الفيروسات

المحتويات

تعريف الفيروس :
تركيب الفيروسات :
صفات الفيروسات النباتية :
تقدير الفيروسات :
مورفولوجيا الفيروسات :
تركيب الحامض النووى للفيروسات النباتية :
إنتقال وتوزيع الفيروسات فى النبات :
الأعراض التى تسببها الفيروسات النباتية :
تنقية الفيروس :
عزل الفيروس :
طرق تشخيص الفيروسات النباتية سيرولوجياً:

تعريف الفيروس :

الفيروس عبارة عن بروتين نووى صغير للغاية لايمكن مشاهدتة بالميكروسكوب الضوئى ويتكاثر فى الأنسجة الحية فقط ولة القدرة على أحداث المرض . وكل الفيروسات متطفلة داخل الخلايا وتسبب أعداد كبيرة من الأمراض لكل التكوينات من الخلايا الحية إعتباراً من الكائنات بدائية النواة حتى النباتات الكبيرة والحيوانات .

إما بعض الفيروسات بتهاجم النباتات وبعضها يهاجم الكائنات الحية الدقيقة الفطريات والبكتريا والميكوبلازما.

العدد الكلى للفيروسات المعروفة حتى الأن حوالى 2000 وإن كان هناك فيروسات جديدة تكتشف كل شهر. وحوالى ربع هذا العدد (500) فيروس تهاجم النباتات محدثة لها امراضاً .

ويمكن لفيروس معين إن يصيب نباتات من نوع وأحد أو عدة أنواع نباتية كما أن كل نوع نباتى عادة ما يهاجم بعدة أنواع من الفيروسات كما أن النبات الواحد يمكن أن يصاب بأكثر من فيروس .

بالرغم من أن الفيروسات عوامل مرضية تشترك مع الكائنات الحية الأخرى فى قدرتها الوراثية على إزدياد أعدادها فإنها تسلك أيضا سلوك الجزئى الكيماوي . وببساطة فإن الفيروسات تحتوي على حامض نووى وبروتين والأخير يعمل كغلاف يسمى

Capsid حول جزئ الحامض النووى .

وبالرغم من إن الفيروسات يمكن أن تأخذ عدة أشكال فإنها غالباً ما تكون عصوية أو خيطية أومتعددة الأسطح أو متباينة عن هذة الأشكال.

تتركب الفيروسات :

وفى كل فيروس من الفيروسات النباتية يوجد نوع وأحد من أنواع من DNA أو RNA البروتينات وبعض الفيروسات الكبيرة

تحتوى على أكثر من نوع بروتينى ولكل بروتين دور مختلف عن الأخر .

والفيروسات لاتنتج أى نوع من التراكيب مثل الجراثيم ولكنها تتناسخ داخل الخلايا الحية لتكوين فيروسات جديدة .

كما أنها تسبب أعراضاً مختلفة على النباتات ولكنها لا تقتلها بل تستهلك الغذاء من الخلايا . ولكنها تستخدم المواد الخلوية وتأخذ مكان فى الخلايا محدثة خلل وإضطراباً يؤدى الى تطور غير عادى فى الخلايا والأعضاء النباتية .

صفات الفيروسات النباتية :

تختلف الفيروسات النباتية عن بقية المسببات المرضية فى النبات ليس فقط فى الحجم ولكن فى الشكل .وأيضاً فى البساطة فى التركيب الكيماوى والطبيعى – وطرق العدوى والأنتقال فى العائل والأنتشار كذلك فى الأعراض التى تنتجها فى النبات .وحيث أنها صغيرة جداً وشفافة فإنة لايمكن مشاهدتها أو تقديرها بالطرق المعروفة والفيروسات ليست خلايا ولاتحتوى على خلايا .

تقدير الفيروسات :

لايمكن مشاهدة الفيروسات داخل النبات بواسطة الميكروسكوب الضوئي على الرغم من إن بعض الفيروسات تحتوي على أجسام بللورية يمكن مشاهدتها فى الخلايا المصابة .

