الفصل السادس

فيرويدات تحت مجموعة B_2 وB_3

أولاً: فيرويدات تحت مجموعة B_2

١ ـ فيرويدات التفاح

Apple Viroids

مقدمة:

يهاجم التفاح من قبل فيرويدين هامين هما ١ ـ فيرويد ندب الجلد فى التفاح Apple Scar Skin Viroid ويكتب باختصار ASSVd ٢ ـ فيرويد تنقط التفاح Dapple Apple Viroid ويكتب DAVd.

إن فيرويد ندب الجلد فى التفاح ASSVd هو العامل المسبب لمرض ندب الجلد فى التفاح وهو عبارة عن جزئ RNA دائرى مفرد الخيط معدى يتكون من سلسلة طولها ٣٣٠ نيوكليتيدة. أما الفيرويدات الأخرى القريبة له وذات حجم مشابه لحجمه وتهاجم أشجار التفاحيات فهى فيرويد تنقط التفاح DAVd وفيرويد الجلد الصدأ فى الكمثرى Pear Rusty Skin Viroid (PRSVd). إن هذه الفيرويدات الثلاثة ASSVd ، DAVd و PRSVd هامة إقتصادياً على التفاح والكمثرى فى الصين واليابان، ولكن عائلها الطبيعى محدود فى التفاحيات. بذلت

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

١ ـ الأعراض التى تظهر على الثمرة.

٢ ـ تحليل الحمض النووى المعزول بواسطة طريقة RGE.

٣ ـ تهجين الجزئ بمنقب ASSVd cRNA معلم بالفسفور المشع.

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

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

أ ـ مرض ندب الجلد فى التفاح

Apple Scar Skin Disease

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

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

١ ـ إن أماكن الإختبارات فى كثير من أقطار العالم لا تكون مجهزة بأدوات استعمال منقبات حمض نووى.

٢ ـ إن فهرسة كواشف خشبية لا تزال مطلوبة للكشف عن كثير من الفيروسات الأخرى والعوامل المسببة المرضية الأخرى فى التفاح، وإن توفر الكاشف الخشبى السريع للفيرويد ASSVd يمكن أن يكون مفيد وملائم.

٣ ـ إن مثل هذه الكواشف يمكن أن تزودنا بتأكيدات حيوية للإختبارات المعملية.

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

الأعراض على الثمار:

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

الأعراض على المجموع الخضرى:

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

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

تأثير الحرارة والفترة الضوئية على حدوث وتكشف الأعراض:

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

لم يتكشف على أى من الأشجار المحقونة أعراض تدلى الأوراق عندما نمت على ٣٨°م وتحت فترة قصيرة من ساعات الإضاءة، أو على ٤ ساعات إضاءة وأى درجة حرارة (جدول ٤٩). هذه الأعراض لم تظهر على أشجار الكنترول.

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

تأثير الحرارة وفترة الإضاءة على معيارASSVd فى أشجار التفاح:

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

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

تفاعلات ظاهرة ولم يحصل عليها مع نسيج من أشجار نامية على ٣٨°م. جميع عزلات ASSVd تفاعلاتها متشابهة. لم يلاحظ تفاعلات إيجابية من مستخلصات من عنق الورقة المصابة بالفيرس الكامن أو أشجار الكنترول غير المحقونة.

تأثير نوع النسيج على معيار الفيرويد ASSVd :

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

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

طول اليوم بالساعة	درجة الحرارة (مئوية)	عدد الأشجار التى ظهر عليها أعراض تدلى الورقة / العدد الكلى للأشجار المحقونة					
		Stark's Earliest			Sugar Crab		
		تنقر التفاح	العزلة اليابانية Heiya	ندب الجلد	تنقر التفاح	العزلة اليابانية Heiya	ندب الجلد
٢٤	٣٨	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر
	٢٨	٥/٥	٥/٥	٥/٥	٥/١	٥/١	٥/١
	١٨	٥/٥	٥/٥	٥/٥	٥/٥	٥/٤	٥/٥
١٤	٣٨	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر
	٢٨	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/١	٥/صفر	٥/صفر
	١٨	٥/صفر	٥/صفر	٥/٣	٥/٢	٥/٢	٥/صفر
٤	٣٨	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر
	٢٨	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر
	١٨	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر	٥/صفر

شكل رقم ٧١ :

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

شكل رقم ٧٢ :

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

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

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

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

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

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

لقد ثبت بأن فيرويد ASSVd يتكون من ٣٣٠ نيوكليتيدة وليس له علاقة بأى من الفيرويدات الأخرى.

ب ـ مرض تنقر التفاح

Dapple Apple Disease

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

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

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

مسبب المرض:

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

ولقد تبين أن الأحماض النووية المعزولة من أنسجة التفاح المريضة بمرض تنقر التفاح فى شمال أمريكا أعطت نتائج إيجابية مع منقب ASSVd cRNA وأن فيرويد تنقر التفاح (DAVd) ينتشـر جهـازياً فى بـذور التفاح وفى الثمـرة والقلف والورقة وفى أنسجة الجذر. إن أفضل طريقة سريعـة لاكتشاف الفيرويد هى منقب SP6 generated ASSVd cRNA وهذه الطريقة تكشف أيضاً عن فيرويد ASSVd فى الأحماض النووية المستخلصة من النسيج المصاب.

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

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

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

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

٤ ـ RNA المهجن يكون بشكل أساسى موزع فى جزيئات محلول كلوريد الليثيوم والذى يميز الفيرويدات.

