ا لجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
Université des Frères Mentouri

كلية علوم الطبيعة و الحياة
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة 1
كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم البيولوجيا و علم البيئة النباتية
فرع العلوم البيولوجية
تخصص بيولوجيا و فيزيولوجيا التكاثر

مذكرة تخرج بعنوان:

دراسة حول الفيروسات النباتية والأمراض الناتجة عنها

من إعداد : بوقزيوة نبيل

أعضاء لجنة المناقشة :

- **رئيسة اللجنة :** د.حمودة دنيا .أستاذة محاضرة قسم (أ) بجامعة الإخوة منتوري قسنطينة 1
- **المشرفة:** د. بوشيبي بعزيز نصيرةأستاذة محاضرة قسم (ب) بجامعة الإخوة منتوري قسنطينة 1
- **الممتحنة:** د. بوشوخ إيمان .أستاذة محاضرة قسم (ب) بجامعة الإخوة منتوري قسنطينة 1

2020-2021

إهداء

الحمد لله و الصلاة والسلام على رسول الله . أما بعد الحمد لله الذي وفقنا لتثمين هذه الخطوة في مسيرتنا الدراسية بمذكرتنا هذه ثمرة الجهد والنجاح بفضله تعالى أهديها إلى الوالدين الكريمين حفظهما الله ورعاهما على كل ما قدماه لي و العائلة الكريمة الأخ هشام ، الأخت كريمة ،الأخت سميرة و شكر خاص لأختي فاطمة لجهودها المبذولة وشكر خاص للأستاذة الكريمة على حسن التوجيه والمساعدة.

شكر

قبل كل شيء ، نشكر الله القدير على منحنا القوة والشجاعة والوسائل لنكون قادرين على إنجاز هذا العمل وأود أن أقدم خالص شكري للسيدة ***بوشيبي بعزيز نصيرة*** لقبولها الإشراف علي ، و لنصائحها وتوجيهاتها ودعمها المعنوي والعلمي.

شكري الجزيل إلى **أعضاء لجنة المناقشة** السيدة ***حمودة دنيا*** و أيضًا أستاذة ***بوشوخ إيمان*** و لهن بالغ احترامي . وأتوجه بخالص شكري إلى الجميع و كل من ساعدني في تنفيذ هذا العمل.

الملخص

الفيروسات النباتية عبارة عن جسيمات صغيرة تحتوي على حمض نووي داخل محفظة بروتينية لها فيروسات مرافقة و تتواجد على عدة أشكال وأنواع مختلفة يتم تنقية الفيروسات النباتية لمعرفة خصائصها الفيزيائية والكيميائية. يصاب النبات بالفيروسات فيتحرك الفيروس ويتضاعف داخله، وينتقل من نبات إلى نبات آخر وينشر العدوى بطرق مختلفة. يتم تشخيص النبات المصاب بالعدوى بطرق مختلفة إما عن طريق الأعراض أو طرق الانتقال أو بالمجهر أو عن طريق الاختبارات المختلفة كال ELISA.
يتم مكافحة انتشار العدوى أو الفيروس عن طريق الحجر الزراعي أو استخدام مواد خضرية خالية من الفيروس أو من خلال معاملات أخرى لتقليل الإصابة والحد منها.
الكلمات المفتاحية : الفيروسات النباتية، يصاب النبات بالفيروسات ، ينشرالعدوى ،مكافحة انتشار العدوى.

Résumé

Les virus phytopathogènes sont de petites particules contenant de l'acide nucléique dans une capsule protéique qui ont des virus compagnons et existent sous de nombreuses formes et types différents. Les virus végétaux sont purifiés pour leurs propriétés physiques et chimiques. La plante est infectée par des virus, donc le virus se déplace et se multiplie à l'intérieur. Le virus se transmet d'une plante à l'autre et propage l'infection . La plante infectée est diagnostiquée de différentes manières, soit par les symptômes, les méthodes de transmission, la microscopie, ou par divers tests tels que ELISA. La propagation de l'infection ou du virus est contrôlée par la quarantaine végétale ou l'utilisation de matières végétales exemptes de virus ou par d'autres traitements pour réduire et limiter l'infection.

Most clés: Les virus phytopathogènes ; la plante est infectée par des virus ; propage l'infection ; la propagation de l'infection ou du virus est contrôlée**.**

Abstract

Plant viruses are small particles containing nucleic acid in a protein capsule that have companion viruses and exist in many different shapes and types. Plant viruses are purified for their physical and chemical properties. The plant is infected with viruses, so the virus moves and multiplies inside. It is transmitted from plant to plant and spreads the infection in different ways. The infected plant is diagnosed in different ways, either by symptoms, methods of transmission, microscopy, or by various tests such as ELISA. The spread of infection or virus is controlled by plant quarantine or the use of virus-free plant material or other treatments to reduce and limit infection.

Key words: Plant viruses ; The plant is infected with viruses ; spreads the infection ; The spread of infection or virus is controlled .

الفهرس

قائمة الجداول

قائمة الأشكال

الملخص

المقدمة

1. نبذة تاريخية عن الفيروسات 01

1.1.نشوء الفيروسات..... 02

2.1.تعريف الفيروس 03

3.1.الفيروسات المرافقة 03

4.1.مرفلوجيا الفيروسات 05

5.1.تركيب الفيروسات النباتية 06

6.1. التركيبة الكيميائية للفيروسات النباتية.....06

7.1.أشكال وأنواع الفيروسات النباتية.....11

8.1.تنقية الفيروسات النباتية.....17

2.الإصابة بالفيروس 27

1.2.تضاعف الفيروس 27

2.2.تحرك الفيروس داخل النبات المصاب..... 29

3.2.الانتشار والتوزيع النهائي للفيروس داخل النبات.....30

4.2.أعراض الإصابة بالأمراض الفيروسية 31

5.2.انتقال الفيروسات النباتية 35

3.الاختبارات التشخيصية بناء على الخصائص الحيوية والمورفولوجية.....41

1.3. الأعراض الظاهرية.....41

2.3.المدى العوائلي وطرائق الانتقال.....41

3.3.الخصائص الفيزيائية في العصير.....42

4.3.المجهر الالكتروني و المجهر الضوئي.....43

5.3.الاختبارات المصلية / السيرولوجية.....43

4.طرق مكافحة الفيروسات والأمراض الفيروسية 54

1.4.الحجر الزراع.....54

2.4.استبعاد مصادر العدوى داخل وبجوار المحصول.....55

3.4.استخدام بذور خالية من الفيروس.....55

4.4.استخدام تقاوي (مواد إكثار) خضرية خالية من الفيروس.....56

5.4.الممارسات الزراعية.....57

6.4. المكافحة المتكاملة للناقلات.....57

7.4.استخدام أصناف نباتية مقاومة للفيروس.....59

8.4.لمحة عامة عن المقاومة الطبيعية للفيروسات في النباتات .....59.

9.4.المقاومة المشتقة من العوامل الممرضة وإسكات الحمض النووي.....59

قائمة الجداول

- **الجدول (01) :** نوع الحمض النووي والوزن الجزيئي والنسبة المئوية للحامض النووي والنسبة المئوية للبروتين في بعض فيروسات النبات.....07
- **جدول (2).** بعض النباتات الدالة الشائعة الاستعمال للكشف على الفيروسات.....42

قائمة الأشكال

- **الشكل (1) .** الفرق بين مكونات الفيروس والفريون.....04
- **الشكل(2).** التركيب البنائي لسلسلة عديدات الريبونيوكليوتيدات لتوضيح الرابطة ثنائية الأيسترين جزيئات سكر الريبوز بواسطة مجموعات الفوسفات وكذلك توضيح الرابطة بين جزيئات سكر الريبوز والقواعد النيتروجينية 09
- **الشكل(3) .**التركيب البنائي لسلسلة عديدات الدييوكسي ريبونيوكليوتيدات.لتوضيح الرابطة لثنايية الاستريين جزيئات سكر الدييوكسيريبوز بواسطة مجموعات الفوسفات وكذلك توضيح الرابطة بين جزيئات السكر و القواعد النيتروجينية.....09
- **الشكل (4):** الجسيمات الفيروسية العصوية الصلدة الأنبوبية المشاهدة بالمجهر الإلكتروني والمصبوغة بطريقة الصبغ السالب (أ) لفيروس موزائيك التبغ (TMV) (ب) لفيروس الاصفرار التماوتي لعروق البنجر (BNYVV).....11
- **الشكل (5).** الجسيمات العصوية المرنة المصورة بالمجهر الالكتروني لخمسة أنواع من الفيروسات.....12
- **الشكل (6).** أنواع من الفيروسات الأيزومترية 13
- **الشكل(7) .** الجسيمات الباسيلية.....14
- **الشكل (8).** الجسيمات الشبيه بالإطلاقة المكورة من جهة والمستقيمة من الجهة الأخرى.....15
- **الشكل (9):** الفيروسات المغلفة.....16
- **الشكل (10):** آلية التبرعم Budding التي تفسر تغليف الفايروسات المغلفة بالغلاف الليبيدي المزدوج ذو المنشأ الخلوي خلال عبورها أغشية خلايا العائل.....17

- **شكل (11)** .اختبار الانتشار المزدوج في الآجار ،الخط الترسيبي يلاحظ فقط ما بين العينة المصابة الموجودة في الحفر الخارجية التي تحوي عصارة من النبات المصاب (IN) و المصل المضاد الموجود في الحفرة المركزية(AS). 44
- **شكل (12).** شكل توضيحي يبين المبدأ العام لاختبار إليزا باحتواء المزدوج للفيروس بالأجسام المضادة.....45
- **شكل(13).** (أ)طريقة طبع النباتات المراد فحصها بالاختبار المصلي لبصمة النسيج النباتي المناعي(TBIA) على غشاء النيتروسيليلوز ،(ب)شكل توضيحي يبين المبدأ العام لاختبار TBIA،(جـ)الكشف عن فيروس الاصفرار الميت للفول(FBNYV) بواسطة إختبارTBIA في ساق نبات الفول (النبات المصاب على اليسار و النبات السليم على اليمين) ، (د)الكشف عن فيروس الموزاييك الأصفر للفاصولياء (BYMV) في عنق ورقة نبات الفول (النبات المصاب على اليسار و النبات السليم على اليمن)،(هـ)الكشف عن فيروس اصفرار و تقزم الشعير (BYD) بواسطة اختبار TBIA في ساق شعير (النبات المصاب على اليسار و النبات السليم على اليمين) ، (و)الكشف عن بادرة عدس مصابة بفيروس تلون بذور الفول (BBSV) ضمن مجموعة مؤلفة من 25 بادرة عدس بوساطة اختبار TBIA.....48
- **شكل(14) .**التركيز النسبي لفيروس تجعد الأوراق الأصفر الطماطم (TYLCV)في نباتات الجيل الثالث عن طريق تهجين الحمض النووي باستخدام طريقة التفاعل الكيميائي الذي يكشف عنه بالتصوير ألشعاعي.....50
- **شكل(15).** الكشف عن ثلاثة فيروسات تصيب أشجار الفاكهة بواسطة Multiplex. 52
- **شكل(16).** الكشف عن فيروس تجعد الأوراق الأصفر للبندورة /الطماطم) 52

المقدمة

أثارت الفيروسات النباتية و الإمراض التي تسببها اهتمام الباحثين بعد الدراسات الرائدة التي أجريت عليها في نهاية القرن التاسع عشر. حيث يوجد ما يزيد على 1000مرض فيروسي يصيب النبات و تعد هذه الكائنات صغيرة جدا مقارنة بالمجموعات الأخرى من مسببات الأمراض النباتية مثل الفطريات والبكتيريا التي يمكن ملاحظتها من خلال المجهر الالكتروني فقط و تتكون بدورها من غلاف بروتيني و نوع من الحمض النووي DNA أو RNA الحامل للمعلومة الوراثية .

تسبب الفيروسات العديد من الأمراض النباتية و هي مسؤولة عن خسائر كبيرة في إنتاج المحاصيل و جودتها في جميع أنحاء العالم .قد تظهر النباتات المصابة مجموعة من الأعراض اعتماداً على المرض ولكن غالبا ما يكون هناك اصفرار في الأوراق إما الورقة بأكملها أو خطوط أو بقع أو يحدث تشوه للأوراق والتفافها او تشوهات أخرى كالتقزم او تشوه الأزهار أو الفواكه .تعد الإمراض الفيروسية من بين العوامل الرئيسية التي تسبب خسائر كبيرة.فما هي الفيروسات النباتية و ما هي الأمراض الناتجة عنها؟ (Agrios,2005)

تضمنت الدراسة حول الفيروسات النباتية لدورها كمسببات للأمراض النباتية ما يلي :

- ✓ التعرف على المكونات الأساسية للفيروسات النباتية و الصفات الحاملة لها .
- ✓ معرفة طرق انتقالها والاستراتيجيات المتبعة للانتشار و العدوى .
- ✓ التشخيص الصحيح للنبات من اجل معرفة المسبب للمرض داخل النبات .
- ✓ طرق المكافحة للحد من الانتشار و العدوى .

1. نبذة تاريخية عن الفيروسات

في عام 1882، وصف أدولف ماير (1942-1843) حالة من نباتات التبغ، أطلق عليها اسم مرض التبرقش .(mozaïkziekte) كانت النباتات المصابة لديها أوراق مبرقشة متناثرة فاستبعد إمكانية الإصابة بالعدوى الفطرية، ولم يتمكن من الكشف عن أي بكتيريا، وتكهن بأن السبب يمكن أن يكون أحد الأمراض المعدية المذيبة التي تشبه الإنزيم ولم يتابع فكرته أكثر من ذلك، وكانت تجارب الترشيح التي قام بها إيفانوفسكي وبيجيرينك اقترحت أن السبب كان عاملا معديا لم يتم التعرف عليه مسبقاً. بعد أن تم التعرف على تبرقش التبغ على أنه مرض فيروسي، تم اكتشاف عدوى فيروسية في العديد من النباتات الأخرى. (قاسم ،2011).

فيروس تبرقش التبغ له دور مهم في تاريخ الفيروسات. فقد كان أول فيروس يتم اكتشافه، وأول فيروس تم بلورته والتعرف على تركيبه بالتفصيل. وتم الحصول على أول صور للأشعة السينية للفيروس المتبلور من قِبل بيرنال وفانكوشن في عام 1941. وعلى أساس هذه الصور، اكتشف روزاليند فرانكلين الهيكل الكامل للفيروس في عام 1955 وفي العام نفسه ، أظهر هاينز فرانكل كونرات وروبلي وليامز أن الحمض النووي الريبوزي المنقى لفيروس تبرقش التبغ، وغطاءه البروتيني يمكن أن يتجمعوا بأنفسهم لتشكيل فيروسات وظيفية ، مما يوحي بأن هذه الآلية البسيطة ربما كانت الوسيلة التي تم من خلالها خلق الفيروسات داخل خلايا الكائن المضيف (قاسم ،2011) .

وبحلول عام 1935، كان يعتقد أن العديد من أمراض النباتات تسببها الفيروسات. في عام 1922 اكتشف جون كونكل سمول (1938-1869) أن الحشرات يمكن أن تكون بمثابة ناقلات تنقل الفيروس إلى النباتات. وفي العقد التالي، تبين أن العديد من أمراض النباتات كانت ناجمة عن الفيروسات التي تحملها الحشرات، وفي عام 1939، وصف فرانسيس هولمز، الرائد في علم الفيروسات النباتات 129 فيروسا تسببت في أمراض للنباتات . وتوفر الزراعة الحديثة المكثفة بيئة غنية للعديد من الفيروسات النباتية. في عام 1948، في كانساس ، الولايات المتحدة، تم تدمير 7٪ من محصول القمح من قِبل فيروس تبرقش القمح. حيث انتشر الفيروس عن طريق العث الذي يسمى أسيريا توليباي .(Aceria tulipae) في عام 1970، اكتشف عالم الفيروسات النباتية الروسي جوزيف أتابيكوف أن العديد من الفيروسات النباتية تصيب فقط نوعا واحد من النباتات المضيفة. وأقرت اللجنة الدولية لتصنيف الفيروسات الآن بأكثر من 900 فيروس نباتي.(قاسم ،2011).

وضعت عدة فرضيات لتفسير ماهية فيروسات النبات في بواكير نشوء علم الفيروسات وجميعها لم تعد مقبولة اليوم وهي الفرضية الإنزيمية وهي التي اقترحها "وود" Wood سنة 1899 مفترضا أن الفيروس هو إنزيم غريب يفرزه طفيل ما و بنى فرضيته استنادا على ملاحظته بزيادة كمية الإنزيمات المؤكسدة في خلايا نباتات التبغ المصابة بفيروس موزاييك التبغ (TMV). (قاسم،2011).

- الفرضية البكتيرية وهي التي تبناها ماير و ايفانوفسكي في نهاية القرن التاسع عشر بعد

انجازهما لبحوثهما على فيروس موزاييك التبغ مفترضين أن المرض الذي يسببه هذا الفيروس يعود إلى بكتيريا صغيرة جدا تعبر المرشحات البكتيرية ولا تشاهد بالمجهر الضوئي.

(Sussman *et al* ,1998)

- فرضية البروتوزوا (الحيوان الأولي) والتي اقترحها "ايفانوفسكي" سنة 1903 معتقدا

أن الأمراض الفايروسية تسببها أنواع من البروتوزوا نتيجة رؤيته للأجسام الضامة المسماة "الأجسام السينية" X -bodies التي شاهدها بالمجهر الضوئي في الخلايا المصابة بفايروس موزائيك التبغ واعتقد أنها بروتوزوا. (قاسم،2011).

- فرضية السم الراشح والتي وضعها " بيجيرينك " سنة 1899 مفترضا أن المسبب هو

مادة سامة غير خلوية ذائبة في الماء تعبر المرشحات البكتيرية أطلق عليها مصطلح "السائل الحي المعادي" Contagium vivum fluidum او"السم الراشح" Filterable virus.

(Sussman *et al*,1998)

- الفرضية الفسلجية والتي وضعها داجر وكرير (duggar , karrer) سنة 1921

مفترضين ان المسبب هو مادة كيميائية ايضية نباتية ناتجة عن اختلال فسلجي في خلايا النبات المريض .

(قاسم،2011)

1.1. نشوء الفيروسات

أثار أصل الفيروسات وتطورها النشوئي Evolutionary development (يستعمل أيضا مصطلح Phylogeny) جدلا واسعا لدى الباحثين وذلك لعدم وجود أدلة مادية ملموسة عنها وهي الأحافير أو المتحجرات Fossils كما هو الحال مع الكائنات الأخرى حيث أن الاحافير هي السجلات التاريخية المحفوظة في الأرض لأجساد الكائنات والتي تدل على كيفية تطور الكائنات الحية، ولازال أصل الفيروسات لغزا أمام الباحثين (Lyer *et al* , 2006).

2.1. تعريف الفيروس

الفيروسات عبارة عن جسيمات معدية صغيرة جدًا (تحت المجهرية) (فيريونات Virions) تتكون من غلاف بروتيني و حمض نووي ، تحمل معلومات وراثية مشفرة في حمضها النووي ، والتي تحدد عادةً بروتينين أو أكثر. تتم ترجمة الجينوم (لإنتاج البروتينات) أو النسخ والتكاثر (لإنتاج المزيد من الحمض النووي) داخل الخلية المضيفة وتستخدم بعض الميكانيزمات البيوكيميائية للمضيف. الفيروس ليست نشطة وظيفيًا خارج مضيفها. لذلك فهي طفيليات (وعادة ما تكون مسببات الأمراض Pathogens) ولكنها لا تعتبر عادة كائنات دقيقه حقيقية (Agrios,2005) .

تقتصر معظم الفيروسات على نوع معين من المضيف. تصيب بعض البكتيريا، وتُعرف باسم (Bacteriophages) ،بينما يُعرف البعض الآخر بأنها تصيب الطحالب،أو الأوليات،أو الفطريات (فيروسات الفطريات) ،أو اللافقاريات،أو الفقاريات،أو النباتات الوعائية. ومع ذلك،يمكن لبعض الفيروسات التي تنتقل بين الفقاريات أو المضيفات النباتية عن طريق تغذية الحشرات (النواقل Vectors) أن تتكاثر داخل كل من مضيفها وناقلها. (Agrios,2005) .

هناك أيضا أشباه الفيروسات Viroids وهي جزيئات الحمض النووي الريبي المعدية التي تسبب الأمراض في النباتات المختلفة. إن جينوماتها أصغر بكثير من تلك الموجودة في الفيروسات (تصل إلى 400 نيوكليوتيد من الحمض النووي ألريبي الدائري أحادي السلسلة) ولا ترمز لأي بروتينات.

تسبب الفيروسات أيضًا العديد من الأمراض النباتية الهامة وهي مسؤولة عن خسائر فادحة في إنتاج المحاصيل وجودتها في جميع أنحاء العالم. قد تظهر النباتات المصابة مجموعة من الأعراض اعتمادًا على المرض ولكن غالبًا ما يكون هناك اصفرار الأوراق (إما الورقة بأكملها أو في نمط من الخطوط أو البقع) ، وتشوه الأوراق (مثل الالتفاف curling) و / أو تشوهات النمو الأخرى (مثل التقزم النبات كله stunting، تشوهات في تكوين الأزهار أو الفاكهة) .(Agrios,1978) ; (Agrios,2005) .

3.1. الفيروسات المرافقة Satellite Viruses

هي فيروسات مرافقة لفيروسات معينة تعتمد عليها تناسخها و أحداث العدوى و غالبا ما تعمل على خفض كفاءة الفيروس الأصلي في التناسخ و إحداث العدوى فهي تسلك سلوك الطفيل المصاحب للفيروس الأصلي.(Agrios ,2005)(Agrios ,1978) .

- **Viroids:** عبارة عن خيط واحد (Single Strand) من RNA صغير جدا يتكون عادة من 250 – 400 نيكليوتيدة و هو قادر على إحداث الأمراض النباتية.

- **Virusoids :** تشبه الفيروسات فهي تتكون منRNAحلقي فردي لكنه يوجد داخل الفيروس نفسه المكون من RNA أي أنه جزء من المادة الوراثية له و عليه فإنه لا يقوى بمفرده على إحداث عدوى كما أن الفيروس لا يقوى على إحداث عدوى بدونه فهي علاقة تصاحب إجبارية .
- **Satellite RNAs:** عبارة عن RNAs صغير موجود في جزئي الفيروس(Virions) لبعض الفيروسات المركبة و يعتقد أن له علاقة ب :RNAالنباتي و ربما يكون هو المسؤول عن حماية العائل من الإصابة الفيروسية. (Agrios ,2005)(Agrios ,1978)

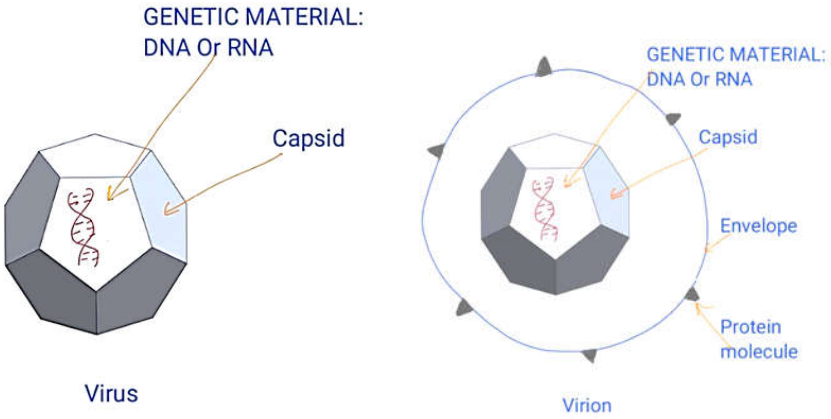
1.3.1. الفرق بين الفيروس و الفيريون

1.1.3.1. **الفيروس** Virus

- الفيروس هو كيان صغير يتكون إما من DNA أو RNA كمواد وراثية.
- المواد الجينية محاطة بغلاف بروتيني يسمى الكبسيد capsid .
- قد يكون الفيروس محاطًا أو غير محاط بغشاء دهني خارجي يسمى الغلاف.
- يصيب الفيروس جميع أنواع الكائنات الحية(Agrios ,2005)(Agrios ,1978) .

2.1.3.1. الفريون Virion

- هو فيروس وظيفي كامل لديه القدرة على إصابة الأنسجة الحية.
- وتشمل المادة الجينية إما RNA أو DNA ، الكبسيد ، الغلاف ، البروتينات الغشائية.
- تسمح بروتينات الغشاء للفيروس بالارتباط بمضيفه والدخول إليه.



الشكل (1) . الفرق بين مكونات الفيروس و الفريون .

(Agrios ,1978)(Agrios ,2005)

3.1.3.1. فيرويدViroid

- الفيرويد أصغر من الفيروس.
- الفيرويد وجزيء RNA معدي مغلق تساهميً بدون كبسيد.
- أنها تتكاثر عن طريق نسخ RNA-RNA وتفتقر إلى تشفير(ترميز)البروتين.
- فيرويدات تصيب النباتات فقط . (Agrios ,2005)(Agrios ,1978) .

4.1. مرفلوجيا الفيروسات

يتكون جزئ الفيروس المثالي (Virion) من مادة وراثية و التي قد تكون (DNA) أو (RNA) محاطة ب capside أو المعطف البروتوني و الذي بدوره يتكون من جزيئات بروتينية صغيرة تسمى الـ capsomeres بعض أنواع من الفيروسات تحتوي على غلاف خارجي يتكون من لبيد (دهون) و السكريات المتعددة (polysaccharides) . (زغلول وآخرون،1988).