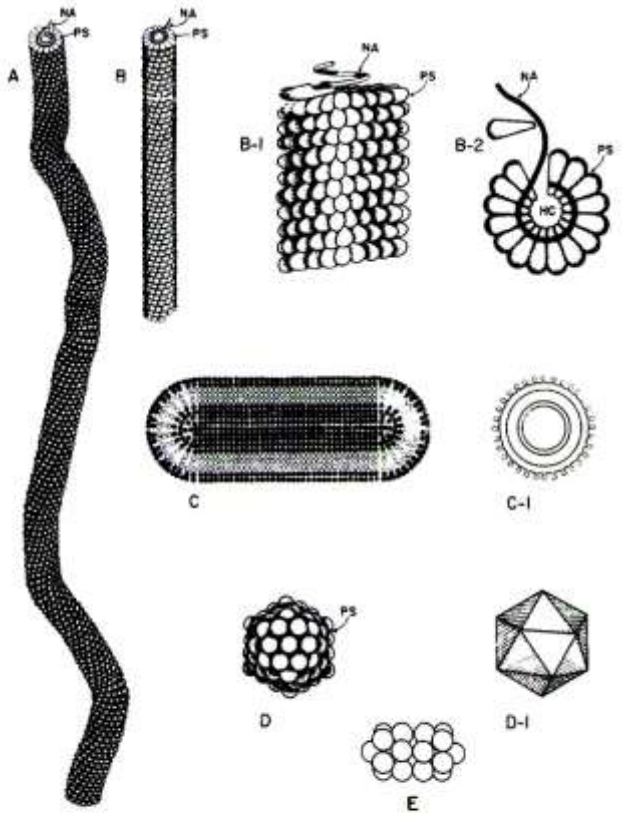
عند عمل قطاعات أو أخذ عصيرخلوى مصاب يمكن فحصة بالميكروسكوب الألكترونى وعندئذ يمكن مشاهدة جزيئات الفبروس وقد لايمكن مشاهدتها .

الطرق الحالية لتقدير الفيروسات تعتمد على نقل الفيروسات من النباتات المصابة الى السليمة بعدة طرق منها :

1-البرعمة 2-التطعيم 3-المسح بواطة العصير النباتى

ومعظم هذة الطرق لاتميز إذا ما كان المسبب فيروس أو ميكوبلازما أوغيرها .والأسلوب الأمثل هو مشاهدة المسبب المرضي. وتصبح الطريقة الأكيدة لإثبات وجود الفيروس فى النبات هى التنقية ثم الفحص بالميكروسكوب الإلكترونى وإيضاً بالطرق السيرولوجية

مورفولوجيا الفيروسات :



Relative shapes, sizes, and structures of some representative plant viruses. (A) Flexous threadlike virus. (B) Rigid rod-shaped virus. (B-1) Side arrangement of protein subunits (PS) and nucleic acid (NA) in viruses A and B. (B-2) Cross-section view of the same viruses. HC, Hollow core. (C) Short, bacilluslike virus. (C-1) Cross-section view of such a virus. (D) Polyhedral virus. (D-1) Icosahedron, representing the 20-sided symmetry of the protein subunits of the polyhedral virus. (E) Geminivirus, consisting of twin particles.

تركيب الحامض النووى للفبروسات النباتية :

RNA ويوجد حوالى 24 فيروس معروف أن المادة النووية فيها معظم الفيروسات النباتية يتكون الحامض النووى فيها من DNA.

Viroids : **عبارة عن SingleStrandمن RNA**

صغير جداً يتكون عادة من 250-400 نيوكليوتيدة وهو قادر على أحداث الأمراض النباتية

إنتقال وتوزيع الفيروسات فى النبات :

لحدوث العدوى فإنة على الفيروس أن ينتقل من خلية لأخرى وأن يحدث لو تناسخ فى أن لم يكن كل الخلايا -أى ينتقل فيها .

وفى حركتة من خلية لأخرى يسلك طريقة خلال البلازمودزماتا (الخيوط الموصلة بين برتوبلاست الخلايا المتجاورة) وعلية فإن الفيروس لايمكنة الأنتقال من خلية لأخرى إلا إذا أصيبت الخلايا وحدث لة تناسخ بداخلها ويحدث التحرك عادة بمعدل 1 ملليمتر/ يوم (8-10) خلية .