٥ ـ إن مقارنة الحركة فى الهجرة الكهربائية للفيرويد DAVd مع فيرويد PSTVd يؤدى إلى القول بأن الفيرويد DAVd يتكون من نيوكليتيدات أقل بكمية بسيطة عن ٣٥٩ نيوكليتيدة، هذا الحجم يكون متكامل مع حجم فيرويد ASSVd الذى يتكون من ٣٣٠ نيوكليتيدة.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

اكتشاف الفيرويد ASSVd و DAVd فى مكونات البذرة والبراعم:

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

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

مصدر الأحماض النووية	نوع آسيوى ١	نوع آسيوى ٢ ـ ٢٤	أشجار مصابة بفيرويد تنقر التفاح نوع واحد	أشجار مصابة بفيرويد تنقر التفاح نوع ٢	أشجار مصابة بالفيرويد ASSVd	أشجار كنترول
الأوراق	+	−	+	+	+	−
أوراق قديمة	+	+	+	+	+	−
قلف	+	+	+	+	+	−
أوراق حديثة جداً	+	+	+	+	+	−
جذور	+	+	+	+	+	−

الحمض النووى الكلى ٧٥ ـ ١٠٠ ميكروغرام / عينة، حللت بطريقة Dot blot hybridization وطريقة Northern blot hybridization. (+) تفاعل تهجين موجب، (−) تعنى تفاعل تهجين سالب.

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

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

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

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

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

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

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

جـ- مرض تغضن ثمرة التفاح

Apple Fruit Crinkle Disease

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

٢ـ فيرويدات الكمثرى

Pear Viroids

تصاب أشجار الكمثرى **Pyrus communis** بثلاثة فيرويدات مختلفة وهى: ـ

1 - Pear Blister Canker Viroid = (PBCVd)

2 - Pear Rusty Skin Viroid = (PRSVd)

3 - Apple Scar Skin latent Viroid = (ASSLVd)

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

مرض البثرة المتقرحة فى الكمثرى

Pear Blister Canker Disease

مقدمة:

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

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

أعراض المرض:

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

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

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

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

شكل رقم ٧٣ :

أعراض الإصابة بفيرويد PBCVd . البثرة المتقرحة فى قلف الكمثرى.

مسبب المرض:

يتسبب هذا المرض عن فيرويد ويسمى (PBCVd) Pear Blister Canker Viroid. شكل ٧٤ يبين التركيب الثانوى لهذا الفيرويد. إن فيرويد PBCVd هو RNA دائرى يتكون من ٣١٥ نيوكليتيدة. وتركيبه العام يتكون من ٩٩ قاعدة G (حوالى ٣١,٤٪) و٩٢ قاعدة C (٢٩,٢٪) و ٥٤ قاعدة A (١٧,١٪) و٧٠ قاعدة U (٢٢,٢)، وبالتالى فإن محتوياته من G + C حوالى ٦٠,٦٪ مشابهاً بذلك الفيرويدات الأخرى باستثناء فيرويد ضربة الشمس فى الافوكادو ASBVd. وكذلك فإن هذا الفيرويد مثل بقية الفيرويدات الأخرى لا يعمل تشفير لأى بروتينات.

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

فى التركيب الثانوى المفترض لهذا الفيرويد فإن ٦٧,٦٪ من نيوكليتيداته هى أزواج وأن نسبة GC ٦٤,٤٪ و AU ٢٢,٤٪ و GU ١٣,٢٪. كذلك فإن هذا الفيرويد يحتوى تتابع CCR والذى يميز أفراد تحت مجموعة B_2 والتى يطلق عليها اسم apscaviroids (تعنى مجموعة فيرويد ندب الجلد فى التفاح ASSVd) وهذا الاصطلاح وضعه Elena سنة ١٩٩١ ليجمع الفيرويدات التى تشابه فيرويد ندب الجلد فى التفاح فى معظم صفاتها فى مجموعة واحدة سماها apscaviroids وهذه المجموعة ذكرناها فى التصنيف فى الجزء الأول من الكتاب بأنها تحت مجموعة B_2. أما الفيرويدات التى تشابه فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس فسماها مجموعة Pospiviroids وذكرنا اسمها فى الجزء الأول من الكتاب تحت مجموعة B_1.

من التركيب السابق لفيرويد PBCVd يتبين عدم وجود U الموجودة على نهاية -3` من CCR فى الخيط السفلى من الخمسة فيرويدات الأخرى التى تمثل تحت مجموعة B_2 (apscaviroids)وهى: ـ

ASSVd = Apple Scar Skin Viroid

GYSVd = Grapevine Yellow Speckle Viroid

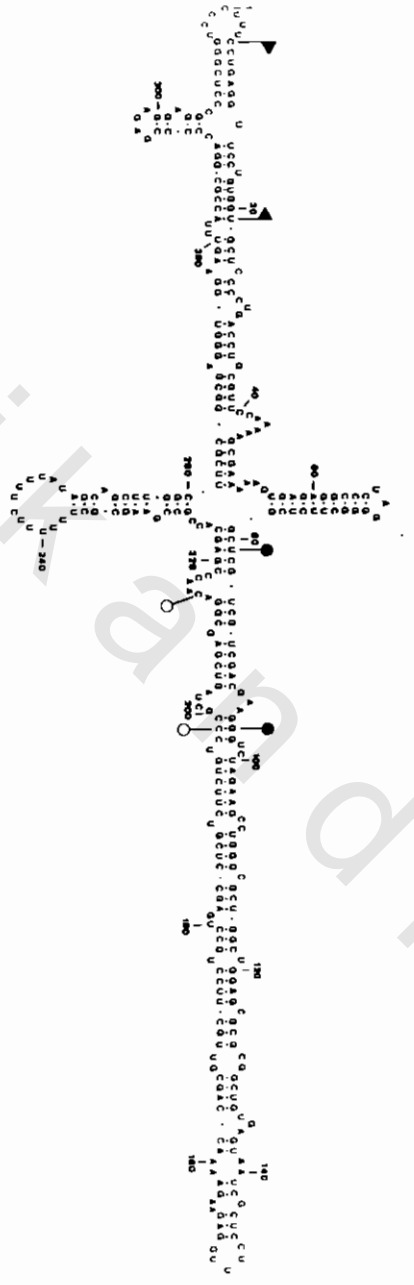
G1BVd = Grapevine 1B Viroid

AGVd = Australian Grapevine Viroid

CBLVd = Citrus Bent Leaf Viroid

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

كذلك فإن الفيرويد PBCVd له منطقة حفـظ طرفـية Terminal Con-served region (TCR) تبـدأ مـن موقـع ٥ إلـى ٢١ وتتكـون من CCUGAGGUUCCUGUGGU وهذه المنطقة محفوظة فى جميع أفراد pospiviroids و apscaviroids فى مواقع مشابهة. كذلك فإن هذا الفيرويد كما فى بقية الفيرويدات النموذجية غنى بتتابع الأدنين Adenine فهو من هذه الناحية يتضمن ١٣ مركز من ضمنها ١٠ ادنين بين موقعى ٤٢ و ٤٥ وهو كذلك غنى فى تتابع اليوراسيل Uracil ففيه ١١ قاعدة يوراسيل فى موضعى ٢٣٧ و ٢٤٧.