5.1. تركيب الفيروسات النباتية

العناصر المعدنية إلا أن بعض الفيروسات قد تحتوي على بعض المواد الكيماوية الأخرى ، إذ تشير بعض الأبحاث الحديثة إلى أن فيروس الذبول المتبقع في الطماطم وفيروس اصفرار و تقزم البطاطس يحتويان على الدهون في تركيبها ، يختلف نسبة الحامض النووي والبروتين من فيروس إلى آخر، فإذا ما قورنت الفيروسات الكروية بالفيروسات العصوية الشكل فأننا نجد أن الكروية تحتوي على نسبة أعلى من الحامض النووي ونسبة أقل من البروتين من تلك التي تحتويها الفيروسات العصوية.

يشكل البروتين بوجه عام نسبة تبلغ حوالي 60-95% من الفيروس في حين يشكل الحامض النووي نسبة تبلغ 5-40% تقريبا، وفيما يلي النسبة المئوية للحامض النووي في بعض الفيروسات المختلفة.

1.5.1.فيروسات كروية (عديدة الأوجه)

- فيروس التبقع الحلقي في الدخان Tobacco Ringspot virus 40%
- فيروس الموزايك الأصفر في اللفت Turnip yellow mosaic virus 35%
- فيروس موزايك الفاصوليا الجنوبي Southern bean mosaic virus 20%
- فيروس نيكروزس الدخان Tobacco necrosis virus 18%
- فيروس الشجيرة القومية في الطماطم Tomato bushy stunt virus 17%

2.5.1.فيروسات عصوية

- فيروس موزايك الدخان Tobacco mosaic virus 5%
- فيروس خشخشة الدخان Tobacco rattle virus 5%
- فيروس x البطاطس Potato virus x 5.7% (حلمي وآخرون ،1976) .

6.1. التركيبة الكيميائية للفيروسات النباتية

قد دلت دراسات بان جميع الفيروسات التي يمكن عزلها بصوره نقية تتكون من بروتين و حامض نووي . لذا يمكن القول بان جميع الفيروسات النباتية المتكاملة تتكون بصوره رئيسية من نوع واحد أو أكثر من البروتينات ومن نوع واحد فقط من الحامض النووي الذي إما أن يكون من نوع RNAأو DNA.

تختلف النسبة المئوية و الوزن الجزيئي الحامض النووي و للبروتين في الفيروس الواحد باختلاف الفيروسات ويبين الجدول التالي النسبة المئوية و الوزن جزئي للأحماض النووية و البروتين لبعض فيروسات النبات. (قاسم ،2011).

الجدول (01) : نوع الحمض النووي والوزن الجزيئي والنسبة المئوية للحامض النووي والنسبة المئوية للبروتين في بعض فيروسات النبات. (قاسم ،2011).

الفيروس	نوع الحمض النووي	% الحامض النووي	الوزن الجزيئي للحامض النووي (مليون دالتون)	% بروتين
Cauliflower mosaic	DNA	19	4.7	84
Cowpea mosaic	RNA	33	1.7	67
Pea enation mosaic	RNA	29	1.6	81
Potato X	RNA	6	1.0	94
Tobacco mosaic	RNA	5	2.05	95
Tobacco necrosis	RNA	20	6.6	80

Tobacco ring spot	RNA	40	2.0	60
Tomalo bushy stunt	RNA	17	1.5	83
Wild cumumber mosai	**RNA**	**35**	**2.4**	**65**
Wound tumour	**RNA**	**23**	**10.0**	**77**

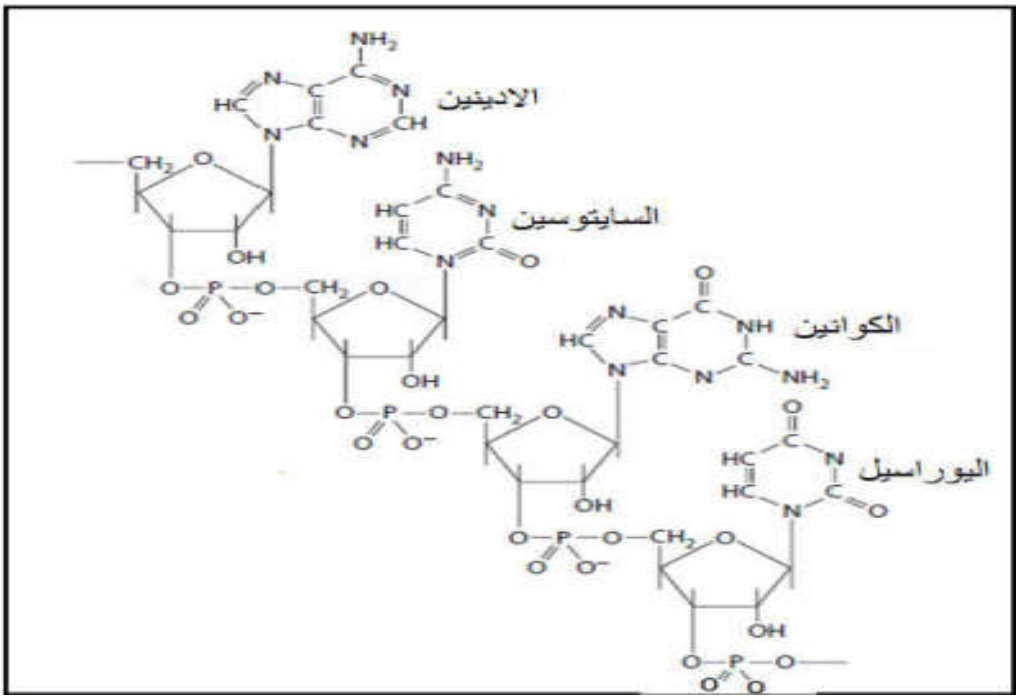
1.6.1.الحمض النووي

تتكون الأحماض النووية الفيروسات مثل الكائنات الأخرى في الطبيعة من السلاسل غير متفرعة من عديد النكليوتيدات ,nucleotide و يتكون كل نيوكليوتيد من جزيء سكر وقاعدة نيتروجينية و فوسفات ويتكون الهيكل الأساسي لهذين النوعين من الحمضين النوويينDNA و RNA من سلاسل بها جزيئات فوسفات و سكر خماسي بالتبادل . و يتصل بكل جزيء من جزيئات السكر قاعدة نيتروجينية إما من نوع البيورين او البريميدين . والسكر الموجود بجزيء الحامض النووي RNA هو سكر الريبوز . بينما في جزيء الحامض النووي DNA فان السكر الموجود هو سكر منقوص الأكسجين deoxyribose الشكل(2) التركيب البنائي لهما . (قاسم ،2011).

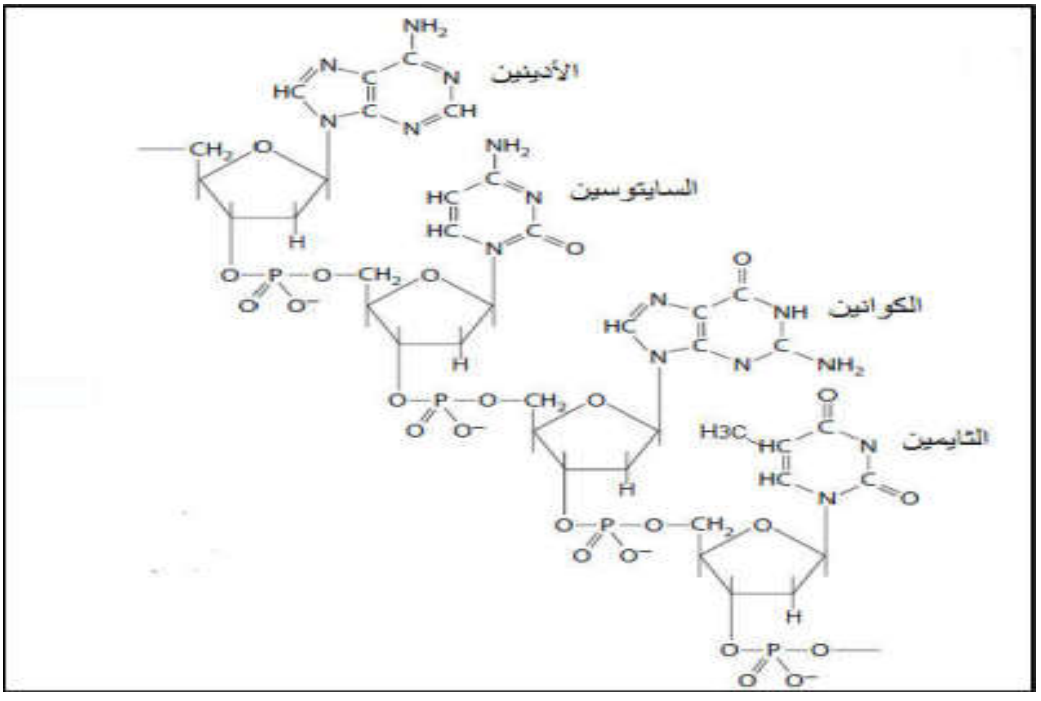
من الملاحظ أن الأحماض النووية تتركب من وحدات متكررة مكونه قاعدة نيتروجينية (بيورين او بريميدين) وسكر خماسي ومجموعة فوسفات وكل وحدة من هذه الوحدات المتكررة تسمى نيوكليوتيد nucleotide و ترتبط النيوكليوتيدات الأحادية ببعضها بواسطة جزيء الفوسفات عن طريق ثنائية الاستر مع المجاميع الهيدروكسيلية الموجودة على الكربون الثالث والخامس بالسكر الخماسي كما يظهر بوضوح في الشكل(3) لكل من RNA.DNAوالمركب الناتج من ارتباط النيوكليوتيدات ، يعرف اسم عديدات نيوكليوتيدات Polynucleotides . (قاسم ،2011).

يختلف RNA عن DNAمن حيث التركيب في نقطتين هما:

- الاختلاف في جزيء السكر حيث يكون منه ribos في . RNA بينما تكون من نوع deoxyribos فيDNA .
- تحتوي كل من RNA و DNA على أربع قواعد نيتروجينية منها a.g c.t مشتركة بين DNA و RNA بينما تختلف بالنسبة للقاعدة الرابعة .حيث يحتوي DNAعلى t ويحتوي RNA علىu



الشكل(2). التركيب البنائي لسلسلة عديدات الريبونيوكليوتيدات لتوضيح الرابطة ثنائية الأيسترين جزيئات سكر الريبوز بواسطة مجموعات الفوسفات وكذلك توضيح الرابطة بين جزيئات سكر الريبوز والقواعد النيتروجينية . (قاسم ،2011).



الشكل(3) .التركيب البنائي لسلسلة عديدات الديبوكسي ريبونيوكليوتيدات . لتوضيح الرابطة لثنايية الاستريين جزيئات سكر الديبوكسيريبوز بواسطة مجموعات الفوسفات وكذلك توضيح الرابطة بين جزيئات السكر و القواعد النيتروجينية . (قاسم ،2011).

من الحقائق المعروفة اليوم أن الحمض النووي في الفيروسات هو المادة الوراثية لها، حيث يتميز بقدرته على التضاعف و إحداث العدوى و تصنيع الغلاف البروتيني الخاص بالفيروس . ولما كان الحمض النووي هو المادة الوراثية للفيروسات ، فمن البديهي بأنه كلما زادت كتلة الفيروس والنسبة المئوية للحمض فيها كان الفيروس معقد في التركيب . قد يكون الحامض النووي للفيروس أحادي الخيط (single_stranded). كما هو الحال في فيروس موزاييك الدخان tmv او ثنائي-double) stranded) في بعض الفيروسات مثل فيروس قزم الأرز. (rdv) أن الحامض النووي لهذه الفيروسات هو من نوعRNA . (قاسم ،2011).

في معظم فيروسات النبات التي درست بصورة جيدة . وجد بان الحامض النووي فيها كم من نوع RNA. إلا أن هناك بعض الفيروسات التي وجد بان الحامض النووي فيها كان من نوع DNA. ويكون موقع الحامض النووي في داخل جزيء الفيروس و محاط من جميع جوانبه بالغلاف البروتيني الذي نعتقد بأنه الغطاء الواقي للحافض النووي من تأثير الأنزيمات عليه ، بصورة خاصة أنزيمات النيوكليوتياز nuclease التي تقوم بتحليل الأحماض النووية و لأجل أن يكون هذا الغطاء الواقي فعالا يجب أن يكون مقاوما الأنزيمات التي تحليل البروتينينات والتي تسمى proteolytic enzymes المتواجدة في خلايا الكائنات الحية و يظهر أن الغلاف البروتيني فعلا يتميز بمقاومة هذه الأنزيمات بالنسبة لمعظم الفيروسات التي درست بصورة مفصلة و يعتقد بان هذا التركيب للغلاف البروتيني حدث نتيجة للانتخاب الطبيعي أثناء نشوء وتطور الفيروسات في الطبيعة. (قاسم ،2011).

2.6.1.الغلاف البروتيني او المحفظة protein coat or capsid

يشكل الغلاف البروتيني المعروف capsid معظم كتلة الفيريون وخاصة في الفيروسات الصغيرة .(الفيريون virion هو جسيمة فيروس كاملة أي تحتوي على الحامض النووي والغلاف البروتيني وبقية المكونات الأخرى) . ونظرا لحجم الفيروسات المتناهية الصغر والذي يترتب عليه صغر حجم مادته الوراثية genome size فان الفيروسات لا يمكنها أن تخصص إلا جزءا محدودا من مجموع مادتها الوراثية (عدد محدود من الجينات genes) لبناء بروتين المحفظة وعلى ذلك فان المحفظة لا بد أن تتكون بالضرورة من وحدات بروتينية متشابهة identifical protein subunits و الوحدات البروتينية التي تكون الغطاء البروتيني تسمى الكابسومات capsomeres ومفردها capsomere .(قاسم ،2011).

تتكون البروتينات بصورة عامة من سلاسل طويلة وغير متفرعة من البوليبيبتيدات poly_peptides

وتتكون الخيرة من وحدة بنائية أساسية هي الأحماض الامينية amino_acids . تحتوي البروتينات المختلفة على حوالي عشرين حمضا امينيا مختلفا ويختلف ترتيب هذه الأحماض الامينية ونسبتها في البروتينات المختلفة وترتبط هذه الأحماض الامينية ببعضهما البعض في سلسلة بواسطة روابط بيبتيدية عن طريق اتحاد مجموعة الكربوكسيل في احد الأحماض الامينية بمجموعة الامين في الحمض الاميني الثاني له . مع فقد جزيء ماء.وعند تكوين سلسلة من عدد الأحماض الامينية فانه يطلق عليها اسم سلسلة بيبتيدية . لكل سلسلة بيبتيدية نهايتان (طرفان) احدهما يحتوي على مجموعة كربوكسيل غير مرتبطة وتسمى النهاية الكربوكسيلية . والطرف الثاني يحتوي مجموعة امينية غير مرتبطة وتسمى النهاية الامينية و تتكون البروتينات من سلاسل بيبتيدية ذات عدد مرتفع من وحدات الاحماض الامينية و للبروتينات مستويات مختلفة من التركيب . تتقدم بتقدم مستوى تعقيد البروتين . وتسلسل الاحماض الامينية في أي بروتين يعتبر على درجة كبيرة من الأهمية وتغير هذا التسلسل قد يؤدي إلى فقد نشاط البروتين.

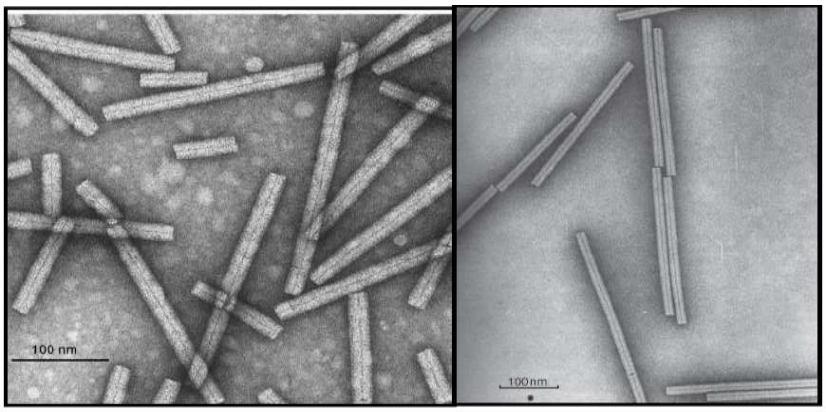
3.6.1.مكونات أخرى other constituent

بالإضافة للبروتين و الحامض النووي .فقد وجد بان بعض الفيروسات تحتوي على مكونات اخرى مثل : مركبات البولي امين plamines والدهون lipids والتي اهمها phospholipids وتتميز معظم هذه الفيروسات باحتوائها على غشاء خارجي يحيط بالغلاف البروتيني ويدعىenvelope ان وجود هذه المركبات يكون شائعا في الفيروسات التي تصيب الحيوان .بينما نجدها مقتصرة على فيروسات قليلة من فيروسات النبات (SALAMA *et al* ،2000).

7.1.أشكال وأنواع الفيروسات النباتية

1.7.1.الفيروسات العصوية الصلدة

تمتاز الفيروسات العصوية الصلدة Rigid rod Viruses بشكلها العصوي الأنبوبي المستقيم وهي غير قابلة للانثناء بسبب قوة الأواصر الأيونية بين الوحدات البروتينية لغطائها البروتيني، تتراوح أطوال هذه الفيروسات بين 300-500 نانومتر أما قطرها فهو بحدود 12 نانومتر ومن أمثلتها فيروس موزائيك التبغ (TMV) وفيروس موزائيك الطماطة (ToMV)الشكل(4).

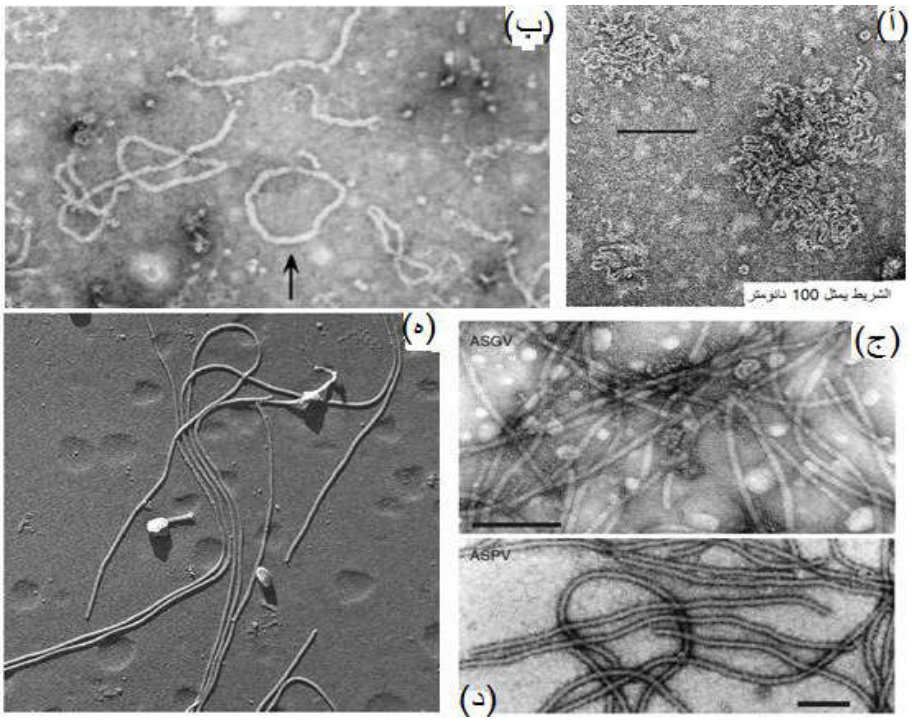


(ب) (أ)

الشكل (4): الجسيمات الفيروسية العصوية الصلدة الأنبوبية المشاهدة بالمجهر الإلكتروني والمصبوغة بطريقة الصبغ السالب (أ) لفيروس موزائيك التبغ (TMV) (ب) لفيروس الاصفرار التماوتي لعروق البنجر (BNYVV). الشكل مقتبس من Mahy و Van Regenmortel (2008).

2.7.1.الفايروسات العصوية المرنة

الفيروسات العصوية المرنة Flexuous rod Viruses شبيهة بالفيروسات العصوية ولكنها مرنة قابلة للانثناء وهي أطول عادة من الفيروسات العصوية الصلدة وتضم أطول فيروسات النبات المكتشفة وهما فيروسي ترستيزا الحمضيات (CTV) واصفرار البنجر (BYV) اللذين تصل أطوالهما إلى 2000 و 1200 نانومتر على التوالي، تتراوح أطوال هذه الفيروسات بين 650–750 وقطر 13 نانومتر، (الشكل 2). يطلق على نوعي الفيروسات العصوية الصلدة والمرنة أيضا "الفيروسات الأنبوبية" Tubular Viruses وهي تمثل نسبة كبيرة من أنواع فيروسات النبات إذ تشكل ما يقرب من 50% من مجمل الفيروسات المسجلة.

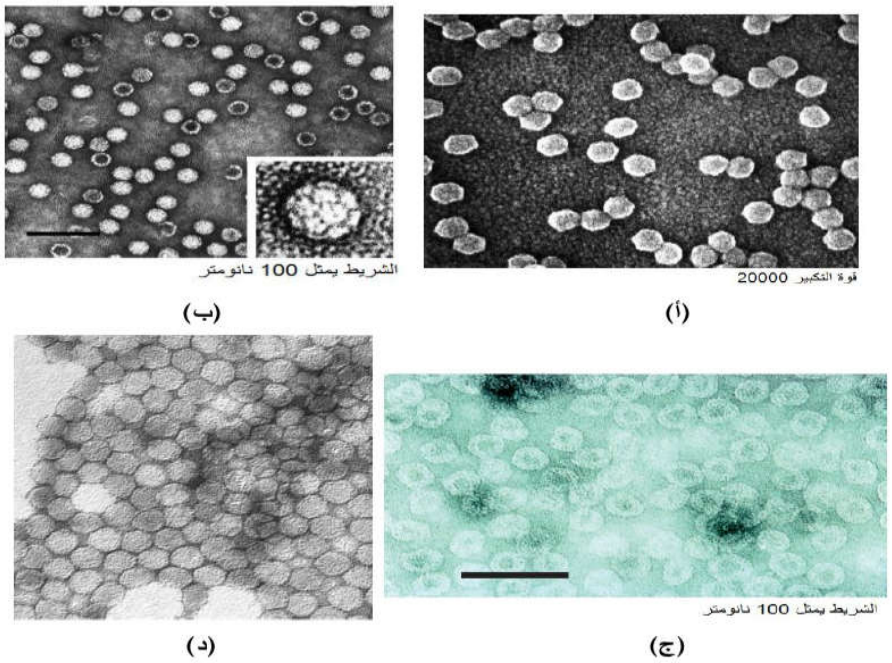


الشكل (5). الجسيمات العصوية المرنة المصورة بالمجهر الالكتروني لخمسة أنواع من الفيروسات هي (أ) أجسام خيطية غريبة لفيروس غير مشخص يعود للجنس Ophiovirus معزول من نباتات خس (ب) فيروس الورقة البيضاء للرز(RHBV) (ج) فيروس تشقق ساق التفاح (ASGV) (د) فايروس تنقر ساق التفاح (ASPV) (ه) جسيمات فيروس البطاطا وأي (PVY) المصورة بالمجهر الالكتروني الماسح ووجود جسيمة من الفاج البكتيري لغرض المقارنة الحجمية (الشريط في الشكلين ج و د = 100 نانومتر).

الشكل مقتبس من Mahy و Van Regenmortel (2008).

3.7.1.الفيروسات الايزومترية

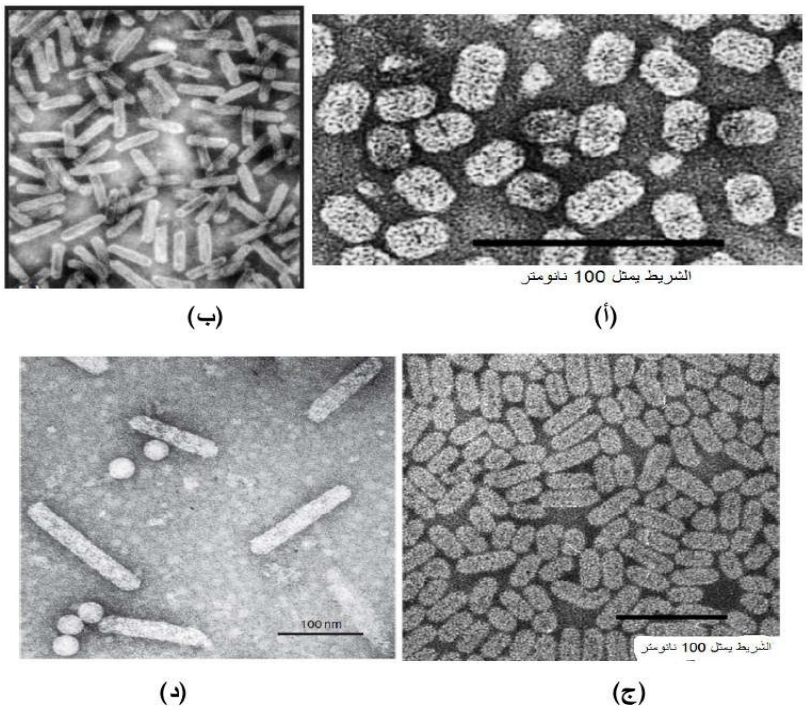
تمتاز الفيروسات الايزومترية Isometrical viruses و المسماة أيضا الفيروسات الكروية Spherical viruses أو الفيروسات البلورية Polyhedral viruses أو الفيروسات العشرينية الاوجة Icosahedral viruses بشكلها البلوري المنتظم المغلق ، وتتباين أقطارها بين 25-50 نانومتر وهي تشكل نسبة كبيرة أيضا من أنواع فيروسات النبات، ومن أمثلتها فيروس موزائيك الخيار (CMV) وفيروس موزائيك القرنابيط (CaMV) الشكل (6) .