وبمجرد دخول الفيروس الى اللحاء فإنة يتحرك بسرعة اتجاة مناطق النمو خاصة المرستيمات القمية أو الى مناطق تخزين الغذاء مثل الدرنات والريزومات

الأعراض التى تسببها الفيروسات النباتية :

أشهر الأعراض التى تسببها الفيروسات النباتية هى نقص معدل النمو فى النباتات وبالتالى نقص إنتاجية المحاصيل لقصر عمر النباتات المصابة .

التأثيرات السابقة ربما تكون شديدة بحيث يسهل مشاهدتها بالعين المجردة كما إنها قد تكون بسيطة جداً ويمكن مشاهدتها أيضاً .

تظهر الأعراض عادة و بشدة على الأوراق ولكن فى أحوال أخرى تسبب الفيروسات أعراضاً شديدة الوضوح على السيقان والثمار والجذور كما قد لاتظهر أعراض على الورقة بالمرة .

معظم الأعراض التى تحدث فى الحقول تكون نتيجة إصابة جهازية حيث ينتقل الفيروس جهازيا فى النبات .

عديد من الفيروسات تحدث عدوى لبعض العوائل دون ظهور أى أعراض مرئية عليها .

وفى أحوال أخرى نجد أن بعض النباتات المصابة تظل ذات مظهر سليم عقب العدوى إلا أنة فى ظروف معينة من الرطوبة والحرارة يظهر عليها أعراضاً شديدة أو حادة تؤدى الى موت النبات كلياً .

تنقية الفيروس

المقصود بالتنقية أنها عملية ينتج عنها زيادة في نشاط التحضيرات الفيروسية وهذا يترجم إلى زيادة الوحدات القادرةعلى الإصابة لوحدة الوزن للمادة (عادة البروتين أو النيتروجين).

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

- **أشكال خيطية وأشكال غير كاملة حيث يظهر بها أن الجزيئات الفيروس غير متماثلة .**
- **جزيئات غير معدية ولكن لها صفة الأنتجين الفيروسي.**
- **جزيئات صغيرة تسمى أنتيجينية زائدة لا ترسب تحت ظروف ترسيب الفيروس.**
- **جزيئات غير معدية من حجم الفيروس نفسه .**

والمحتويات السابقة التى توجد فى العائل المصاب وتحتوي على بعض خواص الفيروس (صفة الأنتجين) ليست لها القدرة على العدوى ، وتكون ذات وضع مختلف . وتنفصل مثل هذة المواد بواسطة الطرق الطبيعية أو الكيميائية

عزل الفيروس

ويمكن تلخيص عملية التنقية بالنسبة للفيروسات المختلفة فى النقاط الأتية

Extraction-1

أستخلاص المحلول الخام (العصير) المحتوى على الفيروس من نسيج العائل.

clarification -2 ترويق العصير .

Purification -3 الحصول على الفيروس

أن تكرار بعض العمليات السابقة عمل مرغوب ,حيث أن المواد الغريبة يصعب فصلها عن الفيروس بااجراء العملية مرة وأحدة ,فاستعمال أكثر من عملية يعطى فرصة أفضل للتخلص منها.

وهناك قواعد مهمة يجب ملاحظتها عند تنقية بروتين ما وأهمها:

1- معرفة درجة ثبات لبروتين (الفيروس) لدرجات حرارة مختلفة ولدرجات ال (بي آتش) المختلفة .

2- فى أى المذيبات (غير الماء) يمكن أن يترسبالبروتين دون تغير فى خواصة.

وعلى ضوء هاتين النقطتين تتم العمليات المختلفة لتنقية الفيروس .

اولا :استخلاص المحلول الخام (العصير)

تختلف وسائل استخلاص العصير الخام باختلاف طبيعة الأصابة الفيروسية والخلايا التي يوجد بها ,وما اذا كان الفيروس موجودا داخل خلايا فردية طليقة ,مثل البكتريا ,أوداخل خلايا سطحية فى الجلد اوبشرة النبات ,مثل الفيروسات التى تحدث اضرارا واضحة فى اوراق النبات .

