول بأن هذا تعبيرعن النشاط المباشر للفيرويد من حيث بناء ال RNA أو تضاعفه فى نواة خلية العائل. هذه التغيرات يمكن أن تكون ناتجة من عوامل أخرى مثل عدم التوازن الهرمونى وتسمى تأثيرات ثانوية. يمكن القول بأن التغيرات المحدثة فى نباتات الأقحوان المصابة بالفيرويد تكون مشابهة لتلك المتسببة عن الإصابة بالفيروسات المختلفة فى العائل النباتى.



شكل رقم ٦٤ :

مقطع عرضى فى نصل الورقة من نبات أقحوان مصاب بفيرويد CSVd يظهر تحطم نسيج الميزوفيل على الجانب القمى من الليمينا. يلاحظ الأسهم. التكبير ١١ مرة.



شكل رقم ٦٥ :

مقطع عرضى فى نصل الورقة من نبات أقحوان مصاب بفيرويد CSVd يبين استطالة الخلايا السياجية. وتحطيم طبقات الابيدير. التكبير ٥٧ مرة.

استعمال فيرويد CSVd فى تقليل الإصابة ببكتريا العفن الطرى :

يعتبر مرض تقزم الأقحوان الفيرويدى والإصابة البكتيرية (العفن الطرى) من الأمراض الهامة التى تصيب الأقحوان وتؤثر على إنتاج الأزهار فى النوع **Chrysanthemum morifolium** وإن معظم الدول تمنع فى الحجر الزراعى دخول الأجزاء النباتية من الأقحوان إذا كانت تحمل بكتيريا **Erwinia Chrysanthemi** وكذلك إذا كانت تحمل فيرويد تقزم الأقحوان CSVd.

إن بكتيريا **E. chrysanthemi** هى بكتيريا العفن الطرى القادرة على إفراز أنزيمات بكتينية (محللة للبكتين) وتسبب تحطيم البرانشيما الوعائية وتحلل النخاع. لقد وجد أن إنخفاض التفكك فى النخاع الناتج من الإصابة البكتيرية فى عقل الأقحوان المصابة بالفيرويد CSVd له علاقة بوجود الفيرويد نفسه فى النبات.

لدراسة تأثير الإصابة الفيرويدية على تحلل النخاع فى عقل الأقحوان صنف Bonnie Jean بواسطة بكتيريا العفن الطرى **E. chrysanthemi** سلالة ١٥٨ . تؤخذ عقل من النباتات ذات عمر ٣ أسابيع والتى نشأت من أصول نباتات إما سليمة أو مصابة بالفيرويد CSVd ولكنها مصابة بالبكتيريا ويلاحظ أعراض الإصابة البكتيرية عليها وذلك بأن يظهر على النخاع عفن أحمر داكن طرى بالإضافة لتلون الحزم الوعائية فوق النقطة حيث ينتهى عفن النخاع. لا يظهر أعراض على أنسجة الساق الخارجية.

تبين من الدراسة أن العفن الطرى الذى حدث فى السيقان المصابة بالفيرويد CSVd كان تقريباً ثلث الكمية التى تحدث فى النباتات غير المصابة بالفيرويد. وجد فى إحدى التجارب أن طول النخاع المتحلل (بواسطة البكتيريا) فى النباتات غير المصابة بالفيرويد ١٧,٨ ملم فى حين كان طوله فى النباتات المصابة بالفيرويد ٥,٨ ملم وفى تجربة أخرى كان طول النخاع المتحلل فى النباتات غير المصابة بالفيرويد ٢٢,٦ ملم فى حين أنه كان فى النباتات المصابة بالفيرويد ٧ملم.

العلاقة بين الفيرويد الموجود فى النبات وخفض تحلل النخاع بالبكتيريا:

بعد عشرة أيام من زراعة ٢٠ نبات سليم فى أوعية، يغرز فى هذه النباتات أقراص نسيجية (تحقن) إما من أصول سليمة أو من أصول نباتية مصابة بالفيرويد. كان يتم الحقن على بعد ٣٥ ملم تحت قمة الفرع الطرفية. تحفظ جميع النباتات على درجة حرارة ٢٩ ـ ٣٠°م وطول نهار ١٦ ساعة. تزال الأفرع الطرفية بعد عشرة أيام من الحقن وهذا يؤدى إلى تكوين أفرع جانبية. بعد ١٠، ٢٠، ٢٦، ٣٤ و٤١ يوم بعد الحقن يؤخذ فرع قمى واحد أو جانبى من كل نبات من فوق منطقة الحقن. يؤخذ ٢ غرام من نسيج نصل الورقة ويستعمل للكشف عن الفيرويد. فهرسة النباتات السليمة على ١٠، ٢٠ و٤١ يوم فقط. يؤخذ قطع من الساق بطول ٥ ملم من قاعدة كل عقلة وتوضع فى مثبت للدراسة الهستولوجية.

الجزء الباقى من الفرع (الساق + أعناق الأوراق) يقطع على بعد ٤٠ ملم تحت القمة وتحقن بالغمر (بالبكتيريا) لإختبار التفكك البكتيرى.

تبدأ النباتات المحقونة بالفيروويد تظهر الأعراض بعد ٢٧ يوم من الحقن، أما حدوث الأعراض واكتشاف الفيرويد يتم بعد ٣٤ و ٤١ يوم بعد الحقن كما هو واضح فى جدول ٣٨ وتبين أن تفكيك النخاع البكتيرى قد خفض معنوياً فى حالتين إما باكتشاف CSVd فى نسيج الورقة بطريقة PAGE أو بالتعبيرات العرضية للمرض الواضحة للفيرويد. وبشكل عام فإن هناك خفض قليل فى تفكك النخاع قد حصل عليه فى العقل المأخوذة من نباتات محقونة بالفيرويد، ولكن الخفض يكون أكثر إذا كانت العقل مظهرة أعراض الإصابة الفيرويدية وتحتوى على كمية يمكن تقديرها من الفيرويد (تكاثر فيها الفيرويد بكمية كبيرة). الأعراض المرئية (بقع صفراء) تظهر إما لفترة قصيرة قبل أو فى نفس الوقت الذى يكون فيه عيار الفيرويد المكتشف بواسطة إختبار PAGE كاف لأن يسبب ظهور الأعراض.

جدول ٣٨ : العلاقة بين تعبيرات الأعراض واكتشاف الفيرويد CSVd ، ٣٤ و ٤١ يوم بعد حقن الأقحوان بالفيرويد.

بعد ٣٤ يوم من الحقن		بعد ٤١ يوم من الحقن	
أعراض الورقة	اكتشاف الفيرويد	أعراض الورقة	اكتشاف الفيرويد
صفر	—	صفر	—
صفر	—	١	—
صفر	—	١	—
صفر	—	١	—
صفر	—	٢	+
صفر	—	٢	+
١	+	٣	+
٢	+	٣	+
٢	+	٣	+
٣	+	٣	+

ملاحظات:

صفر = لا يوجد أعراض، ١ = قليل من البقع على ورقة أو ورقتين، ٢ = بقع على عدة أوراق، ٣ = كثير من البقع على كل الأوراق، + = يمكن اكتشاف الفيرويد، — = فيرويد غير مكتشف.

إعادة اكتشاف البكتيريا من العقل المحقونة:

أمكن عزل البكتيريا **E. Chrysanthemi** سلالة ١٥٩ المحقونة فى العقل النباتية باستمرار من المقطع الأول والثالث (كل مقطع يبعد ٨ ملم عن المقطع الآخر وذلك إبتداءً من القاعدة) من العقل غير المصابة بالفيرويد والمحقونة أيضاً بالفيرويد CSVd. لم يمكن عزل البكتيريا من المقطع الخامس. هذه النتيجة تدل على أن البكتيريا الموضوعة على القاعدة فى العقل السليمة والمحقونة بالفيرويد تتحرك لنفس المسافة العمودية تقريباً وتكون ذات مقدرة على البقاء حية على الأقل خمسة أيام ضمن العقل.

الإختبارات الهستولوجية:

لم يلاحظ إختلافات تشريحية بين السيقان السليمة والمحقونة بالفيرويد وقت الحقن. إن تشريح سيقان حديثة نموذجية من الأقحوان صنف Bonnie Jean، لوحظ فى المقاطع العرضية أنها تختلف قليلاً فقط عن الصنف Giant 4 وهو النموذج الأمثل للتشريح. فى سيقان Bonnie Jean يبدأ النخاع فى قاعدة الحزم الوعائية بقليل أو بدون ألياف extraxylary تفصل بين النخاع وقاعدة الحزم الوعائية. المقاطع فى السيقان المتقدمة بالسن تظهر أغطية للحزمة فى الألياف الناضجة، مناطق كبيرة فى النسيج الوعائى Interfasicular وكثير من الألياف Extraxylary.

فى سيقان العقل السليمة يبدو أن البكتيريا تتحرك إلى أعلى فى النخاع وتفكك النسيج. كذلك فإن البكتيريا تتحرك ضمن عناصر الأوعية الخشبية، حيث أنها وجدت ضمن الأوعية فوق المنطقة المتكشف فيها تعفن النخاع. تحطيم الأوعية تسبب بواسطة البكتيريا عن طريق تحطيم الأوعية الداعمة لنسيج برانشيما الخشب ثم تنتشر من الحزم الوعائية وتفكك النخاع القريب من الخلايا. يكون تفكك الحزم الوعائية والنخاع شديداً بعد خمسة أيام من الحقن بينما الأنسجة الأخرى تظهر غير متأثرة.

وعلى النقيض من ذلك فإن البكتيريا فى العقل المصابة بالفيروويد تبقى محددة بشدة مع العناصر الوعائية والتى تكون على شكل مستعمرات أولية وتسبب كمية قليلة من تحلل النخاع فى قاعدة العقلة ولكنها لا تستمر فى الحركة إلى القمة البعيدة. لوحظت البكتيريا ضمن تجاويف العناصر الوعائية، ولكن قليل من الخلايا من برانشيما الخشب، الكامبيوم، اللحاء أو النخاع تحطمت بعد خمسة أيام. الإختبارات الهستولوجية أظهرت عدم وجود إختلافات كبيرة بين مقاطع الساق المصابة والخالية من الفيرويد CSVd.

هل هذه الظاهرة وقاية بالتضاد؟؟

إن هذه الظاهرة تختلف عن ظاهرة الوقاية بالتضاد Cross - Protection، حيث أنه فى الأخيرة يكون الكائنين الداخلين فى التجربة ذوى علاقة قريبة من بعضهما البعض مثل سلالات لفيرس أو فيرويد معين، ولم يسبق أن استعمل فيرويد فى مقاومة أو تخفيض أعراض متسببة عن كائنات أخرى، فى حين أن الفيروسات استعلمت فى تخفيض أو زيادة شدة الإصابة بالفطريات.

فى هذه التجربة فإن بكتيريا **E. Chrysanthemi** سلالة ١٥٩، بكتيريا العفن الطرى تمتلك أنزيمات بكتينية والتى يمكن أن تحطم الصفيحة الوسطىMiddle lamellae فى الخلايا البرانشيمية مؤدية إلى موت الخلية وفقد إنتفاخ النسيج وبالتالى فإن هذه الأنزيمات تؤثر على الأنسجة العصارية فى الأقحوان (النخاع والبرانشيما الوعائية)، بينما الجدر ذات اللجننة العالية تكون أكثر مقاومة للبكتيريا. عندما تفقد الأنسجة عصاريتها وتتشقق أنسجة الساق فإن استعمالها يكون صعب من قبل البكتيريا وبالتالى يمكن أن نتوقع تكاثر الفيرويد وتحركه خلال النباتات المحقونة الناتجة من فقد صفة العصارية، وبالتالى فإن هذا التكاثر يمكن أن يكون كافياً لمنع أو خفض الأنزيمات البكتيرية المحطمة والتى عادة تؤدى إلى العفن الطرى.

لوحظ فى المقاطع المثبتة والمأخوذة من الساق بعد ٨٤ يوم من الحقـن بالفيرويد CSVd أنها أظهرت كثيراً من Extraxylary fibers وقلنسوة ناضجة للحزمة الوعائية

بالإضافة لزيادة سمك الجدر الخلوية. وعلى أية حال فإن الاختلافات فى التشريح العام والذى يمكن أن يحسب لصالح الخفض فى كفاءة البكتيريا لا يبدو واضحاً فى تجارب مقاطع الساق السليمة والمحقونة بالفيرويد. إن التغيرات الكبيرة فى تركيب الساق والتى تحد من الإصابة لا تظهر مبكراً بوقت كاف ليكون متزامناً مع العلاق بالفيرويد المتكشف وتخفيض تفكك النخاع. إذا كان الفقد فى عصارية السيقان المصابة بالفيرويد CSVd داخلاً فى هذا الموضوع، فمن الصعب تحديد العامل أو العوامل المسئولة عن الخفض فى التفكك. بينما الفرصة لاكتشاف الفقد أو الحصول على كميات صغيرة من مكونات الجدار يمكن أن تكون قليلة، هذه التغيرات يمكن أن تؤثر كثيراً على مقدرة التفكك للبكتيريا.

إن نتائج الدراسات الهستولوجية للمقاطع المصابة بالبكتيريا، يبدو أنها تدل على أن ارتباط أو تجمع البكتيريا فى النباتات المصابة بالفيرويد فى عناصر الأوعية الخشبية وإن فشل البكتيريا فى تمزيق العناصر الوعائية بانطلاقها المتتابع فى خلايا النخاع يؤدى إلى القول بأن هناك تغير فى تركيب الوعاء. لقد ذكر بعض الباحثين أن بعض نباتات الأقحوان تنتج مادة السوبرين فى جدر الأوعية كجزء من إستجابة العائل للإصابة البكتيرية. إن العناصر الوعائية فى نبات الأقحوان السليمة تفتقر إلى مادة السوبرين بكميات يمكن تقديرها ولم يوجد مثل هذه التغيرات يمكن أن تحدث فى أوعية النباتات المصابة بالفيرويد. زايدة على ذلك فلقد وجد أن مسبب مرض بيرس فى العنب يؤدى إلى إنتفاخ الأغشية المغلفة للنخاع وقفل ميكانيكى للنخاع بواسطة إنتاج الكثير من الصمغ أو الجيل، ولا يوجد أى دليل على أن الفيرويد يسبب إنتاج صمغ أو تغير فى النخاع والذى يمكن أن يؤدى إلى إعاقة **حركة البكتيريا خلال نسيج النبات. إن بقاء البكتيرية حية فى النباتات المصابة** بالفيرويد يكون دليل ضد إفتراض أن هناك مواد خاصة تنتج تكون مميتة للبكتيريا. إن دراسة التكاثر البكتيرى والانتاج الأنزيمى فى النسيج المصاب يمكن أن يظهر أن البكتيريا إما أن تكون غير قادرة على إنتاج كميات عادية من الأنزيمات المحللة أو أن هذه الأنزيمات تكون غير قادرة على تفكيك نسيج النبات. يمكن دراسة الخلية البكتيرية الخالية من الأنزيمات واستعمالها فى هذا الغرض.