الشكل (6). أنواع من الفيروسات الأيزومترية (أ) الجسيمات البلورية لفيروس التقزم الأصفر للشعير(BYDV) (ب) فيروس تبرقش البيلادونا (BeMV) حيث يظهر الشكل الجسيمات الكاملة وعدد من الجسيمات الفارغة من الحامض النووي ذات المركز الغامق بسبب دخول الصبغة فيها، والصورة المكبرة إلى اليمين لجسيمة مكبرة تظهر فيها الكابسوميرات (ج) الجسيمات الكروية لفايروس التقزم الشجيري للعليق (RBDV) (د) الجسيمات البلورية لفيروس التبرقش الأصفر للذرة (MCMV) (ه) شكل مجسم للتركيب السطحي لفيروس موزائيك البروم يظهر الكابسوميرات الخماسية والسداسية (و) شكل مجسم لكابسيد فايروس التبرقش الأصفر للرز (RYMV) يظهر تكونه من أكثر من نوع من البروتينات وترتيب شبه مكافئ . الشكل مقتبس من Mahy و Van Regenmortel (2008).

4.7.1. الفيروسات الباسيلية

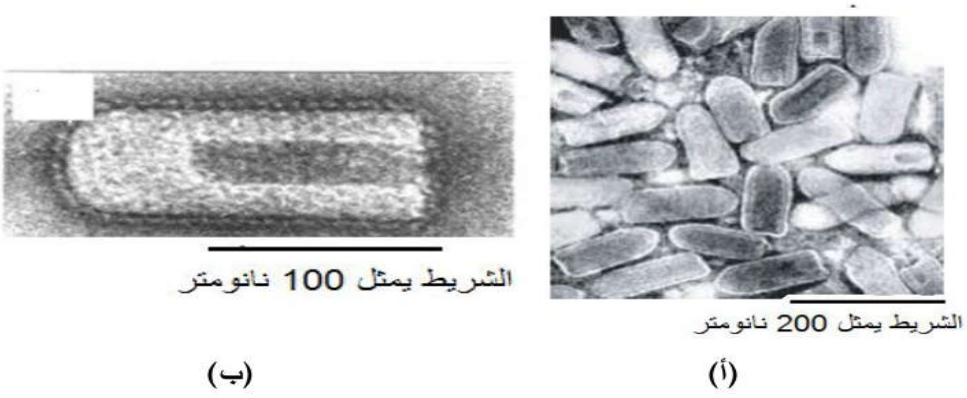
تمتاز الفيروسات الباسيلية Bacillus Viruses بشكلها الأنبوبي العصوي القصير مع نهايات مكورة بشكل نصف دائري، وتتباين في أطوالها وأقطارها حسب نوع الفيروس ومن أمثلتها فيروس موزائيك الجت (AMV) وأفراد الجنس Badnavirus بأبعاد 130 x30 نانومتر، الشكل(7) .



الشكل(7) . الجسيمات الباسيلية (أ) لفيروس من الجنس Ourmiavirus (ب) لفيروس من الجنس Baldnavirus (ج) لفيروس موزائيك الجت (AMV) (د) لفيروس تدهور الرز (RTBV) مع ملاحظة وجود عدد من الأجسام الكروية وهي للجسيمات الفيروسية التي صورت من الأعلى. الشكل مقتبس من Mahy و Van Regenmortel (2008) و Carters و Saunders (2007).

5.7.1. الفيروسات الشبيهة بالإطلاقة

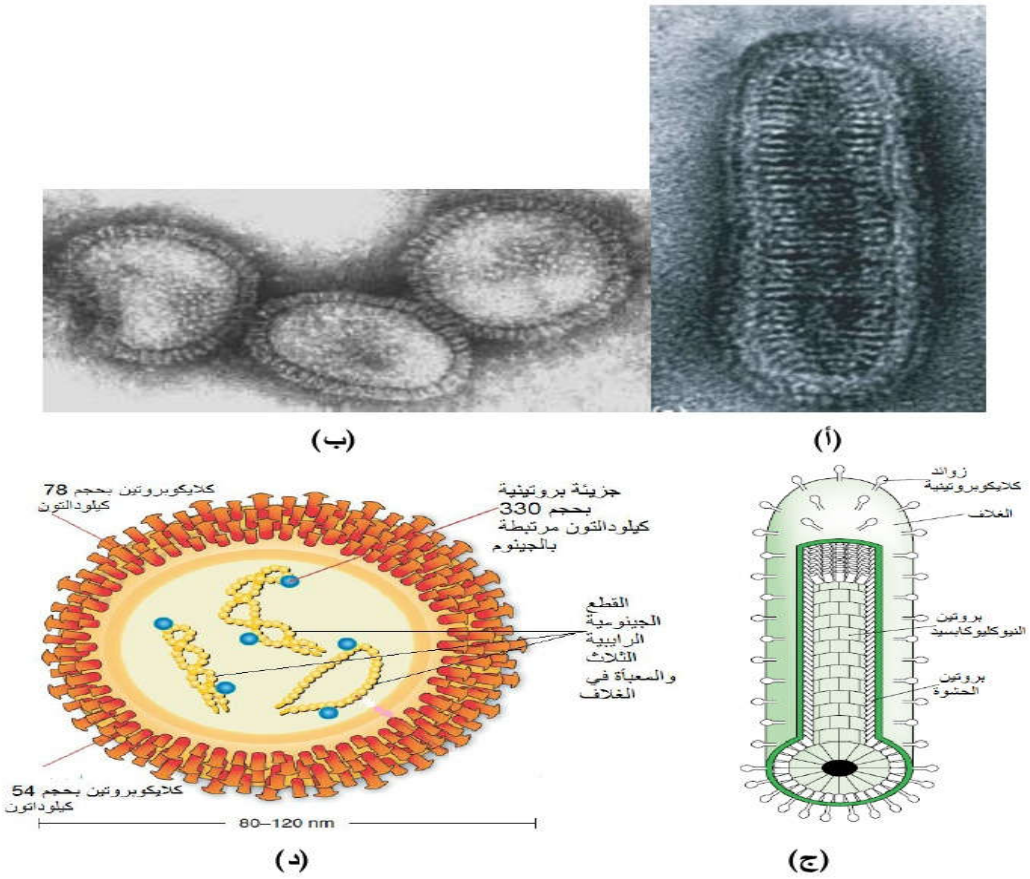
تمتلك الفيروسات الشبيهة بالاطلاقة Bullet-Shaped Viruses شكلا يماثل كثيرا الشكل الباسيلي إلا أن إحدى النهايتين مستقيمة تماما، وتتباين في أطوالها وأقطارها حسب نوع الفيروس ومن أمثلتها فيروس الاصفرار التماوتي للخس (LNYV)، الشكل (8).



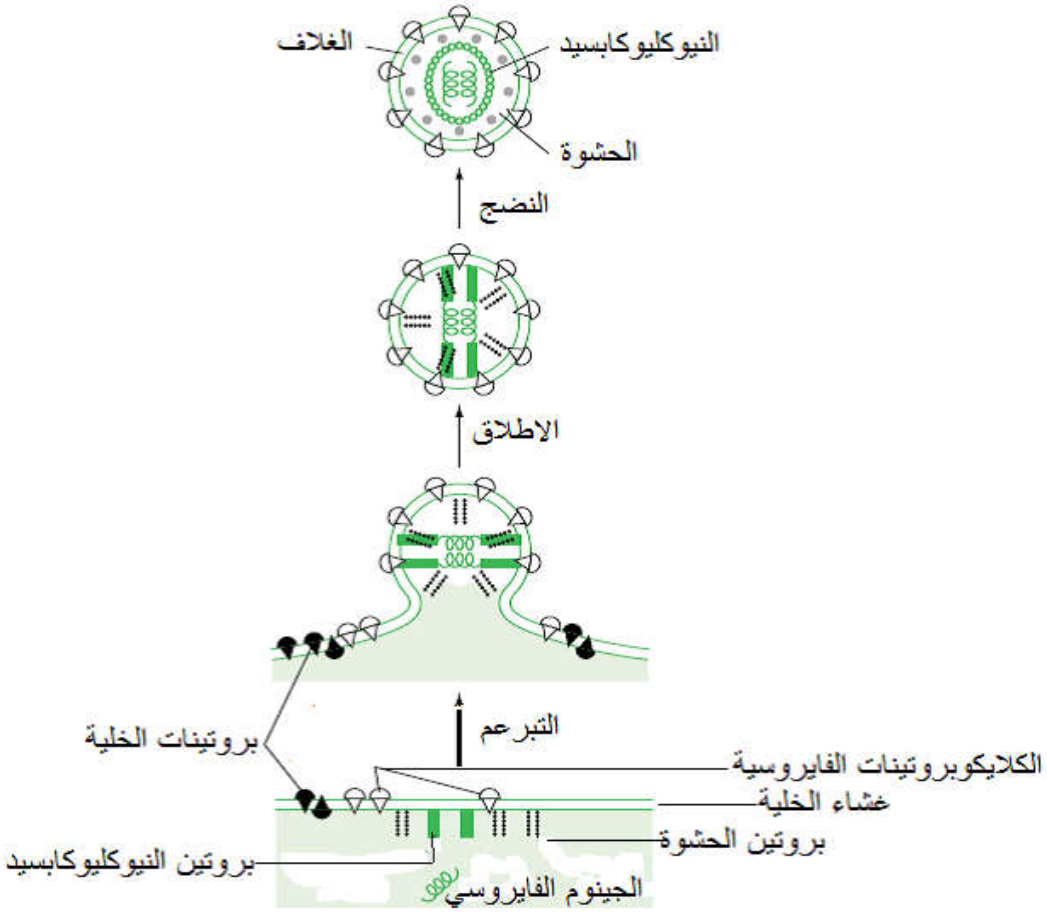
الشكل (8). الجسيمات الشبيه بالإطلاقة المكورة من جهة والمستقيمة من الجهة الأخرى (أ) لفيروس الاصفرار التماوتي للخس (LNYV) (ب) لفيروس التبقع الأحمر لأوراق الليليا (LRLV)، (الشريط يمثل 100 نانومتر) . الشكل مقتبس من Carter و Saunders(2007) و Mahy و Van Regenmortel (2008).

6.7.1. الفيروسات المغلفة

الفيروسات المغلفة Enveloped Viruses هي فيروسات معقدة التركيب تمتلك غلافا إضافيا Envelope ليبوبروتيني يحيط بالكابسيد البروتيني الذي قد يأخذ شكلا مغايرا أحيانا للغلاف الخارجي ، ومن أهم أمثلتها الأنواع التابعة لعائلة Rhabdoviridae التي تمتلك جسيماتها غلافا باسيليا أو شبيها بالإطلاقة مكونا من الليبيد التي تبرز منه أشواكا كليكوبروتينية Spikes ويضم داخله نيوكليوكابسيد حلزوني التنظيم ، وكذلك الأنواع التابعة لعائلة Bunyaviridae وهي فايروسات مغلفة كروية أو متعددة الأشكال Pleomorphic ذات أشواك كليكوبروتينية خارجية منطمرة في غلاف ليبيدي مزدوج، الشكل (9). ونظرا لتماثل أغلفة هذه الفيروسات تركيبيا مع الأغشية الخلوية الليبيدية المزدوجة المغلفة للعضيوات الخلوية لذا اقترح الباحثون أن الفيروسات المغلفة تكتسب أغلفتها من الأغشية الخلوية الليبيدية المزدوجة وذلك خلال عبورها لها أثناء حركتها في الخلية بآلية التبرعم، الشكل (10).



الشكل (9): الفيروسات المغلفة (أ) جسيمة مغلفة عصوية معقدة تمثل فيروسات الرابدو Rhabdoviridae مصورة بالمجهر الالكتروني (ب) جسيمة مغلفة كروية معقدة مصورة بالمجهر الالكتروني (ج) مخطط لمقطع في جسيمة لفيروس رابدو المغلفة العصوية (د) مخطط لمقطع في جسيمة لفيروس من فيروسات التوسبو Tospoviruses المغلفة الكروية. الشكل مقتبس من Mahy و Van Regenmortel (2008) و(2005) Cann.



الشكل (10): آلية التبرعم Budding التي تفسر تغليف الفايروسات المغلفة بالغلاف الليبيدي المزدوج ذو المنشأ الخلوي خلال عبورها أغشية خلايا العائل. الشكل مقتبس من Cann (2005) .

8.1.تنقية الفيروسات النباتية

1.8.1. تعريف التنقية Purification:

هي تحضير محلول فيروسي يحوي جسيمات مركزة وفعالة نقية غير ملوثة بأية ملوثات نباتية أو مركبات أخرى وتجرى عملية التنقية لدراسة خصائص الفيروسات الفيزيائية والكيميائية والإعداد المصول المضادة. لقد تعددت وتطورت طرق التنقية ووظفت فيها تقنيات الكيمياء الحيوية وعلم الحياة الجزيئي ورغم ذلك لا زالت العديد من أنواع الفيروسات غير ممكنة التنقية بسبب عدم ثباتها مما يجعلها لا تتحمل إجراءات التنقية أو لقلة تركيزها في النبات، وتعد عملية التنقية صعبة الإنجاز للأسباب الآتية:

- احتواء عصير النبات المصاب بالفيروس المطلوب تنقيته على مكونات نباتية قريبة الحجم والوزن الجزيئي من جسيمات الفيروس وهي الريبوزومات وجزيئات إنزيم Ribulose diphosphate Carboxylase والذي يسمى أيضا "جزء البروتين الأول" Fraction 1

protein حيث يبلغ قطر جزيئاته 10 نانومتر وبقيمة معامل ترسيب S18 وبوزن جزيئي 55 كيلو دالتون ويشكل ما يقرب من 50% من مجمل البروتينات النباتية الذائبة في العصير النباتي وهو موجود في الكلوروبلاستات والمسئول عن تثبيت الكربون في عملية البناء الضوئي، أما البروتينات النباتية الأخرى الملوثة فهي الإنزيم المسمى "جزء البروتين الثاني Fraction 2 protein الموجود في السيتوبلاز وبقيمة معامل ترسيب S4، وبروتين "الفايتوفيريتين" Phytoferritin وبقيمة معامل ترسيب S60 وقطر 10 نانومتر كذلك تعد الصبغات النباتية من الملوثات الهامة والتي يصعب إزالتها فيما يسهل إزالة الجسيمات الخلوية الكبيرة نسبيا وهي بقايا الجدر الخلوية المحطمة والميتوكوندريات والبلاستيدات والتي يسهل إزالتها من العصير وفصلها عن الفيروس لكبر حجمها مقارنة بجسيماته :

- تلف وتكسر العديد من جسيمات الفيروس خلال مراحل التنقية مما يربك النتيجة التنقية
- وجود أنواع من الكاتيونات الموجبة الشحنة وخاصة أيون المغنيسيوم Mg^{++} والتي تسبب تكتل وتجميع الجسيمات الفيروسية سالبة الشحنة. (قاسم، 2011)

2.8.1. خطوات تنقية الفيروسات

تنفذ عملية التنقية لأي فايروس نباتي بثلاث خطوات متتالية وهي:

1.2.8.1.استخلاص الفيروس من النبات

يسحق الجزء النباتي المصاب للحصول على العصير النباتي الذي سينقى الفيروس منه لذا فمن الضروري اختيار نوع النبات المناسب لإكثار الفيروس والذي يجب أن يكون سهل التربية وخالي من المواد المثبطة للفيروس وخاصة الفينولات والأحماض العضوية والمواد اللزجة والأصماغ حيث أن النباتات التي توجد فيها هذه المواد بتركيز عالي فانه يصعب تنقية فيروساتها ومنها أشجار اللوزيات التي تحوي أوراقها تراكيز عالية من التانينات لذلك يفضل نقل فيروساتها إلى نباتات إكثار عشبية أو من الخضراوات ثم تنقيتها وعموما فان تركيز هذه المواد المثبطة يزداد كلما تقدمت النباتات في العمر، كما يجب اختيار الوقت المناسب للحصول على العصير من النبات والذي يكون فيه تركيز الفيروس في أعلى درجاته وذلك لتباين مستويات تركيز الفيروس في النباتات زمنيا وعادة ما يتناقص التركيز بعد مرور وقت طويل من إصابة نبات الإكثار بالفيروس كما يتباين تركيز الفيروسات مكانيا في النباتات أي تباين توزيع الفيروس في أجزاء النبات فقد يوجد الفيروس بتركيز عالي في الأوراق ومنخفض في الساق أو الجذور أو بالعكس، يتم استخلاص عصير النبات المصاب ميكانيكيا بسحق الأنسجة النباتية مع كمية معينة من محلول منظم مناسب للحصول على العصير الحاوي على الجسيمات الفيروسية الفعالة بإخراجها من الخلايا ويمكن استعمال أية وسيلة ميكانيكية لإنجاز ذلك ومنها الهاون الخزفي أو ماكينة فرم الخضراوات

أو الضاغطات الميكانيكية أو الخلاطات الكهربائية، إن عملية الاستخلاص تعني إخراج الفيروس من وسطه الحيوي الطبيعي إلى العصير وهو وسط يحوي الكثير من المركبات والعوامل الخطرة على الفيروس والتي تسبب تلفه وبالتالي فشل التنقية ومنها الإنزيمات النباتية المحللة للأحماض النووية والمواد المثبطة التي ذكرت آنفا فضلا عن تأكسد الفيروس بالأكسجين الجوي وتأثير درجات الحرارة، ولغرض الحفاظ على الفيروس من هذه العوامل ولمنع تكتل الجسيمات الفيروسية في العصير وتوزيعها فيه بشكل متجانس فانه يجب اتخاذ الإجراءات التالية :

(1) يتم الاستخلاص في درجة حرارة لا تزيد عن 4م وذلك لان أغلب الفيروسات تفقد فاعليتها عند درجات الحرارة المرتفعة كما أن التبريد يوقف فاعلية الإنزيمات المحللة المؤثرة على الفيروس.

(2) استعمال المحلول المنظم المناسب للفيروس عند استخلاص العصير لضبط الأس الهيدروجيني للعصير عند حدود التعادل وذلك بسبب قدرته على سحب وإطلاق أيونات الهيدروجين في العصير وإبعاده عن نقطة التعادل الكهربائي Isoelectric point للفيروس وذلك لمنع تكتل جسيمات الفيروس في العصير وترسبها بسبب تغير الأس الهيدروجيني أثناء الاستخلاص ولضمان التوزيع المتجانس لتلك الجسيمات في المحلول، حيث أن أغلب الفيروسات تترسب عند الأس الهيدروجيني 4 والذي يمثل نقطة تعادلها الكهربائي وتنتشر بشكل متجانس عند القيمة 7 باستثناء فيروسات Bromoviruses التي تنتشر في العصير بشكل متجانس عند الأس الهيدروجيني 5 وتترسب عند القيمة 7، علما بأن عصائر العديد من أنواع النباتات هي حمضية ضعيفة وبعضها علي الحمضية مثل أوراق العنب والذي تصل قيمة أسه الهيدروجيني بين 3-4 فيما تكون عصائر القرعيات قاعدية ضعيفة، إن عملية تكتل الجسيمات الفيروسية في مرحلة الاستخلاص هي حالة غير مرغوبة لأنها ستسبب فقدان الفيروس في المراحل الأولى للتنقية خلال الانتباذ الواطئ، ومن الضروري ضبط القوة الايونية (المولاريتية) ، Ionic Molarity Strength للمحلول المنظم المستعمل وذلك لتأثيرها على الفيروسات التي تتباين في تحملها لتلك القوة، فالفيروسات العصوية تناسبها القوة الايونية بقيمة 0،2 مولر فأكثر فيما نجد أنواعا من الفيروسات تفقد فاعليتها إذا وضعت في محلول منظم تزيد قوته الايونية عن 0،2 مولر .

(3) سحب الأيونات ثنائية الارتباط وخاصة ايوني الكالسيوم Ca^{++} والمغنيسيوم Mg^{++} من العصير حيث أن وجودها يسبب تكتل الجسيمات الفيروسية وفقدها من العصير بسبب عدم تجانس انتشارها فيه .

(4) إضافة المواد المانعة للتأكسد Antioxidants لإيقاف عمل الأنزيمات المؤكسدة وأهمها إنزيمات "الفينول أوكسيديز" Phenol Oxidases الحاوية على النحاس الضروري لعملها والتي تؤكسد المواد الفينولية إلى تانينات أو كينونات .

(5) إضافة مادة البنتونايت المغنيسيومي Magnesium bentonite إلى العصير للتخلص من الإنزيمات المحللة للأحماض النووية.

(6) إضافة المنظفات Detergents واليوريا باعتبارها مواد ناشرة لمنع تكتل الجسيمات الفيروسية في العصير بما تسببه من إضعاف للأواصر الكاره للماء والأواصر الهيدروجينية كما تساعد في تحرير الفيروس من خلايا النبات أثناء السحق.

(7) اللجوء إلى الاستخلاص الإنزيمي بدل الميكانيكي في الحالات الخاصة فقد استعمل المعقد الإنزيمي Driselase المكون من إنزيم البكتينيز Pectinase والسيليليز Cellulase لتحرير فيروس التفاف أوراق البطاطا (PLRV) من نسيج اللحاء. (قاسم،2011)

2.2.8.1.تصفية العصير

تنفذ عملية التصفية Clarification مباشرة بعد انتهاء مرحلة الاستخلاص للتخلص من المواد النباتية الكبيرة الحجم نسبيا وفصلها عن الفيروس وتشمل الميتوكوندريات والبلاستيدات ونوى الخلايا والحبيبات النشوية وأجزاء الجدر الخلوية وأجزاء الأغشية الخلوية الليبوبروتينية إلا أن هذه الخطوة لا تتمكن من فصل المواد النباتية المماثلة في الحجم للفيروس أو الأصغر منه وتتم التصفية بإحدى الطرق التالية: (قاسم،2011)

1) **التصفية بالانتباذ الواطئ**

الانتباذ الواطئ Low Centrifugation هو أكثر الطرق استعمالا ويتم بتعريض العصير المستخلص إلى انتباذ واطئ على قوة انتباذ1000 - 10000 Xg لمدة 15 دقيقة وهي فترة انتباذ كافية للتخلص من الجسيمات التي يزيد قطرها عن 250 نانومتر وذات معامل ترسيب يصل إلى 6500 S حيث تتجمع كل هذه المواد في الكتلة الراسبة Pellet في قعر أنبوبة الانتباذ ويتم التخلص منها ويؤخذ الرائق Supernatant الحاوي على الجسيمات الفيروسية .

2) **التصفية بالترشيح بالمرشحات الدقيقة**

تستعمل مرشحات دقيقة تسمح للفيروسات والمواد الأصغر منها بالعبور خلالها فيما تحجز المواد النباتية الكبيرة نسبيا، وهذا يسمى بالترشيح الفائق الذي تستعمل فيه أنواع من المرشحات هي مرشح السيلايت" Celite filter الذي يحضر آنيا ويستعمل لمرة واحدة و"مرشح زايتس الاسبستي" Seitz filter ومرشح بيركفيلد" Berkefeld filter المصنوع من رمل الدياتوم DiatomaCeous earth و "امرشح شيمبرلاند" Chamberland Filter .

3) **التصفية باستعمال المدمصات**

يمكن إجراء التصفية بمزج العصير النباتي مع مواد مدمصنة Adsorbants تقوم بادمصاص البروتينات النباتية ليسهل بعد ذلك فصلها بالترسيب بالانتباذ أو بالترشيح وأفضل المدمصات هي البنتونايت المغنيسيومي حيث يعمل أيون المغنيسيوم بمثابة جسر يربط جزيئة البنتونايت مع جزيئة البروتين ويتم منع جسيمات الفيروس من الادمصاص عليه بالتحكم بقيمة الأس الهيدروجيني.

4) **التصفية بالتجميد والإذابة**

هي طريقة قليلة الاستعمال وتعتمد تجميد العصير النباتي ثم إذابته ببطء فيتم عندها فصل المواد قليلة الكثافة عن بقية المكونات بسبب تجمدها بشكل كتلة ثلجية مائية طافية وهي التي تحوي عادة الجسيمات الفيروسية وبذلك تؤخذ هذه الكتلة وتبقى المواد النباتية الثقيلة غير متجمدة، تستعمل هذه الطريقة فقط مع الفيروسات الثابتة مثل فيروس موزائيك التبغ (TMV). (قاسم،2011)

5) التصفية بالتسخين

هي كسابقتها قليلة الاستعمال ومع الفيروسات الثابتة فقط حيث يسخن العصير إلى درجة 60-50م لعدة دقائق مما يسبب ترسيب بعض البروتينات النباتية نتيجة تكتلها بتأثير الحرارة مما يسهل فصلها من العصير دون التأثير على الفيروسات التي تتحمل درجات حرارية أعلى من تلك الدرجة بكثير.