امااذا كانت الاصابة غائرة فى انسجة داخلية كأمراض التبقع والأصفرار وتجعد الأوراق فى النباتات فأن هذا يتطلب استخراج المحلول الخام من هذة الانسجة .

يبدأ بعمل مستخلص من خلايا الانسجة التي تحتوى على الفيروس المطلوب .ويفضل تتم هذة العملية على درجة حرارة منخفضة 2-5درجة مئوية ,وفيا تكسر الخلايا بطرق عدة ,منها :

1- التجمد والاذابة: حيث توضع الأوراق المصابة على درجات حرارة منخفضة تصل الى التجميد لعدة ساعات ,تعرض بعضها للجو العادى ,وبهذه العملية تتهتك جدر الخلايا ويسهل استخراج العصير .

2- الطحن وفيها تطحن الانسجة فى هاون معقم .

3-الرج مع كتل زجاجية.

4- الفرم مثل الفرم بالمفرمة.

5- الفصل بواسطة الموجات الصوتية.

ويستخرج العصير بواسطة عصر الأوراق المهروسة وتصفيتهاخلال قطعة شاش , وقد لوحظ أن الالياف المتبقية من عملية العصرتحتوى على فيروس قد يكون اكثر مما يحتوية العصير المستخلص ,وتحتاج الى معاملات خاصة لاطلاقة . وابسط هذة المعاملات هى اعادة طحن الالياف مع قليل من الماء او محلول منظم ثم عصرها.

ثانيا :ترويق العصير

يستعمل الطرد المركزى البطئ لعصير نباتات الدخان المصابة بفيروس موزيك الدخان لانتاج سائل رائق ,حيث ان اغلب مكونات العائل تترسب. و.يزيد من كفاءة عملية الترويق حفظ العصير المستخلص لعدة ساعات اما على درجة حرارة المعمل او فى الثلاجة .كما ان تسخين العصير المستخلص على درجة 60درجة مئوية يجمع عديدا من مكونات العصير ,ويعطى تنقية جيدة الا انها قد تؤثر على حيوية بعض الفيروسات ولذلك لا تستعمل للفيروسات الثابتة ذات درجة الحرارة العالية لتعيد نشاطها.

قد تستعمل بعض المذيبات العضوية التى تؤدى الى اختزال الدهون وتحليل المواد الغريبة البروتينية .

ثالثا : ترسيب وتجميع الفيروس

البروتين والحمض النووى هما المركبين الأساسين فى تركيب الفيروس يوجد أيضاً فى خلايا العائل بكميات أكبر آلاف المرات عن وجودهما فى الفيروس . ولذلك فان الطرق التى تتبع يجب ان تميز بين البروتين وحمض النووى الخاص بالفيروس ومثيلهما فى خلايا العائل وتعطى درجة ثبات الفيروس الاعتبار الاول فى هذة العملية .

و تستعمل طرق مختلفة لترسيب الفيروس منها : ماهو كيماوى وما هو طبيعى .

الطرق الكيمائية لترسيب الفيروس

1- التمليح : وهو عبارة عن اضافة املاح ذائبة بتركيزات مختلفة.

2- الترسيب بواسطة الكحولات : وفيها تستعمل الكحولات المنخفضة مثل الميثانول والايثانول .

3- الترسيب عند درجة التأين

الطرق الطبيعية لترسيب الفيروس

وعنداجراء التنقية يراعى الاتى :

1- يجب ان تكون السلالة الفيروسية المستخدمة سريعة التضاعف فى العائل لتعطى تركيزا عاليا من الجزيئات الفيروسية ,وبالاضافة الى ذلك يجب ان تكون ثابتة من الناحية الوراثية اى لايحدث فيها طفرات قد تؤدى الى تغييرها.

2- يجب عند اختيار العائل المستخدم لزراعة هذة السلالة او الفيروس ان يكون سهل الزراعة سهل العدوى متماثلا وراثيا .

3- -تؤثر العوامل الجوية والبيئية على تركيزالفيروس داخل النباتات العائل .

4- عند استخلاص الفيروس من النباتات العائل ,يجب اخذ الاحتياطات الكفيلة حتى لايحدث تلف للجزيئات الفيروسية فى العصير الخام المجهز من النباتات المصابة .