ب ـ مرض الشحوب المتبقع فى الأقحوان

Chrysanthemum Chlorotic Mottle Disease

كان أول وصف لهذا المرض فى أوائل الخمسينات وكان يعزى إلى مسبب فيروسى، استمرت الأبحاث عليه حتى سنة ١٩٧١ حيث أثبت Dimock et al أن هذا المرض يتسبب عن فيرويد وذكر أن أعراض الشحوب المتبقع التى تظهر فى الأقحوان **Chrysanthemum morifolium** من المستبعد أن تتسبب عن إصابة فيروسية. وفى أبحاثه أثبت أن مسبب هذا المرض يشبه مسبب مرض الدرنة المغزلية فى البطاطس ومسبب مرض تقزم الأقحوان.

الأعراض:

تظهر أوراق النباتات المصابة بلون أصفر شاحب يتخلله بقع متفاوتة فى اللون الأخضر من الفاتح حتى الغامق. هذه الأعراض تكون المرحلة الأخيرة من الإصابة، أما فى البداية فهو يشبه أعراض الموزايك المتسبب عن الفيرس، لذلك يحدث التباس فى تشخيص هذا المرض وتمييزه عن الأمراض الفيروسية. قد تظهر الأعراض على عدة أوراق على النبات وقد تكون معظم الفروع مصابة. يضعف النبات وتتساقط الفروع القريبة من سطح التربة بعد أن تضعف. النباتات الشديدة الإصابة تظهر باللون الشاحب. كما سبق وذكرنا يكون هناك إلتباس فى أعراض هذا المرض مع الأعراض الأخرى وخاصة الموزايك الفيروسى ونقص العناصر الغذائية فى التربة، إلا أن التبرقش الأخضر على سطح الورقة المصفرة هو الذى يميز الإصابة بهذا الفيرويد عن بقية الأمراض الأخرى شكل ٦٦.

المسبب:

يتسبب هذا المرض (مرض الشحوب المتبقع فى الأقحوان) عن فيرويد Chrysanthemum Chlorotic Mottle Viroid ويكتب (ChCMVd). يبدو

obeikandl.com

أن هذا الفيرويد يختلف تماماً عن بقية الممرضات الأخرى فهو يصيب وبسبب الأعراض المرضية على نباتات الأقحوان فقط. للفيرويد المقدرة على أن يصيب النباتات التى تكون قد أصيبت مسبقاً بأى فيرويد آخر وليس عنده القدرة على الحفظ أو الوقاية بالتضاد. لقد استعمل مع كثير من الفيرويدات فى تجارب الوقاية بالتضاد فلم يثبت بأن عمل وقاية للنبات من أى فيرويد متحدى آخر. من الصعب صبغ مستحضرات هذا الفيرويد بمادة Toluidine blue.

إن صفات هذا الفيرويد تختلف عن بقية الفيرويدات حيث أن المدى العائلى له منحصر فقط فى بعض أنواع الأقحوان مثل Bonnie Jean ، Deep Ridge ، Mistletoe. كذلك فإن إنتقال الفيرويد بالعصارة صعب. أما تتابع النيوكليتيدات فى هذا الفيرويد ووضعه التصنيفى لم يتأكد بعد. يمكن أن تفقد حيوية الفيرويد بسرعة فى المستخلص وكذلك طريقة الاستخلاص تؤثر على حيوية الفيرويد حيث جداول ٣٩، ٤٠ تبين بعض صفات هذا الفيرويد.

شكل رقم ٦٦ :

أعراض الإصابة على أوراق نبات الأقحوان بالفيرويدChCMVd. الورقة a سليمة والورقة B تظهر أعراض الشحوب المتبرقش.

جدول ٣٩: تأثير رقم الحموضة على ثبات فيروبد ChCMVd فى المستخلص الخام.

المادة المخففة للمستخلص تركيز ٠,١ مول	عد ساعات التحضين	% حيوية المستخلص فى درجة حموضة						
		٥,٥	٦,٢	٦,٥	٧,٥	٨,٥	٩,٥	١٠,٥
Tris - moleate - HCl	صفر	صفر	—	٢٠	٧٠	—	—	—
	٢	صفر	—	صفر	٣٠	—	—	—
Tris - HCl	صفر	—	—	—	٥٠	٨٠	—	—
	٢	—	—	—	٥٠	٩٠	—	—
Boric acid - NaOH	صفر	—	—	—	١٠٠	٩٠	—	—
	٢	—	—	—	—	١٠٠	٩٠	—
Glycine - NaOH	صفر	—	—	—	—	—	٩٠	٤٠
	٢	—	—	—	—	—	٧٠	٣٠
NaCO3	صفر	—	—	—	—	—	—	٦٠
	٢	—	—	—	—	—	—	صفر
water	صفر	—	صفر	—	—	—	—	—
	٢	—	صفر	—	—	—	—	—

ملاحظات:

كان يستعمل إختبار الحيوية مباشرة بعد التحضير وثانية بعد التحضين لمدة ٢ ساعة على درجة حرارة الغرفة العادية. كان يستخلص من النسيج فى Specified diluent (١٠ مل / غرام) ويضبط رقم الحموضة باستعمال ٢ نظامى من هيدروكسيد الصوديوم و ٢ نظامى حمض HCl.

جدول ٤٠: حيوية وثبات الفيرويد بعد طرق الاستخلاص المختلفة.

طريقة الاستخلاص	٪ الحيـويـة							
	تخليض المستخلص			عدد أيام التحضين على درجة ٤°م				
	صفر	١٠-١	١٠-١,٥	صفر	١	٣	٧	٢٨
Borate buffer	٦٠	٤٠	صفر	٦٠	١٠٠	٤٠	٣٠	صفر
Borate buffer + chloroforum n - butanol	١٠٠	٤٠	صفر	٩٠	١٠٠	٨٠	٧٠	٧٠
Borate - SDS - buffer + Phenol	٦٠	٦٠	٢٠	٧٠	٩٠	٦٠	٦٠	٦٠
Borate - SDS - buffer + DEP	٤٠	صفر	صفر	٣٠	٢٠	٣٠	صفر	—
water	صفر	صفر	صفر	صفر	صفر	صفر	صفر	صفر

ملاحظات:

١ ـ كان يستخلص النسيج فى ٠,٢ مول يوريك أسد ـ هيدروكسيد صوديوم، ٥ ملى مول كلوريد مغنيسيوم حموضة (٩). (٢ مللتر / غرام) والمتجانس ينقى بالسرعة المنخفضة بآلة الطرد عن المركز قبل الاختبار.

٢ ـ تختبر النباتات المريضة بعد ٣٠ يوم من الحقن وتحسب النسبة المئوية بين عدد النباتات المريضة والمحقونة.

٣ ـ بيئة الاستخلاص تحتوى كلوروفورم ـ n ـ بيوتانول (١ مل / غرام).

٤ ـ Borate buffer تحتوى ١ ٪ SDS.

٥ ـ كان يستعمل الماء بدلاً من المنظم فى التجربة الكنترول.

٥ ـ فيرويدات حشيشة الدينار

Hop Viroids

١ ـ مرض تقزم حشيشة الدينار

Hop Stunt Disease

مقدمة عن نبات حشيشة الدينار:

قبل أن نتكلم عن الأمراض الفيرويدية الهامة والخاصة بنبات حشيشة الدينار وحيث أن هذا النبات لا يزرع فى بلدان الشرق الأوسط، نود أن نعطى فكرة عن الوصف النباتى لهذا النبات.

يسمى نبات حشيشة الدينار باللغة العربية الفصحى (جنجل) واسمه العلمى **Humulus lupulus** ويتبع العائلة القنابية Fam. Cannabinaceae. والأصل فى تسميته بهذا الاسم غير معروف ولكن يبدو أن كلمة Humulus مأخوذة من كلمة Humus ومعناها رطب وهى تشير إلى الأرض الرطبة التى ينمو فيها النبات. أما كلمة **Lupulus** معناها الذئب وتشير إلى صفة من صفات النبات حيث أنه يخنق العائل الذى يتسلق عليه مثل الذئب الذى يخنق فريسته.

لايزرع نبات حشيشة الدينار فى منطقة الشرق الأوسط ولكنه يزرع بكثرة فى اليابان وانجلترا وفرنسا والولايات المتحدة الأمريكية وقد إنتشرت زراعته فى أماكن متفرقة من العالم مثل أمريكا الجنوبية وأستراليا أما موطنه الأصلى فهو أوروبا وأسيا.

obeikandl.com

نبات حشيشة الدينار عشب معمر متسلق ويلزم له دعامات أو سنادات فى الحقل لسيتند عليها، يعيش فى الأرض من ١٠ ـ ١٥ سنة ويصل ارتفاعه إلى عشرة أمتار له أوراق بيضاوية الشكل ويحمل النبات أزهاراً مؤنثة وأخرى مذكرة لونها أصفر مخضر قليلاً وتوجد الأزهار فى نورات شبه مخروطية شكل ٦٧. الأزهار المؤنثة أكبر حجماً من الأزهار المذكرة. يوجد فى قواعد الأزهار قنابات ويوجد على قواعد هذه القنابات غدد تحتوى على الزيت الطيار العطرى وهذه الزيوت هى التى تعطى النورة رائحتها وطعمها المميز لحشيشة الدينار. تستعمل المخاريط الثمرية الأنثوية فى العمليات الصناعية حيث هى التى تحتوى شعيرات غزيرة توجد فيها المكونات الفعلية المستفاد منها.

تتكاثر حشيشة الدينار إما بالبذور أو بالعقلة وتفضل الطريقة الأخيرة وهى المنتشرة فى أوربا وأمريكا لسهولتهاحيث تزرع العقل فى مشاتل ثم بعد التجذير تنقل إلى الأرض الدائمة. تجمع المخاريط الزهرية فى شهر سبتمبر من كل عام إبتداءً من العام الثالث، عندما يتم نضجها ويتم الجمع فى الصباح الباكر وتنقل إلى حجرة التجفيف الصناعى مباشرة حتى لا يتغير لونها. يعطى الهكتار الواحد حوالى ١٢ ـ ٢٢ طن من الثمار المخروطية فى الجمعة الواحدة. يستمر النبات يعطى إنتاج لمدة عشرة سنوات.

تستعمل حشيشة الدينار أساساً فى صناعة البيرة حيث تكسبها الطعم المر وهو مرغوب فى صناعة البيرة. كذلك فإن لحشيشة الدينار قيمة حافظة لوجود مواد راتنجية فيها. كذلك فإن حشيشة الدينار عندها قدرة على تكوين رغوة Froth وذلك للأحماض والمواد الراتنجية الموجودة فيها. أما زيت بذرة حشيشة الدينار فهو منوم ومسكن خفيف ويستعمل لتهدئة الأعصاب.

شكل رقم ٦٧ :

يبين شكل الورقة والمخروط فى حشيشة الدينار.

أهم مكونات حشيشة الدينار هو الزيت الطيار الموجود فى غدد زيتية وشعيرات غدية فى النورة المخروطية بنسبة تتراوح من ٠,٣ ـ ١ ٪ ويستخلص الزيت بواسطة عملية التقطير وله رائحة نفاذه وطعم مر ويحتوى على مادة Humulene وهو يتبع مجموعة Sesquiterpenes . بالإضافة إلى الزيت الطيار تحتوى المخاريط الزهرية مواد راتنجية منها Humulone ومادة Lupulone ويرجع إليها الطعم المر الداخل فى صناعة البيرة. كذلك يوجد حمض Lupulinic ومواد تنينيه Humulo وكذلك كحول Geraniol .

مرض تقزم حشيشة الدينار:

كان أول وصف لهذا المرض بواسطة العالم Yamamoto **et al** سنة ١٩٧٠ فى اليابان وذكر أن النباتات المريضة تكون ذات عقل قصيرة خاصة فى الساق الرئيسى والفروع الجانبية وتتجعد الأوراق العليا وتلتف إلى الجهة السفلية ويصغر حجم نصل الورقة وتصفر الأوراق وتسقط أحياناً، تتقزم النباتات. بعد ذلك كثير من الباحثين وصف المرض. إن هذا المرض قد نال قسطاً وافياً من الأبحاث مثل مرض الدرنة المغزلية فى البطاطس ومرض تقزم الأقحوان وهو لا يقل عنهما شأناً من الناحية العلمية.

إصابة نباتات حشيشة الدينار بفيرويد تقزم حشيشة الدينار يؤدى إلى خفض فى معدل النمو ولكنه لا يؤثر على معدل تكوين وخروج الأوراق ولا على إختفاء التركيب شبه المطوى الذى يغطى خلايا الابيدرمز. المخاريط الناتجة والمأخوذة من النباتات المصابة تكون صغيرة الحجم محتوياتها من الأحماض الاليفاتية منخفضة إلى النصف أو الثلث بالمقارنة مع النباتات السليمة. كذلك فإن الغدد (اللوبيولين Lupulin) تكون موزعة وأكثر إنتشاراً على القنيبات وعلى الأغلفة الزهرية وينخفض عدد هذه الغدد بنسبة تصل ٦٠٪ مقارنة مع النباتات السليمة. بالفحص والتصوير بالميكروسكوب الالكترونى تبين أن معظم الغدد اللوبيولينية الموجودة على أغلفة المخروط من النباتات المصابة تنكمش كثيراً وتذبل. أما الحبيبات الكروية (١,٢ ـ ١,٩ مليميكرون) لم تلاحظ على سطح هذه الغدد فى المخاريط المصابة.

أما خلايا الغدد الراتنجية فى المخاريط المصابة جهازياً، عند الفحص الدقيق لها وجد أنها تختلف فى نقطتين أساسيتين الأولى: الخلايا المصابة تكون ذات جدر خلوية مشوهة. الثانية: يظهر نقص كبير فى المواد Electron dens substance، وقد إكتشف أن هذه المواد تكون على شكل أملاح غير ذائبة والتى تكون مساوية لجزيئات الأحماض الالفاتية من المواد الراتنجية المفرزة بواسطة الغدد الراتنجية.

عند فحص القمم المرستيمية من نباتات حشيشة الدينار المصابة بفيرويد التقزم لملاحظة التغيرات السيتوبلازمية لم يلاحظ أى تغيرات فى قمة الفرع لغاية طول ٠,٢ ملم (هذه المنطقة تحمل القمة المرستيمية وزوجان من بداية الأوراق) ولكن فى خلايا الطبقة الثالثة من الأوراق المحيطة بالقمة لوحظت جدر الخلايا غير منتظمة واسمك منها فى النباتات السليمة، هذه الاضطرابات فى جدر الخلية تزداد لغاية الطبقة الخامسة المحيطية من الأوراق بالقمة وتزداد بزيادة الإصابة. كذلك بالإضافة لتشوة الجدر الخلوية يظهر عدم تعضى فى البلاستيدات الخضراء. أما أجسام Paramural فلم يطرأ عليها تغيير نتيجة الإصابة. أما جدر النواة والميتوكندريا

والرايبوسومات وجهاز الغشاء السيتوبلازمى لم يحدث عليهما تغيرات نتيجة الإصابة الفيرويدية. كما وجد بأن الإصابة الفيرويدية تسبب نقصاً فى التجذير ويكون هناك إضطرابات فى المحتوى الهرمونى فى النبات وخاصة هرمون أندول أستك أسد والسيتوكاينين.