6) **التصفية بأنظمة السوائل ثنائية الطور**

تستعمل في هذه الطريقة المسماة Liquid two-phase system نوعين من البولمرات العضوية Organic polymers وأكثرها استعمالا هي الدكستران ممزوجا مع الكلايكول متعدد الايثيلين أو الأخير ممزوجا مع مثيل السليلوز حيث ينفصلان بعد المزج إلى طبقتين وعند إضافة المحلول الفيروسي غير النقي ومزجه معهما فإن الجسيمات الفيروسية ستنفصل نقية نسبيا في إحدى الطبقتين تاركة أغلب الملوثات النباتية مستقرة في الطبقة الأخرى ثم تختبر الطبقة التي يوجد فيها الفيروس ليتم التأكد من وجوده فيها بواسطة اختبارات النقاوة وتفصل عن طبقة الملوثات. (قاسم،2011)

7) **التصفية باستعمال المصول المضادة لبروتينات النبات**

يتم تحضير مصول مضادة ضد المكونات البروتينية النباتية بالطريقة ذاتها التي يتم فيها تحضير المصول المضادة الفيروسية ولكن بحقن الحيوان اللبون بالبروتينات النباتية المنقاة من النبات السليم والذي هو من نفس نوع النبات المصاب بالفيروس ثم استعمال هذا المصل المضاد ومزجه مع المحلول الفيروسي غير النقي للتخلص من البروتينات النباتية الملوثة عن طريق ارتباط جزيئات الضد مع

البروتينات المتخصصة عليها والتي تفصل بعد ذلك بالانتباذ الواطئ لتترسب بشكل كتلة راسبة، تتيح هذه الطريقة التخلص من المواد النباتية ذات الوزن الجزيئي المنخفض. (قاسم،2011)

3.2.8.1. **التنقية النهائية للفيروس**

هي الخطوة التي يعزل فيها الفيروس ويفصل مركزا ونقيا عن البروتينات النباتية الذائبة والرايبوسومات والتي لم تفصل عنه في خطوة التصفية بسبب تقارب حجمها معه، تتم التنقية بإحدى الخطوات التالية والتي يعرض لها المحلول الناتج من التصفية : (قاسم،2011)

1) **التنقية بالانتباذ العالي**

هي الطريقة الأكثر شيوعا وتعتمد تعريض المحلول الناتج من التصفية إلى انتباذ عالي Ultracentrifugation يبدأ من 20 ألف دورة/دقيقة فأكثر باستعمال جهاز الانتباذ عالي السرعة و المبرد Cooled Ultracentrifugation والدوار ثابت الزاوية Fixed angle rotor (قاسم،2011).

2) **التنقية بطريقة الترشيح الهلامي**

استعملت طريقة الترشيح الهلامي Gel filtration والتي تسمى "الكروماتوغرافيا المنخلية الجزيئية Molecular Sieve Chromatographyلغرض تنقية عدد من أنواع الفيروسات وهي الطريقة التي تعتمد استعمال عمود من الهلام يمرر فيه المحلول الناتج من خطوة التصفية لغرض تنقية الفيروس وأكثر الهلامات استعمالا هو "السيفادكس" Sephadex ويسمى أيضا "الدكستران" Dextran وأيضا هلام "البولي أكريل أمايد" Polyacrylamide gel، PAGويسمى ايضا Biogel P ثم هلام الاكاروز Agarose والذي يسمى أيضا "السيفاروز" Sepharose أو "البايوجيل ألفا" Biogel A . (قاسم،2011)

3) **تنقية الفيروسات بطريقة كروماتوغرافيا التبادل الأيوني**

تعد "طريقة كروماتوغرافيا التبادل الأيوني lon exchange chromatography قليلة الاستعمال في تنقية الفيروسات وتستعمل فيها أعمدة من هلامات السليلوز أو فوسفات الكالسيوم أو الكايتين Chitin أو الألبومين المثيلي Methylated albumin ويستند مبدأ فصل الجسيمات في هذه الطريقة بادمصاص جسيمات الفيروس على جزيئات الهلام والسماح للجزيئات النباتية الملوثة بعبور الهلام ثم فك ارتباط جسيمات الفيروس عن جزيئات الهلام بتغيير الأس الهيدروجيني للهلام باستعمال محلول منظم يناسب النوع الفيروسي ونوع الهلام المستعمل. (قاسم،2011)

4) **التنقية بطريقة الترحيل الكهربائي**

استعملت طرق الترحيل الكهربائي Electrophoresis بمحدودية لتنقية الفيروسات رغم أنها واسعة الاستعمال لفصل البروتينات الفايروسية وتشخيصها وتقييم نتائج التنقية، وأكثر طرق الترحيل الكهربائي استعمالا مع الفيروسات هي طريقة "الترحيل الكهربي النطاقي" Zone electrophoresis باستعمال السكروز متدرج الكثافة وتتم بإضافة المحلول الفيروسي إلى المحلول السكري المتدرج وتعريضه إلى حقل كهربي مما يسبب انفصال مكونات المحلول إلى حزم حسب شحنتها وحجمها وبالتالي فصل الفيروس نقيا في إحدى هذه الحزم واستعملت أيضا طريقة الحافة المتحركة" Moving boundary method أو تسمى "خلية تيسليوس" Tiselius electrophoresis cell بمحدودية لتنقية الفيروسات. (قاسم،2011)

3.8.1. اختبارات النقاوة

اختبارات النقاوة Purity tests هي مجموعة اختبارات حيوية وفيزيائية تجرى على المحلول الفيروسي النقي لتقييم نتائج التنقية ونجاحها في تنقية الفيروس مركزا وفعالا وخاليا من الملوثات النباتية وتشمل الاختبارات التالية:

1.3.8.1.الاختبار الحيوي

هو اختبار تقييم الفعالية المعدية للفيروس النقي ويتم بتلقيح نباتات كاشفة حساسة للفيروس وتفضل أن تكون استجابتها له بشكل بقع موضعية ليمكن حساب النتائج كميا وهو اختبار مناسب جدا للفيروسات المنقولة ميكانيكيا أما التي لا تنقل بهذه الطريقة فيمكن تلقيح نباتات بها بحقن الفيروس في أنسجة الشتلات الغضة أو اللجوء إلى النقل بالناقلات وخصوصا الحشرات التي يتم تغذيتها على المحلول الفيروسي عبر غشاء كما أنه يعطي دليلا على تركيز الفيروس في المحلول ومقارنته مع تركيزه في نسيج النبات من خلال مقارنة عدد البقع الموضعية المتكونة على الأوراق الملقحة بالمحلول النقي وتلك الملقحة بالعصير الخام للنبات المصاب. (قاسم،2011).

2.3.8.1.الاختبار المصلي السلبي للملوثات النباتية

يجرى باستعمال مصول مضادة للبروتينات النباتية المحتملة الملوثة للمحلول الفيروسي النقي والتي تسمى "المجسات المصلية" والتي تشمل البروتينات القريبة الوزن الجزيئي من الفايروس حيث تمزج مع المحلول الفيروسي ويفترض أنها لا تحدث أي تفاعل مصلي مع المحلول لخلوه إن كان نقيا من هذه الملوثات. يطلق على هذه المصول المضادة مصطلح "المجسات المصلية" Serological probes.

3.3.8.1. الفحص بالمجهر الالكتروني

يستعمل لمشاهدة الجسيمات الفيروسية مباشرة في المحلول لملاحظة سلامتها وعدم تأثير إجراءات التنقية عليها والتأثير على أشكالها وأبعادها، كما يستعمل لتقدير تركيز الجسيمات الفيروسية في المحلول بفحص قطرة معلومة الحجم منه والمقارنة مع قطرة بنفس الحجم من العصير الخام للنبات المصاب، كما يستعمل المجهر لمشاهدة البروتينات الملوثة للمحلول الفيروسي في حالة وجودها. (قاسم،2011).

4.3.8.1.اختبار الامتصاص الطيفي للأشعة فوق البنفسجية

هو اختبار امتصاص المحلول الفيروسي للأشعة فوق البنفسجية باستعمال جهاز "المطياف" Spectrophotometer إذ تمتص الجسيمات الفيروسية هذه الأشعة عند المدى الموجي 220-300 نانومتر إلا أن أقصى امتصاص يكون عند الطول الموجي 260 نانومتر ويعود سبب الامتصاص لوجود القواعد النتروجينية الحلقية في تركيب الحامض النووي(قاسم،2011).

5.3.8.1.الاختبارات الضوئية

يمكن الحصول على نتائج مفيدة لتقييم التنقية باستعمال عدد من الاختبارات الضوئية التقليدية للمحلول الفيروسي النقي باستعمال الضوء العادي وهي:

1) المشاهدة البصرية للمحلول الفيروسي النقي

يمكن بواسطة المشاهدة البصرية للمحلول الفيروسي النقي Viewing of Solution الحصول على معلومات مفيدة عن نقاوة الفيروس وشكل جسيماته حيث يظهر المحلول الفيروسي متلالنا Opalescent إذا أحتوى على جسيمات فيروسية يقل طولها أو قطرها عن 500 نانومتر أو يظهر معكرا Turbid إذا كانت أكبر من ذلك ويتم هذا الاختبار البسيط بالنظر بالعين المجردة إلى المحلول الفيروسي النقي الموضوع في أنبوبة زجاجية بوضعها أمام مسار الضوء العادي، وتحدث هذه الظاهرة بسبب تطاير الضوء الذي تسببه الجسيمات الفيروسية عند مروره في المحلول وتزداد كثافة البريق عند تعريض المحلول للضوء المنحرف Oblique light ويعطي هذا الاختبار مؤشرا على نقاوة الفيروس وحجم جزيئاته النسبي كما يعطي قياسا عاما لتركيزه في المحلول حيث أن هذه الظاهرة تحدث عندما يبلغ تركيز الفيروس في محلوله مقدار 1ملغم / مل فأكثر كما تتناسب كثافة البريق طرديا مع حجم الجسيمات والطول الموجي للضوء المتطاير. (قاسم،2011).

2) التدوير الضوئي (الومضي) عند التعريض للضوء المستقطب

التدوير الضوئي Anisotropy of flow or Streaming birefringence هي خاصية ضوئية للمحاليل النقية لبعض الفيروسات حيث تومض Shimmer عند رجها والنظر إليها باتجاه ضوء مستقطب مسببة تدويره أو انحرافه وهي ظاهرة معروفة مع الفيروسات العصوية لأنها تصطف بشكل حزم فتعمل على تدوير الضوء المستقطب إذ من المعروف فيزيائيا أن المحلول المدور للضوء Birefringence Solution يغير اتجاه الضوء المستقطب بينما لا يفعل ذلك المحلول الثابت ضوئيا Isotropic solution . (قاسم،2011).

3) قياس مؤشر انكسار المحلول الفيروسي

يسبب المحلول الفيروسي النقي انكسارا للضوء عند مروره فيه يزيد عن مقدار الانكسار الذي يسببه المذيب المذاب فيه الفيروس وبذلك تمتلك المحاليل الفيروسية مؤشر انكسار Refraction index يزيد عن مثيله لمحاليل الانتباذ المستعملة ويقاس بجهاز قياس الانكسار الذي يعطي تقديرا دقيقا له واستعمل هذا القياس لحساب الوزن الكلي للنيوكليوبروتينات الفيروسية منذ خمسينات القرن العشرين. (قاسم،2011).

6.3.8.1.اختبارات الترحيل الكهربائي (الرحلان)

استعملت تقنية الترحيل الكهربائي (الرحلان) Electrophoresis لدراسة صفات الفيروسات ومكوناتها من الأحماض النووية والبروتينات وحساب أوزانها الجزيئية بالمقارنة مع مركبات بروتينية قياسية معروفة الوزن الجزيئي وذلك بعد فصل الحامض النووي عن البروتين الفيروسي حيث تتم عملية الفصل بطرق كيميائية وفيزيائية عديدة لا تؤثر على خواص هذه المركبات(قاسم،2011).

4.8.1.خزن المحلول الفيروسي النقي

من الضروري توفير طريقة الخزن المناسبة للمحلول الفيروسي النقي والمحافظة على فاعلية الجسيمات الفيروسية أثناء مدة الخزن حيث أن سوء الخزن يؤدي إلى نمو الفطريات والبكتريا الملوثة وبالتالي طرح إنزيمات وبروتينات غريبة في المحلول وقد تنوعت طرق الخزن وبما يناسب نوع الفيروس ولعل أكثر الطرق استعمالا هي الحفظ بالتجميد وإن كانت الفيروسات النقية تتباين في مدة تحملها لظروف التجميد حيث أن الفيروسات غير الثابتة لا تتحمل ظروف التجميد، يتم خزن المحاليل الفيروسية النقية بين الصفر المئوي و4م مع إضافة مركبات تمنع النموات الميكروبية وأكثرها استعمالا هو مركب أزايد الصوديوم بتركيز 0،1% Sodium azide وهو الأفضل من بين مواد الحفظ لعدم تأثيره على

فعالية الفيروسات كما يمكن استعمال الثايمول او الكليسيرول بمزجة مع المحلول الفيروسي بنسبة 1:1 وكذلك الكلوكوز او الببتون بتركيز 5-10 % كما يمكن استعمال الكلوروفورم والفورما لديها يد بمحدودية مع بعض الفيروسات.(قاسم،2011)

2.الإصابة بالفيروس Virus infection

لكي تحدث الإصابة لابد من أن يصل الفيروس إلى داخل الخلايا الحية المناسبة، ولا يستطيع الفيروس اختراق أدمة النبات معتمدة على نفسه ولهذا فإما أن يتجنب اختراقها، وذلك عن طريق الانتقال الداخلي من البذور المصابة، أو عن طريق التكاثر الخضري للنبات، أو أن يدخل عن طريق خدوش أو جروح دقيقة في بشرة النبات تحدث عن طريق العدوى الميكانيكية، أو بواسطة الحشرات والنيماتودا والجراثيم الهدبية لبعض الفطريات والحامول وغيرها.

من السهل تصور دخول الفيروس إلى داخل الخلية عن طريق الحشرات أو النيماتودا والفطريات والحامول، ولكن بالنسبة للعدوى الميكانيكية فإن الوضع يختلف إلى حد ما، فالأسطح الخارجية للنبات تتغطى بطبقات خاصة لحمايتها تتركب في أساسها من الكيوتين، كما تحتوي البشرة الخارجية على فتحات دقيقة هي الثغور وعلى خلايا حارسة بجانب الخلايا البرانشيمية العادية، كما قد توجد بعض الشعيرات والزوائد الخاصة .

وجود الشعيرات على بشرة الأوراق قد يكون لها دور في بعض الأحيان ، ولكن هذا لا يعني أن لمثل هذه الشعيرات أهمية كبيرة في العدوى، الميكانيكية ، فهناك أوراق تخلو منها ومع هذا يسهل عدواها ، كذلك فان بعض التجارب التي أجريت على نبات الفلفل ثبت منها عدم أهمية الشعيرات في العدوى وعلى هذا فالشعيرات يكون لها أهمية في بعض الحالات دون الأخرى. وبالنسبة للخلايا الحارسة فليس لها دور خاص في عملية العدوى إذ وجد أن البشرة السفلى لأوراق الفلفل تحتوي على خلايا حارسة أكثر ما يوجد على البشرة العليا بما يزيد عن 20مرة، وعند إجراء العدوى الميكانيكية لكلا السطحين فإن البقع المحلية الناتجة عليها كانت متساوية تقريبا. دخول الفيروس إلى داخل الورقة عن طريق الثغور لا يسبب عدوى أو إصابة النبات ، إذ عندما أدخل فيروس موزايك الدخان في المسافات البينية داخل الورقة لم تحدث إصابة(الحمادي، 2018).

1.2.تضاعف الفيروس virus multiplication (replication)

إذا ما ألقينا نظرة عامة على جميع الفيروسات ، فإننا نجد أنها تتركب أساسا من حامض نووي أما DNA أو RNA محاطة بغطاء بروتيني . ويكون هذا الحامض ذو خيط واحد أو ذو خيطين single -stranded or double stranded.

1.1.2.طريقة تناسخ أل DNA

في خلية النبات الحية يوجد ارتباط وثيق بين الأحماض النووية وبين تخليق البروتين ومن المهم معرفة العلاقة بين هذه المركبات إذ أن ذلك يساعد على تفهم عملية تضاعف الفيروس.

وقد أجريت عديد من الدراسات للكشف عن عملية تضاعف الفيروس في النبات، يسر بإيجاز الخطوات الرئيسية التي يمر بها فيروس موزايك الدخان أثناء تضاعفه داخل الخلية والتي ترجحها غالبية الأبحاث والآراء. نظرا لأن ال RNA هو القادر على إحداث الإصابة وتكوين جزيئات فيروسية جديدة، فإن هذا يعني ببساطة أنه هو المسئول عن التوارث في الفيروس وبالتالي فإنه يقوم بما يلي:

1.1.1.2.نزع الغلاف البروتيني عن الحامض النووي للفيروس

أول خطوة لتضاعف الفيروسات بعد دخولها إلى الخلية هي نزع الغلاف البروتيني عن الحامض النووي. تحدث هذه العملية بصورة تدريجية وذلك بإزالة الوحدات البروتينية Protein subunit من الغلاف بخطوات متعاقبة. ونظراً لعدم احتواء فيروسات النبات على إنزيمات فان عملية نزع الغلاف البروتيني تتم بمساعدة خلية النبات العائل في سيتوبلازم الخلية.

2.1.1.2.تضاعف الحمض النووي للفيروس .

تركزت الدراسات على فيروس موزاييك التبغ TMV وهو أيضاً من الفيروسات التي تكون العوامل الوراثية فيه من نوع RNA أحادي السلسلة .ونظراً لكون العوامل الوراثية لمعظم فيروسات النبات هي من نوع RNA الأحادي الخيطً، وعليه نلخص فيما يلي الخطوات والمعلومات المتوفرة عن تضاعف الحمض النووي لهذا النوع من الفيروسات في خلايا العائل:

1) ترجمة العوامل الوراثية على جزء معين من الحمض النووي التي تؤدي إلى تصنيع الأنزيمات الخاصة بتضاعف الحمض النووي وأهمها RNAReplicase .
2) استنساخ خيطي سالب يسمى بالخيط الشقيق السالب Minus complementarystrand على خيط الحمض النووي الكامل للفيروس الذي يسمى عادة بالخيط الموجب RNA+ بمساعدة الانزيم RNA Replicase وربما إنزيمات وعوامل مساعدة أخرى ونتيجة لذلك يتكون RNA ثنائي الخيط احدهما الحمض النووي الاصلي للفيروس RNA+ والثاني هو الخيط الشقيق-RNAويطلق على هذين الخيطين معاً الشكل التناسخي Replicative form RNA (RF) .
3) ينفصل خيطا الشكل التناسخي RF عن بعضهما، ويعمل الخيط السالب RNA- كقالب Templateلإنتاج العديد من الخيوط الموجبة RNA+ عليه بمساعدة الإنزيمات وبذلك يتم تضاعف الحمض النووي للفيروس. أما موقع العمليات الكيمائية المذكورة أعلاه داخل خلية العائل

تختلف من فيروس لآخر فمثلا في حالة فيروس الموزايك mosaic virus فانه يبدو أن تمثيل الحامض النووي الفيروسي وتكوين الوحدات الفيروسية يتم في النواة ومنها تخرج الجزيئات الفيروسية الكاملة إلى السيتوبلازم، بالرغم من أن هناك بعض الأدلة على أن تمثيل الحامض النووي والبروتين واتحادهما معا في حالة بعض الفيروسات يتم في سيتوبلازم خلية العائل فإن بعض الفيروسات قد تمثل في البلاستيدات الخضراء . (الحمادي و اخرون،2018)

3.1.1.2.تصنيع البروتينات الخاصة بالفيروسات

تصنيع بروتينات الفيروسات في الخلية المصابة بواسطة ريبوسومات الخلية التي تقوم بترجمة المعلومات الخاصة بنوعية البروتين من جزء معين من الحمض النووي للفيروس.

4.1.1.2.تركيب وتجميع البروتين مع الحامض النووي للفيروس

لازالت الطريقة التي تتجمع وتتحد فيها اجزاء الفيروس المصنعة (البروتين والحامض النووي) داخل الخلية لتكوين فيروسات متكاملة غير معروفة بالتحديد. إلا أنه يستدل من المعلومات التي سبق ذكرها بأن الأجزاء المصنعة لفيروس موزايك التبغ تتجمع في السيتوبلازم، كما هو معروف أيضاً أن جسيمات الفيروس المتكاملة تتجمع أيضاً في السيتوبلازم. وقد أقترح أن الكيفية التي يتم فيها اتحاد الحامض النووي والوحدات البروتينية لهذا الفيروس هو ان تتحد مجموعة من الوحدات البروتينية لتكوين قرص ثم يتحد او يتفاعل هذا القرص مع قواعد النيوكليوتيدات في إحدى نهايتي الحمض النووي للفيروس وهذا الاتحاد يحول قرص الوحدات البروتينية الى دورتي حلزونيتين حول الحمض النووي وتستمر هذه العملية باندماج أو إضافة أقراص أخرى بصورة متتالية إلى القرص الأول، وهكذا حتى يتم تغليف الحامض النووي بأكمله وتنتج جسيمات فيروس متكاملة.

(الحمادي و اخرون،2018) (حامد،2011) (Agrios, 1978) (Agrios,2005)

2.2.تحرك الفيروس داخل النبات المصاب

هناك ارتباط بين تحرك الفيروس داخل النبات وبين إصابة هذا النبات. لكي تحدث الإصابة فانه يلزم أن يتحرك الفيروس وينتشر داخل النبات بين خلايا العائل لابد لها من الانتقال إلى مواقع تكاثرها داخل الخلية وبعد تكاثرها داخل الخلية تنتقل منها إلى مختلف أجزاء النبات مسببة الإصابة أو العدوى الجهازية وعليه فانه يتحرك قبل أو بعد التحرر من غطائه البروتيني في اتجاه أماكن تمثيل وتجميع الحامض النووي والبروتين الفيروسي، والمرجح أن هذه الحركة سلبية وتعتمد على الحركة الانسيابية لبروتوبلازم الخلايا، (البلازمودزماتا Plasmodesmata) الخيوط الموصلة بين برتوبلاست الخلايا المتجاورة و عليه فإن الفيروس لا يمكنه الانتقال من خلية لأخرى إلا إذا أصيبت الخلايا و حدث تناسخ بداخلها و يحدث التحرك عادة بمعدل 1 ملليتر / يوم (8-10خلية) . إلا أنه من المحتمل أيضا أن تشترك بعض

الأنظمة الميكانيكية الأخرى. بعد أن يتم تضاعف الفيروس داخل خلية العائل ، فانه عادة ما تتواجد الجزيئات الفيروسية متجمعة في أجسام أمورفيه أو بلورية أو تتواجد متفرقة في السيتوبلازم والنواة. الغالبيةالعظمى من الفيروسات تتواجد أساسا في السيتوبلازم أو في الشبكة الاندوبلازمية endoplasmic reticulum إلا أن هناك العديد من الفيروسات التي قد وجدت في النواة، النوية، البلاستيدات الخضراء سواء على صورة أجسام محتواة أو جزيئات متفرقة. معنى ذلك أن الفيروسات أو حامضها النووي تتحرك داخل الخلية من جزء إلى آخر. (قاسم ،2011).

وعليه يمكن تقسيم حركة الفيروسات داخل النبات المصاب إلى ثلاثة أنواع هي:

1.2.2. حركة الفيروسات داخل الخلية الواحدة

تتحرك الفيروسات الكاملة أو بعض مكوناتها المصنعة في الخلية مثل الحمض النووي أو الغلاف البروتيني داخل الخلية المصابة مع حركة السيتوبلازم وقد وجد بأن بعض الفيروسات الكروية تنقل من السيتوبلازم إلى النواة من خلال فتحات موجودة على الغشاء النووي تحت تأثير الضغط الانتشاري الذي يتكون في السايتوبلازم. (قاسم ،2011). .

2.2.2.حركة الفيروسات من خلية إلى أخرى .

إن الكيفية التي تنتقل بها العوامل المعدية من خلية إلى أخرى غير معروفة بصورة دقيقة إلا أنه بالنظر لعدم امتلاك الفيروسات القدرة على الحركة الذاتية فلابد أن يكون لحركة السيتوبلازم دوراً مهماً في هذه الحركة، كما قد يكون ذلك مدعوماً بفعل الانتشار. إن الشكل الذي تتحرك به الفيروسات أو العوامل المعدية غير معروف أيضاً غير أنه من المعروف بأن كلاً من الفيروسات المتكاملة أو الحمض النووي بمفرده لها القدرة على إحداث العدوى لذا قد يكون أيا من هذين العاملين هو الشكل الذي تتحرك به العوامل المعدية من خلية إلى أخرى وقد يضاف إلى ذلك عامل ثالث وهو الخيط السالب من الحمض النووي وعلى هذا يمكن القول بأن الفيروسات أو العوامل المعدية الأخرى تحمل بواسطة السيتوبلازم من خلية إلى أخرى من خلال القنوات السيتوبلازمية Plasmodesmata التي تربط الخلايا المجاورة مع بعضها البعض.

3.2.2.حركة الفيروسات في الأوعية الناقلة .

إن حركة الفيروسات داخل أوعية اللحاء لا تعتمد على تركيز الفيروس في هذه الأوعية بل تعتمد بالدرجة الأولى على حركة المواد الكربوهيدراتية في تلك الأوعية يمكن توجيه حركة الفيروسات في النبات من جزء إلى آخر ببعض العمليات، فمثلاً بإزالة الأوراق من جزء من النبات يوجه حركة الفيروسات إلى ذلك الجزء، رغم أن غالبية الفيروسات تتحرك داخل أوعية اللحاء إلا أن هنالك بعض الفيروسات التي تتحرك داخل أوعية الخشب. إن شكل وطبيعة العوامل المعدية التي تتحرك في أوعية

اللحاء أو الخشب غير معروفة إلا أن مشاهدة جسيمات بعض الفيروسات داخل الاوعية تشير إلى احتمال حركتها بشكل جسيمات متكاملة. (الحمادي و اخرون،2018) (حامد،2011) (Agrios, 1978) (Agrios,2005).

