فيروسات النبات
PLANT VIRUSES
2020
الاستاذ الدكتورم / مظهر العيسوي الشريف
رئيس قسم الميكروبيولوجي

تنقية فيروسات النبات وخواصها الطبيعية والكيميائية

Purification of plant viruses and its physical and chemical properties

لدراسة التركيب وغيره من الصفات الاساسية للفيرس، فمن الضروري الحصول عليه في صورة نقية مع المحافظة على قدرته على احداث العدوى. وتتفاوت الفيروسات النباتية تفاوتاً كبيراً فيما بينها في حدود عشرة آلاف ضعف في كمية الفيرس التي يمكن استخلاصها من الانسجة المصابة (من حوالي 4000 – 0,4 ميكروجرام/ جرام وزن طازج) كما تتفاوت الفيروسات فيما بينها تفاوتاً كبيراً من حيث الثبات Stability أو تحمل عديد من العوامل الطبيعية والكيماوية والانزيمية والتي يمكن ان يتعرض لها الفيرس خلال عملية الفصل، والتخزين. ومن أجل ذلك لا توجد قواعد ثابتة لعملية الفصل بالنسبة لكل الفيروسات حيث أن الطريقة التي تؤدي نتائج جيدة بالنسبة لفيرس ما يمكن أن تفشل تماماً مع فيرس آخر قد يكون متشابهاً مع الأول..

تنقية الفيرس Purification of viruses

المقصود بتنقية الفيرس تلك العملية التي ينتج عنها زيادة في نشاط التحضيرات الفيروسية، وهذا يترجم الى زيادة الوحدات القادرة على الإصابة لوحدة الوزن للمادة (عادة البروتين أو النيتروجين).

ومن المعروف انه يتكون داخل الخلايا المصابة مواد غريبة غير الجزيئات الفيروسية أو الحاملة لصفة العدوى مثل:

1- أشكال خيطية Filamentous واشكال غير كاملة كما في فيرس الانفلونزا، حيث يظهر بها أن جزيئات الفيرس غير متماثلة Heterogenous
2- جزيئات غير معدية ولكن لها صفة الانتيجين الفيروسي Antigenic specificity
3- جزيئات صغيرة تسمى أنتيجيناً ذائباً Soluble antigen لا ترسب تحت ظروف ترسيب الفيرس. وقد عرف انها توجد في كثير من فيرس الحيوان.

Virology, Dr M. Elsawi

4- جزيئات غير معدية من الحجم نفسه، كالتي وجدت في حالة الاصابة بفيرس موزايك اللفت Turnip Yellow Mosaic Virus

والمحتويات السابقة التي توجد في العائل المصاب وتحتوي على بعض خواص الفيرس (صفة الانتيجين) ليس لها القدرة على العدوى. وتكون ذات وضع مختلف. وتنفصل مثل هذه المواد بواسطة الطرق الطبيعية والكيماوية.

والتحضير النقي في عرف الكيمياء الطبيعية عبارة عن تحضير يحتوي على مكون واحد متجانس، ويكون كل جزء فيه (أو كل وحدة) مكونة من جزيئات موحدة التركيب الكيماوي. إلا أن هذا التعيف لا يجد قبولاً عند البيولوجيين خاصة الوراثة؛ إذ انهم يعتبرون أن التحضير النقي هو الذي لا يمكن فيه فصل صفة العدوى عن الجزيئات الموجودة، والذي لا يتميز فيه وجود المحتويات غير الفيروسية. ولكن مثل هذا التعريف يترك مجالاً للاختلافات الكيميائية الطبيعي خاصة في مورفولوجي الفيروسات الكبيرة المعقدة وخاصة الجزيئات غير المميزة والطفرات التي توجد بكل تأكيد في أعداد كبيرة.

الخواص الكيميائية والطبيعية للفيروسات النباتية

Chemical and Physical properties of plant Viruses

اولاً الخواص الطبيعية Physical properties

منذ فترة طويلة بدأ العلماء يهتمون بدراسة شكل وحجم وتركيب الفيرس، وقد أوضح "إيفانوفيسكي" أن سبب مرض موزايك الدخان فيرس ذو شكل عصوي. وحاول العلماء بعد ذلك تحديد أشكال الفيروسات واستخدموا لذلك طرقاً عديدة يمكن ترتيبها حسب استخدامها الى: الترشيح - الترسيب – استخدام الميكروسكوب الضوئي – استخدام ميكروسكوب الأشعة فوق البنفسجية – استخدام ميكروسكوب اختلاف الطور الضوئي – استخدام الميكروسكوب المقطب الضوئي - استخدام الميكروسكوب الالكتروني. ويعتبر الميكروسكوب الالكتروني في الوقت الحالي من أهم الطرق المستخدمة في تعريف شكل وحجم الفيروسات المختلفة. وتقدمت طرق الفحص بالميكروسكوب الالكتروني كثيراً باكتشاف وسائل جديدة لعمل مقاطع -في الخلايا المصابة بالفيرس – دقيقة جداً يتراوح سمكها من 10-20 ملليميكرون والتي بواسطتها أمكن معرفة شكل الفيرس في مراحل حياته المختلفة.