مسبب المرض:

يتسبب مرض تقزم حشيشة الدينار عن فيرويد تقزم حشيشة الدينار(HSVd) Hop Stunt Viroid هذا الفيرويد يتكو ن من ٢٩٧ نيوكليتيدة متتابعة وقد يصل التتابع فى بعض السلالات إلى ٣٠٣ نيوكليتيدة. للفيرويد صفات ممرضة وصفات كيماوية مشابهة لفيرويد الثمرة الباهتة فى الخيار CPFVd ولكنه يختلف عن صفات فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس PSTVd. للفيرويد HSVd كفاءة ترسيب منخفضة، كذلك فإنه لا يثبط بالفينول أو الكلوروفوم، ويستخلص بالفينول ويترسب بالايثانول. درجة حرارة التثبيط للفيرويد ٨٤م لمدة عشرة دقائق. أما درجة التخفيف القصوى فى العصارة ١ : ٢٥٠٠. كما أن الفيرويد يفقد حيويته فى تخفيف ١ : ١٠٠٠٠ إذا حفظ يوم واحد على درجة حرارة ٢٠م ولكن ليس أكثر من ثلاثة أيام على درجة ٤م. عندما تترك أجزاء النبات والأوراق والمخاريط لتجف بالشمس فإن حيوية الفيرويد تفقد كلية خلال ٣ شهور.

طول الفيرويد إذا كان فى الشكل المستقيم شبه العصوى ٨٠ نانوميتر. وزنه الجزيئى ١٠٠٠٠٠ دالتون. لا ينتقل الفيرويد خلال حبوب اللقاح ولا البويضات. يمكن أن يبقى الفيرويد حياً فى الجهاز الجذرى لنباتات حشيشة الدينار خلال شهور الشتاء. ينتقل الفيرويد ميكانيكياً وتكون النتيجة أفضل عندما يتم الحقن فى الأوراق الأولى حول القمة النامية. كما أنه ينتقل إلى نباتات الخيار-**Cucumis sativum**. تظهر الأعراض النموذجية بعد ١٤ ـ ١٦ يوم من الحقن. درجات الحرارة أعلى من ٣٠م تلائم تكشف الأعراض الخارجية. درجة الحموضة المثلى لاستخلاص الفيرويد ٨ ـ ٩,٥ pH وأفضل طريقة فصل (استخلاص) تكون بمنظم High salt alkaline.

عند إجراء عملية فهرسة للنباتات المصابة بالفيرويد، يلاحظ أن النباتات المصابة بالفيرويد HSVd لا يلاحظ عليها أعراض فى السنة الأولى من حيث المظاهر الخارجية ولا النقص فى محتوى الأحماض الاليفاتية. أما فى السنة الثانية يمكن ملاحظة هذه الأعراض.

ولقد ذكر أن الفيرويد يكون موجوداً فى أجزاء النواة فى خلايا العائل المصاب ويكون تناسخه فى النوية. يكون الفيرويد HSVd كما فى بقية الفيرويدات موجوداً على شكلين الأول شكل مستقيم والثانى دائرى وإن كلا الشكلين يكون معدياً ويسبب مرض تقزم حشيشة الدينار.

كما وجد بأن cDNAs ثنائى الخيط المحتوى من ١ إلى ٣ وحدات طول متتابعة من HSVd يكون معدى، وأن نباتات الخيار المحقونة بهذا التركيب تكون أعراضها غير مميزة عن أعراض الإصابة بفيرويد HSVd كما فى جدول رقم ٤١.

جدول ٤١: الاختبارات الحيوية لفيرويد HSVd والأجزاء من ds - cDNA المحتوية أكثر من وحدة طول من RNA الخاص بالفيرويد، على نباتات الخيار الكاشفة.

الأحماض النووية فى التجربة	التركيز ميكوغرام / مللتر	* ٪ حيوية الفيرويد بعد		
		٢٠ يوم	٢٨ يوم	٣٥ يوم
Bam H 1 - 1 unit	٢	١٧	٣٤	٣٤
	٠,٤	صفر	صفر	صفر
Bam H 1 - 2 unit	٢	١٠٠	١٠٠	١٠٠
	٠,٤	٤٠	٤٠	٦٠
Bam H 2 - 3 unit	١,٥	صفر	٨٠	١٠٠
	٠,٣	١٦	٧٢	٩٣
HSVd RNA	٠,٥	٢٥	١٠٠	١٠٠
	٠,١	٥٠	١٠٠	١٠٠
كنترول ـ ماء	صفر	صفر	صفر	صفر

* كانت تحسب النسبة المئوية بحساب عدد النباتات المصابة على النباتات المحقونة.

كذلك فقد وجد أن التتابع الضرورى وجوده لكى يكون الحمض النووى معدى هو ٦٠ وحدة متتابعة مرتبة مرتين من الفيرويد HSVd من منطقة A (كما يأتى فى السلالات). إن منطقة A هى الحساسة ولها دور كبير فى إحداث العدوى. إذا تكون تركيب لا يحوى الستين نيوكليتيدة المتتابعة من منطقة A فلايكون هذا التركيب معدى.

العوائل المشخصة:

يعتبر نبات الخيار أكثر العوائل حساسية للكشف عن فيرويد HSVd. إن إختبار PAGE للخيار للكشف عن الفيرويد يحتاج ٩ ساعات. أما إنتظار ظهور الأعراض على نبات الخيار فيحتاج ٣٠ يوماً.

من العوائل المشخصة الهامة والمعروفة للفيرويد هى:ـ

1 - **Gynura aurantiaca**
2 - **Lycopersicon esculentum**
3 - **Benincasa hispida**
4 - **Cucumis sativus**
5 - **C. melo**
6 - **Lagenari siceraria**
7 - **L. Siceraria Var. siceraria**
8 - **L. S. Var. microcarpa**
9 - **Phaseolus vulgaris**
10 - **Helianthus annuus**

تظهر أعراض الفيرويد على نبات الخيار **C. sativus** على شكل تقزم، إبيضاض أو شفافية العروق، تجعد الورقة بعد ١٤ ـ ١٧ يوم من الحقن. كذلك فإن أعراض المرض تظهر على الخيار **C. melo** على شكل تقزم، تجعد الورقة وحدوث نكروزز فى قمة الورقة بعد ١٦ ـ ٢٢ يوم من الحقن وتموت أحياناً النباتات المصابة بشدة. أما بالنسبة لنباتات الطماطم فتكون الأعراض غير ظاهرة ويكون تركيز الفيرويد فيها منخفضاً عنه فى نباتات الخيار. لا ينتقل الفيرويد مع بذور الطماطم **L. eseulentum**.

يكون تأثير وسلوك الفيرويد HSVd والفيرويد (الثمرة الباهتة فى الخيار) CPFVd فى الجيل متماثلاً ويشابه 7S RNA المستخلص من النباتات السليمة.

ولقد ثبت فى بعض التجارب التى أجريت فى اليابان سنة ١٩٨٩ أن نبات الدخان **Nicotiana tabacum** يعتبر عائل لفيرويد HSVd بعد أن بقى لعدة سنوات يقال بأن نباتات الدخان مقاومة للإصابة بالفيرويد HSVd. وتمت هذه النتيجة بناءً على التجارب التى أدخل فيها HSVd - cDNA فى نبات الدخان بواسطة بلازمد Ti واكتشف تناسخ الفيرويد فى نباتات الدخان المحولة وراثياً Transgenic. ولقد إختبرت قابلية الدخان للإصابة بالفيرويد بطريقتين مختلفتين الأولى بالحقن عن طريق بكتيريا **Agrobacterium** والتى تسمى Agroinfection inoculation. أما الطريقة الثانية فهى الطريقة الميكانيكية العادية. مع أن الطريقة الميكانيكية كانت تستعمل فى التجارب السابقة، إلا أنها كانت تفشل فى نقل الفيرويد لنبات الدخان ويرجع سبب الفشل لعدم وجود التركيز الكاف من الفيرويد وحيث أن الخطوة الأولى فى الإصابة تكون بتثبيت الفيرويد وترجمته فى السيتوبلازم، وبالتالى فإن عدم كفاءة النقل الميكانيكى فى حقن الدخان يكون لعدم كفاءة نقل الفيرويد من السيتوبلازم إلى النواة.

التخلص من الفيرويد:

كما هو معروف فإن فيرويد HSVd ينتقل ميكانيكياً وحيث أن هذا الفيرويد يتأثر بكثير من المحاليل الكيماوية مثل ١ ٪ فورمالدهيد، ١ ٪ صوديوم هايدروكساييد، ٥ ٪ صوديوم هايبوكلورايد ٥ ٪ ترای صوديوم فسفيت، ٢ ٪ فورمالدهيد. كذلك يوصى باستعمال محلول ٥ ٪ كالسيوم هايبوكلورايت. كذلك فإن تسخين أنصال السكاكين الملوثة لمدة ١٠ دقائق على درجة حرارة ١٦٠°م كانت فعالة فى التخلص من الفيرويد. كذلك فإن تعريض الفيرويد لدرجة حرارة ١٤٠°م تمنع إنتقال الفيرويد.

يمكن منع النقل الميكانيكى عن طريقى غمر مقصات التقليم وسكاكين

القطع والأدوات الزراعية المستعملة فى الحقل لمدة عشرة دقائق فى أى من المحاليل السابقة الذكر.

سلالات الفيرويد:

إن فيرويد HSVd من الفيرويدات ذات السلالات الكثيرة وكل سلالة من هذه السلالات تستخلص من عائل نموذجى لها وتوضع أو تصنف السلالات المتقاربة جداً فى زمرة معينة كما فى جدول ٤٢ وشكل ٦٨.

جدول ٤٢: سلالات فيرويد حشيشة الدينار وأماكن وجودها.

زمرة السلالة والعائل	اسم السلالة	منطقة إنتشار السلالة	عدد النيوكليتيدات	الاختلاف فى النيوكليتيدات			Z تماثل السلالات
				استبدال	دخول	حذف	
Hop Type	Hop Stunt Viroid	اليابان	—	—	—	—	—
Hop	HSVd - hop	اليابان	٢٩٧	—	—	—	٪١٠٠
Peach	HSVd - Peach (A9)	اليابان	٢٩٧	١	صفر	صفر	٩٩,٧
Grapevine	HSVd - Grapevine	الصين اليابان*	٢٩٧	١	صفر	صفر	٩٩,٧
Plum Type	Hop - Plum Viroid	اليابان	—				—
Plum	HSVd - Plum	اليابان	٢٩٧	١٣	٣	٣	٩٣,٦
Peach	HSVd - Peach	اليابان	٢٩٧	١٣	٣	٣	٩٣,٦
Citrus Type	Hop - Citrus Viroid	اليابان	—				—
citrus	HSVd - Citrus - 1	اليابان	٣٠٢	٧	٧	٢	٩٦,٣
citrus	HSVd Citrus - 2	اليابان	٣٠٢	٧	٦	١	٩٧
cucumber	HSVd - cucumber	نذرلان	٣٠٣	٨	٧	١	٩٦,٣

* ينتشر الفيرويد فى كل من أمريكا ـ استراليا ـ فرنسا ـ اسبانيا ـ هنجاريا.

لقد وجد أن الفيرويدات المستخلصة من البرقوق Plum والخوخ Peach تكون متقاربة جداً مع فيرويد HSVd على أساس الصفات المرضية التى تسببها على نباتات العائلة القرعية (الخيار) وإن طريقة التحليل بواسطة PAGE، التهجين الجزيئى، تماثل تتابع النيوكليتيدات وأعراض هذه الفيرويدات على نباتات الخيار صنف (Suyo) كانت تقريباً نفس الأعراض المتسببة عن فيرويد HSVd المأخوذ من حشيشة الدينار والمأخوذ من العنب والمأخوذ من الخيار والمأخوذ من الحمضيات تحت نفس ظروف الصوبا الزجاجية. إن المدى العائلى للفيرويد المأخوذ من DF - plum يشابه الفيرويد المأخوذ من حشيشة الدينار والمأخوذ من الخيار. هناك فرق بسيط فى المدى العائلى أمكن تمييزه على نباتات الطماطم، فقد ذكر أنه لغايـة ١٩٩٠ فإن عزلة DF - plum لم يبدو أنها تصيب الطماطم ولكن الفيرويدات HSVd المعزولة من حشيشة الدينار والعنب والخيار والحمضيات تصيب الطماطم بدون إحداث أعراض ظاهرة.

التهجين الجزيئى وتحليل التتابع أظهر أن كلا الفيرويدين فيهما أكثر من ٩٠٪ تماثل تتابع مع عزلات HSVd. وبشكل خاص فإن عزلة DF - peach - A9 كانت تختلف بنيوكليتيدة واحدة عن HSVd المعزول من حشيشة الدينار و ٢ نيوكليتيدة فقط عن HSVd المعزول من العنب وبالتالى عرفت هذه الفيرويدات على أنها سلالات خوخ من HSVd ويشار إليها HSVd - peach. إن هذه العزلات الثلاثة متقاربة جداً مع بعضها البعض وتشكل زمرة واحدة تسمى زمرة حشيشة الدينار Hop type. ومن ناحية أخرى فإن سلالات DF - plum وDF - peach - AF لها نفس التتابع وهى بعيدة القرابة عن زمرة Hop type من مجموعة HSVd وهى أكثر قرابة وصلة مع عزلات HSVd من العنب الألمانى. وإن هذه العزلة الأخيرة تختلف فى ثمانية مواقع عن الفيرويد المعزول من حشيشة الدينار HSVd - hop وأن سبعة من هذه الثمانية هى نفس النيوكليتيدات فى DF - peach AF مع أن- DF

peach - AF تختلف بزيادة ١٢ موقع عن HSVd - hop، العزلة تكون نموذجية كما فى سلالة HSVd المأخوذة من البرقوق plum ويشار إليها HSVd - plum أو[HSVd - peach - AF] إن HSVd - plum و HSVd grapevine يبدو أنها تشكل زمرة البرقوق وتكتب plum type من مجموعة HSVd.

زيادة على ذلك فإن العزلات المأخوذة من الخيار والحمضيات المذكورة سابقاً متقاربة جداً مع بعضها البعض وتشكل زمرة الحمضيات Citrus type من مجموعة فيرويدات HSVd.

فى السنوات الأخيرة تم اكتشاف عزلات من HSVd من أنواع مختلفة من النباتات فى كثير من أقطار العالم ويمكن تصنيفها إلى ثلاثة زمر كما ذكر سابقاً وهذه الزمر الثلاثة هى زمرة حشيشة الدينار Hop type وزمرة البرقوق Plum type وزمرة الحمضيات Citrus type.