3.2.الانتشار والتوزيع النهائي للفيروس داخل النبات Final distribution in the plant

يتوقف التوزيع النهائي للفيروس على كل من العائل والفيروس وهناك عديد من العوامل التي تؤدي إلى توزيع الفيروس داخل النبات توزيعا غير منتظما، ومن تلك العوامل ما يلي:-

1) **هروب بعض الأجزاء النباتية من الإصابة**

في عديد من الحالات فان الفيروس يتحرك ويتضاعف داخل مجموعة صغيرة من الخلايا حول نقطة العدوى. إذا نتج عن العدوى موت الخلايا فان انتشار الفيروس أكثر من ذلك يتوقف، إذ أنه من المعروف أن الفيروس لا يتحرك من الخلايا الميتة. هناك عديد من الأمثلة التي يحدث فيها إصابة محلية محدودة limited local infection بدون موت للخلايا وفي مثل هذه الحالات فانه لا يحدث مثل هذا التحديد لانتشار الفيروس. إن تحديد انتشار وتوزيع الفيروس داخل النبات ظاهرة معقدة مرتبطة بتطور المقاومة في الأنسجة المحيطة ضد غزو الفيروس لها.

إذا أعديت أوراق نبات بأكثر من فيروس فان الوقت الذي تتحرك فيه الفيروسات المختلفة من الأوراق المعداة قد يختلف ما ينتج عنه توزيعا غير منتظم للفيروسات، فمثلا إذا ما أعدي نبات الدخان بخليط من فيروسي X ، Y البطاطس فان فيروس Y يتحرك متقدما على فيروس X ويمكن فصله من قمة النبات بدون وجود فيروس X.

بعض الفيروسات التي تصيب النبات قد ينشأ عنها إصابة غير متماثلة للنبات وينتج عن ذلك اختلاف واضح في توزيع الفيروس في أنسجة النبات. بالنسبة للفيروسات التي تصيب النباتات الخشبية المعمرة فان توزيعها داخل النباتات قد يكون غير متساوي بشكل واضح. بعض الفيروسات تهاجم الأنسجة الميريستيمية الطرفية للنباتات المصابة فور تكونها عادة ما تتواجد منطقة تختلف في الطول قريبة من قمة المجموع الخضري أو الجذري تكون خالية من الفيروس أو بها كمية قليلة جدا. (قاسم ،2011).

ليس من المعروف تماما أسباب عدم إصابة القمم النامية، إلا أن هناك بعض التعليلات التي تفسر ذلك منها ما يلي:

- تنمو القمة النامية بمعدل أسرع من انتقال الفيروس إليها مع ملاحظة أن القمة النامية تخلو من الحزم الوعائية فإذا فرض وجود فيروس ما بها فان حركته ستكون بطيئة ومحدودة بالانتقال من خلية إلى أخرى.

- قد يوجد عائق ميكانيكي يمنع هجوم الفيروس كأن تكون الخيوط البروتوبلازمية صغيرة جدا. والواقع أنه لا يوجد دليل يؤكد ذلك.
- قد تكون حالة الخلية من الناحية الحيوية والكيماوية عند الانقسام غير ملائمة لتضاعف الفيروس.

2) **تأثير العمر**

تزداد كمية بعض الفيروسات بسرعة في الأوراق المصابة إلى أن تصل إلى حد معين ثم تضاءل بعد ذلك. عند عدوى الأوراق القاعدية لنبات بواسطة فيروس موزايك الدخان فان الأعراض تظهر بعد فترة من الزمن بشكل واضح على الأوراق الحديثة ويكون تركيز الفيروس في هذه الأوراق أكبر منه في باقي الأوراق الكبيرة في العمر. نتيجة لهذه الظاهرة فان توزيع الفيروس يكون غير متساوي في الأوراق المختلفة العمر الموجودة على نفس النبات. (قاسم ،2011).

3) **اختلاف الأعضاء والأنسجة المصابة وارتباط الفيروس بأنسجة معينة**

عند إصابة النبات بفيروس ما، فان تركيز الفيروس قد يختلف باختلاف الأجزاء النباتية وذلك بعد مرور فترة من الزمن. في العديد من الفيروسات التي تسبب أعراض الموزايك فان الفيروس يصل إلى تركيز أعلى بكثير في الورقة عن باقي أجزاء النبات. على سبيل المثال فان تركيز فيروس الموزايك الأصفر في اللفت turnip yellow mosaic virus تختلف من عضو نباتي إلى آخر على نفس النبات، وقد وجد أن تركيزه في الساق وفي المجموع الجذري وفي العرق الوسطى وعنق الأوراق الناضجة يصل إلى حوالي 110 - 120 فقط من التركيز الذي وجد في نصل الورقة.ارتباط الفيروس بنسيج معين يؤدي إلى اختلاف توزيع الفيروس في النبات المصاب. (الحمادي و اخرون،2018) (Agrios, 1978)

4) **اختلاف التوزيع داخل أوراق النباتات المصابة بالموزايك**

يختلف توزيع الفيروس في داخل نفس الورقة التي تظهر عليها أعراض الموزايك، فالأجزاء الخضراء دائما ما تحتوي على كمية قليلة من الفيروس إذا ما قورنت بتلك الأجزاء الصفراء أو الخضراء المصفرة. هذه الظاهرة وجدت بشكل قاطع مع العديد من الفيروسات التي درست مثل فيروس موزايك الدخان وفيروس موزايك الخيار عند إصابتها لنباتات الدخان، وفيروس تقزم الأرز عند إصابته لنباتات الأرز، وعديد من الفيروسات الأخرى، وذلك بصرف النظر عن الاختلافات في تركيب الفيروسات أو أن العائل من ذوات الفلقة أو الفلقتين.

هذا النوع من التوزيع الغير منتظم للفيروس في حالة الأمراض الموزائيكية قد يتواجد أيضا في بتلات الأزهار التي يظهر عليها تقطع في اللون. على سبيل المثال فان فيروس موزايك الدخان يسبب تكون مناطق بيضاء في بتلات أزهار الدخان القرمزية اللون ويكون الفيروس مرتبط أساسا بتلك الأجزاء

البيضاء. هناك بعض الأدلة على أن الفيروسات قد تتحرك خلال الساق والجذور في عكس الاتجاه الذي تسير فيه المواد الغذائية. عموما فبمجرد أن يتواجد الفيروس في اللحاء فإنه ينتشر خلال النبات ويدخل ثانيا إلى الخلايا البرانشيمية الملاصقة لخلايا اللحاء خلال الخيوط البروتوبلازمية.

(الحمادي و اخرون،2018) (Agrios, 1978) (Agrios,2005) .

4.2.أعراض الإصابة بالأمراض الفيروسية Symptoms of virus Diseases

تلعب الأعراض دورا هاما في دراسة الأمراض النباتية الناشئة عن الفيروسات، إذ أنها تساعد في تعريف الفيروسات والتفرقة بينها، كما أنها مازالت تلعب دورا أساسيا في تنمية الفيروسات. إذا أصيب نبات قابل للعدوى بفيروس ما فانه يحدث بعض التغيرات لهذا النبات، ويكون بعضها خارجيا ويمكن ملاحظتها بالعين المجردة، وبعضها يكون داخليا ولا تشاهد إلا ميكروسكوبيا، والبعض الأخير يكون فسيولوجيا ويتم التعرف عليه بواسطة الاختبارات الفسيولوجية والكيماوية.

1.4.2.الأعراض الظاهرية External symptoms

نتيجة لإصابة النباتات بالفيروسات فانه قد تظهر أعراض مرضية على النبات كله أو بعض أجزائه، وقد تكون هذه الأعراض مميزة للفيروس المسبب أو لمجموعة الفيروسات التي تسبب مثل تلك الأعراض، كما قد تكون الأعراض عامة وغير مميزة للفيروس المسبب. تختلف الأعراض الظاهرية الناشئة عن فيروس معين تبعا لعديد من العوامل المختلفة مثل السلالة الفيروسية المحدثة للمرض ; نوع النبات المصاب ; العوامل البيئية السائدة (وخاصة درجة الحرارة وشدة الإضاءة) والإصابة بمرض آخر ;هناك العديد من العوامل التي قد تسبب ظهور أعراض على النباتات تشبه إلى حد كبير تلك الناشئة عن الإصابة الفيروسية، ويجب وضع مثل هذه العوامل في الاعتبار عند دراسة الأعراض.

أكثر الأعراض شيوعا هي تقليل معدل النمو، وفي بعض الأحيان يكون هذا النوع من الأعراض هو الوحيد المتكون، تقليل النمو يظهر في درجات مختلفة من تقزم النبات،وغالبا فان جميع الأمراض الفيروسية تقلل من كمية المحصول الكلي، كما أنها تقلل عادة من عمر النبات المصاب، وقد تكون التأثيرات الناجمة عن الإصابة شديدة ويسهل ملاحظتها أو قد تكون خفيفة ويسهل إغفالها. معظم الأعراض الفيروسية التي يسهل ملاحظتها و هي عادة تلك المتكونة على الأوراق، ولكن بعض الفيروسات قد تسبب أعراضا واضحة على الساق أو الثمار أو الجذور وقد تكون هذه الأعراض مصحوبة بأعراض متكونة على الأوراق وقد لا تكون على الأوراق أي أعراض، الأعراض الظاهرية التي تحدث في الغالبية العظمى للأمراض الفيروسية في الحقل تكون أعراض جهازية systemic symptoms وينتشر الفيروس خلال النبات. في حالة إجراء العدوى صناعيا على العديد من النباتات ومع

العديد من الفيروسات فانه يتكون من بقع صغيرة ميتة على الأجزاء المعداة وفي هذه الحالة تكون الأعراض محلية local symptoms.

هناك حالات عديدة تصيب فيها بعض الفيروسات بعض العوائل القابلة للإصابة بدون أن تظهر أعراضا يمكن رؤيتها، ويطلق على مثل هذه الفيروسات أنها كامنة latent viruses، ويطلق على العوائل أنها حاملات بدون أعراض symptomless carriers ولا تظهر أية أعراض مرضية في مثل هذه الحالات مهما تغيرت الظروف البيئية. هناك حالات أخرى حيث تظهر على النباتات أعراض مرضية مع بعض الفيروسات ولكنها قد تختفي في وجود ظروف بيئية معينة كالحرارة مثلا ويطلق على هذه الأعراض في هذه الحالة أنها متخفية masked symptoms.

الفترة الزمنية التي تمر بين دخول الفيروس إلى العائل القابل للإصابة وبين ظهور أول أعراض الإصابة على العائل يطلق عليها فترة الحضانة incubation period ويتأثر طول فترة الحضانة بعديد من العوامل المختلفة. يستخدم اصطلاح hypertrophy للدلالة عن الزيادة في حجم العضو أو النسيج نتيجة للزيادة الغير طبيعية في استطالة الخلايا بدون الزيادة في عددها، أما اصطلاح hypotrophy فيطلق على الحالة العكسية أي قلة نمو النسيج أو النبات بسبب قلة استطالة الخلايا. يستخدم.

اصطلاح hyperplasia للتعبير عن الزيادة في نمو النبات نتيجة لزيادة انقسام الخلايا. .

اصطلاح hypoplasia يعني قلة نمو العضو أو النبات نتيجة لقلة انقسام الخلايا. .

اصطلاح atrophy يعني التوقف في نمو الخلايا أو الأعضاء. النبات الذي يتفاعل مع فيروسات معينة معطيا أعراضا خاصة مميزة ويستخدم في الكشف والتعرف على الفيروسات يطلق عليه العائل الدال indicator host ، أما الأنواع المختلفة للنباتات التي يمكن إصابتها بالفيروس فيطلق عليها المدى العوائلي host range. (قاسم ،2011).

2.4.2.الأعراض الداخلية Internal symptoms

التغيرات الداخلية التي تحدث في النبات نتيجة للإصابة الفيروسية يمكن أن تقسم إلى تغيرات هستولوجية وتغيرات سيتولوجية.هناك بعض الفيروسات تحدث تغيرات داخلية وتسمى بالأعراض الداخليـة Internal Infection Symptoms نتيجة للإصابة الفيروسية يمكن أن تقسم إلى تغيرات هستولوجية Histological change وتغيرات سيتولوجية Cytological change .

1.2.4.2.التغيرات الهستولوجية او النسيجية Histological change

تسبب الإصابة ببعض الفيروسات النباتية تغيراً في التركيب التشريحي لأجزاء مختلفة من النباتات المصابة وهذه الأعراض غالباً متكون متوافقة مع الأعراض الخارجية ومن أمثلة هذه التغيرات:

- قلة واختزال النمو
- يقل انقسام الخلايا في المناطق المصابة كما تنعدم أو تقل المسافات البينية بين الخلايا فمثلا عند إصابة البصل بفيروس التقزم والاصفرار تنعدم أو تقل المسافات البينية في بعض المناطق مما يظهر على الأوراق تجاعيد تشبه الزجزاج وبالتالي يكون النبات المصاب اقل في النمو من النبات السليم.
- تغير في البلاستيـدات
- تسبب الإصابة ببعض الفيروسات قلة عدد البلاستيدات أو عدم اكتمال تكوين البلاستيدات أو صغر حجمها كما يحدث في أمراض التبرقش والإصفرار وتكون البلاستيدات المصابة أصغر حجماً وأفتح لوناً كما يكون شكلها غير منتظم.
- تغير في حجم وشكل نمو الخـلايا
- تتغير أشكال الخلايا المصابة ببعض الفيروسات النباتية وخاصة تلك الخلايا الصفراء المصابة بمرض التبرقش وتكون الخلايا في هذه المناطق أقل سمكاً من مناطق الورقة الأخرى وذلك نتيجة للاختزال في طول خلايا النسيج العماديPalisade cells ، كما تصغر المسافات في النسيج الإسفنجي .Spongy layer
- نمو أنسجـة غير طبيعية تسبب بعض الفيروسات النباتية نمو الأنسجة بطريقة غير طبيعية فمثلاً ينتج عن إصابة أشجار الليمون بفيروس التدهور السريع Quick decline تكون بروزات Pegsعلى الوجه الكمبيومي لنسيج اللحاء يقابلها تنقرات Pits في الخشب وتنشأ هذه البروزات نتيجة لزيادة نشاط الكمبيوم في تكوين خلايا اللحاء بالنسبة لتكوين خلايا الخشب.
- تكوين أورام داخليةGalls تظهر أورام داخلية في بعض النباتات المصابة ببعض الفيروسات النباتية وذلك نتيجة لتكاثر ونمو سريع غير طبيعي لبعض الخلايا.
- مـوت الخـلاياNecrosis تنتشر هذه الظاهرة كثيراً في معظم الأمراض الفيروسية النباتية مثل إلتفاف الأوراق لنبات البطاطس Potato leaf roll virus وكذلك مرض إنحناء قمة بنجر السكر Sugar Beet Curly Top virus بالإضافة لمرض التدهور السريع في الموالح ويصاحب هذه الأمراض تجمـع زائد للمواد الكربوهيدراتية في أنسجة اللحاء مما يؤدي إلى تأثرها.
- تكوين إفرازات صمغيــة في أنسجة العائلتسبب بعض الفيروسات تكوين مواد صمغية في الأوعية الخشبية لبعض العوائل النباتية كما يحدث في نباتات قصب السكر المصابة بفيروس تقزم الخلفة Ratoon stunting virus.

2.2.4.2.التغيرات السيتولوجية:Cytological change

1) يتسبب عن الإصابة بالأمراض الفيروسية تغيرات واضحة في الخلايا المصابة ففي حالة النباتات المصابة بفيروسات التبرقش يصغر حجم النواة و تنقص كمية الأحماض النووية بها في بداية الإصابة وقد يحدث زيادة في حجم النواة حيث تزداد نويات الخلايا المصابة في الحجم ويصبح شكلها غير منتظم. .

وفي حالة الإصابة بفيروسات الإصفرار Yellows يحدث تجمع ملحوظ للمركبات النشوية في خلايا المناطق الصفراء كما قد يحدث في كثير من الأمراض الفيروسية تجمع لبعض الصبغات Pigmentsالذي يؤدي إلى تغيير لون الأوراق والساق مثل صبغة الأنثوسيانين Anthocyani .

2) **إنتاج الأجسام و المحتويات داخل الخلايا المصابةIntracellular Inclusion**

توجد هذه الأجسام في خلايا الأنسجة التي تظهر عليها الأعراض الخارجية وتوجد ثلاثة أنواع من هذه الأجسام. وتعتبر وجود هذه الأجسام داخل الخلايا للنبات العائل مميزاً للإصابة بالفيروسات النباتية إذ أن هذه الأجسام أو المحتويات لا توجد مصاحبة لأي مرض معدي سوى الأمراض الفيروسية، وقد تظهر هذه الأجسام في خلايا الحيوانات والنباتات المصابة ببعض الفيروسات وهي نتيجة مباشرة للإصابة الفيروسية وينظر إليها بعض الباحثين على أنها طور من أطوار حياة المسبب والبعض الآخر يعتبرها كتل تجمع بروتين النبات. ويرجع الفضل في اكتشاف هذه الظاهرة وهي ظهور هذه المحتويات أو الأجسام الغريبة في خلايا النبات المصاب بالفيروس إلى العالم إيفانويسكي Ivanowski الذي أعتبر أول من وصف وقدم رسومات لهذه المحتويات في خلايا نباتات الدخان المصابة بفيروس TMV ورغم أن وجود هذه المحتويات يعتبر دليلاً على الإصابة الفيروسية إلا أنها لا توجد مصاحبة لكل الأمراض الفيروسية فمثلاً لم تلاحظ في حالة إصابة البطاطس بفيروس التفاف الأوراق . ويعتمد إنتاج المحتويات على الفيروس المسبب أكثر من الاعتماد على العائل ، فمثلاً لوحظت في عدد كبير من النباتات المصابة بفيروس تبرقش الدخان وتعذر رؤيتها في نفس النباتات المصابة بفيروس تبرقش الخيار رغم أن مظاهر الإصابة بهذين الفيروسين تكاد تكون متشابهة. ويمكن رؤية هذه الأجسام بالمجهر الضوئي العادي وتتراوح أقطارها من 5–30 ميكرون

- **أجسام أميبية (أمورفيةAmebois – Amorphous – X bodies)**

تختلف هذه المحتويات بوضوح عن باقي محتويات الخلية كما قد يختلف شكل هذه الأجسام أيضاً نتيجة للإصابة بفيروسات مختلفة ، وتتواجد هذه الأجسام غالباً بالقرب من النواة ويمكن استخراجها من الخلية بهز نباتات الدخان المصابة بفيروس TMV وبعد

غسلها وتكسيرها أنتجت فيروسات تبرقش أوراق الدخان ووجد أن تركيز الفيروس في هذه الأجسام أعلى من تركيزه في سيتوبلازم الخلية وتتحلل هذه الأجسام عند حدوث جروح للخلية.

- **أجسام أو محتويات بللورية (Crystalline Inclusions) .**

لوحظت هذه الأجسام أيضاً في خلايا نباتات الدخان المصابة بفيروس تبرقش الدخان TMV وقد لوحظ أن تلك الأجسام تتكون غالباً في الخلايا المتقدمة في العمر حيث نجد أن هذه الأجسام الأميبية تبدأ في الاختفاء من تلك الخلايا وتظهر هذه المحتويات البللورية وقد ثبت أن هذه المحتويات البللورية تحتوي على نسبة عالية جداً من الحبيبات الفيروسية وتختلف أشكال هذه المحتويات البللورية المميزة للفيروسات المختلفة فقد تكون في شكل صفائح سداسية أو إبرية كما في فيروس تبرقش أوراق الدخان TMV أو بللورات أيزوميترية كما في فيروس تبرقش البصلة أو بللورات مغزلية كما في فيروس تبرقش أوراق الخيار.

- **أجسام داخل النواةIntranuclear Inclusions**

نادراً ما يحدث أن تتواجد المحتويات البللورية داخل النواة في فيروسات النبات ، وقد تظهر بعض البللورات في أنوية الخلايا المصابة مثل البقوليات المصابة بفيروس موزيك البسلة. والمحتويات الداخلية بصفة عامة توجد داخل الخلايا المصابة في الجذر والساق والأوراق ويكثر وجودها في الأوراق وخاصة خلايا البشرة ولا توجد هذه المحتويات طوال فترة الإصابة وغالباً ما تظهر هذه المحتويات في وقت ظهور الأعراض الخارجية على الأوراق الصغيرة. ثم تبدأ في التلاشي وعادة ما تبقى الأجسام البللورية فترة أطول من الأجسام الأمورفية ولكن بعد مضي عدة شهور من الإصابة يختفي كلا النوعين.

3.2.4.2.التغيرات الفسيولوجية (فسيولوجيا النباتات المصابة)

لخص Diener عام 1963 التغيرات والأضرار الفسيولوجية التي عادة ما تصاحب الأمراض الفيروسية في النقاط التالية:-

1- تقليل نشاط التمثيل الضوئي.

2- زيادة معدل التنفس.

3- تجمع المركبات النتروجينية الذائبة وخاصة الأميداتamides

4- زيادة نشاط إنزيم البولي فينول اكسيديز polyphenol oxidase

وتجمع المشتقات البولي فينوليه polyphinol drivatives .

5- تقليل نشاط المواد المنظمة للنمو.

5.2.انتقال الفيروسات النباتية Transmission of plant viruses

إن الفيروس كمتطفل إجباري لابد وأن تكون له القدرة على الانتقال والانتشار من نبات مصاب إلى نبات سليم. حيث أن الفيروسات ليس لها القدرة على اختراق طبقة الكيوتيكل فإنه لابد من وجود وسيلة لإدخالها الخلية الحية. معرفة طرق الانتقال لها أهمية كبيرة فعند دراسة مرض ما فانه لا يمكن التعرف على أن المسبب فيروسي مالم يتم نقله بإحدى وسائل الانتقال من نبات مصاب إلى آخر سليم من نفس الصنف محدثا نفس المرض. كذلك فإن معرفة الطرق التي ينتقل وينتشر بها الفيروس في الحقل ضرورية للتوصل للطرق المناسبة للمقاومة. علاوة على ذلك فان للعديد من طرق الانتقال وخاصة الميكانيكية منها أهمية كبيرة في الدراسات المعملية المختلفة التي تجري على الفيروسات. لهذه الأسباب وغيرها نجد أنهلابد من التعرف على الوسائل التي تنتقل بها الفيروسات المسببة للأمراض النباتية.(حلمي و اخرون ،1978) (قاسم ،2011) (عمار و شتا، 2008).

ومن الطرق المعروفة حاليا لانتقال الفيروسات هي:

1- الانتقال الميكانيكي.

2- التطعيم

3- - التكاثر الخضري للنباتات

4- التربة

5- الحشرات

6- البذور

1.5.2.الانتقال الميكانيكي Mechanical transmission

تنتقل بعض الفيروسات من نبات مصاب إلى آخر سليم بالطرق الميكانيكية وقد يحدث هذا الانتقال طبيعيا في الحقل أو يجري بالطرق الصناعية في التجارب الحقلية والمعملية. الانتقال الميكانيكي في الحقل قليلا ما يحدث نتيجة ملامسة نبات مصاب لآخر سليم، وقد يحدث مثل هذا الانتقال في حالة الزراعات الكثيفة، ونتيجة لهبوب الرياح الشديدة فإن أوراق النبتات المتجاورة تحتك مع بعضها وقد تحدث بها بعض

الجروح ينتقل خلالها الفيروس من النبات المصاب إلى السليم. ومن أكثر الفيروسات التي تنتقل بهذه الطريقة فيروس موزاييك الدخان وفيروس × البطاطس.

يقوم الانسان والحيوان بدور في نقل بعض الفيروسات في الحقل أثناء العمليات الزراعية المختلفة وذلك بإحداث جروح في بعض النباتات وتعلق بعض العصارة المعدية بأيدي وملابس العمال وبالأدوات الزراعية المختلفة وعن طريقها تنتقل الفيروسات إلى النباتات السليمة. نقل العدوى ميكانيكيا بالطرق الصناعية له أهمية كبرى في الدراسات المختلفة، ويتم ذلك عن طريق أنسجة النبات المصاب.(hull ,2002) (قاسم ،2011) .

2.5.2.الانتقال بالتطعيم Transmission by grafting

يعتبر التطعيم طريقة من طرق التكاثر الخضري وفيها ينمو جزء من نبات معين على جزء من نبات آخر. عندما يحدث الالتحام فان الأصل والطعم يصبحان نباتا واحدا، فاذا كان الأصل أو الطعم مصابة بالفيروس فان النبات كله سوف يصاب وهذا في حالة إذا ما كان الجزء الآخر غير المصاب قابلا للإصابة. هناك نوع من التطعيم قد يحدث طبيعيا بين جذور الأشجار إذ تتلامس الجذور وتتداخل مع بعضها وبالتالي قد يحدث انتقال للفيروس من الأشجار المصابة إلى السليمة بهذه الطريقة. (عمار و شتا، 2008).