شكل رقم ٧٤:

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

obeikandl.com

مقارنة فيرويد PBCVd مع فيرويدات أخرى:

يتميز فيرويد PBCVd بأن فيه تماثل تتابع كلى عال متشابه مع فيرويد G1BVd و CBLVd. (٥٢,٤٪ للأول و ٥٠,٦٪ للثانى). إن التشابة بين هذا الفيرويد وبين الفيرويدات الأخرى يتضمن بالإضافة إلى أل ٣٣ موقع النموذجى من CCR العلوية والسفلية الموجودة فى جميع أفراد تحت مجموعة ASSVd و ١٢ موقع فى TCR فإن هناك تتابعات أخرى عديدة متوزعة بطريقة سمتية على نفس الخط فى هذه الفيرويدات. كذلك فإن فيرويد PBCVd يحوى أيضاً مناطق والتى هى ذات علاقة للتتابع الموجود فى الفيرويدات الأخرى. هذه العلاقة التتابعية تدل على أن فيرويد PBCVd له تركيب معين يتكون من تتابع فريد عن الفيرويدات التى تنتمى إلى تحت مجموعات الفيرويدات الأخرى. إن الجزء الأيسر من هذا الفيرويد يماثل فيرويدات تحت مجموعة فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس، بينما الجزء الأيمن يشمل منطقة CCR فيه مناطق تشابه تلك الموجودة فى فيرويدات تحت مجموعة B_2. هناك إمتدادات قصيرة من المراكز تقع بين مركز ١٦٦ و ٢٥٧ تظهر تماثل متطابق مع ASBVd وفيرويد CTiVd و PLMVd.

الصفات العامة للفيرويد:

إن تتابع النيوكليتيدات الكامل للفيرويد PBCVd يبين أنه جزئ دائرى يمتلك عناصر تركيبية مشتركة مع الفيرويدات النموذجية الأخرى، إنه يحوى CCR مشابهة لما هو فى مجموعة apscaviroids ولكن يفتقر إلى النهاية الطرفية -3` التى فيها U فى الخيط السفلى والموجودة فى الأفراد الأخرى من تحت هذه المجموعة. وبالتالى فإن التتابع المحفوظ من ال CCR فى تحت مجموعة apscaviroids تنخفض إلى ٣٣ موقع من النيوكليتيدات، ١٦ منها متعلق بالخيط العلوى و ١٧ للخيط السفلى. كذلك فإن الفيرويد PBCVd يحتوى ال TCR الموجودة فى تحت مجموعة pospiviroids وتحت مجموعة apscaviroids ومنطقة غنية بالادنين فى الموقع العادى على الجانب الأيسر من الخيط العلوى. وعلى أية حال فإن هذه

المنطقة الأخيرة ليست أزواج قواعد مع التتابع الغنى باليوراسيل الموجود فى الخيط المقابل فى التركيب الثنائى للفيرويد PBCVd من موقع ٢٣٧ إلى ٢٤٧ بالمقارنة مع تلك الموجودة فى الفيرويدات النموذجية.

إن الصفة الغريبة لهذا الفيرويد هى عدم وجود تنوعات تتابع له. إن هذه الظاهرة تتكرر فى حالات معينة مع الفيرويدات التى تخضع لعمليات تصفية فى العائل، فى هذه الحالة يمكن أن تختفى ظاهرة تنوعات التتابع، أما هنا فلا يخضع الفيرويد لمثل هذه التصفية وبالتالى فإن هذه الصفة متأصلة فيه. إن تماثل التتابل الملاحظ فى PBCVd يمكن أن يكون دلالة على تركيب قوى أو / و وظيفة إجبارية. إن شرح التتابعات الإضافية الموجودة فى عزلات أخرى للفيرويد PBCVd والتى تحدث تفاعل مشابه فى شجرة الكمثرى الكاشفة A20 ستساعد فى توضيح هذا السؤال مستقبلاً إن شاء الله.

ونظراً لأن الأجزاء المختلفة من PBCVd أيضاً تظهر تماثل ملحوظ مع فيرويدات من تحت مجموعات أخرى يؤدى إلى القول بأن هذا الفيرويد قد نشأ عن طريق إعادة الاتحاد فى RNA، هذه الاحتمالية قد فرضت للفيرويدات الأخرى. فى غالبية الحالات فإن إعادة الاتحاد يبدو أنها تتدخل فى تغيير قطع بين الفيرويدات التى تتبع إما لنفس تحت المجموعة أو لأخرى قريبة العلاقة بها. وعلى أية حال فإن إعادة الاتحاد بين الفيرويدات من تحت المجموعات المختلفة ملاحظة بشكل خاص فى بعض أفراد apscaviords. إن العائل المتعاون فى دعم تناسخ الفيرويدات المختلفة يمكن أن يسمح فى تغيير RNA. وقد ذكر فى هذا المجال ما يحدث فى الكمثرى من عزلة فيرويد HSVd - pear وفيرويدين آخرين مشابهين فى الحجم والتتابع لفيرويد ASSVd. وعلى أية حال فإن PBCVd يبدو أنه قد نشأ بواسطة إعادة الاتحادة بين هذه الفيرويدات، بالإضافة إلى عوائل مختلفة من الكمثرى تخدم كوسيط إحتياطى لفيرويدات مميزة وتسمح بحوادث إعادة الاتحاد بينها.