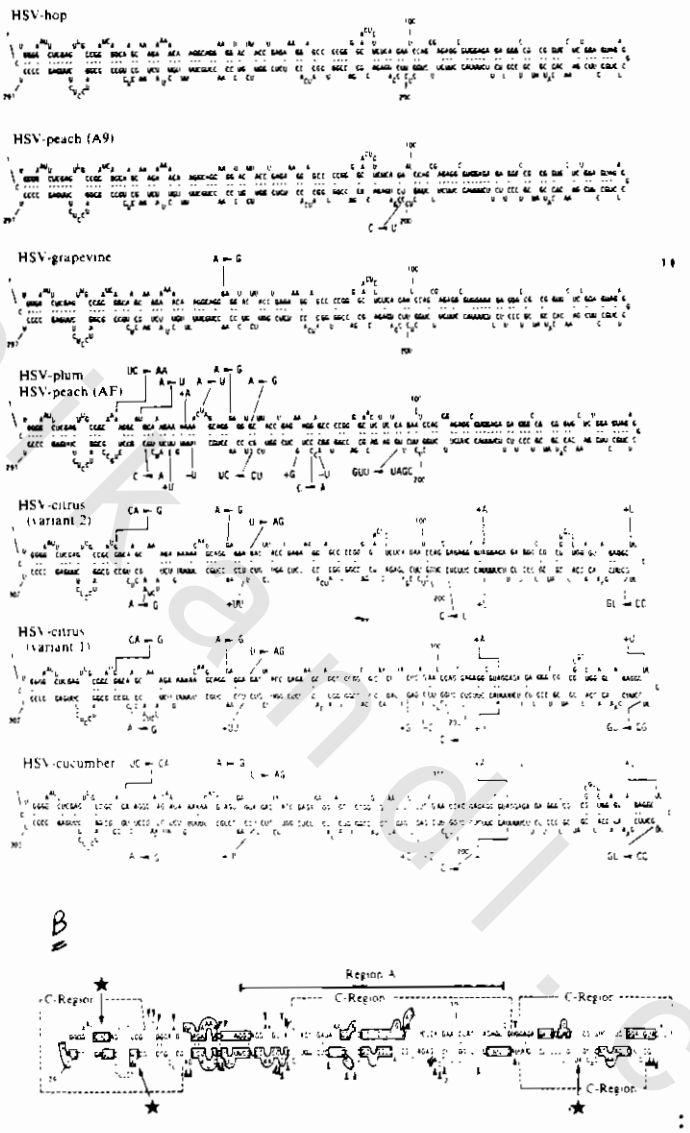
إن التحليل المقارن لتتابع نيوكليتيدات هذه الزمر يظهر وجود منطقة محفوظة ومنطقة متغيرة فى جزئ HSVd. الجزء العلوى من المنطقة المركزية المحفوظة (ذات القواعد من ٦٠ ـ ١١٤ فى السلالة المأخوذة من حشيشة الدينار HSVd - hop) نهاية اليد اليسرى ٢٦٧ إلى ٢٤ فى HSVd - hop، والجزء من اليد اليمنى من جزئ HSVd محفوظ (شكل ٦٨).

إن أهمية الجزء العلوى من المنطقة المركزية المحفوظة (على الشكل Region A) يكون فى تناسخ الفيرويد HSVd. إن المنطقة المركزية المحفوظة فى الجزء العلوى الملاحظة فى العزلات الطبيعية من HSVd متوافقة دائماً مع منطقة A فى الشكل والذى من المعتقد أنه يتضمن وصل الأزواج المستعملة فى تكاثر الفيرويد. بالإضافة إلى ذلك فإن الجزأين الأخيرين المشار إليهما سابقاً هى أيضاً ستكون مهمة فى تكاثر فيرويد HSVd، بسبب ثلاثة طافرات محدثة فى هذا الجزء عن طريق إحداث

طفرات فى المعمل والتى تجعل HSVd غير معدى. من ناحية أخرى فإن هناك مناطق مختلفة موجودة على جانبى المنطقة المركزية المحفوظة. إن الموقع الموجود عليه واحد منها فى الجهة اليسرى متوافق مع منطقة تغيير المرضية فى فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس وفيرويد اكسوكورتز الحمضيات مع أن جميع عزلات HSVd تحدث أعراضاً متشابهة على نباتات الخيار.

بالاعتماد على نتائج حقن العصارة والتحليل بواسطة PAGE يبدو أكثر احتمالاً بأن HSVd - plum يسبب مرض تنقر الثمرة على البرقوق صنف Taiyo. بالإضافة لذلك، على نبات الخوخ فإن HSVd - peach (AF) والذى هو مرادف للاسم HSVd - plum أو HSVd - peach - A9 يبدو أنها مترافقة مع أعراض تنقر الثمرة. إن هاتين العزلتين لهما تتابع نيوكليتيدات مختلف. إنHSVd - peach (AF) المعزول من الخوخ والتى تظهر أعراض تنقر الثمرة الشديدة لها نفس تتابع النيوكليتيدات كما فى HSVd - plum المأخوذة من الأعراض النموذجية لتنقر الثمرة فى البرقوق، ولكن HSVd - peach (A9) المعزولة من الخوخ المظهرة أعراض تنقر الثمرة البسيطة لها تتابع نيوكليتيدات مختلف.

نظراً لأن فيرويد HSVd المكتشف فى نباتات حشيشة الدينار اليابانية، فيه مجموعة مماثلة من هذه العوامل تسمى HSVd - group، قد تبين بأنها منتشرة بين أنواع عديدة من أشجار الفاكهة مثل العنب، الحمضيات، الخوخ والبرقوق، فإن بعضاً من هذه السلالات من فيرويد HSVd تسبب أمراضاً خطيرة على ال hop، الخيار، البرقوق وأحياناً الخوخ ولكنها تصيب العنب والحمضيات ومن المحتمل أن يكون لهذه النباتات (العنب والحمضيات تفاعل معين مع هذا الفيرويد HSVd).



شكل رقم ٦٨ :

A: مقارنة بين تتابع النيوكليتيدات فى DF - plum وDF - peach A9 وDF - peach AF التابعة إلى مجموعة HSVd. النيوكليتيدات المختلفة عن تلك التى فى HSVd يشار إليها بأسهم.

B: المناطق المحفوظة والمتغيرة فى جزئ HSVd (◭) تدل على المواقع حيث التغير فى تتابع النيوكليتيدة قد تميز بين السلالات. (▭) تدل على نهايات التتابع المشترك لفيرويد HSVd مع تلك فى فيرويد PSVd. (✦) تدل على مواقع الطفرات التى تجعل HSVd غير معدى عن طريق استعمال تكنيك الطافرات فى المعمل. C - Region تمثل المناطق المحفوظة. يلاحظ منطقة A الهامة فى تركيب الفيرويد.

ب ـ الفيرويد الكامن في حشيشة الدينار

Hop Latent Viroid

كان أول ذكر لمرض غير معروف المسبب يظهر على نباتات حشيشة الدينار فى اليابان سنة ١٩٧٧ بواسطة كل من Sasaki & Shikata وذكر هذان العالمان أن هناك بعض الخفض فى إنتاجية حشيشة الدينار ويوجد بعض الاضطرابات التركيبية فى المحتويات من الأحماض والراتنج الموجود فى النباتات المصابة، إلا أنهم لم يذكروا مسبب هذا المرض.

فى سنة ١٩٨٠ ظهرت خسائر واضحة فى جميع زراعات حشيشة الدينار، وبالرغم من أن الخسائر الاقتصادية كانت واضحة فى الانتاج، إلا أن مسبب المرض لم يحدد لأنه لا يوجد أعراض ظاهرة خارجية يمكن تمييزها على النبات وكانت الخسائر تقدر بدون الاعتماد على اسم المرض.

فى سنة ١٩٨٧ ذكر فى أسبانيا أن فيرويد وجد بالمصادفة أثناء الكشف عن فيرويد تقزم حشيشة الدينار، يرافق زراعات حشيشة الدينار وهو مميز عن فيرويد تقزم حشيشة الدينار، وقد إعتقد الباحثون أن هذا الفيرويد له علاقة مع بعض المظاهر المرضية فى هذا النبات. فى سنة ١٩٨٨ كان أول وصف علمى لهذا الفيرويد فى اليابان وذلك من قبل كل من Ramm & Sanger و Puchta وهذا الوصف مذكور فى مجلة Nucleic acid Res. العدد ١٦ صفحة ٤١٩٧ ـ ٤٢١٦.

سمى الفيرويد باسم الفيرويد الكامن فى حشيشة الدينار Hop Latent Viriod ويكتب HLVd. ينتشر هذا الفيرويد فى بريطانيا، اليابان، نذرلاند وأسبانيا.

الأعراض غير المنظورة:

ينتشر هذا الفيرويد فى معظم زراعات حشيشة الدينار فى العالم. يوجد فى النبات بدون إظهار أعراض مرئية، إلا أن هناك خسائر تعتبر أعراض غير مرئية تلاحظ فى

النباتات المصابة. يكون إنتاج المخاريط فى النباتات المصابة أقل منه فى النباتات غير المصابة. كذلك فإن وزن المخروط يقل فى النباتات المصابة بنسبة ٨ ٪ عنه فى النباتات السليمة، وبالتالى فإن الانتاج الكلى ينخفض ويصل خفض الإنتاج حوالى ٣٥ ٪. كذلك تنخفض نسبة الأحماض الأليفاتية فى النباتات المصابة بنسبة٣٠ ٪ عنها فى غير المصابة، فى بعض الأصناف يكون الخفض ١٥ ٪ فقط. أما أحماض بتا والتى هى beta - acids ترتفع فى النباتات المصابة بالفيروبد عنها فى النباتات السليمة. تنضج المخاريط فى النباتات المصابة قبل النباتات السليمة.

هناك بعض الملاحظات المرئية قد تعتبر أعراض نتيجة الإصابة بالفيروبد، من هذه الملاحظات تكون النباتات غير المصابة ذات لون أخضر هذا الخضار أشد منه فى النباتات المصابة والمجاورة وتكون هذه النباتات أكثر قوة More Vigorous بحيث أنها تصل بسهولة إلى الأسلاك الموجودة فى قمم السنادات (النبات متسلق ويصل النوع فى بريطانيا إلى طول خمسة أمتار ويعتمد على سنادات) وتعطى نموات طرفية غزيرة. كذلك فإنه قبل موسم الجمع فى سبتمبر يكون التمييز بين النباتات المصابة وغير المصابة غير لافتاً للنظر من حيث قوة النبات. النباتات المصابة تسمى النباتات غير القوية non - Vigorous. وثبت بالتجربة أن جميع النباتات غير القوية-non - Vigor ous مصابة بالفيروبد أما النباتات القوية تتراوح نسبة وجود الفيروبد فيها من ٥ ٪ ـ ١٥ ٪ ويلاحظ فى جدول ٤٣ تأثير الإصابة على كثير من محتويات المخاريط.

جدول ٤٣: الإنتاج وصفات المخاريط لنوعOmega من حشيشة الدينار مصاب بالفيروبدHLVd وأخرى غير مصابة.

حالة النبات	إنتاج المخاريط بالغرام / طازج	حجم المخروط عند الجفاف	القيمة الوصلية	٪ الأحماض الأليفاتية	٪ أحماض بتا	كوهيوبولين فى ٪ أحماض ألفا ٪	كولوبيولين فى ٪ أحماض بتا	الزيت ٪ حجم / وزن	مايرسين ٪ فى الزيت
مصاب	١٤٣٠	١٠٣	٧,٠٩	٦,٧٥	٣,٨	٣٣,٨٧	٥١,٠٧	٠,٧٨	١٩,٥٤
سليم	٢٢٦٦	١٥٦	٩,٣٥	٩,٧٢	٢,٩٣	٣٠,٦٥	٥١,٧٣	٠,٦٨	١٢,٥٧

الفيرويد:

اسم الفيرويد Hop Latent Viroid (HLVd). يتكون الفيرويد من تتابع ٢٥٦ نيوكليتيدة. له عائلين فقط هما **Humulus lupulus** و **H. japonicus**. يمكن اكتشاف الفيرويد فى بقايا النبات بعد أن تكون جميع الأجزاء الهوائية قد ماتت فى الشتاء وذلك باستعمال طريقة Dot - blot hybridization. من السهل كذلك اكتشاف الفيرويد فى نسيج الأجزاء الهوائية فى منتصف الموسم الثانى للنمو ومن الصعب اكتشافه مبكراً فى بداية موسم النمو. يمكن اكتشاف الفيرويد أيضاً بسهولة بين بداية الموسم ومنتصفه ويمكن كذلك اكتشاف الفيرويد فى قواعد السيقان الجديدة ثم بعد ذلك ينتشر كلما تقدمت النباتات فى النمو ويصبح قابل للاكتشاف عندما يصل قريباً من القمة النامية من السيقان فى منتصف الموسم، تقريباً فى الوقت الذى تكون فيه معظم استطالات النمو إنتهت وبدأ الازهار. تكون أعناق الأوراق أكثر الأنسجة كفاءة للإختبار ولإثبات وجود الفيرويد، وذلك لسهولة جمعها ولكبر نصل الورقة وقلة وجود المثبطات بها. إن التهجين فىDot - blot أو فى الموقع قد فشلا فى اكتشاف الفيرويد HLVd فى قمم الأفرع من النباتات النامية على درجات حرارة منخفضة ١٠ْم و ١٥ْم. ولذلك فإن هناك فشل فى إنتاج نباتات خالية من الفيرويد فى مزارع القمة المرستيمية فى المعمل. هذا يؤدى إلى القول بأن هذه الأجزاء تحتوى فيرويد HLVd ولكن بمستوى منخفض جداً بحيث لا يمكن اكتشافه بأى من الطريقتين.

إن هذا الفيرويد ينتشر بشكل كبير جداً فى بريطانيا بحيث أن جميع زراعات حشيشة الدينار تقريباً تصاب به. لقد أجرى إختبار لوجود الفيرويد HLVd بطريقة Nucleic acid hybridization باستعمال ٤٧٦ عينة مأخوذة من زراعات تجارية وإن هذه العينات تمثل نصف إنتاج حشيشة الدينار فى بريطانيا، لقد أمكن اكتشاف الفيرويد فى ١٧ ٪ من العينات وتتراوح نسبة الإصابة فى العينات من صفر٪ إلى ٨٩ ٪.

لقد وجد أن هذا الفيرويد موجود فى جميع الأصناف الحساسة لفطر الذبول **Verticillium** باستثناء صنف واحد اسمه Sunshine وهو صنف قديم ينمو فى مزرعة واحدة فى بريطانيا. كما وجد أن هناك صنفان أقل تحملاً لفطر الذبول، إلا أن الإصابة الفيرويدية فيهما بكمية أقل. ولكن الأصناف التجارية الهامة المتحملة للذبول كلها تكون غير مصابة بالفيرويد HLVd. جدول ٤٤ يبين الأصناف الحساسة لفطر الذبول ونسبة الإصابة الفيرويدية فيها.

ينتقل الفيرويد ميكانيكياً بالحقن بالعصارة وله شكلان دائرى ومستقيم وإن تتابع النيوكليتيدات ٢٥٦ تترتب فى تركيب ثانوى، وفيه منطقة مركزية محفوظة مثل بقية الفيرويدات ولكن ليس فيه ما يسمى Viroid - specif oligo A فى الجزء الأيمن العلوى فى شكل الجزئ شبه العصوى.

جدول ٤٤: الإصابة الفيرويدية فى مخاريط حشيشة الدينار المأخوذة من أصناف حساسة لذبول الفيرتسليم وغير حساسة. يلاحظ أن الجدول قسمين يمينى ويسارى.