Virology, Dr M. Eisawi

- **شكل الفيرس Shape of Virus**

أمكن بواسطة الميكروسكوب الإلكتروني تمييز أجسام في انسجة النباتات المصابة بأمراض فيروسية لم ينجح في رؤيتها في انسجة النبات السليمة. وامكن ملاحظة اجسام خيطية أو عصوية أو كروية تميز بسهولة عن الاشكال الفيروسية. وف العام 1955 اعتبر ريجكوف Rijkov 1955 ان الجزيئات الموجودة في عصير النباتات المصابة والمنقاة كيميائيا شكلاً اطلق عليه اسم "جراثيم فيروسية" Virus spores واطلق عليها غيره من العلماء "جزيئات الفيرس"

حجم الفيرس Size of Virus

أما مقاييس جزيئات الفيرس فتختلف اختلافاً بيناً. ويمكن تقدير هذه المقاييس بالدقة الكافية بواسطة الصور المأخوذة بالميكروسكوب الالكتروني لتحضيرات نباتات مصابة. ومن المعروف أن مقاييس جزيئات الفيرس ثابتة بالنسبة لكل نوع كما هو الحال بالنسبة للشكل، الا انه عندما يكتب الباحثون عن هذا الفيرس أو ذاك عادة ما يعطونه مقاييس مختلفة لنوع الفيرس الواحد.

هذا التباين في مقاييس جزيئات الفيرس الواحد ربما يعزي سببه الى طريقة تحضير العينات، وما يتبع ذلك من تكسير لجزيئات الفيرس، علاوة على ما قد يكون لعمر الفيرس من تأثير؛ لهذا رأى بعض الباحثين أن القياس الذي يمثل أكبر عدد من جزيئات الفيرس يمثل طول جزيء الفيرس بصفة عامة.

وقد كتب بروتسنكو وليجونكوفا Protcenko & Legonkova 1965 ان جزيئات كثير من الفيروسات تحتفظ بشكلها في الظروف العادية، وعملا مقارنةً لشكل جسيمات فيرس موزايك الدخان مع جسيمات فيرس البطاطس الناتجين عن هرس النسيج المصاب في هاون بمساعدة الرمل ودون مساعدة الرمل. ووجدا انه لا يوجد فرق واضح في طول جسيمات الفيرس الواحد الناتجة عن هرس النسيج المصاب بمساعدة الرمل أو هرسه دون مساعدة الرمل.

وأصبح معروفاً ان مقاس جزيئات الفيرس يختلف اختلافاً كبيراً؛ فجزيئات فيرس نيكروزيس الدخان قطرها 17 نانوميتر، وجزيئات فيرس اللون البرونزي في نباتات الطماطم قطرها 10 نانوميتر. كذلك طول جزيئات فيرس موزايك الدخان 300

Virology, Dr M. Eisawi

نانوميتر، أما جزيئات فيرس X البطاطس فطولها 500 نانوميتر، وفيرس اصفرار البنجر طول الخيط فيه 1250 نانوميتر، بينما طول خيط فيرس تخطيط البسلة 5000 نانوميتر.

نقطة فقدان الفيرس لنشاطه الباثولوجي بالحرارة

Thermal Inactivation Point

تتأثر الفيروسات وهي خارج عوائلها بالحرارة العالية بدرجات مختلفة. وتلعب حالة العصير دوراً كبيراً؛ فمثلاً يفقد فيرس موزايك الدخان تأثيره عند تسخينه على درجة 75 درجة مئوية لمدة 10 دقائق اذا كان الوسط ذو pH7. أما اذا كان الوسط pH5,5 فيفقد تأثيره اذا ما عرض لحرارة 59 درجة مئوية لمدة 10 دقائق.