أخيراً فإن التركيب الثانوى المتفرع على أقل طاقة حرة متحصل عليها للفيرويد PBCVd تدل على أن هذا الفيرويد لا يتطابق مع التركيب شبه العصوى. إن هذا الوضع ليس فريداً للفيرويد PBCVd بل يمكن أن يحدث هذا الشئ لأفراد كثيرة من تحت مجموعة apscaviroids حيث أنها تحدث شكل متفرع باستثناء AGVd تحت ظروف معينة. إن تكوين الشكل المتفرع قد إفترض أيضاً لكثير من الفيرويدات من ضمنها ASBVd وفيرويد تقزم قمة الطماطم TASVd وفيرويد PLMVd وغيرها.

العوائل المشخصة :

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

للفيرويد ثلاثة عزلات متماثلة هى P2098T ، P1914T و P49T.

٣ـ فيرويدات العنب

Grapevine Viroids

مقدمة :

هناك عدة فيرويدات وكائنات أخرى شبيهة بالفيرويدات ذكر بأنها تهاجم أصناف العنب والأصول النباتية التى يطعم عليها العنب. وإن عمليات الحصر التى تؤدى إلى تقدير إنتشار هذه المسببات المرضية خلال مدى واسع من المصادر المدروسة جيداً أظهر بأن الفيرويدات موجودة فى جميع النباتات المختبرة فى استراليا، فقط بعض البادرات تبين أنها خالية من الفيرويدات وهذا يرجع لعدم إنتشار الفيرويد خلال البذور.

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

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

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

إن أول التقارير التى كانت تشير إلى وجود الفيرويدات فى العنب كانت سنة ١٩٨٤، حيث ذكر العالم Sano et al فى اليابان أنه أمكن عزل فيرويدات من العنب. كذلك سنة ١٩٨٥ ذكر Flores et al فى أسبانيا أن كثير من نباتات العنب مصابة بالفيرويد وقد أمكنه عزل بعض الفيرويدات من العنب وفى سنة ١٩٨٦ ذكر فى كاليفورنيا ظهور أعراض مرضية بالفيرويد فى نباتات العنب. بعد ذلك إنتشرت الدراسات على فيرويدات العنب.

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

١ ـ مجموعة الفيرويدات التى هى عزلات من فيرويد اكسوكورتز الحمضيات ويرمز لها CEVd - g

٢ ـ مجموعة الفيرويدات التى هى عزلات من فيرويد تقزم حشيشة الدينار ويرمز لها HSVd - g

٣ ـ مجموعة الفيرويدات التى تصيب العنب الاسترالى وتكتب AGVd

٤ ـ مجموعة الفيرويدات التى تسبب مرض النقطة الصفراء فى العنب Yellow Speckle وهى تسبب أمراض واضحة على العنب وتتكون من فيرودين: ـ

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

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

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

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

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

أما من حيث التصنيف فإن المجموعة الأولى والثانية، تتبع فيرويدات المجموعة B وتحت مجموعة B_1 الذى يمثلها فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس PSTVd. أما فيرويدات المجموعة الثالثة والرابعة فهى تتبع فى التصنيف فيرويدات تحت

مجموعة B_2 الذى يمثلها فيرويد ندب الجلد فى التفاح والذى يكتب ASSVd . إن جدول ٥١ يبين هذه المجموعات وبعض صفاتها.

جدول ٥١: يبين مجموعات فيرويدات العنب وبعض صفاتها.

اسم الفيرويد الحالى	عدد النيوكليتيدات	مجموعة التصنيف	المرضية على العنب	عائلة العشبى	بعض الأسماء القديمة
CEVD - g	٣٧١	تحت مجموعة B_1	لم تذكر أعراض على العنب	الطماطم	GVs
HSVd - g	٢٩٧	تحت مجموعة B_1	لم تذكر أعراض على العنب	الخيار	GV3
AGVd	٣٦٩	تحت مجموعة B_2	بدون أعراض	الطماطم والخيار	—
GYSVd - 1	٣٦٧	تحت مجموعة B_2	نقطة صفراء	غير محدد	GVF, GV1
GYSVd - 2	٣٦٣	تحت مجموعة B_2	نقطة صفراء	غير محدد	GV2, GV1B

أ ـ فيرويد العنب عزلة فيرويد تقزم حشيشة الدينار

Hop Stunt Viroid - Grapevine HSVd - g

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

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

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

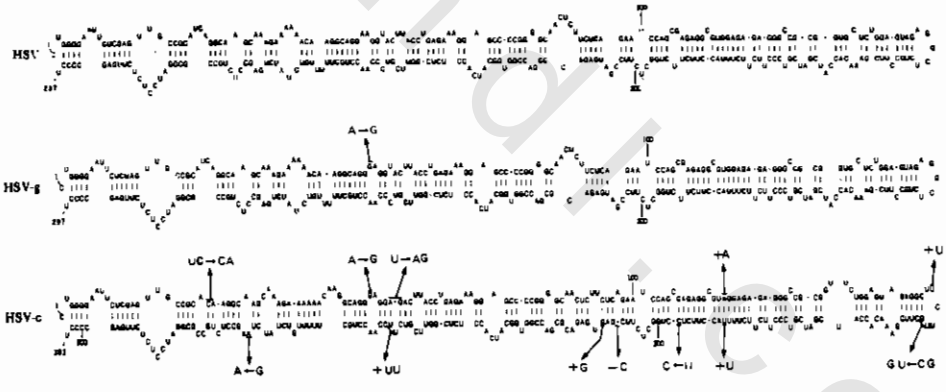
كما ذكرنا سابقاً فإ هذه العزلة مشابهة فى عدد النيوكليتيدات لفيروويد تقزم حشيشة الدينار فهى تتكون من ٢٩٧ نيوكليتيدة وتبلغ نسبة تماثل التتابع فيها ٩٩٪ بالنسبة للعزلة الأصلية HSVd، و ٩٥٪ بالنسبة لعزلة الخيار HSVd - c، إلا أن عزلة HSVd - g تقل بستة نيوكليتيدات عن عزلة الخيار (شكل ٧٥). تختلف عزلة العنب عن الفيروويد الأصلى HSVd فقط فى موقع الأدنين على مركز ٥٤ فى HSVd ويصبح جوانين فى عزلة العنب. كذلك فإن عزلة العنب تختلف عن عزلة الخيار فى ١٥ نيوكليتيدة، إلا أن موقع ٥٤ فى عزلة الخيار يشبه عزلة العنب فى كونه جوانين .Guanine. وبالتالى يمكن القول بأن التركيب الثانوى المقترح لعزلة العنب يشبه تماماً تركيب الفيروويد الأصلى HSVd.