الصنف (حساس) غير متحمل للذبول	عدد النباتات المختبرة	عدد النباتات المصابة	٪ إصابة	٪ إصابة	عدد النباتات المصابة	عدد النباتات المختبرة	الصنف متحمل للذبول
Fuggle	٧٩	٧	٩	١٢	١	٨	Bramling cross
Goldings	٤٦	٢٠	٤٣	٨	١	١٢	Progress
Omega	٢٨	٢٥	٨٩	صفر	صفر	١٦	WGV
Sunshine	١	صفر	صفر	صفر	صفر	٨٢	Wye Target
wye challenger	٧٨	١١	١٤	صفر	صفر	٤٥	Yeoman
wye North down	٧١	١١	١٥	٥٠	١	٢٠	EMY
Zenith	٨	٥	٦٢				

٦ ـ فيرويدات الطماطم

Tomato Viroids

أ ـ مرض النبات الذكرى فى الطماطم

Tomato Planta Macho Disease

مقدمة:

كان أول وصف لهذا المرض فى المكسيك سنة ١٩٧٤ وذلك بواسطة Belalcazar & Galindo. ونتيجة أبحاثهما المستمرة على هذا المرض ذكرا أنه يتسبب عن عامل معدى سهل الانتقال ميكانيكياً ويصعب إنتقاله بالوسائل الأخرى. إن هذا المرض ينتشر فى الحقل عن طريق احتكاك المجموع الخضرى للنباتات المريضة مع المجموع الخضرى للنباتات السليمة وبالأيدى والأدوات الزراعية الملوثة. أجريت تجارب عديدة لمعرفة المسبب ومن هذه التجارب معاملة العصارة المستخلصة من النباتات المريضة بطرق الكشف والتحاليل المختلفة، تبين أن هناك أجزاء صغيرة جداً ومعدية موجودة فى مستخلص الأوراق المريضة وبناءً على هذه النتائج إعتبر المرض بأنه يتسبب عن فيرس. باستمرار الأبحاث أحاطت الشكوك بهذه النتائج مما حدى بالعالم Galindo ومرافقه أن يستمرا فى البحث وخاصة باتجاه الفيرويد لأن علم الفيرويدات كان قد نشأ علماً شاباً يافعاً وبدأت الأبحاث تتسابق إليه. وهكذا استطاع الباحثان أن يثبتا بأن الأجزاء المعدية ليست فيرس وذلك بالاعتماد على الميكروسكوب الالكترونى والآلات المبعثرة للضوء وغيرها. وعندما حضرا حمض نووى من الحزم المبعثرة للضوء وإجراء فصل للأحماض النووية Fractionated

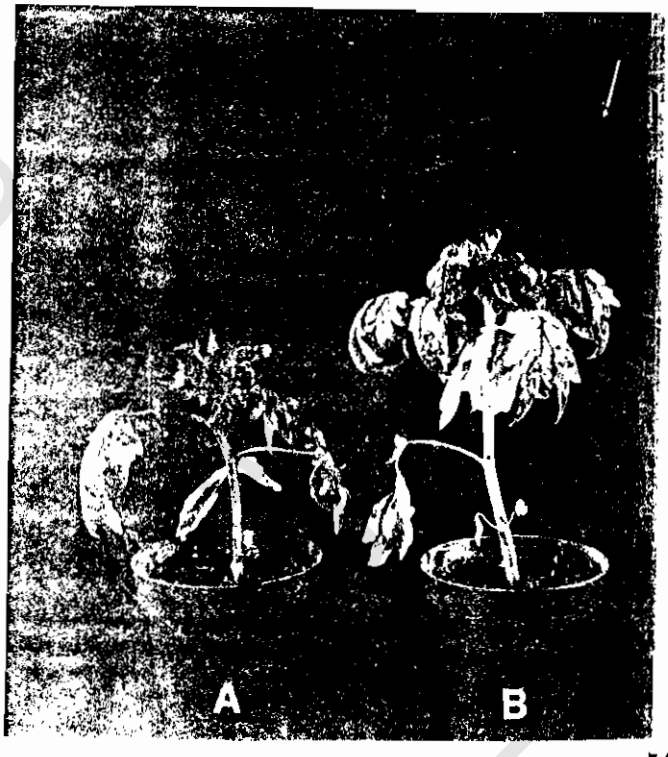
وذلك بالمعاملة بكلوريد الليثيوم وجدا أن هناك جزئ عال الشدة فى العدوى فى محلول كلوريد الليثيوم LiCl - soluble fraction وإفترضا أن هذه الأجزاء ليست فيرس وذلك بسبب أن الأحماض النووية فيها كانت ذات وزن جزيئى منخفض نسبياً. لقد تأكد العالمان أن المسبب فيرويد وليس فيرس وقررا أن مرض النبات الذكرى فى الطماطم Tomato Planta Macho Disease يتسبب عن فيرويد وليس عن فيرس. كذلك فإن المسبب الفيرويدى لهذا المرض يمكن تأكيده على أساس الأعراض التى تظهر على العائل والتى تشبه تلك الأعراض المتكونة على الطماطم المصابة بمرض Tomato Bunchy Top Disease، وكذلك يشبه الأعراض المتكونة على الطماطم نتيجة الإصابة بفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس وكذلك يشبه الأعراض المتسببة على الطماطم من الإصابة بفيرويد اكسوكورتز الحمضيات وبالتالى تأكد أن مرض النبات الذكرى فى الطماطم يتسبب عن فيرويد.

الأعراض:

عرف هذا المرض فى المكسيك وهو يهاجم الطماطم **Lycopersicon esculentum** المزروعة فى جميع ولايات المكسيك وخاصة فى منطقة Cuahutla المشهورة بزراعة الطماطم وخاصة للتصدير. يعرف المرض فى تلك المنطقة باللهجة المحلية باسم (Planta Macho) يعنى النبات الذكر وذلك بسبب أن النباتات التى تصاب بالمرض لا تنتج ثمار تسوق، فى بعض السنوات يسبب المرض خسائر كبيرة وأحياناً يسبب فقد كامل فى المحصول.

النباتات المصابة تعانى من التقزم الشديد وتتدلى الأوراق والوريقات ويأخذ النبات المظهر المتهدل وكأنه مرشوش بمبيدات الحشائش عريضة الأوراق أو كأنه يعانى من العطش الشديد (شكل ٦٩). الأوراق المتقدمة فى السن تأخذ اللون الأصفر ثم تجف وتسقط، تصبح أنصال الوريقات متجعدة وهشة وسريعة الانكسار. تحت الظروف المثلى المناسبة للمرض يمكن أن يتكشف نكروزز فى عروق الأوراق والساق.

أهم مظهر يميز هذا المرض هو أن النباتات المصابة تنتج كثيراً من الأزهار والثمار أكثر من النباتات السليمة، إلا أن هذه الثمار تبقى صغيرة جداً لا يزيد حجمها عن حجم البلية (marlbes) وليس لها أية قيمة تسويقية أو إقتصادية.



شكل رقم ٦٩ :

أعراض الإصابة بمرض فيرويد النبات الذكرى فى الطماطم على المجموع الخضرى.

A: أعراض شديدة B: أعراض متوسطة

المسبب :

يتسبب مرض النبات الذكرى فى الطماطم عن فيرويد اسمه فيرويد النبات الذكرى فى الطماطم Tomato Planta Macho Viroid. ويكتب باختصار (TPMVd). يتكون هذا الفيرويد من ٣٦٠ نيوكليتيدة. عند تحضير معلقات لمستخلصات النباتات المصابة بالمرض وحقنها فى البادرات السليمة، تبين أن

الأعراض تبدأ فى الظهور بعد ٢١ يوم من الحقن وتزداد أكثر إبتداءً من ٢٦ يوم بعد الحقن. ولقد وجد أن هذا الفيرويد إذا حضن مع RNase يفقد حيويته نهائياً أما إذا حضن مع DNase فلا يتأثر بذلك (مثل بقية الفيرويدات) ولقد وجد أن سرعته فى الهجرة الكهربائية مشابهة لسرعة فيرويد PSTVd، واعتماداً على هذه الصفة برز سؤال أمام جميع العاملين على هذا الفيرويد هو هل هذا الفيرويد سلالة من سلالات PSTVd أم لا ؟؟. عندئذ إتجهت الأبحاث لتحديد العلاقة بين فيرويد النبات الذكر فى الطماطم TPMVd وفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس PSTVd. وباستعمال الطرق الحيوية وطرق التحليل الكيميائية مثل Finger prints تبين أن فيرويد TPMVd هو فيرويد منفصل وليس سلالة شديدة كما كان يقال من سلالات PSTVd وذلك اعتماداً على: ـ

١ ـ لقد تبين أن هناك أنواعاً كثيرة من النباتات مقاومة للإصابة بفيرويد TPMVd ولكنها قابلة للإصابة بالفيرويد PSTVd.

٢ ـ هناك أنواع من النباتات العائل يستطيع الفيرويدان أن يتكاثرا فيها ولكن PSTVd يحدث أعراض فى هذه العوائل فى حين أن TPMVd لا يسبب فيها ظهور أية أعراض.

٣ ـ وجد أن هناك أنواع نباتية مشخصة أخرى لهذا الفيرويد TPMVd منها نبات **Gynura aurantica**. فمن المعروف أن فيرويد PSTVd وفيرويد اكسوكورتز الحمضيات CEVd يصيبان هذا النبات ويتكاثران فيه (تتناسخ) وتظهر عليه أعراض مميزة، ولكن هذا النبات عند حقنه بالفيرويدTPMVd فإن هذا الفيرويد يتناسخ فى النبات (يتكاثر) وذلك بعد ٣ أسابيع من الحقن، ولكن هذا النبات لا يظهر عليه أعراض إصابة بالفيرويد TPMVd ويبقى Symptomless.

٤ ـ كذلك فإن الفيرويد TPMVd والفيرويد PSTVd تتشارك فى كثير من العوائل ولكنهما يختلفان إختلافاً معنوياً فى تفاعلهما مع هذه العوائل من

حيث القابلية للإصابة والتعبيرات المرضية. فوجد أن كل من **Gomphrena globosa** ، **Datrura stramonium** و **Nicotiana - tabacum** ، هذه الثلاثة عوائل مناسبة PSTVd للفيرويد ويتكاثر فيها (يتناسخ) ولكنها لا تدعم الفيرويد TPMVd وتساعده على التناسخ (التكاثر) أما العوائل:

1 - **Nicotiana glutinosa**

2 - **Solanum melongena**

3 - **Solanum tuberosum**

هى عوائل للفيرويدين ولكنها تصاب فقط بفيرويد الدرنة المغزلية PSTVd وتظهر عليها أعراض مرضية ولا يظهر عليهـا أعـراض مرضية إذا أصيبت بالفيرويد TPMVd.

هذه المميزات أكدت للباحثين أن فيرويد TPMVd هو فيرويد منفصل وليس سلالة شديدة من سلالات فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس PSTVd.

إنتشار الفيرويد TPMVd فى النباتات المصابة:

إن جدول ٤٥ يبين أن الفيرويد TPMVd أمكن اكتشافه فى جميع أجزاء نباتات الطماطم المصابة. أما الأوراق الناضجة التى لم يظهر عليها أعراض وجدت باستمرار تحتوى كميات أقل مما هو موجود فى الأوراق الصغيرة المظهرة للأعراض. وجدت أكبر كمية من الفيرويد TPMVd فى السيقان والجذور. أما جدول ٤٦ يبين أن الفيرويد متواجد فى جميع الأجزاء تحت الخلوية فى النبات باستثناء ال Postribosomal ووجد أن خلايا الورقة فيها مستويات عالية من الفيرويد موجودة فى أجزاء من الأنوية. أما فى خلايا الساق فإنه يوجد نسبة بسيطة من الفيرويد مرافقة للنوية. معظم الفيرويد متواجد فى الميتوكندريا والأغشية ويوجد بنسبة منخفضة جداً فى البلاستيدات الخضراء والرايبوسومات.

الوقاية بالتضاد Cross - Protection :

كما هو معروف فإن إصابة نباتات الطماطم بالسلالة المعتدلة من فيرويد PSTVd يقيها من إظهار الأعراض (التعبيرات المرضية) عند حدوث إصابة ثانية بالسلالة الشديدة من PSTVd أو الإصابة بفيرويد اكسوكورتز الحمضيات CEVd. إعتماداً على ذلك إتجهت الأبحاث لمعرف فيما إذا كانت إصابة نباتات الطماطم بالسلالة المعتدلة من PSTVd يمكن أن تحفظ النباتات من الإصابة أو إظهار التعبيرات المرضية عند حقنها بالفيرويد TPMVd بعد مدة من حقنها بالسلالة المعتدلة من الفيرويد PSTVd.

جدول ٤٥ : التركيز النسبى لفيرويد TPMVd فى أجزاء مختلفة من نباتات الطماطم.

جزء النبات	الفهرسة الحيوية	
	تجربة أولى	تجربة ثانية
جذر	٤٤	٥٩
ساق	٦٥	٤٨
الورقة الأولى والثانية غير مظهرة أعراض	٤٠	٤٥
الورقة الثالثة والرابعة مظهرة أعراض	٥٣	٥٨

ملاحظات:

التجربة الأولى: كانت درجة الحرارة فى الصوبا الزجاجية منخفضة وكانت الأعراض متوسطة.

التجربة الثانية: كانت درجة الحرارة فى الصوبا الزجاجية ٢٩°م والأعراض شديدة.

كانت تستعمل أربعة تخفيفات للفيرويد وهى ١ ـ بدون تخفيف ٢ ـ تخفيف ١ : ١٠، ٣ ـ تخفيف ١ : ١٠٠ أو تخفيف ١ : ١٠٠٠، ٤ ـ تخفيف ١ : ١٠٠٠٠

كانت الفهرسة الحيوية تجرى كما فى بقية أنواع التجارب بدون تمييز.

كانت تحقن النباتات فى طور الفلقات بمستخلص من نباتات مصابة بالفيريد ثم توضع فى الصوبا الزجاجية حتى تصل طول أربعة ورقات ثم يؤخذ منها المستخلص ويقدر فيه الفيرويد.

جدول ٤٦ : توزيع الفيرويد TPMVd فى الأجزاء تحت الخلوية فى ورقة الطماطم ونسيج الساق.

جزء الخلية المختبر	الفهرسة الحيوية	
	الساق	الأوراق
النواة	٦	٢٦
البلاستيدات الخضراء	١٤	١٨
الميتوكندريا	١٩	٩
الأغشية الخلوية	١٨	٢٤
الرايبوسومز	١٢	١٩
بوست رايبوسومال	صفر	صفر

ملاحظات:

كانت تجرى عملية الفهرسة الحيوية كما فى أى تجربة أخرى.

الأجزاء تحت الخلوية تؤخذ من النباتات المظهرة الأعراض النموذجية.

أجريت تجارب على ثلاثة مجموعات من بادرات الطماطم كل مجموعة فيها أربعة بادرات، حقنت بالسلالة المعتدلة من الفيرويد PSTVd ثم بعد ذلك حقنت بالفيرويد المتحدى TPMVd بعد ٥، ١١، ١٧ يوم. ثم حقنت ثلاثة مجموعات أخرى بالفيرويد TPMVd لوحده أيضاً على فترات ٥، ١١، ١٧ يوم وذلك لمقارنة الأعراض وتأثيرات النمو على كل فيرويد. ثم حقنت ثلاثة مجموعات من بادرات الطماطم بالسلالة المعتدلة من PSTVd لوحدها.

يبين جدول ٤٧ أن النباتات المصابة بالسلالة المعتدلة من فيرويد PSTVd لوحدها لها تأثير قليل على نمو النباتات وتؤدى إلى إصابة متوسطة، بينما الإصابة بالفيرويد TPMVd لوحده يؤدى إلى خفض شديد فى طول النباتات ويسبب أعراض شديدة.

عندما حقنت النباتات بالفيرويد المتحدى TPMVd بعد خمسة أيام من الحقن بالسلالة المعتدلة من PSTVd فإن التقزم الملاحظ فى النباتات قد إنخفض قليلاً، بمـرور ١٦ ـ ٤٠ يـوم بعد الحقـن الأول فإن الأعراض كانت أقل شدة إلى حد ما.