5- يجب اختيار الطريقة المناسبة للتنقية حسب طبيعة الفيروس المراد تنقيتة, وبعد اتمام عملية التنقية وقبل التحليل الكيماوى يجب تقدير نقاوة الفيروس.

طرق تشخيص الفيروسات النباتية سيرولوجياً

إن أساس الطرق السيرولوجية المستخدم فى الكشف عن الفيروسات النباتية هو أتحاد أنتيجين الفيرس مع الأجسام المضادة لة وتكوين راسبا مرئياً .

ويمكن إجراء التفاعل بين الأنتيجين الفيروس والأجسام المضادة لة بطرق مختلفة ، وبالنسبة للفيروسات النباتية يمكن أستخدام الطرق التالية لإجراء هذا التفاعل :

1- أختبار التجمع .
2- أختبار الترسيب .
3- أختبار الأنتشار فى الآجار .
4-أختبار إبطال العدوى .
5-أختبار المصل المرتبط بالأنزيم .
6-الميكروسكوب الإليكترونى للتحليل السيرولوجى .

أختبار التجمع :

وقد كان هذا الأختبار فى الماضى شا ئعاً لسهولة إجرائة ولإمكانية رؤية التفاعل مباشرة وإمكانية أستخدامة فى الحقل .

ومن أبسط الطرق التى أستخدمت طريقة النقطة :

حيث توضع نقطة من العصير المصاب بالفيرس على شريحة زجاجية ، ثم تخلط مع نقطة من المصل المضاد للفيرس ، ويقلب المخلوط فينتج عن ذلك راسب مرئى ، يمكن ملاحظتة بالعين المجردة فى خلال ثوانى قليلة ، ويساعد على رؤية الراسب تجمع الكلوروبلاستيدات عند أتحاد الفيرس مع الأجسام المضادة وبذلك يطلق على هذا الأختبار أسم أختبار التجمع.

أختبار الترسيب :

ويمكن إجراء أختبار الترسيب للكشف عن الفيروسات النباتية بعدة طرق :

1- أختبار الترسيب فى أنابيب :

وهى أكثر الأختبارات وأبسطها أستعمالاً ، وفى هذا الأختبار يتم خلط كميات صغيرة متساوية من الأنتيجين والمصل المضاد فى أنابيب صغيرة فى ظروف مناسبة ، ثم يراقب تكون الراسب .

كما يستخدم أختبار الترسيب على نطاق واسع لتقدير تركيز أنتيجين الفيرس فى التحضيرات المختلفة .

كما يستخدم أختبار الترسيب فى تعريف الفيرس وتقدير درجة القرابة السيرولوجياً لفيروسين أو بين السلالات المختلفة لفيرس ما .

2- أختبار الحلقة :

وهو أختبار بسيط حيث يتلاقى الأنتيجين مع الجسم المضاد بواسطة الأنتشار ، ولإجراء هذا الأختبار يوضع قليل من المصل المضاد فى أنبوبة زجاجية ضيقة أو أنبوبة شعرية ، وتوضع طبقة من تحضير الفيرس بعناية على القمة . تنتشر جزيئات الفيرس والأجسام المضادة، ويتكون الراسب حينما يتلاقيان بنسب مناسبة ويتم ذلك خلال دقائق .

أختبار الأنتشار فى الآجار :

وهذا الأختبار يشبة أختبار الحلقة ، ويختلف عنة فى أن الطبقة السفلي تكون فى آجار جل مخفف وتحتوي عادة على الأنتيجين ، وهذا يطلق عليها الأنتشار الفردى . وفى هذة الحالة تتكون طبقة من الراسب فى الجل (بدلاً من السائل) عندما تتلاقى كميات مناسبة من الانتيجين والأجسام المضادة .

ثم حدث تعديل وذلك بوضع المصل المضاد فى ثقب من الآجار فى طبق بترى ، ثم يعمل ثقوب فى الآجار حولة وملأها بتحضيرات الأنتيجين وفى هذة الحالة تتكون هالة من الراسب حول الثقب الأوسط ويطلق على هذا الأختبار أسم الأنتشار الأشعاعى

ويجرى هذا الأختبار :

يصب الآجار الساخن على طبق بترى ويترك ليبرد ليكون طبقة من الجيل ، ثم تعمل ثقوب فى الجيل وتملأ بالمواد المتفاعلة (الأنتيجين والأجسام المضادة) ، وتحضير الفيرس فى ثقوب متجاورة ، تتكون طبقة الراسب عند الزاوية الصحيحة لأقصر خط يصل بين الثقبين .