من الصعوبة تمييز الأعراض على الخيار المتسببة عن العزلات الثلاثة (العنب ـ الخيار وحشيشة الدينار) إلا أن عزلة العنب أكثر قرباً وعلاقة مع الفيروويد الأصلى HSVd من عزلة الخيار.

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

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

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



شكل رقم ٧٥ :

تتابع النيوكليتيدات والتركيب الثانوى المقترح فى كل من HSVd ، HSVd - g و HSVd - c. النيوكليتيدات المختلفة عن HSVd مشار إليها بأسهم.

ب ـ فيرويد العنب عزلة فيرويد اكسوكورتز الحمضيات

Citrus Excocortis Viroid - Grapevine CEVd - g

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

اكتشاف الفيرويد:

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

أما النموذج الثانى فهو عبارة عن فيرويد حصل عليه من نباتات **G. aurantiaca** نتيجة لحقنها بحمض نووى من مستخلصات مأخوذة من العنب وسمى فيرويد العنب البطئ (GVd - f). وهذا الفيرويد يهاجر مشتركاً مع CEVd فى كل نظام من أنظمة الهجرة الكهربائية المستعمل فى التحليل.

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

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

هنا يبرز السؤال الآتى هو هل GVd - f و / أو GVd - s العامل المسبب لأمراض العنب؟؟. إن أعراض التفاف الورقة وتفلن القلف وتنقر الساق، النقطة الصفراء، التقرح، موزايك العروق ونكروزز العروق هى أمثلة للأمراض التى تصيب العنب والتى مسبباتها لم تحدد بعد وهل يفترض بأنها فيرويدات أم فيروسات. نظراً لأن بعض هذه الأمراض ينقل بالتطعيم وأعراضها تشبه الأعراض المتسببة عن فيروسات فى نباتات أخرى فقد إفترض بأنها تتسب عن فيروسات.

إلا أن الأبحاث المستمرة على العنب أثبتت أن هذ الأمراض تتسبب عن

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

دراسات تتابع النيوكليتيدات والصفات الحيوية للشكل GVd - s أثبتت أنه يتكون من (٣٧١) نيوكليتيدة وبأن صفاته متماثلة وقريبة الشبه من صفات فيرويد اكسوكورتز الحمضيات وبالتالى أطلق على هذا المسبب المرضى إسم عزلة فيرويد اكسوكورتز الحمضيات المسببة أمراض العنب.

جـ- فيرويد العنب الإسترالى

Australian Grapevine Viroid

مقدمة:

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

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

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

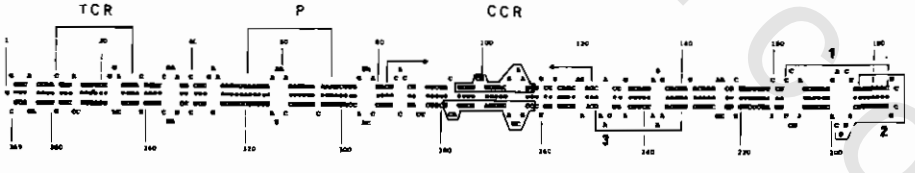
تتابع النيوكليتيدات الكامل للفيرويد AGVd :

إن تتابع النيوكليتيدات فى الفيرويد وتركيبه الثانوى المقترح يظهر فى شكل ٧٦. إن فيرويد AGVd هو جزئ دائرى من RNA يتكون من ٣٦٩ نيوكليتيدة

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

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

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



شكل رقم ٧٦ :

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

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

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

تركيب النطاقات فى الفيرويد AGVd :

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

obeikandl.com

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

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

نطاقات المرضية والأطرف:

Pathogenicity and Terminal Domains

يبدأ نطاق المرضية فى هذا الفيرويد من المركز ٥٣ ويمتد إلى مركز ٧٠ فى الخيط العلوى. هذا التتابع يشابه نطاق المرضية فى الفيرويدات الأخرى. إن تتابع AAAGAAAA موجود فى نطاقات المرضية فى معظم فيرويدات تحت مجموعة B_1 وهو موجود فى الفيرويد AGVd من مركز ٥٣ إلى مركز ٦١. عند مقارنة نطاق المرضية فى فيرويد AGVd مع الفيرويدات الأخرى نجد أنه أكثر إنتظاماً فى قواعد الأزواج وفيه عروة واحدة فقط. إن ثبات تتابع أزواج القواعد فى نطاق P فى الفيرويد AGVd يتوافق مع قلة حدوث التعبيرات المرضية فى النباتات العشبية وهذه الظاهرة ملاحظة أيضاً فى فيرويد PSTVd حيث أن زيادة ثبات أزواج القواعد فى تتابع نطاق P يرتبط مع نقص الشدة المرضية للفيرويد.

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

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

مقارنة الفيرويد AGVd مع الفيرويدات الأخرى:

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

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

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

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

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

د ـ فيرويدات النقطة الصفراء في العنب

Grapevine Yellow Speckle Viroids

مقدمة:

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

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

(GYSVd - 1) Grapevine Yellow Speckle Viroid - 1

(GYSVd - 2) Grapevine Yellow Speckle Viroid - 2

إن كلا الفيرويدين عضوين فى تحت مجموعة فيرويدات B_2 التى يمثلها فيرويد ندب الجلد فى التفاح ASSVd وفيها ٧٣٪ تماثل تتابع. إن كلا الفيرودين الأول والثانى قد اكتشفا فى الأعناب المظهرة للأعراض المرضية وغير المظهرة للأعراض فى أعناب استراليا بالإضافة لوجودهما بوضوح فى الأنسجة غير المظهرة للأعراض فى أعناب كاليفورنيا.