وتتميز الفيروسات المختلفة فيما بينها **بنقطة فقدان نشاطها**. وهي عبارة عن درجة الحرارة التي اذا ما تعرض لها الفيرس لمدة 10 دقائق فقد قدرته على احداث الاصابة. فمثلاً يتأثر فيرس موزايك موزايك الدخان بارتفاع درجة الحرارة تأثراً تدريجياً ويتم التأثير على درجة حرارة 93 درجة لمدة 10 دقائق. وفيرس نيكروزيس الدخان يتأثر بدرجة حرارة منخفضة وهي عند 50 درجة لمدة 10 دقائق تسبب له تأثير نسبي، في حين أن نقطة فقدان نشاطه الباثولوجي حوالي 80 درجة مئوية. ومن الفيروسات ما هو مقاوم لدرجات الحرارة العالية مثل فيرس تجعد أوراق البسلة فنقطة فقدانه لنشاطه تصل الى 108 درجة مئوية.

- **التجميد: Freezing**

يتحمل عصير النبات المصاب درجات الحرارة المنخفضة، بينما تقل قدرة المستحضرات النقية للفيرس على تحمل مثل هذه الدرجات. واذا ما أضيف الى مثل هذه التحضيرات النقية جلوكوز أو أملاح فان ذلك يرفع من درجة مقاومتها أو ثباتها. وللوسط الموجود به الفيرس تأثير كبير؛ فالتحضير النقي لفيرس موزايك الدخان يتحمل التجميد في الوسط المتعادل pH7 ولكنه يفسد اذا تمت عملية التجميد في وسط حامضي.

- التجفيف drying

معظم الفيروسات النباتية تفسد بسرعة بالتجفيف العادي للانسجة. حتى فيرس موزايك الدخان، الذي يتميز بقوة مقاومته وثباته، فانه أمام التجفيف يفقد جزءاً ملحوظاً من نشاطه. واذا ما جففت الأوراق المصابة بسرعة على درجة 1 درجة ثم حفظت

Virology, Dr M. Fisawi

الأوراق في مكان خالي من الرطوبة فان بذلك يمكن للفيروسات الثابتة أن تحتفظ بحيويتها لبضعة أشهر أو ربما لسنة. ومن هذه الفيروسات موزايك الخيار رقم 1، وفيرس البقع الحلقية في الدخان وفيرس X البطاطس.

تأثير الاشعة فوق البنفسجية Effect of Ultravoilet (UV)

جميع الفيروسات تفسد بسرعة عند تعرضها الى الـ UV. ويتم فقدان هذا النشاط عند طول موجي 260 ملليميكرون. هذه الأشعة تمتص بواسطة أحماض النواة، وكذلك الموجات الأقصر من ذلك ذات تأثير قوي على نشاط الفيرس. أما الموجات الطويلة التي تزيد عن 300 ملليميكرون فان تأثيرها ضعيف. وتحتفظ الفيروسات الفاقدة لنشاطها بواسطة اشعة UV تحتفظ بخواصها الطبيعية وصفاتها كأنتيجين.

بعض الفيروسات الفاقدة لنشاطها نتيجة لتعرضها للـ UV يمكن لها ان تعود لها حيويتها اذا ما تعرضت الانسجة المصابة الى الضوء العادي. وعودة النشاط لا تتم اذا ما كانت الفيروسات خارج خلايا نسيج العائل.

الضغط Pressure

بعض الفيروسات تُظهر مقاومة كبيرة نسبياً تحت الضغط العالي. فيفسد فيرس موزايك الدخان TMV الموجود في العصير اذا ما عرض لضغط 50,000 جو فساداً ضعيفاً. بينما يفسد فيرس نيكروزيس الدخان في ضغط 3000-5000 جو حيث انه اقل منه مناعة.

مدة حفظ الفيرس لحيويته Ageing

يفسد الفيرس الموجود في عصير النباتات المصابة تدريجياً اذا ما ترك على درجة الحرارة العادية، ذلك لفساد المواد الموجود بها الفيرس وكذلك عمل اكسجين الهواء. ويمكن أطالة مدة بقاء الفيرس بحالة صالحة اذا ما اضيف للعصير مواد حافظة. وتختلف الفيروسات في مدة بقائها حافظة لنشاطها اختلافاً كبيراً. فمثلا فيرس موزايك الدخان يحتفظ بحيويته سنيناً طويلة وهو في العصير، بينما يفسد فيرس برونز الطماطم خلال بضع ساعات.

نقطة التخفيف النهائية Dilution end point

Virology, Dr M. Eisawi

لتركيز الفيرس في محلول الحقن تأثير كبير. فعند درجة معينة من التخفيف بالماء تصبح الإصابة متعذرة وذلك ربما يكون نتيجة لقلة جزيئات الفيرس التي تدخل الخلية وبالتالي فالفرصة تكون بسيطة أمام الجزيئات التي تسمح لها الظروف بالتكاثر؛ وعلى ذلك تتوقف الإصابة على عدد جزيئات الفيرس التي تدخل الخلية.