من أهم مميزات طريقة الأنتشار فى الآجار مايلى :

1- يمكن فصل مخاليط الأنتيجينات بواسطة الأجسام المضادة لكل منها ، وذلك بناء على معدل أنتشاركل منها فى الآجار .

2- إجراء مقارنة مباشرة بين نوعين مختلفين من الآنتيجينات .

أختبار المصل المرتبط بالإنزيم (ELISA) :

وتعتبر هذة الطريقة الآن من أحدث الطرق السيرولوجية التى تكشف عن الفيروسات فى العينات المحتوية على أقل كمية من الفيروسات، ويمكن أستخدامها فى التقدير الكمى للفيروسات النباتية سيرولوجياً .

وتعتمد هذة الطريقة على القياس اللونى الناتج من تفاعل الإنزيم المرتبط بالمصل المضاد المتخصص للفيرس ، وعند تفاعلة مع الفيرس الخاص بة يعطى اللون الأصفر وهذا اللون يري بالعين المجردة .

وهناك الآن طريقتان أساسيتين لإجراء الاليزا هما :

الطريقة المباشرة : وقد شاع أستخدام الطريقة المباشرة إلا أنة يحدد أستخدامها عاملان أساسيان:

1- أنها تكون شديدة التخصص للسلالة .

2- هو أحتياجها إلى تحضير مركبات مختلفة من الإنزيم المرتبط والأجسام المضادة لكل فيرس يراد أختبارة .

الطريقة غير المباشرة :

أى طريقة ساندويتش الأجسام المضادة المزدوج فإن الإنزيم المستخدم فى الخطوة الأخيرة للكشف يكون مرتبطاً بأجسام مضادة .

الميكروسكوب الإلكترونى المتخصص للتحليل السيرولوجى :

أن هذة الطريقة تعتمد فى التشخيص على خاصيتين من خصائص الفيرس هما :

1- قدرة الفيرس على التفاعل مع المصل المضاد الخاص بة .

2- الشكل المورفولوجى لجزيئات الفيرس .

وفى هذة الطريقة تغطى الغشاء المغلف لشباك العينات الخاصة بالميكروسكوب الأليكترونى بالمصل المضاد الخاص بالفيرس المراد أختبارة ، ثم توضع الشبكات طافية فوق المعلق الفيروسى ، وفى هذة الأثناء تلتصق أعداد كبيرة من جزيئات الفيرس ، ويمكن مشاهدتها بالميكروسكوب الإلكترونى بطريقة الصبغ السالب .

مميزات هذة الطريقة :

النتائج تكون وأضحة .

دقة هذة الطريقة تقارب طريقة ELISA.

تغطية الأغشية المبطنة للشبكة بالأجسام المضادة تقلل جداً من الجسيمات التى تنتمى للعائل النباتى من أن تعلق بها .

تسمح باستخدام الأمصال كما هى وحتى الأمصال ذات التركيز المنخفض ، كما أنها لا تستهلك كمية كبيرة من هذة الأمصال أو الأنتيجين .

عيوب هذة الطريقة

لاتمكن من فحص بعض الجزيئات التى تقل فى حجمها كثيراً عن أن تظهر فى الميكروسكوب الإلكترونى .

. هذة الطريقة مكلفة وذلك لأرتفاع سعر الميكروسكوب الإلكترونى وأدواتة والمواد المستخدمة

كما أن الميكروسكوب يحتاج إلى خبرة وكفاءة خاصة فى تشغيلة مما يجعل هذة الطريقة لايمكن أن تنافس طريقة الاليزا فى الاستخدام على نطاق وأسع ، ولكن مع ذلك يظل الميكروسكوب الإلكترونى ذا قيمة كبرى فى تعريف الفيروسات المجهولة وفى حالة الحاجة الى عدد قليل من الاختبارات التشخيصية .