أولاً: فيرويد النقطة الصفراء فى العنب رقم ١

Grapevine Yellow Speckle Viroid - 1 (GYSVd - 1)

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

صفات الفيرويد GYSVd - 1 :

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

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

مطابقة الفيرويد GYSVd - 1 مع نموذج نطاقات الفيرويدات:

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

إن مقارنة التتابع بين GYSVd - 1 و ASSVd من ناحية ومجموعة PSTVd من ناحية أخرى يبين أن GYSVd - 1 يتطابق مع نموذج نطاقات الفيرويد المفترض من قبل Keese and Symone سنة ١٩٨٥ وهو يتكون من T_1 ، T_2 وهما نطاقى الطرف الأيمن والطرف الأيسر ويعتبران متغيران بين الفيرويدات المختلفة ثم نطاق P وهذا النطاق يتعلق بمرضية الفيرويد ثم نطاق C وهو المنطقة المركزية المحفوظة وهى ضرورية لتجهيز وتناسخ الفيرويد. نطاق V وهى منطقة عالية الاختلاف فى التتابع.

هناك مسافة ممتدة تتكون من ١٧ مركز موجودة فى منطقة T_1 من التركيب الثانوى للفيرويد GYSVd 1. لا يوجد تتابع فى المنطقة المفترضة للنطاق T_2 تتشارك مع فيرويدات من مجموعة PSTVd، ولكن هذه المنطقة محددة بواسطة إمتدادات لتتابع مشترك للفيرويدين GYSVd - 1 و ASSVd. أما نطاق P فإن هناك ١٩ مركزاً من تتابع Oligopurine فى هذا الفيرويد تقع بين مركز ٦١ و ٩٠ وهى ذات جزء غنى بالادنين يقع بين ٦٣ و ٧٣. فى التركيب الثانوى المفترض من الفيرويد GYSVd - 1 فإن التتابع الغنى بازواج القواعد من الأدنين يتركب مع تتابع U فى الخيط المقابل فى مراكز ٢٩٩ ـ ٣٠٩. أما نطاق C، فإن فيرويد GYSVd - 1 مثل فيرويد ASSVd لا يحتوى تتابع منطقة C الشائع فى جميع الفيرويدات الأخرى من مجموعة PSTVd. وعلى أية حال فإن هناك ١٦ مركز محفوظة فى منطقة شبيهة لموقع المنطقة المركزية المحفوظة فى PSTVd. هذه التتابعات تتدخل بكفاءة فى تكوين تركيبين والتى تشابه تلك التى فى منطقة C فى مجموعة PSTVd.

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

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

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

ثانياً: فيرويد النقطة الصفراء فى العنب رقم ٢

Grapevine Yellow Speckle Viroid - 2 (GYSVd - 2)

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

إن فيرويد GYSVd - 2 يتكون من ٣٦٣ نيوكليتيدة تتكون من ٦٨ A، ٧٧ U، ١٠٦ G و ١١٢ C. وبالإجمال ٦٧٪ من نيوكليتيداته أزواج قواعد وأزواج القواعد هذه ٣٣٪ A : U و ٥٥٪ G : C و ١٢٪ G : U. هناك إختلاف فى التتابع لوحظ بين كلونات cDNA للفيرويد GYSVd - 2. التغيرات كانت A → G على مواقع ٣٠٠ و ٣٢٨، U → C على المواقع ٣٤٤ و C → U على موقع ٣٦٠ وهناك حذف على موقع ٨.

إن تتابع الفيرويد GYSVd - 2 قورن مع تتابعات الفيرويدات المعروفة الأخرى باستعمال برنامج الكمبيوتر الذى وضعه Wilbur & Lipman سنة ١٩٨٣. إن درجة التشابه بين مختلف تركيب النطاقات فى الفيرويد GYSVd - 2 والفيرويدات المعروفة الأخرى فى جدول ٥٣. إن هذا الفيرويد يحتوى تتابع فى منطقته المركزية مشابه تماماً لذاك الموجود فى GYSVd - 1 و ASSVd. إن التتابعات المركزية فى GYSVd - 2 مختلفة تماماً عن تلك الموجود فى تحت مجموعة B_2 من الفيرويدات والتى تعطى زيادة فى التأكيد عن وجود إختلاف بينهما.

إن الفيرويد GYSVd - 2 قريب الشبه جداً مع الفيرويد GYSVd - 1، حيث فيه ٧٣٪ تشابه كلى معه والذى يمكن أن يتسبب عنه Cross - hybridization والذى لوحظ بين الفيرودين. إن تركيب فيرويد GYSVd - 2 يتوافق مع نموذج النطاقات المقترح من قبل Keese & Symons سنة ١٩٨٥ وفيه يمكن تحديد نطاق C، P و T_1 بسهولة. إن وجود نطاق V مشكوك فى موقعه بالضبط فى هذا الفيرويد حيث أن حلزون Oligopurine : Oligopyrimidine يحتوى على الأقل ٣ أزواج قواعد GC كما حدد فى نموذج النطاقات وهذا غير واضح فى الموقع العادى بين منطقتى C و T_2. أما نطاق P فى هذا الفيرويد فهو غنى باليورين فى الخيط العلوى وغنى باليوريدين فى الخيط السفلى والذى يؤدى إلى تماثل تتابع عال نسبياً عندما يقارن نطاق P فى GYSVd - 2 مع نطاق P فى الفيرويدات الأخرى.

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

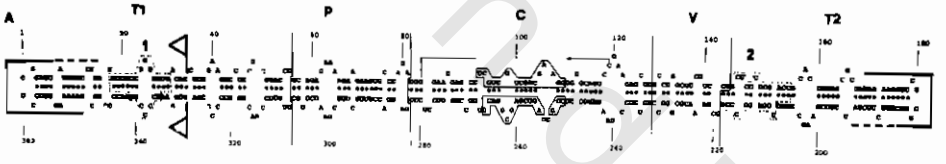
أما نطاق T_2 فى الفيرويد GYSVd - 2 فإنه بشكل عام يظهر قليل من تماثل التتابع مع نطاقات T_2 فى الفيرويدات الأخرى. وعلى أية حال هناك بعض التتابع المحفوظ بين نطاقات T_2 فى GYSVd - 2 و GYSVd - 1 وASSVd. إن المراكز من ١٧٠ إلى ١٨٥ فى الجزء الطرفى من منطقة T_2 من الفيرويد GYSVd - 2 مكررة فى الجزء الطرفى من منطقة T_1 (مراكز ٣٥١ ـ ٦). إن التكرار فى منطقة T_1 غير كامل بسبب الثلاثة مراكز الزائدة عن ما هو موجود فى T_2 الموجودة فى مواقع ٣٥٦، ٣٥٧ و ٥. إن النهاية `3 فى كل تتابع مكرر محاطة جانبياً بواسطة منطقة غنياً باليوردين. إن التكرار المباشر على نهايات مناطق T ليس واضحاً فى الفيرويدات الأخرى.