عندما حقنت النباتات بالفيرويد المتحدى TPMVd بعد ١١ و ١٧ يوم من الحقن بالسلالة المعتدلة من فيرويد PSTVd لم يلاحظ تغيرات معنوية فى النمو بين النباتات المحقونة بالفيرودين وبين تلك النباتات المحقونة بالفيرويد TPMVd لوحده وذلك بسبب أن موعد الحقن متأخر نوعاً ما وأن النباتات أصبحت أكبر عند حقنها بالفيرويد TPMVd وبالتالى فإن التأثير على النمو إنخفض كثيراً بالمقارنة فى التجربة التى فيها تم الحقن بالمتحدى بعد خمسة أيام. عند المقارنة مع الكنترول كان هناك خفض قليل فى شدة الأعراض لوحظ ثانية فى النباتات المحقونة بالفيرودين، هذا لوحظ بعد ٩، ٤٠ يوماً بعد الحقن الأول فى الاختبار مع المتحدى على يوم ١١ ولكن فقط ٤٠ يوم بعد الحقن الأول فى الاختبار مع المحتدى على يوم ١٧.

ويمكن القول باختصار أن جميع الإختبارات تدل على أنه، بغض النظر عن مدة الزمن التى تفصل بين حقن النباتات بالسلالة المعتدلة من PSTVd والفيرويد المتحدى TPMVd، يحدث هناك تداخل بسيط فى التعبيرات الكاملة لمرض النبات الذكرى فى الطماطم تحدث فى النباتات المحقونة بالفيرودين. هذا التداخل كان بسيطاً بحيث لا ينظر إليه وكأنه ظاهرة وقاية بالتضاد cross - protection. هذا يتأكد بملاحظة أن النباتات المحقونة بالفيرودين، فإن أعراض مرض النبات الذكرى تظهر باستمرار مبكراً وكانت بشكل أولى أكثر شدة فى النباتات الكنترول التى حقنت بالفيرويد TPMVd فى نفس الوقت الذى حقن فيه الفيرويد PSTVd. قد يمكن تفسير ذلك بأنه نوع من ال Synergistic أكثر منه Antagonistic بين الكائنين الممرضين.

جدول ٤٧: تأثير إصابة نباتات الطماطم بالسلالة المعتدلة من الفيرويد PSTVd على التعبيرات المرضية للإصابة بالفيرويد TPMVd.

نظام الحقن (التجربة)	طول النبات سم بعد يوم			كثافة الأعراض على يوم			
	١٦	٢٩	٤٠	١٣	١٦	٢٩	٤٠
١ ـ بداية الحقن							
أ ـ سلالة فيرويد PSTVd المعتدلة لوحدها	١٦	٢٧	٣٣	+	++	++	++
ب ـ فيرويد TPMVd لوحده	١٠	١٢	١٣	+++	+++	++++	++++
جـ ـ كنترول	١٨	٢٩	٣٥	—	—	—	—
٢ ـ حقن المتحدى بعد خمسة أيام							
أ ـ PSTVd - m / TPMVd	١٣	١٤	١٦	++	++	+++	+++
ب ـ فيرويد TPMVd لوحده	١١	١١	١٣	+	+++	++++	++++
جـ ـ كنترول	١٨	٣٢	٣٧	—	—	—	—
٣ ـ حقن المتحدى بعد ١١ يوم							
أ ـ PSTVd - m / TPMVd	١٦	٢٣	٢٦	—	++	++	++
ب ـ فيرويد TPMVd لوحده	١٨	٢٤	٢٦	—	—	+++	+++
جـ ـ كنترول	٢٥	٣٧	٤١	—	—	—	—
٤ ـ حقن المتحدى بعد ١٧ يوم							
أ ـ PSTVd - m / TPMVd	١٧	٢٨	٣١	?	?	++	++
ب ـ فيرويد TPMVd لوحده	١٨	٣٠	٣٠	?	?	—	+++
جـ ـ كنترول	٣٠	٤٢	٤٦	—	—	—	—

ملاحظات:

PSTVd - m تعنى سلالة فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس المعتدلة.

—: لا يوجد أعراض، ?? لم يجرى لها إختبار، (+) أعراض بسيطة (++) أعراض متوسطة، (+++) أعراض شديدة، (++++) أعراض شديدة جداً. كان يستعمل متوسط طول أربعة نباتات.

نباتات الكنترول التى لم تحقن بأى من الفيرويدين لم تظهر عليها أعراض لأنها سليمة.

العوائل الطبيعية للفيرويد:

اجريت تجربة لتحديد العوائل الطبيعية للفيرويد، جمعت بذور ٥٣ نوع نباتى تمثل ١٥ عائلة نباتية توجد بالقرب من مزارع الطماطم فى المكسيك. حقنت البادرات الناتجة من هذا البذور ميكانيكياً بالفيرويد TPMVd. كانت النتيجة أن أصيب ١٣ نوع من النباتات كلها تتبع العائلة الباذنجانية. وجد أن ثمانية أنواع من هذه الثلاثة عشر تصاب طبيعياً بالفيرويد كان أهمها **Solanum torvum** وإن شدة الأعراض تتراوح من إصابة بسيطة جداً كما فى كل من **Solanum nigrescens** و **Physalis phyladelphica** إلى إصابة شديدة جداً كـما فى **Lycopersicon escu-lentum**. وجد أن نسبة تركيز الفيرويد فى جميع العوائل الطبيعية تكون عالية فى فترة الخريف بنسبة ١٤,٥٪ أكثر منها فى الربيع والصيف حيث تكون النسبة ٠,٤٪. بعد أن عرف بأن الفيرويد ينتشر فى ١٩ ولاية فى المكسيك درس التوزيع الجغرافى لهذا المرض وتأثير البيئة فى ذلك فوجد أن الخط الحرارى (الذى يحدد درجات الحرارة) الذى يحدد ٢٢°م هو الحدود الفاصلة بين المناطق التى يوجد فيها الفيرويد فى الزراعات البرية لنباتات العائلة الباذنجانية والمنطقة التى لا يوجد فيها الفيرويد، على هذه النباتات ووجد أنه ينتشر فى مقاطعة Tepalcingo بنسبة ٣٢,٥٪ فى نباتات الطماطم. بناءً على هذه النتائج إتجه البحث لمعرفة العامل الناقل للفيرويد والذى يجب أن يتوفر فى الشتاء والخريف ولا يظهر فى الربيع والصيف.

إنتقال الفيرويد:

سبق وأن ذكرنا أن فيرويد TPMVd ينتقل ميكانيكياً بسهولة سواء بالاحتكاك أو بالأدوات الزراعية الملوثة أو أثناء إجراء العمليات الزراعية والملامسة بالأيدى الملوثة. إن دراسة إنتشار الفيرويد والظروف الحرارية التى تحيط بانتشاره جعلت الباحثين لا يقفوا مكتوفى الأيدى ويكتفوا بالقول بأن الفيرويد ينتقل ميكانيكياً. إستمرت الأبحاث المضنية أربع سنوات على هذا الفيرويد لمعرفة طرق إنتقاله، أعطت هذه الأبحاث نتائج مثمرة وذلك باكتشاف ناقل حشرى ولتأكيد هذا استمر البحث

على هذا الناقل مدة ستة شهور بعد ذلك صدر القرار النهائى وهو أن حشرة المن **Myzus Persicae** هى الناقل النشيط لهذا الفيرويد. إن حشرة المن المذكورة تتجمع على نباتات الفاسيالز من العائلة الباذنجانية **Physalis aff foetens** وهو نبات برى عائل للفيرويد وأن حشرة المن تعيش على هذا النبات وبالتالى تنقل الفيرويد من العائل البرى إلى النباتات المزروعة. لقد وجد أيضاً أن جميع أطوار الحشرة قادرة على أن تنقل هذا الفيرويد. ولقد وجد أيضاً أن هذا العائل يؤثر على درجة النقل بحشرة المن عندما يستعمل كمصدر للفيرويد.

إن نبات **Physalis aff foetens** يلائم إنتقال الفيرويد بنسبة ٩٧٪ بينما نباتات الطماطم لا تساهم فى نقل الفيرويد إلا بنسبة ٣٣٪. وجد أن الفيرويد يبقى فى الحشرة لمدة ٢٤ ساعة بعد اكتسابها له. يبدو أن الحشرة تتكاثر على سبعة أنواع من النباتات والتى هى أيضاً عوائل للفيرويد.إن نبات **Solanum rostratum** هو أكثر الأنواع مناسبة لتكاثر الحشرة وبالتالى لإنتشار الفيرويد. أما نبات الطماطم فهو أقل الأنواع ملائمة لتكاثر الحشرة الناقلة. إن الحشرة تزداد أعدادها إلى أقصى حد فى شهر يناير وتصل أدنى حد من التكاثر فى شهر مايو وهذا ما يتوافق مع إنتشار الفيرويد على نباتات الطماطم ويمكن اعتماداً على ذلك وضع برنامج جيد لمقاومة الحشرة وبالتالى مقاومة الفيرويد بطريق غير مباشر.

ب ـ مرض تقزم قمة الطماطم

Tomato Apical Stunt Disease

يتسبب هذا المرض عن فيرويد تقزم قمة الطماطم(TASVd) Tomato Apical Stunt Viroid. لهذا الفيرويد سلالتين السلالة الأولى اسمها سلالة ساحل العاج وتتكون من ٣٦٠ نيوكليتيدة والثانية سلالة إندونيسيا وتتكون من ٣٦٣ نيوكليتيدة. تبلغ نسبة تماثل التتابع فى هذا الفيرويد ٩١٪. يسبب أعراض شديدة على الطماطم صنف Rutgers.

تظهر الأعراض على شكل تقزم فى قمة النبات بحيث تقصر السلاميات وتصغر الأوراق (شكل ٧٠). تصفر الأوراق السفلية وتسقط تبقى النباتات ضعيفة وينخفض الإنتاج كثيراً. ينتقل الفيروید ميكانيكياً بسهولة عن طريق تلوث الأيدى والأدوات الزراعية وأثناء العمليات الزراعية.

هناك تجارب كثيرة على هذا الفيروید بحيث يتكون فيروید جديد مركب من جزيئين جزء من فيروید تقزم القمة فى الطماطم والجزء الثانى من فيروید الدرنة المغزلية فى البطاطس أو فيروید اكسوكورتز الحمضيات. وبالفعل أمكن تركيب فيروید جديد فيه صفات الفيرودين وهذه أبحاث كثيرة لا مجال لذكرها هنا.

شكل رقم ٧٠ :

أعراض الإصابة بفيروید تقزم القمة فى الطماطم.

١ ـ كنترول ٢ ـ الإصابة بالعزلة الأندونيسية ٣ ـ الإصابة بعزلة ساحل العاج.

جـ ـ مرض القمة الشجيرية في الطماطم

Bunchy Top Disease of Tomato

مقدمة :

كان أول وصف لهذا المرض فى جنوب أفريقيا وذلك سنة ١٩٣١ من قبل العالم McClean. إستمرت أبحاث هذا العالم على مرض القمة الشجيرية فى

الطماطم لغاية سنة ١٩٣٥ وذكر بأن هذا المرض ينتشر فى جنوب أفريقيا ويسبب خسائر كبيرة فى محصول الطماطم ونشر أول بحث عن هذا المرض فى مجلة اسمها South African Department of Agriculture Science Bulletin 139. ذكرت الأعراض ونسبة الإصابة والخسائر إلا أن مسبب المرض إفترض على أنه فيرس، مع ذلك فإن طرق الانتقال وصفات المسبب لم توضح فى تلك الأبحاث وبقيت الشكوك محيطة بهذا المسبب المرضى. فى سنة ١٩٧٩ ذكر هذا المرض فى الهند وأجريت عليه تجارب عديدة إلا أنها لم تحدد المسبب ولا طريقة الانتقال. فى سنة ١٩٨١ كان هناك وصف لهذا المرض فى المجلة العلمية الأكاديمية فى غرب أفريقيا. إن مرض القمة الشجيرية فى الطماطم ينتشر فى الهند بشكل كبير ويسبب خسائر كبيرة ولذلك يسمى باسم مرض القمة الشجيرية الهندى فى الطماطم Indian Bunchy Top Disease of Tomato. أجريت تجارب عديدة على مسبب المرض فى الهند وإتجهت هذه الأبحاث إلى الفيرويد واستبعدت الفيرس. لقد عزل الفيرويد من نباتات الطماطم **Lycopersicon esculentum** المصابة بمرض التقزم الشجيرى الهندى. باستعمال طرق الإختبارات Blot hybridization بالمنقب cRNA المعلم بالفسفور المشع ٣٢ المخصص لاكتشاف الفيرويدات المختلفة، وجد أن هذا الفيرويد الهندى شديد التقارب والعلاقة مع فيرويد اكسوكوترز الحمضيات CEVd. ولقد أظهر تحديد التتابع أن الفيرويد يتكون من ٣٧٢ نيوكليتيدة ولقد أعطى اسم فيرويد اكسوكورتز الحمضيات سلالة الطماطم CEVd - t وهذه السلالة تختلف عن السلالات الاسترالية للفيرويد CEVd بستة وثلاثين نيوكليتيدة عن السلالة A و ٤٧ نيوكليتيدة عن السلالة B ويختلف عن سلالة العنب الأسبانية بتغير ٥٢ نيوكليتيدة. وبتحليل النشوء الوراثى لهذا الفيرويد تأكد بأنه قريب الصلة مع فيرويد CEVd فى جميع تركيب النطاقات باستثناء نطاق المرضية والنطاقات الطرفية اليسارية والتى هى مطابقة تماماً لما هو فى فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس وفيرويد تقزم القمة فى الطماطم.

الأعراض:

يصيب هذا المرض نبات الطماطم **Lycopersicon esculentum** وتظهر الأعراض على شكل توالد مستمر وغزير من النموات الحديثة فى قمة النبات مصحوباً بتقزم هذه النموات الحديثة وتدليها وحدوث تشوهات كثيرة مختلفة فى أنصال الأوراق (الوريقات) ونكروزز فى العروق. تتشابه أعراض هذا المرض مع مرض تقزم القمة فى الطماطم المذكور سابقاً ويصعب التمييز بينهما إلا بالعين الخبيرة حيث أن هذا المرض تكون فيه قمم النباتات أكثر غزارة من المرض الأول وتكون الأوراق الصفراء قليلة فى مرض شجيرة الطماطم الهندى ولكن هذه الأخيرة ليست علامة مميزة دائماً بل قد يحدث العكس عند إختلاف درجات الحرارة عن الظروف المثلى للنبات.

المسبب:

يتسبب مرض القمة الشجيرية الهندى فى الطماطم عن فيروید هو عبارة عن سلالة من سلالات فيروید اكسوكورتز الحمضيات CEVd ويطلق عليه CEVd - t ويتكون هذا الفيروید من ٣٧٢ نيوكليتيدة تتكون من ٧٢ A و ١٠٩ C و ١١٣ G و ٧٨ U وبذلك تكون محتوياته من G + C تساوى ٥٩,٧٪ وهى قريبة من الفيرويدات النموذجية الأخرى. وأن نسبة G + C إلى نسبة A + U تساوى ١,٤٨ وإن التركيب الثانوى لهذا الفيروید يتكون من أزواج قواعد عالية ويأخذ ظاهرياً شكل عصوى ثنائى الخيط والذى فيه مناطق حلزونية قصيرة التتابع مع عروات منتفخة داخلية.