3.5.2.الانتقال اثناء التكاثر الخضري Transmission by vegetative propagation

كثيرا من الفيروسات ذات الأهمية الاقتصادية تنتشر جهازيا خلال النبات، فاذا ما أصيب النبات بالفيروس فانه يظل مصابا طول حياته. وعلى هذا ففي حالة النباتات التي تتكاثر خضريا سواء عن طريق العقل أو الدرنات أو الكورمات أو الأبصال أو الريزومات فان الفيروس ينتقل غالبا من النبات الأم المصاب إلى النباتات الجديدة. (عمار و شتا، 2008). (قاسم ،2011).

4.5.2. الانتقال عن طريق البذور Seed transmission

ان ما يقرب من 110 الفيروسات المعروفة تنتقل خلال بذور النباتات المصابة أو أثناء عملية تلقيح أزهار النباتات السليمة بحبوب لقاح من نباتات مصابة. ولقد عرف مؤخرا أن تأثير الفيروس المنقول بواسطة حبوب اللقاح لا يقتصر على إصابة البذور المتكونة والبادرات الناتجة عن هذه البذور ولكن تأثيره قد يتعدى أيضا إلى النبات الأم إذ انه ينتشر خلال الزهرة المخصبة ومنها إلى النبات فيصيبه. النقل عن طريق البذور يؤدي إلى إصابة النباتات في أطوار نموها الأولى مما يجعلها كمصادر عدوى مبكرة متفرقة في الحقل، ولو وجد لتلك الفيروسات مصادر أخرى للنقل كالحشرات مثلا لأدى ذلك إلى انتشارها انتشارا سريعا على النباتات. كما أن تلك الفيروسات قد تظل محتفظة بحيويتها مدة طويلة في البذور وعلى

هذا فأنها قد تنتقل مع البذور إلى مسافات بعيدة. وحيث أن التعرف على الفيروسات في البذور لم يصل بعد إلى مرحلة متقدمة فان القائمون بالحجر الزراعي في أغلب الأحوال لا يستطيعون بسهولة تحديد هذه الفيروسات في البذور الأمر الذي يساعد على دخول هذه الفيروسات إلى بلاد خالية منها.

انتقال الفيروسات عن طريق البذور قد يتم داخليا ،فيروس التبقع الحلقي في الدخان، فيروس موازيك الخس، فيروس الموازيكالتخططي في الشعير، فيروس موزايك الفاصوليا وفيروس موزايك الفاصوليا الجنوبي وغيرها.قد يحدث النقل خارجيا كما في حالة فيروس موزايك الدخان الذي يحمل خارجيا على بذور الطماطم المصابة، وقد وجد أن هناك نسبة بسيطة من البذور قد تحمل الفيروس في الاندوسيرم. هذا ولم يشاهد فيروس موزاييك الدخان في جنين بذور نباتات الطماطم المصابة. (johanson et al maule et wang.1996; 1994. (قاسم ،2011).

هناك العديد من العوامل التي تؤثر على نسبة البذور المصابة نذكر منها التالي:

1) الفيروس والسلالة الفيروسية.
2) النبات العائل .
3) وقت اصابة النباتات
4) هناك بعض العوامل الأخرى التي تؤثر على نسبة البذور المصابة المتكونة على النبات المصاب

5.5.2. الانتقال عن طريق التربة Soil transmission

انتقال الفيروسات عن طريق التربة يمثل أحد الوسائل الهامة في نقل وانتشار الأمراض الفيروسية. ومازال هناك الكثير والغير معروف عن ميكانيكية الانتقال هذه.

وعموما فهناك ثلاثة أنواع من طرق انتقال الفيروسات عن طريق التربة:

1) الانتقال بدون ناقلات أرضية معروفة.
2) الانتقال بواسطة الفطريات.
3) الانتقال بواسطة النيماتودا.
4) الانتقال بدون ناقلات أرضية معروفة:

قد تكون الجزيئات الفيروسية ثابتة stable بدرجة تمكنها من الاحتفاظ بنشاطها الحيوي في التربة بدون مساعدة أي عوامل أخرى. وينطبق ذلك على فيروس موزاييك الدخان إذ عند زراعة عائل قابل للإصابة في أرض ملوثة بهذا الفيروس فان العائل سوف يصاب وتحدث الإصابة غالبا خلال الجروح الدقيقة التي تحدث في الجذور او عن طريق الجروح التي تتواجد على الأوراق السفلى الملاصقة لسطح التربة.

1.5.5.2.الانتقال عن طريق الفطريات Transmission by fungi

يعرف حتى الآن حوالى 7 فيروسات تنتقل بواسطة فطريات التربة - soilinhabitingfungi . من اكثر فطريات التربة الناقلة للفيروس دراسة هو *brassicaeolpidium* وهو فطر يتطفل اجباريا على جذور الكثير من النباتات. يكون هذا الفطر في خلايا الجذر جراثيم ساكنه resting spores قد تنتقل إلى التربة عندما تتحلل الجذور. تحت الظروف المناسبة فان الجراثيم الساكنة تعطى العديد من الجراثيم الهدبية التي تتحرك في ماء التربية لتصيب جذور نباتات أخرى، العلاقة بين هذا الفطر والفيروسات التي يقوم بنقلها غير مفهومة على وجه الدقة إلا أن نتائج الأبحاث الحديثة توحي بان هذا الفطر قد ينقل فيروسا بطريقة وينقل فيروسا آخر بطريقة أخرى. (compbell.1996) (rochen et al.2004)

2.5.5.2.الانتقال عن طريق النيماتودا Transmission by nematodes

كثير من الأمراض الفيروسية الهامة وواسعة الانتشار تنتقل خلال التربية عن طريق النيماتودا.ولقد وجد أن الأجناس الثلاثة التي تنقل الفيروسات تنتمي إلى رتبة Dorylaimida وهناك جنسين من هذه الأجناس الثلاثة هما *Longidorus*، *Xiphinema* متقاربان تماما وينتميان إلى تحت عائلة واحدة وهي نيماتودا كبيرة يصل طول البالغة منها 3 مم أو أكثر. أما الجنس الثالث فهو *Trichodoras* وينتمي إلى عائلة أخرى. أفراد هذا الجنس أصغر من أفراد الجنسين السابقين ويصل طول الأفراد البالغة 1مم.

الأجناس الثلاثة خارجية التطفل ذات رمح طويل وتتغذى على خلايا بشرة العائل وتحدث التغذية عادة قريبا من قمة الجذر. ويتبين من بعض الفيروسات وأنواع النيماتودا التي تقوم بنقلها.ويلاحظ أن الفيروسات الكروية تنتقل عن طريق *Longidoras*، *Xiphinama* أما الفيروسات العصرية فتنتقل بواسطة *Trichodorus*. (brown et al.1996) .

6.5.2.الانتقال بواسطة الحشرات Insect transmission

تعتبر الحشرات أهم وسائل انتقال الفيروسات في الطبيعة. معظم الحشرات الناقلة للفيروسات حشرات ماصة. هناك قليل من الفيروسات التي تنتقل بواسطة الحشرات ذات الفم القارض.

1.6.5.2.الحشرات الماصة

1) **المن aphids:** أكبر مجموعة من الحشرات تقوم بنقل الفيروسات سواء من ناحية عدد الفيروسات التي تنقلها أو عدد أنواع المن الناقلة. المن ينقل ما يزيد عن ١٠٠ فيروس وحشرة من الخوخ *Myzuspersicae* تنقل بمفردها أكثر من 50 فيروسا.

2) **نطاطات الأوراق Leafhoppers**: تنقل عددا من الفيروسات منها فيروس تجعد قمة بنجر السكر، وفيروس التورم الجرحى في البرسيم وفيروس تقوم الأرز.

3) **الذباب الأبيض White flies**: ينقل أكثر من 8 فيروسات منها فيروس موزايك أبو تيلون، وفيروس تجعد الورقة الصفراء في الطماطم، وفيروس تجعد أوراق الدخان وفيروس تجعد أوراق القطن.

4) **البق الدقيقي mealy bugs:** ينقل فيروس تضخم أفرع الكاكاو وفيروس ذبول الاناناس.

5) **التربس Thrips** ينقل فيروس الذبول التبقع في الطماطم.

2.6.5.2.**الحشرات القارضة**

تلعب بعض حشرات هذه المجموعة دورا هاما في انتشار بعض الفيروسات مثل فيروس موزايكالكوسة الذي ينتقل بخنافس الخيار cucumberbeetles وفيروس الموزايك الأصفر في اللفت الذي ينتقل بالخنفساء البرغوثية.sp *Phyllotreta* .

6.2.نوع العلاقات الموجودة بين الفيروس والحشرة

يوجد نوعين من العلاقات بين الفيروسات والحشرات الناقلة. حشرات النوع الأول تكتسب الفيروس بعد أن تتغذى على النبات المصاب ولكنها لا تنقله مباشرة إلى النبات السليم. وإذا ما اكتسبت الحشرة القدرة على النقل فأنها تظل محتفظة بها مدة طويلة قد تصل إلى طول حياتهاpersistent viruses . أما حشرات النوع الثاني فلها القدرة على عدوى النباتات السليمة مباشرة بعد تغذيتها على النبات المصاب إلا انه غالبا ما تفقد الحشرة القدرة على نقل الفيروس خلال ساعات من تركها النبات المصاب وأحيانا خلال دقائقnonpersistentviruses. ان نظرة بسيطة على فيروسات النوع الأول تجعلنا نقبل الاقتراح بان هناك علاقة بيولوجية اجبارية بينها وبين الحشرات الناقلة أما فيروسات النوع الثاني تنتقل بطريقة ميكانيكية بحته كتلوث على الأجزاء الخارجية من فم الحشرة.

استخدم واتسون وروبرتس عام 1939، watson and Roberts 1940 طول المدة التي تظل خلالها الحشرة محتفظة بقدرتها على العدوي لتمييز الفيروسات التي تنتقل بالحشرات فأطلق على

الفيروسات التي تظل الحشرة قادرة على نقلها مدة طويلة بالفيروسات الباقية persistent viruses والفيروسات التي تفقد الحشرة القدرة على نقلها بسرعة بعد تركها العائل المصاب بالفيروسات غير الباقية nonpersistentviruses. وقد استمر هذا التقسيم فترة من الزمن إلا أنه اكتشف بعد ذلك أن هناك مجموعة أخرى من الفيروسات ذات خواص وسطية بين الفيروسات الباقية والفيروسات غير الباقية أطلق عليها الفيروسات شبه الباقية semipersistentviruses. و هي الفيروسات التي تظل الحشرة محتفظة بقدرتها على نقلها عدة ساعات أما الفيروسات الباقية فهي تلك الفيروسات التي تظل الحشرة محتفظة بقدرتها على نقلها على الأقل عدة أيام. احيانا يعتمد بعض العلماء على التقسيمات التالية:

1.6.2.الفيروسات المحمولة بأجزاء الفم Stylet - borne viruses

يطلق عليها ايضا الفيروسات غير الباقية أو الفيروسات الخارجية، وهي تلك الفيروسات التي تكتسب الحشرة القدرة على نقلها مباشرة بعد فترة تغذية قصيرة على النبات المصاب إلى نبات واحد أو عدد من النباتات السليمة. قدرة الحشرة على النقل تفقد سريعا. تنتقل معظم هذه الفيروسات بالمن. ويتميز هذا النوع من الفيروسات بالصفات الآتية:

- كفاءة النقل تزداد غالبا إذا تم تجويع الحشرات قبل تغذيتها على النبات المصاب.
- كلما قلت في تغذية الحشرة على النبات المصاب كما زادت قدرتها على اكتساب الفيروس وبالتالي احداث العدوى.

2.6.2.الفيروسات العابرة Circulativeviruses

الحشرة الناقلة لا تكتسب القدرة على نقل تلك الفيروسات إلا بعد مرور فترة من الزمن بعد تغذيتها على النبات المصاب تختلف من عدة ساعات إلى عدة أيام يطلق عليها فترة الحضانة. ومتى اصبحت الحشرة قادرة على النقل فأنها تحتفظ بقدرتها على نقل الفيروس إلى النباتات السليمة مدة طويلة.

من الأمثلة الواضحة للفيروسات العابرة هو فيروس تجمد قمة بنجر السكر sugarbeetcurly top virus الذي ينتقل بنطاطات الأوراق. وهناك من الأدلة ما يدل على أن هذا الفيروس لا يتكاثر في جسم الحشرة الناقلة له إذ وجد بالتقديرات الكمية أن محتوى الفيروس في نطاطات الأوراق الحاملة له يقل بمرور الوقت من بعد تغذيتها على نباتات البنجر المصابة، ثم تفقد الحشرة قدرتها على النقل بعد فترة من الوقت قد تصل في بعض الأحيان إلى 70 يوما أو أكثر ولا تستعيد الحشرة تلك القدرة إلا بعد تغذيتها مرة ثانية على نباتات البنجر المصابة. كما وجد أيضا أن إطالة مدة تغذية الحشرة على النبات المصاب يطيل من المدة التي تظل خلالها الحشرة حاملة للفيروس ومحتفظة بقدرتها على العدوي.

3.6.2.الفيروسات المتكاثرة Propagativeviruses

يوجد من البراهين ما يدل على أن كثيرا من الفيروسات التي تنتقل بنطاطات الأوراق، وبعض الفيروسات التي تنتقل بالمن تتكاثر داخل جسم الحشرة الناقلة لها. معظم الفيروسات العابرة وكذا المتكاثرة في جسم الحشرة لا تنتقل نقلا ميكانيكيا صناعيا. وقد فتح الميكروسكوب الالكتروني مجالا جديدا في تلك الدراسة وأمكن عن طريق تقدير تركيز الفيروس في الحشرات المحقونة بكمية معينة للفيروس بعد فترات مختلفة من الحقن وكذا متابعة انتشار الفيروس في أنسجة الحشرة المختلفة وأيضا باستخدام الطرق السيرولوجية من إثبات أن بعض الفيروسات ومنها الفيروسات السابقة الذكر تتكاثر داخل الحشرات الناقلة لها. (الحمادي و اخرون،2018) (قاسم ،2011).

3.الاختبارات التشخيصية بناء على الخصائص الحيوية والمورفولوجية

1.3.الأعراض الظاهرية

تستخدم الأعراض التي تسببها الأمراض الفيروسية للتعرف على المسببات المرضية فبمحاولة للسيطرة على المرض .تكون المعاينة سهلة نسبيا عندما تكون الأعراض لمرض محدد واضحة .غير أن عوامل كثيرة مثلا لسلالة الفيروسية ،النوع النباتي،وقت الإصابة و الظروف البيئية يمكن أن تؤثر على الأعراض الظاهرية (Matthews, 1980).كما أن بعض الفيروسات لا تؤدي إلى أعراض إصابة ظاهرية .إضافة إلى ذلك، فإن فيروسات مختلفة أو سلالات مختلفة لنفس الفيروس يمكن أن تعطي أعراضا مشابهة على نفس العائل النباتي .أحيانا كثيرة تظهر على النباتات أعراض مشابهة لأمراض الفيروسية إلا أنها ناتجة عن عوامل أخرى مثلا لظروف الجوية غير المناسبة ،التربة المعدنية ونقص بعض العناصر المعدنية المغذية ،الإصابة الناتجة عن آفات أخرى كالبكتيريا والحشرات أو النيماتودا،تلوث الهواء و الضرر الناتج عن سوء استعمال المبيدات (وخاصة المبيدات العشبية) . مع أن الأعراض تعطي معلومات عن الفيروسات ،فإن الخبرة الميدانية مطلوبة عند اتخاذ قرار حول تشخيص الفيروسات بناء على الأعراض فقط .في العادة ،من الضروري أن يسير التشخيص بناء على الأعراض جنبا إلى جنب معا لاختبارات الأخرى لضمان دقة تشخيص الإصابة الفيروسية (Bock, 1982).

2.3.المدى العوائلي وطرائق الانتقال

إن الكشف عن ماهية الفيروسات يمكن أن تعتمد جزئيا على معرفة طريقة انتقال الفيروس ،أهي بالعدوى الميكانيكية،أم بالتطعيم أو بواسطة ناقل حشري أو أية نواقل حيوية أخرى(Jones, 1993).إن القاح النباتات العشبية ميكانيكيا باستخدام العصارة النباتية يمكن القيام بها بحد أدنى منا لتسهيلات ،فالأعراض المميزة التي تنتجها الفيروسات على هذه النباتات تسمح بالكشف وتعريف العديد من لفيروسات (Horvath, 1993).وعلى الرغم من أن المدى العوائلي قد آلا يكون طريقة دقيقة لتحديد ماهية الفيروس (Hamilton *et al*., 1981)،إلا أنها مازال تستخدم في كثير من المختبرات لاعتبارها عنصرا هاما في تشخيص الفيروس .يمكن زيادة دقة اختبارات المدى العوائلي عن طريق استخدام مجموعة مناسبة من النباتات (جدول1)و إجرائها بواسطة أصحاب خبرة في هذا الموضوع.

جدول (2). بعض النباتات الدالة الشائعة الاستعمال للكشف على الفيروسات.(Noordam, 1973)

عمر النبات المفضل عند الإعداء	النوع النباتي
5 أسابيع	الشمندر السكري/البنجر (*Beta vulgaris* L.)
شهرين	*Chenopodium amaranticolor,* Coste & Reyn.
شهرين	*Chenopodium quinoa* L.
10 أيام	الخيار (*Cucumis sativus* L.)
8-5 أسابيع	الداتورة (*Datura stramonium* L.)
6 أسابيع	*Nicotiana glutinosa* L.
5 أسابيع	التبغ (*Nicotiana tabacum* L.) – الصنف Samsun NN
5 أسابيع	التبغ (*Nicotiana tabacum* L.) – الصنف White Burley
10 أيام	الفاصولياء (*Phaseolus vulgaris* L.) – الصنف Beka
10 أيام	الفاصولياء (*Phaseolus vulgaris* L.) – الصنف Pinto
اسبوعين	الفول (*Vicia faba* L.)
10 أيام	اللوبياء (*Vigna sinensis* (L.) Endl.)

يمكن تشخيص الفيروسات التي لا تنتقل ميكانيكيا و فيروسات أشجار الفاكهة عن طريق النقل الحشري أو بالتطعيم على نباتات دالة حساسة (Martelli, 1993؛Fridlund, 1980) و مع أن هذه الاختبارات تستخدم في العديد من المختبرات سواء لتشخيص الفيروسات أو لحفظها أو تكاثرها ، إلا أنها تستهلك الوقت و الموارد ، و يصعب تمييز بعض الفيروسات عن طريق الأعراض الظاهرية فقط.

3.3.الخصائص الفيزيائية في العصير

إن الخصائص الفيزيائية (مثل درجة الحرارة المثبطة، نقطة التخفيف النهائية ، مدة التعمير في المختبر) لقياس فعالية الفيروس في العصير النباتي،كانت تستخدم لتعريف الفيروسات النباتية .إلا أن مثل هذه الصفات غير موثوق بها ولم يعد يوصى بها لتشخيص الفيروسات (Francki, 1980).

4.3.المجهر الالكتروني و المجهر الضوئي

إن استخدام المجهر الالكتروني يمكن أن يعطي معلومات مفيدة عن الصفات المورفولوجية للجسيمات الفيروسية ،وهو شائع الاستعمال في الكشف عن الفيروسات النباتية عندما تكون التسهيلات متوفرة(Milne, 1993؛.Baker *et al*, 1985) ؛كما يسمح المجهر الإلكتروني بكشف وجود إصابات بأكثر من فيروس واحد في نفس النبات إذا كانت صفاتها المورفولوجية مختلفة . إن الكشف عن الفيروسات الخيطية و العصوية الشكل مثل Potyviruses ، Potexviruses و Tobamoviruses ، يكون أسهل من الفيروسات متساوية الأبعاد و غيرها من الفيروسات عند فحصها بالمجهر الإلكتروني . يصعب رؤية الفيروسات التي توجد عادة بتراكيز منخفضة في عصارة النسيج النباتي تحت المجهر الإلكتروني ما لم يتم تركيز هذه الفيروسات قبل فحصها . ويمكن تحسين كفاءة المجهر الإلكتروني عند القيام بالإختبارات المصلية / السيرولوجية (immunoelectron microscopy) . إلا أن استخدام المجهر الإلكتروني مكلف ويحتاج إلى خبرة ، و هو غير متوفر في كثير من الأحيان .إن العديد من مؤسسات البحوث الزراعية تستطيع أن تتحمل تكلفة المجهر الإلكتروني الباهظة و التي تتطلب صيانة مستمرة.

5.3.الاختبارات المصلية / السيرولوجية

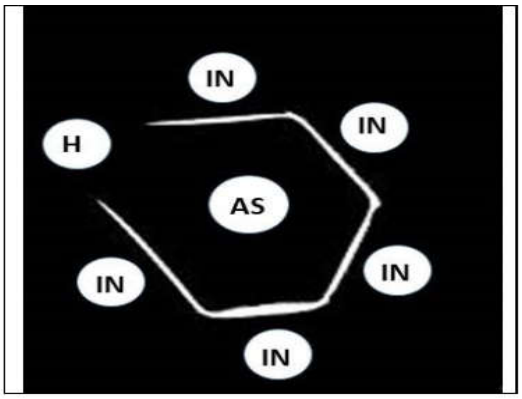
تم تطوير و استخدام الاختبارات المصلية / السيرولوجية و الأمصال المناعية بنجاح للكشف عن الفيروسات النباتية منذ عدة عقود من الزمن . و تعتبر الاختبارات السيرولوجية أكثر الاختبارات المستعملة في الكشف عن الفيروسات الأكثر شيوعا . في البداية ، استخدم تفاعل الجسم المضاد مع مولد الضد (الفيروس)لتكوين مترسب مرئي مثل ، اختبارات الترسيب فائق الصغرmicroprecipitin test)، اختبار الانتشار المزدوج في الآجار (Agar double diffusion test) و اختبار تخثر /تراص الخلاياAgglutination) (test للكشف عن الفيروسات و في مرحلة لاحقة ، أجريت الاختبارات على سطح صلب مثل الأطباق أو أغشية النيتروسلليلوز ، حيث تستخدم كواشف لمشاهدة تفاعل الجسم المضاد مع الفيروس وذلك عن طريق تعليم الأجسام المضادة بإنزيمات . سوف يتم التطرق إلى بعض هذه الاختبارات ، يمكن الإطلاع على تفاصيلها. (مكوك وقمري،1996؛ *al.*,

*Regenmortel van, ؛1994Comeau,Makkouk&Hampton et al., 1990 ؛*2001.Feglae*t (van Regenmortel& Dubs, 1993 ؛1982)*

1.5.3.اختبارات الترسيب والتخثر/التراص

تعتمد اختبارات الترسيب(سواء في مادة سائلة أو في مادة هلامية)على تشكيل منطقة ترسيبية مرئية عندما تتحد كميات كافية من الفيروس مع الأجسام المضادة استخدمت اختبارات الترسيب فائقة الصغر من قبل بعض المختصين ، و لكن استخدام اختبار الانتشار المزدوج في الآجار و تخثر / تراص الخلايا كان الأكثر شيوعا . في اختبار الانتشار المزدوج في الآجار ، تنتشر كلا من الأجسام المضادة و مولد الضد (سواء الفيروس النقي أو العصارة النباتية الحاوية على الفيروس)عبر هلام الآجار و تكون خط ترسيبي مرئي في المنطقة التي يلتقيان فيها في الأجار/ الهلام بالتركيزات المناسبة ((Ouchterlony,1962) شكل (11) و يمكن استخدام هذا الإختبار لتمييز صلة القرابة ما بين السلالات الفيروسية . لكن عيوب هذه الطريقة تتمثل بعدم توفر الحساسية الكافية في الكشف عن الفيروسات التي تتواجد بتراكيز منخفضة(مثل فيروسات الاصفرار Luteoviruses و معظم الفيروسات التي تصيب الأشجار الخشبية) ، و ضرورة تجزئة جسيمات الفيروسات الخيطية و العصوية لتمكينها من الانتشار في الهلام ، كما تحتاج إلى كميات كبيرة من الأجسام المضادة ، و التي أصبحت الآن غالية الثمن.

في اختبار التخثر / التراص ، فإن الجسم المضاد يرتبط أو يغطي السطوح لبعض جسيمات المادة الخامدة(مثل خلايا الدم الحمراء ، لبن الشجر latex ، أو خلايا بكتيريا المكورات العنقوديةَ*Staphylococcus aureus)* ، و إن التفاعل الموجب للجسم المضاد مع الفيروس يكون على شكل تخثر أو تراص جسيمات المادة الخامدة التي يمكن أن تشاهد بالعين المجردة أو باستخدام مكبر . (Walkey*et al*., ؛ Hughes &Ollennu, 1993 ؛Chirkov*et al*., 1984 1992).



شكل (11) .اختبار الانتشار المزدوج في الآجار ،الخط الترسيبي يلاحظ فقط ما بين العينة المصابة الموجودة في الحفر الخارجية التي تحوي عصارة من النبات المصاب (IN) و المصل المضاد الموجود في الحفرة المركزية(AS). و يلاحظ عدم وجود خط ترسيبي مقابل عصارة من نبات سليم(H).

مع أنا اختبارات الترسيب و التخثر / التراص أقل حساسية من الاختبارات المصلية /السيرولوجية الأخرى ، إلا أنها طرق ممتازة للكشف عن الفيروسات التي تكون بتراكيز معقولة في النباتات .إن هذه الاختبارات سهلة جدا ، فبمجرد الحصول على نقطة من عصارة النبات المصاب يتم فحصها بالأمصال المضادة المناسبة .يمكن إجراء هذه الاختبارات بالحد الأدنى من الإمكانيات و الخبرات ، و بالتالي فهي مناسبة للكثير من المختبرات التي تملك إمكانيات محدودة و لديها كميات كافية من الأمصال المضادة.