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

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

الأصل بسبب مجموعة من ٦٩ مركز فى نهاية اليد اليسرى من الفيرويد GYSVd - 2 والتى هى مماثلة إلى حد كبير مع المنطقة المشابهة لها فى نهاية اليد اليسرى من الفيرويد TPMVd. وبشكل عام فإن نطاق T_1 فى الفيرويد GYSVd - 2 فيه تماثل تتابع عال مع نطاقات T_1 فى الفيرويدات PSTVd ، TPMVd، CEVd. وهذا يزودنا باثباتات أكثر لأهمية إعادة الاتحاد فى RNA ودوره فى تطور الفيرويد.

إن العالم Keese & Symons قد ذكرا سابقاً ملاحظات عن إعادة الاتحاد فى الحمض النووى RNA بين أفراد فيرويدات تحت مجموعة B_1 التى يمثلها فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس وهذه الملاحظات تنطبق على الفيرويد GYSVd - 2.



شكل رقم ٧٧ :

تتابع النيوكليتيدات والتركيب الثانوى المقترح لفيرويد GYSVd - 2. يوضح كذلك أماكن النطاقات. الأسهم تشير (مرسومة فوق) المراكز المتكررة المقلوبة والتى تحيط جانبياً بالمنطقة المركزية المحفوظة [محصورة فى خطوط سوداء غامقة]. الصناديق المكونة من نقط رقم ١ و ٢ تحتوى المراكز والتى هى أيضاً محفوظة فى فيرويد ASSVd و GYSVd - 1. التتابع المتكرر المباشر موجود فى الأجزاء الطرفية من T_1 و T_2 فى الفيرويد GYSVd - 2 ومشار إليها بخطوط سميكة، أما المناطق الغنية بـ U والتى تلتف جانبياً على 3` فى كل تكرار يشار إليها بشرطات سميكة، الأعلام تدل على حدود تتابع $GYSVd_2$ والذى يكون دائماً نموذجى كما هو موجود فى فيرويد TPMVd.

جدول ٥٣ : يبين تماثل التتابع بين نطاقات الفيرويدات المختلفة.

الفيرويدات المستعملة فى المقارنة المزدوجة		٪ تماثـل تتابـع النطـاقـات				
١	٢	T_1	P	C	V	T_2	الكلى
GYSVd - 1 - GYSVd - 2		٨٦	٦١	٨٦	٥٣	٤١	٧٣
ASSVd - GYSVd - 2		٤٠	٥٢	٥٩	—	٣٨	٤٦
GYSVd - 1 - ASSVd		٣٣	٤٦	٥٣	—	٤٥	٤٢
GYSVd - 2 - HLVd		×	×	٣٠	×	×	٣٨
ASSVd - HLVd		×	×	٢٢	×	×	٣٠
GYSVd - 1 - HLVd		×	×	٢٨	×	×	٤٢
GYSVd - 2 - PSTVd		٤٨	٥٧	٣١	—	٢٧	٤٢
ASSVd - PSTVd		٥٢	٤٦	٢٦	٢٤	١١	٤٢
GYSVd - 1 - PSTVd		٥٠	٤٦	٢٦	—	٢٦	٣٧
HLVd - PSTVd		×	×	٥٣	×	×	٤٤
GYSVd - 2 - TPMVd		٦٦	٥٩	٢٥	—	٣٦	٤٩
ASSVd - TPMVd		٤٦	٤٦	٣٢	—	٢٨	٣٦
GYSVd -1 - TPMVd		٥٦	٤٢	٢٣	—	٣٦	٤٤
HLVd - TPMVd		×	×	٥٤	×	×	٤٥
GYSVd - 2 - CSVd		٣٠	٣٨	٢٥	—	٢٤	٣٧
ASSVd - CSVd		٤٦	٤٤	٣٤	—	٢١	٤٤
GYSVd - 1 - CSVd		٣٠	٥٥	٢٢	—	٣٣	٤٠
HLVd - CSVd		×	×	٦١	×	×	٣٧
GYSVd - 2 - CEVd		٥٩	٥٠	٢٥	—	٣٣	٤٠
ASSVd - CEVd		٤٣	٤٠	٢٩	٢٨	٢٧	٤٠
GYSVd - 1 - CEVd		٥٢	٥٥	٢٥	—	٢٥	٤٠
HLVd - CEVd		×	×	٦٩	×	×	٤٠
GYSVd - 2 - TASVd		٤٦	٥٠	٢٦	—	٣٨	٤٢
ASSVd - TASVd		٤٣	٥٢	٣٠	—	٣٤	٤٠
GYSVd - 1 - TASVd		٤٩	٥٥	٢٦	—	٣٦	٤٠
HLVd - TASVd		×	×	٦٨	×	×	٤٧
GYSVd - 2 - CCCVd		—	—	٢١	—	٧	٣٤
ASSVd - CCCVd		—	٣١	٢٨	—	٣٣	٣١
GYSVd - 1 - CCCVd		١٩	٢١	٢٧	—	٢٨	٣٠
HLVd - CCCVd		×	×	٦٠	×	×	٥٠
GYSVd 2 - HSVd		٢٠	٤٠	٢٤	—	١٦	٣٤
ASSVd - HSVd		٢٤	٤٠	٢٣	—	٢٦	٣٦
GYSVd 1 - HSVd		٢٨	٥٠	٢٣	—	٢٥	٣٨
HLVd - HSVd		×	×	٤٥	×	×	٤٢

(—) = لم يحدث قياس. (×) المنطقة المركزية المحفوظة هى المنطقة الوحيدة التى حددت فى HLVd واستعملت فى المقارنة.