بتحليل تتابع تركيب النطاقات الخمسة لهذا الفيروید ومقارنتها مع الفيرويدات الأخرى والفيروسايدات أعطت النتيجة المذكورة فى جدول ٤٨. إن المنطقة متغيرة النطاق ونطاقات جانب الطرف الأيمن قريبة الشبه غالباً مع ما هو موجود فى فيروید

اكسوكورتز الحمضيات CEVd، بينما نطاق المرضية يشبه فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس PSTVd أما الطرف اليسارى فهو أكثر تشابهاً وقرباً مع فيرويد تقزم قمة الطماطم TASVd.

إن حدود النطاقات لفيرويد القمة الشجيرية الهندى عزلة CEVd - t هى كما يلى: ـ

١ ـ نطاق الطرف الأيسر من ٣٢٦ إلى ٣٧٢ فى الخيط السفلى ومن ١ إلى ٤٦ فى الخيط العلوى } ٩٣ نيوكليتيدة

٢ ـ نطاق المرضية من ٤٧ إلى ٧٥ فى الخيط العلوى ومن ٢٩٤ إلى ٣٢٥ فى الخيط السفلى } ٦١ نيوكليتيدة

٣ ـ المنطقة المركزية المحفوظة من ٧٦ ـ ١٢٢ فى الخيط العلوى ومن ٢٤٤ إلى ٢٩٣ فى الخيط السفلى } ٩٧ نيوكليتيدة

٤ ـ المنطقة المتغيرة من ١٢٣ إلى ١٥٠ فى الخيط العلوى ومن ٢١٥ إلى ٢٤٣ فى الخيط السفلى } ٥٧ نيوكليتيدة

٥ ـ نطاق الطرف الأيمن من ١٥١ إلى ٢١٤ تأخذ جزء من الخيط العلوى وجزء من الخيط السفلى يتكون من ٦٤ نيوكليتيدة.

المميزات العامة للمسبب:

الصفة الأولى: ـ

من نتائج الدراسات السابقة تبين أن مرض القمة الشجيرية الهندى فى الطماطم يتسبب عن فيرويد وأن هذا الفيرويد من سلالات الفيرويدات التى تصيب الطماطم

جدول ٤٨: يبين أعداد النيوكليتيدات المتغيرة فى كل نطاق بالنسبة للفيروبد ١- CEVd.

الفيروبد وسلالاته	عدد النيوكليتيدات المختلفة الموجودة فى كل نطاق من الفيروبدات عن فيروبد القمة الشجيرية فى الطماطم									
	الطرف اليسار		المرضية		المنطقة المركزية المحفوظة		المنطقة المتغيرة		الطرف اليمين	المجموع
	عدد	٪	عدد	٪	عدد	٪	عدد	٪	عدد	٪	عدد
١ ـ CEVd										
السلالة الاسترالية A	١	٠,٩	١٤	٢٢,٩	صفر	صفر	١٦	٢٨,٠٧	٥	٧,٨١	٣٦
السلالة الاسترالية B	١١	١١,٨	١٥	٢٤,٥٩	٢	٢,٠٦	١٥	٢٦,٣	٤	٦,٢٥	٤٧
السلالة الاسبانية g	١٢	١٢,٩	١٣	٢١,٣١	٣	٣,٠٩	١٦	٢٨,٠٧	٩	١٤,٠٦	٥٣
٢ ـ PSTVd										
السلالة المتوسطة I	٤٣	٤٦,٢٣	١٣	٢١,٣	٥١	٥٢,٥٧	٨٤	١٤٧,٣٦	٤٣	٦٧,١٨	٢٤٤
السلالة المعتدلة M	٤٣	٤٦,٢٣	١٥	٢٥	٥٠	٥١,٥٤	٨٣	١٤٥,٦	٤٣	٦٧,١٨	٢٣٤
السلالة الشديدة S	٤٦	٤٩	١٤	٢٢,٩٥	٥١	٥٢,٥٧	٨٤	١٤٧,٣٦	٤٣	٦٧,١٨	٢٣٨
٣ ـ TASVd										
عزلة أفريقيا	٨	٨,٦	٥٠	٨١,٩٧	١٨	١٨,٥٥	١٠٦	١٨٥,٩٥	٤٩	٧٦,٥٦	٢٣١
عزلة اندونيسيا	١٠	١,٠٧	٤٤	٧٢,٣	٢١	٢١,٦٤	١١٤	٢٠٠	٤٦	٧١,٨٧	٢٣٥
٤ ـ TPMVd	٤٣	٤٦,٢٣	٣٢	٥٢,٤٦	٥٠	٥١,٥٤	١١٤	٢٠٠	٤٧	٧٣,٤٣	٢٨٦

ملاحظات:

محتوى فيروبد١- CEVd : الطرف اليسار ٩٣، نطاق المرضية ٦١، المنطقة المركزية المحفوظة ٩٧ المنطقة المتغيرة ٥٧، الطرف اليمين ٦٤.

النسبة المئوية الزائدة عن ١٠٠٪ تعنى أن نيوكليتيدات الفيروبد المقارن أكثر من نيوكليتيدات ١- CEVd وكلها مختلفة.

مثل فيرويد تقزم القمة فى الطماطم TASVd أو فيرويد النبات الذكرى فى الطماطم TPMVd ولكنه سلالة مميزة من سلالات فيرويد اكسوكورتز الحمضيات CEVd ولم يسبق لهذا الفيرويد أو هذا المرض أن وجد مترافقاً مع أمراض أخرى من أمراض الطماطم. لقد ثبتت العلاقة القريبة لهذا الفيرويد مع فيرويد CEVd بواسطة إختبار Blot - hybridization وباستعمال cRNAs متخصصة لاكتشاف عدد كبير من الفيرويدات وأن تحليل التتابع قد أكد بأن هذا الفيرويد هو سلالة منفصلة من CEVd، وأطلق عليه اصطلاح سلالة الطماطم من فيرويد اكسوكورتز الحمضيات CEVd - t. مع أن فيرويد تقزم قمة الطماطم وفيرويد النبات الذكرى فى الطماطم تسبب أمراض تحدث طبيعياً ومنتشرة فى مناطق كثيرة، إلا أن مرض القمة الشجيرية الهندى هو أول مرض يصيب الطماطم ويتسبب عن فيرويد CEVd.

الصفة الثانية:

إن فيرويد CEVd - t أكثر قرباً وعلاقة مع فيرويد العزلة الاسترالية A، حيث أن هناك إختلاف فى ٣٦ تغير فى النيوكليتيدات، حصل استبدال فى ٢٩، وثلاثة إضافة (ادخال) و وإزالة ٤. أما فى العزلة الاسترالية B هناك إختلاف فى ٤٧ نيوكليتيدة منها ٣٨ إستبدال و ٤ إضافة (ادخال) و ٤ إزالة أما فى سلالة العنب من CEVd فإن لتغير فى ٥٣ نيوكليتيـدة، منها ٤٦ إزالة وإضافة ٢ وخمسة حذف.

كما هو الحال فى عزلة العنب الاسترالية CEVd - g فإن تتابع النيوكليتيدات فى CEVd - t تختلف كثيراً عن السلالات A ، B وهذا الاختلاف أكثر من الاختلافات الموجودة بين B و A نفسها، مما يدل على الانعزال النسبى لكل من CEVd - g و CEVd - t عن بقية سلالات CEVd المعزولة من الحمضيات، وقد يرجع سبب ذلك لإختلاف أصل العائل هذا يعنى العنب والطماطم حيث الاختلاف النباتى بينهما كبير.

الصفة الثالثة:

إن الاختلافات التى تحول CEVd - A إلى CEVd - t موجودة أساساً فى الطرف اليسارى وفى نطاق المرضية والنطاق (المنطقة) المتغير، بينما النطاق المركزى ومنطقة الطرف اليمين لا تخضع أساساً لأى تغيرات. كذلك فإن CEVd - t يشابه أيضاً CEVd - g فى هذه المجالات إلا أن منطقة الطرف اليمين ومنطقة الطرف اليسار تختلف معنوياً عن CEVd - A.

إن تغيير النيوكليتيدات بين سلالات CEVd المؤدية إلى تحورات فى التركيب الثانوى المفترض لنطاق المرضية قد استخدمت من قبل الفيرويد فى تحويرات التعبيرات المرضية على الطماطم. ولقد ثبت أن معظم هذه التغيرات التى تؤدى إلى تركيب ثانوى مختلف فى نطاق المرضية للسلالات المعتدلة (عند مقارنتها مع السلالات الشديدة) تتواجد خارج القلب المركزى والذى هو محفوظ بشدة فى جميع السلالات الشديدة. هذا القلب المركزى يتكون من A_5 - 6 تتابع (غالباً فى عروة داخلية) وملاصقة لزوج قواعد السيقان. بفحص القلب المركـزى فى CEVd - t تبين أن تركيبه الثانوى نموذجى كما هو فى جميع السلالات الشديدة باستثناء الثمانية قواعد الموجودة فى المنطقة الحلزونية إلى اليمين من تتابع(A) Aligo الموجود فى السـلالات الشديـدة مـن CEVd التـى تتعـوق بواسطـة دخول (غرز) خمسة نيوكليتيدات (تؤدى إلـى عروة داخلية من ثلاثة مراكز قواعد مزدوجة A - U). إن تخفيض الثبات الحرارى لهذه المنطقة الموضعية لا يؤثر بالضرورة علـى شـدة التعبيـرات المرضية. هذا يكون واضحاً أكثر بحقيقة أن القلب المركزى لنطاق المرضية موجـود فى كـل السـلالات الشديدة من الفيرويد CEVd (باستثناء CEVd - t)، تحدث أيضاً فى جميع سلالات PSTVd بغض النظر فيما إذا كانت تحدث أعراض متوسطة أو معتدلة أو شديدة فى الطماطم.

الصفة الرابعة :

إن دراسة نشوء الفيرويدات أجريت مع كل تركيب لكل نطاق بمفرده فى الفيرويدات المختلفة وهذا أدى إلى القول بأن النطاقات المتماثلة فى مختلف الفيرويدات قابلة للتغير وهذا يكون أكثر وضوحاً عن طريق ملاحظة تتابع النيوكليتيدات فى فيرويد **Columnea** الكامن والذى يتكون من تتابعات سائدة تبين أنها موجودة فى فيرويدات أخرى. ونتيجة معرفة تتابع فيرويد العنب الاسترالى والذى إقترح بأنه نتيجة لإعادة الاتحاد (الارتباط) المتكررة فى RNA. بالمثل يمكن القول بأن الفيرويد CEVd - t هو نتيجة إعادة الاتحاد بين RNA فى فيرويدات مختلفة أو يمكن القول بأن هذا الفيرويد CEVd - t هو حلقة بين فيرويد PSTVd وفيرويد TASVd التى تسبب أعراض مرضية فى الطماطم. أو القول بأنه مركب من جزئين من الفيرويدين الذين يصيبان الطماطم.

٧ ـ فيرويد الخيار

Cucumber Viroid

مرض الثمرة الباهتة في الخيار

Cucumber Pale Fruit Disease

أعراض المرض:

يهاجم هذا المرض نباتات الخيار **Cucumis sativus** تظهر النباتات المصابة متقزمة فيها شفافية عروق وتتجعد الورقة قبل أن تسقط. تصفر الأوراق السفلى وتسقط أحياناً وتجف أحياناً أخرى قبل أن تسقط، يضعف المجموع الخضرى ويضعف نمو النبات وتقل الانتاجية. تصبح الثمار صفراء أو خضراء باهتة وتكون متكرمشة أحياناً وذات شكل غير منتظم يقل الانتاج بنسبة كبيرة، تصبح الثمار غير صالحة للتسويق. يتشابه هذا المرض فى أعراضه مع أعراض كثير من أمراض الفيروسات التى تهاجم الخيار إلا أن المميزة الرئيسية التى تميزه عن الإصابات الفيروسية هو عدم ظهور تلونات أو موزايك فى نصل الورقة باستثناء شفافية العروق. وكذلك لا يتكون زوائد على الثمرة ولا يصبح نسيجها اسفنجياً كما فى بعض الإصابات الفيروسية.

المسبب:

يتسبب هذا المرض عن فيرويد الثمرة الباهتة فى الخـيار Cucmber Pale Fruit Vioid ويكتب باختصار (CPFVd). بقى الاعتقاد سائداً بأن هذا المرض يتسبب عن فيرويد تقزم حشيشة الدينار HSVd حيث أن فيرويد تقزم حشيشة الدينار له

obeikandl.com

سلالات عديدة ويتراوح عدد النيوكليتيدات فى هذه السلالات من ٢٩٧ إلى ٣٠٣، إلا أن السلالة التى تصيب نبات الخيار طولها ٢٩٧ نيوكليتيدة. ولقد وجد أن فيرويد الثمرة الباهتة فى الخيار CPFVd يتكون من ٣٠٣ نيوكليتيدة. ولقد أجريت تحاليل عديدة وتجارب تمييز بين هذا الفيرويد وسلالة فيرويد HSVd فأصبح من المؤكد أن هذا الفيرويد CPFVd هو فيرويد منفصل لوحده وليس عزلة من عزلات فيرويد تقزم حشيشة الدينار، إلا أن هناك كثير من المراجع لا تزال تذكر أن فيرويد الثمرة الباهتة فى الخيار هو عزلة من عزلات فيرويد تقزم حشيشة الدينار.

هناك أسباب أدت إلى الاعتقاد بأن فيرويد CPFVd هو عزلة من عزلات HSVd وهى: ـ

١ ـ إن بعض عزلات فيرويد HSVd تسبب أعراض على نبات الخيار متماثلة تماماً مع ما يسببه فيرويد الثمرة الباهتة فى الخيار.

٢ ـ لا يمكن التفريق بين عزلة فيرويد HSVd وفيرويد CPFVd اعتماداً على الأعراض أبَدَا.

٣ ـ كلا الفيرويدين له تماثل تتابع عال جداً يصل ٩٥ ٪ إلا أنه غير متطابق.

٤ ـ العوائل التى تصيبها عزلة HSVd هى نفسها التى يصيبها الفيرويد CPFVd.

معظم الأبحاث أقرت بأن فيرويد CPFVd وفيرويد HSVd كلاهما عامل مسبب لمرض الثمرة الباهتة فى الخيار وهما يوجدان منفصلين فى عوائل نباتية مختلفة مثل **Cucumis sativus** للفيرويد الأول و **Humulus lupulus** للفيرويد الثانى فى مناطق مختلفة. يمكن فصل الفيرودين بطريقة PAGE ووجد أن فيرويد CPFVd أكبر من فيرويد HSVd بحوالى ستة نيوكليتيدات وإن كلا الفيرودين فيه تماثل تتابع عال جداً إلا أنها غير متطابقة. يختلف CPFVd عن الفيرويد HSVd عزلة الخيار فى تتابع النيوكليتيدات على موقع ١٦ والذى يتضمن

تغيير ٨ نيوكليتيدات ودخول ٧ نيوكليتيدات وحذف واحدة من HSVd. كلا الفيرودين فيهما تماثل تتابع ٩٥ ٪. إن فيرويد CPFVd يشكل تركيب شبه عصوى مع عديد من أزواج القواعد وإنه يتماثل مع PSTVd بنسبة ٥٥ ٪ ونفس النسبة مع فيرويد HSVd عزلة الخيار. كذلك فإن تماثل عزلات CPFVd يصل ٩٥ ٪ أما تماثل عزلات HSVd فهو ١٠٠ ٪. كلا الفيرودين يسبب إصابة كامنة فى الطماطم ولا يهاجمان نبات **Gynura**.