2.5.3. التفاعل المناعي تحت المجهر الإلكتروني

توجد ثلاثة طرق يمكن استخدامها للكشف عن الفيروسات النباتية تحت المجهرالإلكتروني وهي التجميع (Clumping) الاصطياد (Trapping) و الزخرفة (Decoration) إلا أن اختبار الزخرفة هو الأكثر شيوعا في الاستخدام (Derrick, 1973؛ Milne, 1991) كما يمكن الجمع بينها كاستخدام طريقة الاصطياد أولا يليها الزخرفة على نفس العينة. تجمع هذه الطرق بين خصوصية الاختبارات المصلية / السيرولوجية مع التكبير الذي يسمح به المجهر الإلكتروني . ففي طريقة الزخرفة تغلف الجسيمات الفيروسية بشكل انتقائي بالأجسام المضادة مما يسمح بمشاهدة الفيروسات بسهولة أكبر والتأكد من ماهية الفيروس المراد تشخيصه بالاعتماد على خاصتين : شكل الفيروس وانتقائية الأجسام المضادة . وتسمح هذه الطريقة بالكشف بسهولة عن وجود إصابة مزدوجة بفيروسين لهما نفس الشكل المورفولوجي . بالإضافة إلى التشخيص ، فإنه يمكن استخدام هذه الطرق لتقدير مدى العلاقة السيرولوجية ما بين الفيروسات.

3.5.3.اختبار الإدمصاص المناعي المرتبط بالإنزيم - إليزا (ELISA)

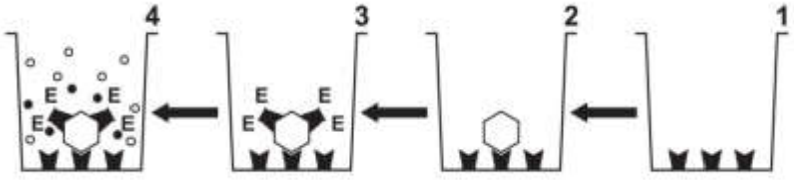
إن اختبار الإدمصاص المناعي المرتبط بالإنزيم (إليزا) هو أكثر الاختبارات شيوعا للكشف عن الفيروسات في المواد النباتية، والحشرات الناقلة، والبذور ومواد الإكثار الخضرية منذ أن تم وصفه في عام 1977 (Clark & Adams, 1977).وخلافا لاختبارات الترسيب والتخثر/التراص، فإن اختبار إليزا تجري على أسطح صلبة، ويتم عادة على أطباق إليزا مصنوعة من البلاستيك – البولي ستيرين (Polystyrenemicrotiter plates) (أطباق صلبة/جامدة) أو كلوريد البوليفينيل،(PVCأطباق مرنة). وبسبب القابلية للتكيف والحساسية والاقتصاد في استخدام الكواشف، يستخدم اختبار إليزا في مجموعة واسعة من الحالات، وخاصة لاختبار عدد كبير من العينات نسبيا في فترة قصيرة من الزمن . تم تطوير تحويرات كثيرة من اليزا، وتختلف هذه الطرائق عن بعضها البعض في مبدأ وضع الأجسام المضادة والفيروس، ولكن مبدأ التفاعل و النتائج النهائية متقاربة (Cooper & Edwards, 1986؛ Clark & vanRegenmortel& Dubs, 1993 Bar-Joseph, 1984) وسوف نتناول بشيء من التفصيل ثلاثة من هذه الطرائق.

الطريقة الأولى :اختبار اليزا بالاحتواء المزدوج للفيروس بالأجسام المضادة

Doublantibody،sandwich-ELISA (DAS-ELISA)

في هذه الطريقة تستعمل الأجسام المضادة(تكون عادة من نوع غلوبيولينات غاما المناعية - Immuno-globulin طراز IgG المعزولة من المصل المضاد)لتغليف سطوح حفر طبق إليزا حيث تسمح بالتقاط الجسيمات الفيروسية في عينة الاختبار . ثم يكشف فيما بعد عن الفيروس المرتبط بالأجسام المضادة عن طريق التحضين بالأجسام المضادة المربوطة بالأنزيم يليه إضافة المادة الكاشفة.

شكل (12). يعتبر اختبار DAS-ELISAعالي التخصص ويحتاج إلى تحضير الأجسام المضادة النقية لربطها بالأنزيم



شكل (12). شكل توضيحي يبين المبدأ العام لاختبار إليزا باحتواء المزدوج للفيروس بالأجسام المضادة

"Double antibody sandwich-ELSA"(DAS-ELISA). (1)إضافة الأجسام المضادة المتخصصة،(2) إضافة العينة التي تحتوي على الفيروس، (3) إضافة الأجسام المضادة المتخصصة المرتبطة بالأنزيم(E)،(4) إضافة المادة الكاشفة التي ستتلون باللون الأصفر نتيجة وجود الأنزيم .

الطريقة الثانية : اختبار إليزا بتغطية الطبق بمولد الضد مباشرة

Direct antigencoating-(DAC-ELISA) ELISA

حيث يتموضع الفيروس (العينات المراد فحصها)مباشرة في طبق الاليزا ، في غياب أي أجسام مضادة لربط الفيروس فيها كما فيDAS-ELISA. في الخطوة الثانية ، تعامل حفر أطباق إليزا بمادة albumin Bovine serum ثم تضاف الأجسام المضادة المتخصصة بالفيروس (يطلق عليه عادة الأجسام المضادة الأولية)سواء على شكل IgG أو مصل مضاد خام. ثم يتم الكشف عن الأجسام المضادة الأولية بواسطة أجسام مضادة متخصصة (يطلق عليها اسم الأجسام المضادة الثانية أو الأجسام المضادة الكاشفة) مربوطة بالأنزيم ، يتبعها إضافة المادة الكاشفة التي تعطي لونا . إن الأجسام المضادة الكاشفة (الأجسام المضادة الثانية)ترتبط تحديدا بالأجسام المضادة الأولية ، حيث أنها أنتجت ضد IgGs المتحصل عليها من الحيوان الذي أنتج فيه الأجسام المضادة للفيروس.(مثال على ذلك ، إذا أنتجت الأجسام المضادة الخاصة بالفيروس في الأرانب ، عندها يجب إنتاج أجسام مضادة لجلوبيلينات الأرانب المناعية في حيوان آخر مثل الماعز)من عيوب هذه الطريقة ، التنافس ما بين الجسيمات الفيروسية و المواد النباتية الأخرى الموجودة في العصارة النباتية للمواقع الموجودة في حفر طبق إليزا وارتفاع قراءة الشواهد السلبية . يمكن التقليل من أثر هذه العيوب باستخدام طامسات (agents (blocking مناسبة و تخفيفات أعلى نسبيا للمستخلص الحاوي للفيروس عن التخفيف الذي يستخدم عادة مع إليزا بالاحتواء المزدوج للفيروس بالأجسام المضادة (DAS -ELISA) ، و كذلك معاملة الأمصال المضادة بعصير النباتات السليمة قبل الاستعمال (Hourani& Abou-Jawdah, 2003 ؛ Feglaet *al*., 1997, 2004 ؛ Younes, 1995)

الطريقة الثالثة :إختبار إليزا بالاحتواء الثلاثي للفيروس بالأجسام المضادة

Triple antibodysandwich-ELISA (TAS-ELISA)

و هي طريقة واسعة الانتشار و مماثلة لإختبار DAS-ELISA ، إلا أن لها خطوة إضافية قبل إضافة الأجسام المضادة الكاشفة المرتبطة بالأنزيم .في هذه الخطوة الإضافية ، يتم إضافة الأجسام المضادة المنتجة في حيوان آخر(عادة الفئران)التي تختلف عن الأجسام المضادة الأولية المستخدمة .

عندها يتم الكشف عن الأجسام المضادة بإضافة أجسام مضادة خاصة بها مرتبطة بالأنزيم (يقصد بذلك الأجسام المضادة للفئران منتجة في حيوان آخر مثل الماعز أو الأرانب) و بحيث لا يرتبط بالأجسام المضادة الأولية ، يليها إضافة المادة الكاشفة التي ستعطي اللون (Al-Moudallal*et al*., 1984) . ومن مميزات اختبار TAS-ELISA ، و الذي يتم فيه الكشف عن الفيروس عن طريق الأجسام المضادة غير المتخصصة بفيروس محدد ، بل متخصصة بالأجسام المضادة للفيروس أو الأجسام المضادة الأولية . و كنتيجة لذلك ، فإن جسم مضاد واحد مربوط بالأنزيم (الأجسام المضادة المنتجة في أجسام الماعز ضد الأجسام المضادة للأرانب goatantirabbit ، أو الأجسام المضادة المنتجة في أجسام الماعز ضد الأجسام المضادة للفئران goatantimouse) يمكن استخدامه للكشف عن عدد كبير من الفيروسات ، مما يجعل هذا الاختبار اقتصاديا و بالتالي مناسبا للكشف عن مجموعة من الفيروسات في عدد كبير من العينات خلال المسوحات الحقلية.

1.3.5.3.العوامل التي تؤثر على نتائج إليزا

رغم أن خطوات اختبارات إليزا بسيطة ، إلا أنه يوجد عوامل كثيرة يمكن أن تؤثر على حساسية ودقة الاختبار و التي تشمل نوعية الأجسام المضادة ، تحضير و تخزين الكاشف ، وقت التحضين ودرجة الحرارة ، اختيار الجزء المناسب منا لعينات النباتية ، واستعمال المحلول المناسب للاستخلاص .ومن الأهمية بمكان إدراج الشواهد السالبة و الموجبة في كل اختبار لتحديد الحد الأدنى للتفريق بين النبات المصاب و السليم في العينات المفحوصة .عموما تعتبر العينة مصابة إذا كان متوسط قراءتها يزيد عن متوسط قراءة الشاهد السليم + 3 مرات قيمة الانحراف القياسي أو ضعفي قيمة متوسطات الشاهد السلبي.

4.5.3.اختبار الارتباط المناعي النقطي (DIBA)

يمكن استخدام اختبار الارتباط المناعي النقطي DIBA (Dot-blot Immunobindingassay) للكشف عن الفيروسات سواء في النباتات أو في نواقل الفيروسات الحشرية .(قمري ومكوك، 1993 ؛ Lange &Heide, 1986 ؛Graddon&Randles, 1986 ؛Banttari&Goodwin, 1985 ؛ Makkouk*et al.,* 1993 ؛Rybicki& Von Wechmar, 1982 ؛Younes, 1995).

إن مبدأ هذا الاختبار مشابه تماما لاختبار إليزا، إلا أن العصارة النباتية للعينات توضع على أغشية النيتروسيليلوز بدلا من استخدام أطباق اليزا. وبالتالي فإن المادة الكاشفة التي تستخدم في اختبار DIBA (وبشكل عام كل الاختبارات التي تجرى على أغشية النيتروسيليلوز) يجب أن تعطي ناتجا نهائيا لا يذوب في الماء، وبالتالي يرسب على غشاء النيتروسيليلوز (الكشف عن طريق اللون) أو يمكنه إطلاق ضوء عن طريق تفاعل كيميائي يكشف عنه عن طريق التصوير الإشعاعي .(قمريومكوك، 1993 ؛ Leong *et al.,* 1986

؛ Makkouk*et al.*, 1993)، يعتبر اختبارDIBAذات حساسية جيدة ، سهل وغير مكلف ، والنتائج يمكن أن يتم قرائتها بالعين المجردة . وقد أمكن زيادة حساسية هذه الطريقة بالاختيار الأمثل لمنظم الاستخلاص ومحلول الطمس وتخفيف المصل المضاد المستخدم (Fegla*et al*., 2000a).

5.5.3. اختبار بصمة النسيج النباتي المناعي(TBIA)

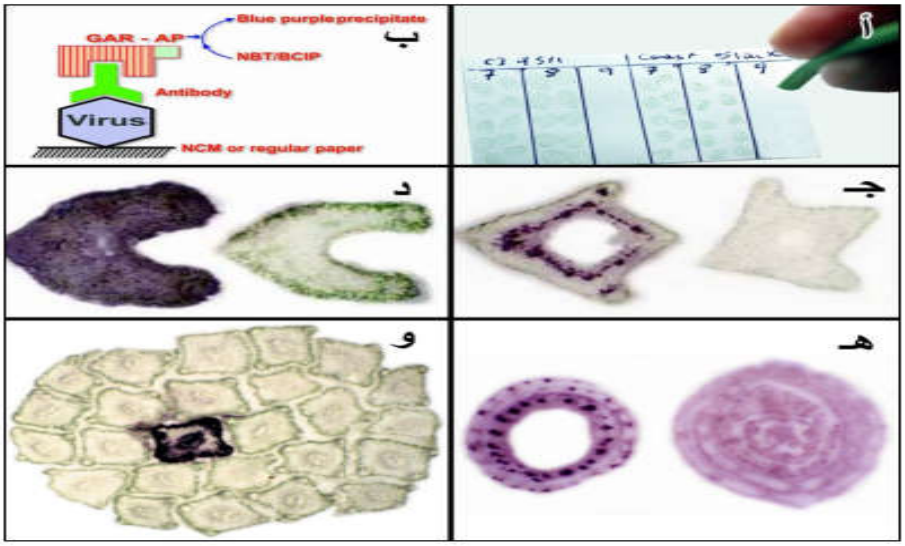
إن اختبار بصمة النسيج النباتي المناعي (Tissue blot immunoassay،)هو نوع من اختبار DIBA، ولكن في هذا الاختبار يتم قطع الجزء النباتي الطازج مباشرة (ورقة، ساق، عنق ورقة، جذر، درنة، أو الحشرة) بواسطة آلة حادة، ثم تطبع على أغشية النيتروسيليلوز مباشرة، (شكل 3- أ)، ثم يكشف عن الفيروس كما في الخطوات المفصلة لاحقا(مكوكوقمري، 1996 ؛Navot*et al.,*1989 ؛ Hsu & Lawson 1991 ؛ Makkouk*et al.,* 1993؛Polston*et al.,* 1991.)، هذا الاختبار بسيط جدا، ولا يتطلب تحضير أو طحن للعينات، كما يقدم معلومات عن توزع الفيروسات في الأنسجة النباتية (مكوكوقمري، 1996 ؛-Abou Jawdah*et al*., 1996؛Fegla*et al*., 2001؛ Hu *et al.,* 1997 ؛ Lin *et al.,* 1990 ؛ Makkouk& Comeau, 1994).

أما عيوب اختباري DIBA وTBIA ، فتنحصر بأنه في بعض الأحيان يكون لون التفاعل ضعيف او لا يمكن تحديد قوة التفاعل بسهولة . و مع ذلك فإن المزايا كثيرة منها :الحساسية العالية ، الفترة الزمنية القصيرة اللازمة لاختبار عدد كبير من العينات ، عدم الحاجة إلى إمكانيات كبيرة لإتمام الاختبار ، و القدرة على تخزين الأغشية المطبوعة بالعينات لفترات طويلة ، و انخفاض تكاليف إجراء الاختبار . بالإضافة إلى ميزة أخرى ، و هي أن العينات المطبوعة على أغشية النيتروسيليلوز يمكن إرسالها بواسطة البريد لمختبر آخر سواء في داخل البلد أو خارجه لإجراء الاختبار ، في حال عدم توفر الإمكانيات المحلية لإتمام الاختبار.

وقد درست كفاءة اختبار TBIA بالكشف عن المايكوبلازما وعدد من الفيروسات النباتية تنتمي إلى أربع مجموعات فيروسية *Cucumovirus* ، *Luteovirus* ، *Potexvirus* ، *Potyvirus* وعلى أنواع نباتية مختلفة (Lin *et al.*, 1990)؛ كما طبق هذا الاختبار للكشف عن فيروس ذبول و تبقع الطماطم على نبات *Impatiens* . *(Hsu & Lawson, 1991)* ؛ وفيروس اصفرار و تقزم الشعيرBYDV(شكل 3- د) على محاصيل الحبوب النجيلية (Makkouk& Comeau, 1994) و 10 فيروسات تصيب المحاصيل البقولية ، تتبع ثمان مجموعات فيروسية، ثمٌان منها توجد في جميع أنسجة النبات وهي BYMV ،BBSV ،PSbMV، BBWV، BBMV، CMV،: AlMVو BBTMV حيث تتلون جميع أجزاء النبات المصاب باللون الأزرق الأرجواني شكل .(13)و اثنان منها يوجدان فقط في الأوعية الغربالية للنبات وهما FBNYV : ،BLRV؛ و في هذه الفيروسات تتلون الأوعية الغربالية للنبات المصاب باللون الأزرق الأرجواني فقط (شكل3- جـ) (مكوك وقمري، 1996) كما أمكن بواسطة هذا الاختبار الكشف عن الفيروسات العشرة السابقة

في جميع أجزاء النبات (الساق، نصل الورقة، عنق الورقة، الجذر) وذلك عند استخدام الأمصال المضادة .

و يمكن لاختبار TBIA أن يكشف عن نبات مصاب واحد ضمن مجموعة 25 نباتا و بحساسية عالية (شكل 3-و). كما أن احتمال الحصول على تشخيص خاطئ في استعمال اختبار TBIA عند فحص عينة مركبة من عدة نباتات هو أقل من احتماله في اختبار DAS-ELISA إذ أن الكشف عن وجود الفيروس في نبات واحد فقط من نباتات المجموعة يكون جليا؛ إلا أن وجوده في العينة المستخرجة من طحن نباتات المجموعة الواحدة وفحصها بواسطة DAS-ELISA يكون مشكوكا فيه عندما يكون تركيز الفيروس في النبات المصاب قليل جدا، علاوة على أن طحن النباتات في مجاميع وفحصها بالاليزا قد تنتج عنه مخاطر لأن حساب نسبة الإصابة يتم في تلك الحالة تبعا لمعادلة رياضية (Maury *et al.*, 1985) ، يتطلب تطبيقها السليم التوزع العشوائي للعينات المصابة في مجاميع، وعليه لو تجمعت عدة عينات مصابة في مجموعة واحدة وظل عدد آخر من المجاميع خاليا من العينات المصابة فإن نسبة الإصابة المقدرة بالمعادلة الرياضية ستكون أقل من المقدرة ببصمة النسيج النباتي (فجلة وآخرون، 2007 ؛Feglaet *al.*, 2000) وذلك لأن البصمة النسيجية، كما ذكرنا، تشير إلى العينات المصابة بغض النظر عن توزعها في المجاميع.



شكل(13). (أ)طريقة طبع النباتات المراد فحصها بالاختبار المصلي لبصمة النسيج النباتي المناعي(TBIA) على غشاء النيتروسيليلوز ،(ب)شكل توضيحي يبين المبدأ العام لاختبار TBIA،(جـ)الكشف عن فيروس الاصفرار الميت للفول(FBNYV) بواسطة إختبار TBIA في ساق نبات الفول (النبات المصاب على اليسار و النبات السليم على اليمين) ، (د)الكشف عن فيروس الموزاييك الأصفر للفاصولياء (BYMV) في عنق ورقة نبات الفول (النبات المصاب على اليسار و النبات السليم على اليمن)،(هـ)الكشف عن فيروس اصفرار و تقزم الشعير (BYD) بواسطة اختبار TBIA في ساق شعير (النبات المصاب على اليسار و النبات السليم على اليمين) ، (و)الكشف عن بادرة عدس مصابة بفيروس تلون بذور الفول (BBSV) ضمن مجموعة مؤلفة

من 25 بادرة عدس بوساطة اختبار TBIA

6.5.3. اختبارات تشخيصية ترتكز على الحمض النووي للفيروس

رغم أن الاختبارات السيرولوجية تستخدم على نطاق واسع للكشف عن الفيروسات، إلا أن استخدام الأمصال المضادة لها بعض الاستثناءات، حيث أنها تستند على مولدات الضد الموجودة على الغلاف البروتيني للفيروس،الذي لا يمثل سوى حوالي 10%من إجمالي جين الفيروس(Gould &Symons, 1983)وبالتالي لا تأخذ في الاعتبار بقية جين الفيروس. بينما في الاختبارات التي تعتمد على الحمض النووي، يمكن استهداف أي منطقة من الجين الفيروسي لتكوين إختبار تشخيصي. بالإضافة إلى ذلك، هناك حالات مرضية لايمكن تطبيق اختبارات مناعية للكشف عنها مثل الفيرويدات والأحماض النووية المرافقة والفيروسات التي لها تنوع في الطرق السيرولوجية (*Tobacco rattle virus*، *Indian& African Peanut clump virus*) والفيروسات التي تكون ضعيفة مناعيا أو التي يصعب تنقيتها وكذلك عندما يراد تحديد سلالات الفيروس. وبالتالي فإن الاختبارات التشخيصية بالاعتماد على الحمض النووي في مثل هذه الحالات تكون الطريقة الأمثل للاختبار .

7.5.3. اختبار تهجين الحمض النووي

يتكون الحمض النووي DNA من سلسلتين متكاملتين مرتبطتين ببعضهما بقوة بواسطة رابطات الهيدروجين (A=T) ، (G≡C) يعتبر انجذاب أحد سلاسل الحمض النووي للسلسلة المكملة له من أقوى وأكثر التفاعلات دقة في الطبيعة. تم استغلال هذه الصفة في تطوير إختبار تهجين الحمض النووي، الذي يقوم على أساس التكامل بين سلسلتين من الحمض النوويDNA:DNADNA:RNA أو RNA:RNA.في هذه الاختبارات، تستخدم كواسم في تشكيل الحمض النووي الهجين مع الحمض النووي المستهدف سلسلة مفردة من الحمض النووي (إما DNA أو cDNA أوRNA) تكون مكملة لمنطقة من جين الفيروس (المراد الكشف عنه) وتكون معلمة بجزيء مراسل (reportermolecule).بعد ذلك، يتم الكشف عن السلسلة المزدوجة المتشكلة (الهجينة) المستهدفة بعدة طرق، حسب "الجزيء المراسل" المستخدم.

إن اختبار النقطة أو البقعة التهجينية (dot- or spot-blot hybridization) هو أسلوب شائع الاستخدام في تشخيص الأمراض النباتية الفيروسية(Gargeret *al*., 1983؛ Maule *et al.*, 1983 ؛ Rosneret *al.*, 1986؛Palukaitis, 1984 ؛Owens &Diener, 1984).

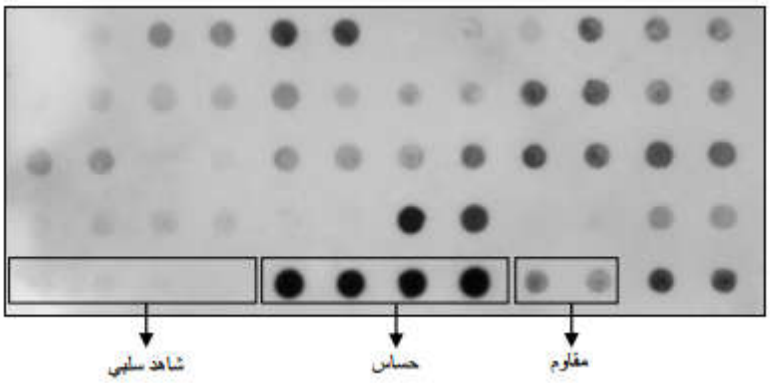
ترتكز العملية على 1 تغيير طبيعة الحمض النووي بجعله سلسلة مفردة خالية من التراكيب الثانوية ، ويتم ذلك عادة بتعريضه لحرارة مرتفعة في إناء يغلي فيه الماء ثم

تبريده بسرعة في الثلج 2 طبع وتثبيت الحمض النووي المستهدف (أي الحمض النووي الفيروسي في العينة المراد فحصها) على أغشية النيتروسيليلوز أو أغشية النايلون الموجبة الشحنة . تغطية 3 الأماكن الحرة على الأغشية بواسطة مواد غير متخصصة بالحمض النووي [في العادة تستخدم نطاف السلمون (Salmon sperm)أو الحمض النووي للغدة السعترية للعجل calf-thymus)][(DNAأو بواسطة البروتين [عادة يستخدم زلال مصل بقريBovine serumalbumin) (أو حليب غير دهني مجفف[، 4السماح للتهجين بين الحمض النووي الفيروسي و الواسم (الموجود بشكل سلسلة مفردة حرة في محلول التهجين(5) إزالة الواسم غير المهجن بالأغشية بواسطة عدة مرات من الغسيل، (6)الكشف عن المراسل الجزيء في الواسم المهجن بالسلسلة المستهدفة.

يمكن استخدام أي من الجينات المكملة للحمض النووي الريبي المنزوع الأوكسجين [Complementary DNA (cDNA) clones] في أي منطقة محددة من المجين الفيروسي كواسم للكشف عن الفيروس في العصارة النباتية. لإنتاج كلون ،cDNA في العادة يتم تحويل RNA الفيروسي إلى سلسلة مزدوجة من DNA ومن ثم استنساخه في نواقل مناسبة (المميزات الرئيسية للحمض النووي المستنسخ هي النقاء، على أن استخدام النواقل في الاستنساخ يؤمن تواجد مستمر و يحفظ ،cDNA حيث يمكن استخدامه في أي وقت ويمكن تزويد المختبرات المختلفة به لاستخدامه في تشخيص الفيروسات ، مما يوفر نتائج اختبارات موحدة. .