مقارنة بين GYSVd - 1 و GYSVd - 2 :

بدراسة تتابع الفيرودين المذكورين أعلاه كل على حدة تبين أن كل منهما يحتوى على تتابع مركزى متماثل وكلاهما موجود على شكل تركيب شبه عصوى وكلاهما ينتمى إلى تحت مجموعة B_2 التى يمثلها ASSVd. أما بالنسبة لحيوية كل من الفيرودين، فقد وجد أن كلا الفيرودين ينتقل إلى الطماطم أو الخيار. إن جدول رقم ٥٤ يبين حيوية كل من الفيرودين على بادرات العنب من حيث التناسخ وأحداث أعراض ظاهرية والانتقال.

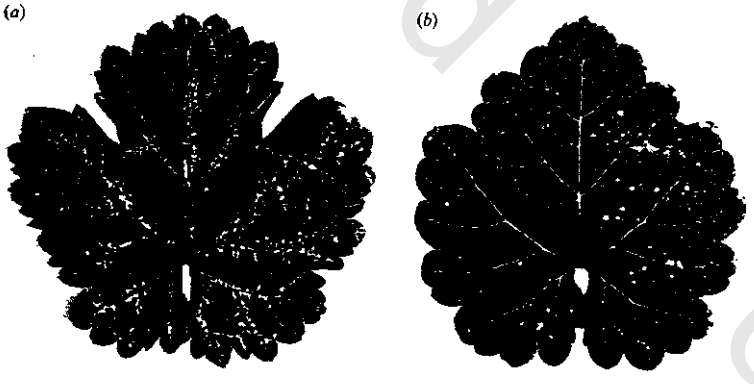
إن استعمال نسخاً مبنية من RNA فى المعمل أظهر نسبة منخفضة فى إحداث الأعراض على النباتات، هذا يدل إما على تلوث اللقاح أثناء التحضير، أو الحقن بطريقة غير محكمة أو غير متحكم بها. كما وأنه ليست جميع النباتات المحقونة بالفيورودين أصبحت مصابة، وهذا قد يكون بسبب الاختلافات الوراثية للنباتات المختبرة حيث أنها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

تعبيرات الأعراض :

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

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

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



شكل رقم ٧٨ :

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

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

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

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

ثانياً: فيرويدات تحت مجموعة B_3

فيرويدات الكوليس

Coleus Viroids

مقدمة:

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

obeikandl.com

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

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

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

أ ـ فيرويد إصفرار الكوليس

(CYVd) Coleus Yellow Viroid

مقدمة :

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

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

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

إنتقال الفيروید:

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

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

طبيعة الفيرويد:

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

جدول ٥٥ : توزيع الفيروبد فى النباتات الناتجة من تكاثر خضرى.

أجزاء النبات	الأصناف المختبرة. عدد النباتات الموجبة للاختبارعلى عدد النباتات المختبرة			
	القطيفى	القرمزى	الارجوانى	الأخضر
الفروع الحديثة	٢/٢	٤/٤	٢/٢	١/صفر
الأغصان	٧/٧	٥/٥	١٢/١٥	—
سبلات الأزهار	١/٢	٢/٢	٢/٢	٢/صفر
بتلات الأزهار	١/٢	٢/٢	٢/٢	٢/صفر
متوك الأزهار	١/٢	٢/٢	٢/٢	٢/صفر
عضو التأنيث فى الزهرة	١/٢	٢/٢	٢/٢	٢/صفر
البذور الساكنة	٣/٥	٢/٥	٤/٥	٥/صفر

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

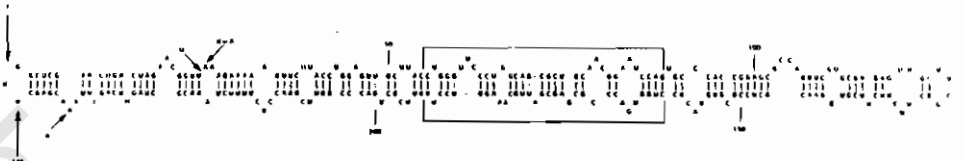
ب ـ فيروبد كوليس بليومس رقم ١

Coleus Blumei Viroid - 1

إن دراسة تتابع النيوكليتيدات الكامل فى فيروبد اصفرار الكوليس المعزول من **Solenostemon seutellarioides** أظهر أن هذا الفيروبد يتكون من ٢٤٨ نيوكليتيدة والتى تأخذ شكل عصوى فى التركيب الثانوى للفيروبد عندما تنثنى بأقل طاقة حرة. إن مقارنة تتابع فيروبد إصفرار الكوليس مع فيروبد كوليس بلومى رقم ١ (CbVd - 1) المعزول فى ألمانيا بين أن هذين الفيرودين بينهما علاقة قريبة جداً. إن الإختلافات بين الفيرودين موجود فى ثلاثة مواقع فقط هى: الموقع الأول فى مركز ٢٥ حيث تزال منه قاعدة U، والموقع الثانى هو مركز ٢٦ حيث تستبدل

قاعدة U وتحل محلها قاعدة A. أما الموقع الثالث فهو مركز ٢٤١ حيث تغرز قاعدة A. هذا يعنى أن الفيرودين فيها نفس عدد النيوكليتيدات ٢٤٨ والاختلاف فى ثلاثة مواقع فقط ولقد صنف هذين الفيرودين فى تحت مجموعة B_3 من الفيرويدات.

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



شكل رقم ٧٩ :

رسـم يبـين ترتيـب النيوكليـتيدات والتـركـيب الثانـوى للفيرويـد CYVd المـعزول مـن S. scutellarioides. النيوكليتيدات المختلفة الملاحظة بين الفيرويدين CYVd و CbVd - 1 مشار إليها بالأسهم. المنطقة المحاطة بمستطيل هى المنطقة المحفوظة المركزية.

obeikandl.com