إنتقال الفيرويد:

ينتقل فيرويد CPFVd خلال بذور وحبوب اللقاح فى الطماطم صنفRutgers وتصبح النباتات مصابة جهازياً وتظهر الأعراض على النباتات وينخفض الإنتاج، لكن نباتات الطماطم النامية من بذور مصابة لا يظهر عليها أعراض ولكن يمكن اكتشاف الفيرويد فيها بطريقة electrophoresis على ٥ ٪ بولى أكريلامايد جيل ويكشف عن الفيرويد فى البذور بواسطة Spot hybridization.

يتحرك الشكل الدائرى من الفيرويد فى الهجرة الكهربائية أقل من سرعة فيرويد HSVd عزلة الخيار. أما الشكل المستقيم للفيرويد لم يمكن كشفه بالصبغ فى الجيل ولكن يستدل عليه بالاختبارات الحيوية. يبلغ متوسط طول الشكل الدائرى لفيرويد CPFVd حوالى (٨٢ ∓ ٤,٢) نانوميتر أما طول الشكل الدائرى لفيرويد HSVd عزلة الخيار (٨٣ ∓ ٢,٤) نانوميتر.

المدى العائلى:

وجد أن هناك ١٢ نوعاً من العائلة القرعية من ٢٦ نوع تصاب بفيرويد HSVd عزلة الخيار وتختلف شدة الإصابة حسب نوع النبات المزروع وحسب الصنف وإن العوائل القابلة للإصابة بالفيرويد HSVd عزلة الخيار والتى تظهر أعراض قابلة للتشخيص هى:-

1 - **Benincase hispida**

2 - **Cucumis melo** Var. **acidulus**

3 - **Cucumis melo** Var. **conomon**

4 - **Cucumis melo** Var. **inodolus**

5 - **Cucumis melo** Var. **reticulatus**

6 - **Lagenaria siceraria** Var. **clavata**

7 - **Lagenaria siceraria** Var. **gourda**

8 - **Lagenaria siceraria** Var. **microcarpa**

9 - **Luffa cylindrica**

10 - **Cucurbita moschata**

فيرويد HSVd عزلة الخيار:

كما هو معروف فإن إصابة بادرات الخيار بفيرويد HSVd عزلة الخيار يسبب تقزم ملحوظ وأوراق غائرة العروق مجعدة. نتيجة الإصابة بهذا الفيرويد يحدث نقص فى نسبة منظم النمو أندول أستك أسد فى أول عشرة أيام بعد الحقن وقبل تجعد الورقة ويستمر على الأقل لمدة ٣٠ يوم. كذلك تتأخر الأزهار المؤنثة فى الظهور عن الوقت المعتاد. أما منظم النمو الجبرلك أسد فإن مستوياته لا تتأثر بالإصابة.

درس تأثير عدة مواد كيمياوية على حيوية فيرويد HSVd عزلة الخيار فوجد أن حيوية الفيرويد تزداد بإضافة البنتونايت Bentonite ولكنها تنخفض بإضافة اوكسلات الصوديم و RNA الخميرة. زادت الحيوية قليلاً باستعمال تانك أسد بتركيز ٠,١ ملغ / مللتر وقلت الحيوية أيضاً باستعمال تانك أسد بتركيز ١ ملغ / مللتر. تثبط نشاط الفيرويد كلية باستعمال RNase البنكرياس وكذلك بإضافة Acridine orange وازرق الميثيلين و Toludine blue O عندما يكون الفيرويد تحت الإضاءة العادية أما تحت الظلام فإن الحيوية انخفضت بنسبة أقل. إن تثبيط الحيوية باستعمال Bentonite مع مخلوط الفيرويد يحدث مع الصبغة أما بدون صبغة فتزداد الحيوية.

٨ ـ فيرويدات كوليومنيا

Columnea Viroids

١ ـ فيرويد كوليومنيا الكامن

Cloumnea Latent Viroid

مقدمة:

إن نبات **Columnea** من نباتات الزينة التابعة للعائلة الجسنراسية Gesneriaceae. إن هذا النبات يسمى Epiphytic وهو عبارة عن تحت شجيرات Subshrubs أو أعناب منشأوها جنوب أمريكا وهى تنمو فى سلال معلقة فى الصوبات الزجاجية أو البيوت فى أمريكا الشمالية. يتكاثر هذا النبات أساساً عن طريق العقل المأخوذة من الساق وهى تستطيع أن تحافظ وتديم الفيرويد فيها.

الفيرويد:

إن فيرويد الكوليومنيا الكامن Columnea Latent Viroid (CLVd) يوجد بشكل كامن فى نبات الزينة المسمى **Columnea erythrophae** والذى ينمو تجارياً. إذا هاجم الفيرويد البطاطس والطماطم فإنه يسبب أعراض شبيهة بأعراض فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس عند مهاجمته للبطاطس. إن تتابع نيوكليتيدات هذا الفيرويد وتركيبه الثانوى المقترح يبين أنه يتكون من RNA أحادى الخيط دائرى يتكون من ٣٧٠ نيوكليتيدة والتى تأخذ التركيب ذو الشكل العصوى بعديد من أزواج القواعد والتى تميز جميع الفيرويـدات المعروفة. إن الحركة فى الهجرة الكهربائية للفيرويد

obeikandi.com

الدائرى CLVd تحت ظروف غير مدنتـرة تؤدى إلى القول بوجود التركيب الثلاثى.

يحتوى الفيرويد CLVd العديد من تماثل التتابع المشابهة لما فى مجموعة فيرويدات PSTVd ولكنه يحتوى منطقة مركزية محفوظة نموذجية كما هو موجود فى فيرويد تقزم حشيشة الدينار HSVd. كذلك فإن الفيرويد CLVd يشارك فى بعض الصفات الحيوية مع كل من مجموعة الفيرويدات B2 و B3. من المحتمل أن يكون الفيرويد CLVd قد نشأ نتيجة من تداخل وإعادة الاتحاد للحمض RNA بين مجموعة HSVd ومجموعة فيرويدات PSTVd أثناء تكاثرهما فى نفس النبات.

ب ـ فيرويد نيماتنثص

Nematanthus Viroid

مقدمة:

عزل فيرويد من نباتات زينة اسمها **Nematanthus wettsteinii** هذه النباتات غير مظهرة لأعراض مرضية، وذلك باستعمال طريقة R - PAGE وذلك لتحليل الأحماض النووية منخفضة الوزن الجزيئى. أمكن نقل الحمض النووى إلى الطماطم وثلاثة أصناف مزروعة من البطاطس ونباتات **Scopolia sinensis** بالحقن الميكانيكى أو بالتطعيم. إن نباتات العائلة الباذنجانية المحقونة يتكشف عليها أعراض مشابهة لتلك المتسببة عن فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس PSTVd. إن فيرويد نيماتنثص يتكون من ٣٧٢ نيوكليتيدة، تركيبها كالآتى: ـ ٢١٤ من G + C و ١٥٨ من A + U وأن نسبة G + C / A + U تساوى ١,٣٥. إن واحدة من سبعة كلونات cDNA أظهرت إختلاف فى التتابع G to A على موقع ٧٣. إن أكثر التراكيب الثانوية ثباتاً لهذا الفيرويد هى تلك التى تمتلك ازواج قواعد G : C ٧٨ و A : U ٣٧ و G : U ١١ مع أقل طاقة حرة من (456.9 KJ -). إن هذا الفيرويد متقارب تماماً مع فيرويد كوليومنيا الكامن الذى يتكون من ٣٧٠ نيوكليتيدة. إن فيرويد نيماتنثص

يمتلك مناطق ذات تتابع متماثل ١٠٠ ٪ مع ستة فيرويدات تتبع مجموعة PSTVd ومجموعة فيرويد ندب الجلد فى التفاح ASSVd. كذلك فإن الفيرويد يتناسخ فى نباتات الطماطم عندما تحقن مع PSTVd. كذلك فإنه أمكن وقاية نباتات الطماطم بالوقاية بالتضاد ضد فيرويد PSTVd عندما حقنت مقدماً بالفيرويد نيماتنثص.

الأعراض:

يتكشف على النباتات المصابة بهذا الفيرويد أعراض تتميز بأنها ميكروسكوبية. فى الطماطم تظهر الأعراض على شكل صغر الأوراق بحيث تكون أصغر من الوضع الطبيعى والتى تتقزم مجتمعة فى قمة النبات. أحياناً فإن العروق الوسطية من الأوراق يتكشف عليها خطوط ميتة ومتحللة Necrotic streaks. هناك فرق معنوى كبير بين طول النباتات المصابة والسليمة حيث تكون النباتات المصابة متقزمة بشكل واضح.

أما فى نباتات **S. sinensis** يتكشف عليها بقع متحللة جهازية وتخطيطات بالإضافة إلى أن الورقة تصل طور الشيخوخة قبل أن تنضج. إن هذه الأعراض مماثلة جداً لتلك المحدثة بواسطة الفيرويد PSTVd فى العوائل الخاصة به. إن إصابة نباتات الطماطم بالفيرويد CLVd - N يظهر عليها أعراض معتدلة تظهر بعد ٣ ـ ٤ أسابيع ويتكشف أوراق أصغر من الأوراق الطبيعية ويحدث تقزم فى النبات.

الفيرويد:

لقد وجد أن الفيرويد المستخلص من نبات **Columnea** يستطيع أن يصيب نباتات العائلة الباذنجانية ومن ضمنها البطاطس. كما أن نبات **Columnea** يستطيع أن يحافظ ويديم الفيرويد فيه (يجعله مستمراً فيه) بطريقة غير محددة وأحياناً ينقله. فى الحصر المحدود لنباتات الزينة فى أمريكا اكتشف إصابة بالفيرويد غير مظهرة أعراض فى نبات الزهرة الجرابية **Nematanthus (Hypocryta) wettsteinii**. إن هذا الفيرويد يتكون من ٣٧٢ نيوكليتيدة وفيه ٩٧,٨ ٪ تماثل مع الفيرويد الكامن

لنبات **Columnea** والذى يكتب CLVd. ولقد وجد أنه كما فى CLVd فإن الفيرويد المأخوذ من **N. wettsteinii** يصيب نباتات العائلة الباذنجانية ومن ضمنها البطاطس. وبسبب قربه التام والعلاقة الوراثية مع CLVd فإن هذا الفيرويد إعتبر سلالة متميزة من CLVd تحدث طبيعياً فى النبات من أنواع **Nematanthus** وأعطى اسم CLVd - N.

انتقال الفيرويد:

أخذت نباتات طماطم ونباتات **S. sinensis** ونباتات بطاطس وحقنت ميكانيكياً بمستخلصات الحمض النووى المأخوذ من نباتات مريضة من **N. wettisteinii** فكانت نسبة الإصابة ٣٠ نبات من بين ٩٣ نبات محقون. أما بالتطعيم فأصيبت ٢٠ بادرة من ٦٣ نبات مطعوم. أما بواسطة التجريح فأصيب ٣ نباتات من ١٥ نبات معامل. يحدث هذا الفيرويد أعراض على نباتات العائلة الباذنجانية تشبه الأعراض الناتجة عن PSTVd. لم يثبت لغاية الآن (١٩٩٢) إنتقال الفيرويد بالبذور سواء فى البطاطس أو الطماطم أو كولويومنيا.

تداخل الفيرويد والوقاية بالتضاد:

عندما حقنت نباتات الطماطم بالفيرويد PSTVd السلالة المعتدلة وكذلك بالفيرويد CLVd - N أعطت نفس الأعراض، وبالتالى فإن تأخير ظهور الأعراض لايمكن استعماله لتحديد تداخل الفيرويدات. إن اكتشاف وتقدير كمية شرائح RNA الفيرويدى بواسطة R - PAGE استعملت لدراسة تفاعلات الفيرويد فى الإصابات المختلطة. النباتات المحقونة بلقاح مركب يحتوى كلا الفيرويدين تصبح مصابة بكلا الفيرويدين بغض النظر عن مرحلة النمو وقت الحقن.

فى دراسات الوقاية بالتضاد، عندما حقنت النباتات بفيرويد PSTVd السلالة المعتدلة ثم بعد ذلك حقنت بالمتحدى الفيرويد CLVd - N فإن الأخير قد اكتشف

بعد ثمانية أسابيع من الحقن وبالمقابل عندما حقنت النباتات بالفيرويد CLVd - N وبعد ذلك حقنت بالسلالة المعتدلة من PSTVd فإن هذه الأخيرة لم تكتشف بعد ثمانية أسابيع ولكنها احتاجت إلى أكثر من ذلك بكثير مما يدل على حدوث وقاية بالتضاد لنباتات الطماطم من الإصابة بالسلالة المعتدلة من الفيرويد PSTVd. وهذا يعنى أن الحقن السابق بالفيرويد CLVd - N تمنع السلالة المعتدلة PSTVd من أن تثبت أقدامها فى النبات.

تماثل تتابع الفيرويد مع الفيرويدات الأخرى:

عند مقارنة تتابع الفيرويد CLVd - N مع الفيرويدات الأخرى تبين أن هناك قرابة وثيقة جداً مع الفيرويد CLVd الذى يتكون من ٣٧٠ نيوكليتيدة. من بين النيوكليتيدات ال ٣٧٢ التى يتكون منها CLVd - N فإن هناك ٣٦٢ نيوكليتيدة متوافقة مع تتابعات موجودة فى CLVd. كما أن CLVd - N يختلف عن تتابعات CLVd فى نطاق P من الخيط السفلى حيث UUC تنقلب إلى UGUCU أما فى الخيط العلوى فإن نطاق V يحدث فيه إنقلاب من UGCC إلى ACG.

إن الفيرويد CLVd - N يظهر تماثل جزئى مع كثير من الفيرويدات تتبع بشكل أساسى إلى مجموعة PSTVd. إن نطاق الطرف اليسارى من CLVd - N يكون متماثل مع تلك الموجود فى الطرف اليسارى لكل من PSTVd و CSVd و CEVd و TASVd و ASSVd. أما نطاق الجانب الأيمن للفيرويد CLVd - N يتماثل مع فيرويد TPMVd و TASVd و PSTVd. إن الأربعة عشر نيوكليتيدة من CLVd - N الممتدة فى الخيط العلوى فى نطاق P متماثلة ١٠٠ ٪ مع المناطق الخاصة بها من فيرويد TPMVd، بينما ١٢ نيوكليتيدة (قطعة من الخيط السفلى) من النطاق P تكون متوافقة توافقاً نموذجياً مع المناطق المشابهة لها فى كل من PSTVd، TPMVd و TASVd. إن كلا الجزأين العلوى والسفلى من المنطقة

المركزية المحفوظة فى CLVd - N هى نفسها مع الأجزاء المتوافقة مع فيرويد HSVd .

إن الدرجة العالية من تماثل التتابع بين الفيرويدات المختلفة قد عزيت إلى خلق فيرويدات مركبة عن طريق إعادة الاتحاد. وعلى أية حال فإن وجود تتابعات متطابقة فى نطاقات خاصة (C،P والنطاقين الطرفيين) من CLVd - N وفيرويدات أخرى عديدة نشأت من أصول عديدة غير متعلقة مع النبات العائل الطبيعى، هذا يؤدى إلى القول بأن فيرويدات حديثة نشأت من أجداد مشتركة ثم تعرضت إلى تأثيرات أدت لحدوث تطورات متقاربة.

obeikandl.com