وتسمى درجة تخفيف الفيرس التي بعدها لا تحدث أي اصابة بنقطة التخفيف النهائية Dilution end point

الخواص الكيميائية للفيرس

Chemical properties of Virus

1- ترسيب الفيرس: يمكن ترسيب الفيرس بواسطة الكيماويات التي ترسب البروتينات مثل الأمونيوم أو الكحول.

2- تقدير تركيز الفيرس بالطرق الكيميائية. ولهذا الغرض تستعمل طريقة كلداهل في تقدير النيتروجين ومنها الفيرس في المحلول.

3- التكوين الكيماوي للفيرس: استعملت لذلك بعض الطرق الحديثة مثل:

أ) Electroporasis

تبنى على اساس هجرة migration الجزيئات في محلول كهربي وربما يتم هذا في وسط سائل أو على ورق. وتتحرك الاجزاء أو الجزيئات نحو القطب السالب أو تبقى ساكنة طبقاً لشكل وحجم الجزيء والشحنة الكهربية المحمولة بواسطة الجزيء. وتؤدي هذه الطريقة الى فصل الجزيئات المختلفة الموجودة في مخلوط وتساعد في تعريفها.

ب) الكروماتجرافي: Chromatography

وهذه الطريقة تقيس حركة البروتينات والأحماض الأمينية والجزيئات الأخرى في مجال غير كهربي. ويمكن توضيح هذه التحركات على ورق أو في أعمدة تحتوي على سيليلوز أو Diatomacoaus earth

ووجد ان استعمال الورق paper chromatography يفيد لفصل وتعريف الأحماض الأمينية ويحلل البروتين الى أحماض أمينية.

Virology, Dr M. Eisawi

تأثير المواد الكيماوية على الفيرس

كثير من المواد الكيماوية لها القدرة على ابطال مفعول الفيرس، ومنها المواد التي تؤثر على البروتين مثل أملاح المعادن الثقيلة والاحماض القوية وكثير من المواد الأخرى. بتعريض الفيرس الى 3-5% ليزول Lysol لمدة 5 دقائق يزول تأثير الفيرس. كذلك برمنجنات البوتاسيوم تستعمل كمطهر ضد فيرس موزيك الدخان.

يؤثر الفورمالدهيد و فوق اكسيد الايدروجين على الفيرس. والتأثير في بعض الحالات يكون جزئياً وعكسياً. فمثلاً يزول تأثير الفورمالدهيد بعمل تحلل مائي لفيرس موزايك الدخان فيعود اليه نشاطه جزئياً. كما لوحظ التأثير العكسي على فيرس موزايك الدخان اثناء تعرضه لمحلول قلوي Alkalization وفي هذه الحالة يعود للفيرس نشاطه اذا ما عمل له تحلل مائي بواسطة الماء.

ويمكن القول بانه لا يوجد تفسير واحد ثابت في عمل المواد المختلفة المؤثرة على الفيروسات المختلفة؛ واوضح مثال على ذلك أن الجليكوبروتين المستخلص من *Phytolaca esculenta* يؤثر بشدة على نشاط فيرس الدخان وفي الوقت نفسه لا يؤثر على البكتريوفاج.

وتتوقف مقاومة الفيروسات بشدة على تركيز أيون الايدروجين. وتختلف مقاومة الفيروسات المختلفة للوسط الحامضي اختلافاً ظاهراً، فمثلاً يتأثر فيرس X البطاطس كلية في وسط أقل من pH4,3 ، أما فيرس موزايك الدخان فانه يقاوم أقل من pH2

يحتفظ الفيرس بنشاطه بعد التحميض المتوسط، فعند عدوى نباتات الدخان فانه تظهر عليه مظاهر الاصابة. ولا يفترق الفيرس المتكاثر والمعزول من هذه النباتات عن الفيرس الأصلي.

وعلى اساس كل ما سبق يمكن القول بان مجموعة الأوكسي ومجموعة الكربوكسيل تلعبان دوراً مهماً في نشاط الفيرس وكذلك بعض أجزاء من مجموعة الأمين. ولهذا يمكن اعتبار ان التركيب البيولوجي للفيرس يحدده مجموع كل خواص مكوناته الكيماوية وتركيبه الطبيعي.

Virology, Dr M. Elsawi