إن اختيار طريقة التعليم/الوسم تتعلق بطبيعة الواسم الذي سيستخدم . إن واسم الحمض النووي من نوع DNA يمكن أن ينتج عن طريق nick translationأو randomprimedlabelling أو PCR، في حين أن واسم RNA يمكن تحضيره من خلال النسخ المخبري خلاف ا لواسم ،DNA فإن واسم RNAللسلسلة المفردة يستطيع التهجين فقط مع القطعة المستهدفة بدون إعادة الالتحام وأن هجين RNA:RNAهو أكثر استقرار ار من هجين DNA:RNAأو DNA:DNA.ومع ذلك، فان احتمال تدهور واسم RNAبسبب التلوث بأنزيم RNAase خلال عملية التهجين والتكاليف العالية لتكوين مثل هذه الواسمات جعلت استخدام الواسمات للحمض النووي DNA أو cDNA أكثر شيوعا في الاختبارات التشخيصية .تستخدم النظائر المشعة مثل P32 لتعليم واسمات الحمض النووي والكشف عنها عن طريق التصوير الإشعاعي وهي تعتبر الأكثر كفاءة أو حساسية في الكشف وتسمح بتحديد أو مقارنة كمية الفيروس الموجودة في العينات. إلا أن للنظائر المشعة عمر قصير لذا يلزم تحضير الواسم خلال فترة وجيزة من الاستعمال، كما يمكن أن يكون لاستخدامها خطر على الصحة العامة إذا تم استعمالها بطريقة غير مناسبة، ولذلك تتطلب إجراءات مكثفة و مكلفة لتلبية إجراءات السلامة. في السنوات الأخيرة، تم التغلب على مثل هذه المشاكل عن طريق التعليم بمواد غير مشعة)أو استخدام نظامdigoxigenin (DIG)/antiDIGأو استخدام نظام biotin/streptavidin، هناك بعض المساوئ

لاستخدام في العينات وربط streptavidinبطريقة غير متخصصة على الأوجه الصلبة مثل أغشية النايلون،مما يؤدي إلى صعوبة قراءة النتائج. لهذا، فإن نظام DIG/antiDIGيستخدم على نطاق واسع للكشف عن العديد من الفيروسات حيث يمكن تحضير الواسم وخزنه لمدة تزيد عن سنة دون أن يؤثر سلبا ذلك على دقة الكشف. في هذا النظام تتعرض الأغشية بعد التهجين إلى إضافةhorseradish أو alkaline phosphatase المربوطة بالأنزيم (سواء antiDIG الأجسام المضادة، peroxidase)ثم الكشف عن التفاعل عن طريق استخدام المادة الكاشفة المناسبة التي تؤدي إما إلى ترسيب الناتج (الكشف عن طريق اللون) أو انطلاق ضوء عن طريق تفاعل كيميائي يكشف عنه عن طريق التصوير الإشعاعي وتجدر الإشارة أنه أحيانا يمكن الاستغناء عن استخراج الحمض النووي بإتباع طريقة بصمة النسيج النباتي والتهجين **شكل(14)** واستخدام نظام الكشف digoxigenin (DIG)/antiDIG .



شكل(14) .التركيز النسبي لفيروس تجعد الأوراق الأصفر للبندورة /الطماطم (TYLCV) في نباتات الجيل الثالث عن طريق تهجين الحمض النووي باستخدام طريقة التفاعل الكيميائي الذي يكشف عنه بالتصوير ألشعاعي.

8.5.3.التفاعل المتسلسل للبوليمرا (PCR)

تحسنت كثيرا حساسية الاختبارات التشخيصية اعتمادا على الحمض النووي بعد تطوير التفاعل المتسلسل للبوليمراز . (PCR)إن اختبار PCR يسمح بتسريع إنتاج الحمض النووي المستهدف بشكل تسلسلي في المختبر . إن السرعة والتخصص، والحساسية الفائقة لاختبار PCR جعلته ملائما للكثير من مجالات البحوث في علم الأحياء. ولقد أصبح هذا الاختبار منذ اكتشافه من أهم الاختبارات التشخيصية للأمراض النباتية الفيروسية إذ أنه يسمح بتكثيف إنتاج الحمض النووي المستهدف ولو كان بتركيز منخفض جدا لإنتاج أو استنساخ الحمض النووي نحتاج إلى زوج من البادئات تكون كل واحدة منها مكونة من حوالي 15-22نيكليوتيدة مكملة للحمض النووي المراد إنتاجه في منطقتين مختلفتين ومتعاكستين، وبذلك يمكن إنتاج أو استنساخ منطقة المجين الواقعة بينهما. في معظم الحالات يجب استخراج الحمض النووي قبل البدء باختبارPCR.يتكون اختبارPCRمن

ثلاث.خطوات:

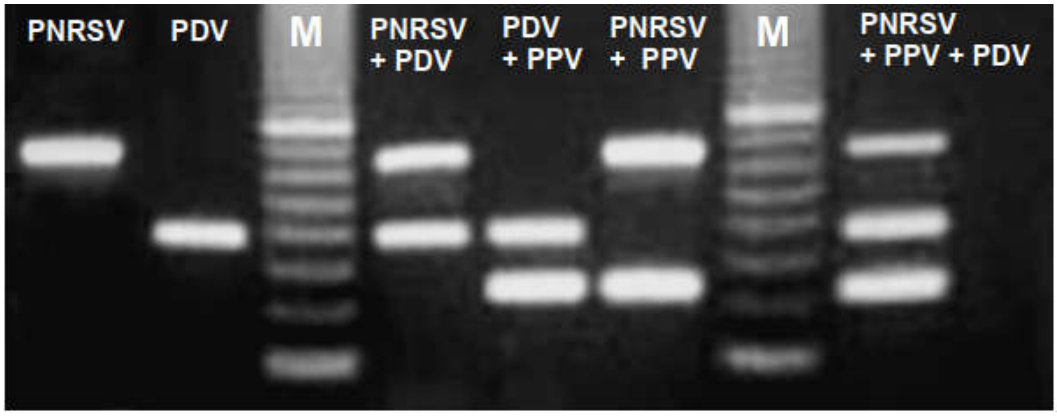
(1) تغيير طبيعة الحمض النووي denaturation (عن طريق رفع درجة الحرارة (عادة94c-95 º) لفصل سلسلتي الحمض النووي DNA عن بعضها البعض ، (2) (التصاقannealing) (البادئات مع سلاسل الحمض النووي DNA المستهدفة والمقابلة لهم (إن درجة حرارة الالتصاق تعتمد على نوع النيكليوتيدات المكونة للبادئ وطوله ، وعادة ما تتراوح ما بين 45-65 ºc و(3) تمدد extension) (كل بادئ عبر المنطقة المستهدفة (تكون عادة عند درجة حرارة 72c) باستخدام إنزيم النسخ لسلسلةDNA) مثل Taqpolymerase . كل سلسلة من الحمض النووي في الدورة الواحدة ستكون بمثابة قالب لتكوين حمض نووي DNAجديد في الدورة القادمة. وهذا يؤدي إلى زيادة هائلة في ناتج PCRيعتمد على عدد الدورات المستخدمة. تتكرر الخطوات الثلاثة السابقة عدد من المرات (بين 30و 40مرة) في جهاز Thermocyclerحتى يستنسخ كمية كافية من المنتج المراد. وبالتالي فإن جزيء واحد سيتم تضخيمه 2ن مرة بعد "ن" دورة، أي حوالي 3.4 × 1010 مرة في 35 دورة إذا ما افترض أن الكفاءة 100%.في العادة تكون الكفاءة بحدود ،65-85%ويمكن للمرء أن يتوقع أن يكون إجمالي الناتج التجميعي مابين1.65ن و 1.85ن وهكذا في ساعات قليلة، فإن السلسلة المستهدفة تتكاثر أو تنتج بكميات هائلة ويمكن الكشف عن الناتج عن طريق تمريره بواسطة الرحلان الكهربائي عبر هلام من الآجار، ثم صبغه بواسطة بروميد الاثيديوم وتعريضه للأشعة فوق البنفسجية لكشف الحمض النووي المنتج. هناك أجهزة PCRمتوفرة تجاريا والتي يمكن استخدامها لتحليل عينات كثيرة في آن واحد، مما يجعل هذه الأجهزة مناسبة للتشخيص الروتيني . .

هذا الاختبار ينطبق مباشرة على الفيروسات ذات الحمض النووي الريبي المنزوع (*Nanovirus* ،*Badnavirus*،*Geminivirus*،*Cauliomvirus*) الأوكسجين مثل الأنواع التابعة للأجناس؛ ولكن لتشخيص الفيروسات النباتية التي تملك غالبيتها حمض نووي ريبي RNA يجب تحويله إلى سلسلة مكملة من DNA (cDNA) بواسطة النسخ العكسي (Reverse Transcription = RT) قبل البدء باختبار PCR لتكوين قطعة مناسبة من الحمض النووي DNA المستهدف لاحقا للتضخيم . في الدورات الأولى لاختبار ، PCR تكون سلسلة الحمض النووي المكملة من قالب ،cDNA ولكن بعد ذلك فإن التفاعل سيتشكل من السلسلة المزدوجة للحمض النووي DNA كما هو موصوف أعلاه . هذه العملية من التضخيم تسمى التفاعل المتسلسل للبوليمراز مع النسخ العكسي (RT-PCR). إن الناتج النهائي للحمض النووي المضخم يمكن تمريره عبر هلام الآجار بواسطة الرحلان الكهربائي . .

إضافة إلى فائدته كاختبار تشخيصي، فإن PCR يمكن أن يستخدم أيضا بالاشتراك مع تقنيات أخرى مثلrestriction fragment lengthpolymorphism (RFLP)أو دراسة تسلسل النيوكليوتيدات في سلسلة الحمض النووي DNAالمضخمة لدراسة الاختلافات مابين الفيروسات؛على المستوى الجزيئي واستنادا إلى معلومات تسلسل النيوكليوتيدات لعدد من الفيروسات المختلفة، فإنه يمكن تصميم بادئات يمكن استخدامها في

اختباراتPCR للكشف والتفريقمابين الفيروسات على مستوى الفصيلة أو الجنس أو حتى على مستوى السلالة (شكل(15) أو الكشف عن فيروسات(اثنين أو أكثر) ليس بينها علاقة في عينة واحدة عن طريق استخدام مزيج من البادئات الفيروسية .

شكل (16) (Multiplex PCR- ويمكن استخدام تقنية PCR بفعالية في دراسات الأوبئة وبرامج التربية لإنتاج نباتات مقاومة للفيروس، وخاصة في الحالات التي يصعب اكتشافها في التقنيات الأخرى. مع أن مزايا RT-PCRتفوق سلبياته، فانه يجب توخي الحذر أثناء القيام بتفاعلات، PCR لما لها من حساسية عالية و قوة تضخيم هائلة ، وذلك من أجل تجنب التفاعلات الكاذبة الناتجة عن التلوث. بعض هذه المشاكل يمكن التغلب عليها مع إتباع التدابير والعناية الكافية لتجنب التلوث الخارجي الناتج عن الجو المحيط، كما أن استخدام الشواهد السلبية والايجابية مع العينات المفحوصة في كل اختبارPCRتعطي فكرة عن مدى نجاح الاختبار .

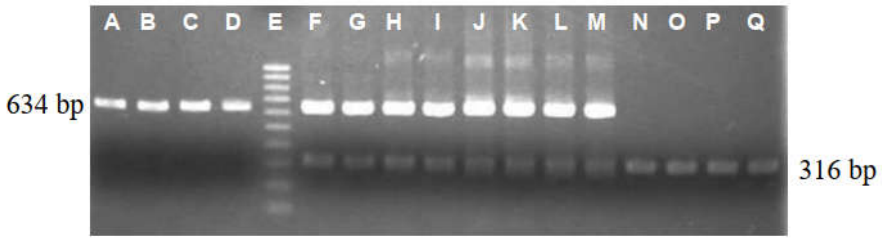


شكل(15). الكشف عن ثلاثة فيروسات تصيب أشجار الفاكهة بواسطة Multiplex PCR.حجم القطعة المضخمة لفيروس البقع الحلقية الميتة للخوخ/البرقوق (PNRSV) = 650 قاعدة آزوتية، لفيروس تقزم الخوخ/البرقوق

(PDV) = 320 قاعدة آزوتية ، وفيروس جدري الخوخ/البرقوق (PPV) = 220 قاعدة آزوتية.

تم تطوير أسلوب جديد يجمع بين المزايا التقنية لاختبار PCR مع مزايا الاختبار السيرلوجي (اليزا)، يدعى Immunocapture-RT-PCR (IC-RT-PCR) للكشف عن عدد من الفيروسات النباتية في هذا الاختبار، يتم تركيز جسيمات الفيروس أولا على سطح صلب (سواء في أنابيب الطرد المركزي الصغيرة أو في أطباق اليزا) باستخدام أجسام مضادة متخصصة بالفيروس. يتم الإفراج عن الجسيمات الفيروسية وتحرير الحمض النووي RNA الفيروسي ثم تضخيمه باختبار RT-PCR.ويؤدي هذا إلى زيادة حساسية الاختبار، وتخفيف المشاكل التي يمكن أن تحدث خلال استخلاص RNA إلى الحد الأدنى. إن أسلوب IC-RT-PCR هو خيار مفيد بديل عن RT-PCR للكشف عن الفيروسات في المواد النباتية والحشرات الناقلة للفيروسات وقد سمحت تقنية الـ RT-PCR باستنساخ جينات الغطاء البروتيني لعدد من الفيروسات (التي يصعب استخراجها وتنقيتها لإنتاج أمصال) وإنتاج بروتين غطاء هذه

الفيروسات في المختبر in vitro ومن ثم استعمالها لإنتاج أمصال مضادة يمكن استعمالها في اختبارات ELISAللكشف عن هذه الفيروسات.



شكل(16). الكشف عن فيروس تجعد الأوراق الأصفر للبندورة /الطماطم (TYLCV) باستخدام زوجين من البادئات TYc138/TYv2337 و TYc138/TYm2664التي تضخم قطعتين بحجم 634قاعدة أزوتية و 316قاعدة أزوتية للعزلتين TYLCV-ILو TYLCV-Mld،على التواليA .إلى Dعينات N،TYLCV-ILإلى Q:عينات F،TYLCV-Mld إلى M:عينات مختلطة، E=شاهد (سلم 100قاعدة آزوتية).

أخيرا، تم ابتداع اختبار للكشف عن الفيروسات وقياسها، بالإضافة إلى حساسية ودقة هذا الاختبار، فله مزايا أخرى إذا ما قورن بـ RT-PCR و PC ؛ فهو يسمح بالحصول على النتائج بسرعة أكبر دون الحاجة إلى تمرير المنتج عبرهلام الآجار بواسطة الرحلان الكهربائي ويمكن من تحديد مقدار الفيروس في العينة ويقلل من التلوث بمادة بروميد الأيثيديوم، يوفر المعالجة بعد PCR، وله طاقة إنتاجية أعلى. ولكن هذا الاختبار يتطلب تكلفة أعلى ومعدات خاصة وكواشف أغلى مقارنة باختبار PCR. .

.(Nolasco*et al.,* 199 3) .(Wetzel*et al.,*1992)

المقدمة

تمثل مكافحة الفيروسات و أمراضها هدفاً رئيسياً للعاملين في مجال أمراض النبات الفيروسية. ترتبط هذه المكافحة بالمعلومات المتاحة عن الفيروس والمرض وكلما زادت لدينا هذه المعلومات كلما كانت الطرق والوسائل المختارة للمكافحة أكثر فاعلية وأكثر آماناً وأقل تكلفة .بالنظر لطبيعة الفيروسات وارتباطها ارتباطاً كاملاً بخلايا النبات المصاب، وتواجدها داخل هذه الخلايا دون وجود فواصل بينها وبين مكونات الخلايا فإنه لا توجد طريقة مباشرة لمكافحتها.وبالتالي فإنه من المتوقع عند مكافحة أي مرض فيروسي أن تكون هناك مجموعة متكاملة من الطرق والوسائل التي تشكل برنامجاً متكاملا للمكافحة . تعتمد أساساً على وسائل لمنع الإصابة و الوقاية منها، وكذلك على وسائل تعمل على تقليل مصادر العدوى والحد من فعالية وسائل انتشار المرض وتقليل تأثير الإصابة على المحصول. بوجه عام فإن غالبية الطرق المستخدمة تهدف أساساً إلى الوقاية من هذه المجموعة من الأمراض وليس معالجتها بعد حدوث الإصابة.

مما لا شك فيه فإن التعرف الدقيق على الفيروس المسبب للمرض وعلى صفاته وعلى دورته المرضية تمثل العامل الأساسي في تحديد وسائل المكافحة (Hadidi*et al.* 1998) وعلى سبيل المثال فإن معرفة طرق وكيفية انتقال الفيروس الممرض من نبات إلى آخر لها درجة كبيرة في تحديد تلك الوسائل ، فإذا كان ينتقل عن طريق البذور فتصبح زراعة بذور سليمة على درجة كبيرة من الأهمية وإذا كان ينتقل بواسطة الحشرات أو غيرها من النواقل فتكون مكافحتها أو تجنبها ذات أولوية مطلقة ، وهكذا بالنسبة لباقي وسائل الإنتقال.

يمثل المدى العوائلي للفيروس أهمية كبيرة في تحديد وسائل المكافحة فإذا كان يصيب أشجار الفاكهة فلابد من إعطاء أهمية لاستخدام طعوم خالية من الإصابة و إذا كان يصيب نباتات حولية فلا بد من معرفة مدى إصابته للنباتات المجاورة للمحصول والأعشاب والنباتات الغريبة داخل المحصول حتى يمكن تقدير مدى أهمية التخلص من مصادر العدوى هذه . وبالطبع فإن الطرق الحديثة المتضمنة استخدام زراعة الأنسجة والهندسة الوراثية قد فتحت مجالاً كبيرا للحصول على نباتات خالية من الإصابة وعلى نباتات مقاومة لفيروس أو لفيروسات معينة . ..

بوجه عام فإنه نظيرا لتعدد وسائل انتقال و إنشار الفيروسات وكيفية بقائها خلال الفترات بين المواسم تعددت طرق المكافحة الملائمة . إن استخدام بعض طرق المكافحة التي قد لا تعطي استبعاداً كاملاً للمرض لا تعتبر غير ناجحة ، ولا يجب الاستهانة بأية وسيلة مباشرة، فقد تؤدي بعض الوسائل البسيطة (مثل إزالة النباتات المصابة في أوائل الموسم أو استخدام بعض الوسائل الزراعية الصحيحة) إلى تقليل الخسائر(Albrechtsen, 1997).

4.طرائق مكافحة الفيروسات والأمراض الفيروسية

1.4.الحجر الزراعي

يعرف الحجر الزراعي بأنه " القوانين التي تحد من حركة الحيوان أو النبات إذا كان حاملا لممرض أو آفة أو حشيشة" . تحدث حالات تسرب الممرضات إلى منطقة ما من خلال وسائل انتشار طبيعية مثل الحشرات أو عبر مسارات من صنع الإنسان مثل استيراد السلع الزراعية (بذور أو أجزاء خضرية) سواء لغرض الاستهلاك أو لغرض الزراعة أو عبور سلع زراعية عبر أراض دولة ما.

تتضمن مهام الحجر الزراعي ما يلى :

استبعاد الشحنات التي يتأكد من إصابتها من خلال الفحص . محاصرة الأمراض التي دخلت حديثا إلى منطقة ما بطرق الانتشار الطبيعية كالحشرات أو عبر مسارات من صنع الإنسان مثل دخول سلع زراعية بصحبة المسافرين و هو ما يعرف بالحجر الزراعي الداخلي ، على أن يتم استئصال النباتات المصابة في تلك الأماكن المحاصرة .(Agrios, G. N. 2005) (Agrios, G. N. 1978).

2.4.استبعاد مصادر العدوى داخل وبجوار المحصول

تتعدد مصادر العدوى بالفيروسات المختلفة ، فقد يكون المصدر عبارة عن نباتات مصابة داخل حقل ما لمحصول اقتصادي ناتجة من زراعة بذور مصابة أو أجزاء خضرية مصابة أو نامية من مخلفات المحصول السابق أو أصيبت مبكرا من حقول مجاورة أو من زراعات سابقة أو من نباتات ذات حولين (حيث تنمو مبكرا في عامها الثاني معطية نباتات مصابة تمثل مصدرا لعدوى النباتات الجديدة المزروعة في عامها الأول) وقد يكون المصدر عبارة عن نباتات معمرة أو نباتات زينة أو أعشاب . (شوكت،1982).

3.4.استخدام بذور خالية من الفيروس

من أهم وأخطر طرق انتقال الفيروسات و انتشارها هو تواجدها في البذور المصابة، والتي عند زراعتها تعطي نباتات تمثل بؤرا للإصابة المبكرة وتشتد خطورتها في حالة وجود ناقلات نشطة تعمل على نقل الإصابة من تلك النباتات المصابة إلى باقي نباتات الحقل في أوائل الموسم الزراعي (Matthews,1970), .أحياناً تكون البذور هي الوسيلة الوحيدة (وقد تشترك معها وسائل أخرى) التي يتمكن الفيروس من البقاء فيها من موسم إلى آخر اد تمثل الخطر الأساسي في إدخال فيروسات جديدة إلى بعض المناطق (Albrechtsen, 1997). وتختلف نسبة الإنتقال عن طريق البذور بإختلاف الفيروس والعائل والصنف النباتي(الحمادي وآخرون ,1980) والظروف البيئية السائدة وغيرها من العوامل.

(الحمادي وآخرون،1976)

ومن الممكن تقليل أو تثبيط الفيروسات المنقولة بالبذور ببعض المعاملات والتي يمكن تلخيصها بالتالي :

- **الحرارة**: تؤثر المعاملة بالحرارة أساساً على الفيروسات المحمولة على السطح الخارجي للبذرة،إلا أنه قد أمكن استبعاد بعض الفيروسات المحمولة داخلياً من البذور المصابة. فقد أظهرت معاملة بذور الخس المصابة بفيروس موزاييك الخس LMV) (بالحرارة الجافة على درجات تراوحت بين40-85°c لمدة تراوحت بين يوم واحد وأربعة أيام، وأن المعاملة عند درجة حرارة عند80°c لمدة 3أو 4أيام كانت فعالة في تثبيط الفيروس بدون تأثير معنوي على إنبات البذور (Feglaet al.,1990).
- **معاملات كيميائية :**قد تستخدم بعض المعاملات الكيميائية لإستبعاد الفيروسات وخاصة تلك المحمولة سطحيا (Feglaet al., 1990).
- **التخمير**: إن استخراج البذور بطريقة التخمير اعطى نتائج إيجابية مع فيروس ToMV في بذور الطماطم. (Feglaet al., 1990).
- **التخزين :** يؤدي تخزين البذور في بعض الحالات إلى استبعاد بعض الفيروسات .(الحمادي وآخرون،1976)

4.4.استخدام تقاوي (مواد إكثار) خضرية خالية من الفيروس

عندما يصاب نبات ما بفيروس معين فإن الفيروس يظل متواجداً بصورة مزمنة داخل هذا النبات ، وتنتقل الإصابة إلى الأجيال التالية إذا ما تم إكثار هذا النبات خضرياً أو إذا ما أخذت منه طعوماً لنباتات أخرى كما في حالة أشجار الفاكهة.

تمثل النباتات التي تتكاثر خضرياً نسبة عالية في العديد من محاصيل الخضر والزينة والفاكهة ، وتؤدي إصابة تلك النباتات وخاصة المعمرة منها بالفيروسات المختلفة إلي خسائر اقتصادية كبيرة. كما تنتقل الفيروسات بوجه عام عن طريق التطعيم، خصوصاً في حالة نجاح الالتحام بين الأصل والطعم القابلين للإصابة (Abo El-Nil &Zettler, 1976)

1.4.4.بعض المعاملات لتقليل إصابة التقاوي (مواد الإكثار) الخضرية

- تطهير سكاكين تقطيع البطاطس (ويفضل استخدام درنات صغيرة كاملة) وسكاكين تقطيع العقل وآلات كسر أو قطع محصول قصب السكر وسكاكين التطعيم وذلك باستخدام اللهب أو بواسطة محلول فوسفات ثلاثي الصوديوم (تركيز10%).
- التأكد من سلامة الطعوم المستخدمة وخلوها من أي فيروسات (تؤخذ من أشجار أمهات سليمة مختبرة) كما يجب أن يكون الأصل خالياً من الإصابة أو مقاوماً لها.
- قد يكون من المجدي في بعض الحالات التخلص من النبات المصاب أو الشجرة المصابة وإعدامها.
- في بعض الحالات يتم معاملة الأجزاء التكاثرية الخضرية بالماء الساخن (حوالي50°c) لأوقات محدودة قد تؤدي إلى نتائج جيدة.
- تجنب تحميل بعض نباتات الخضر على بعض النباتات المعمرة كالموز، لمنع انتقال بعض الإصابات الفيروسية من الخضر إلى الموز .

2.4.4.الحصول على نباتات خالية من الفيروس .

يمكن الحصول على نباتات خالية من الفيروس بأحدى الوسيلتين التاليتين :

1) الحصول على نباتات أو أجزاء نباتية سليمة طبيعيا

لا يمكن الاعتماد على الأعراض الظاهرية عند إختيار النباتات التي تستعمل كنواة للإكثار، كما قد تصاب بعض النباتات دون ظهور أعراض عليها أو تكون الأعراض موسمية أو غير واضحة .

2) تخليص النباتات المصابة من الفيروس

إذا ما كانت جميع النباتات المتاحة مصابة فإنه يمكن استخدام الطرق التالية لتخليص النباتات المصابة أو أجزاء منها من الفيروس، ويمكن تخليصها بالتالي:

- العلاج بالحرارة.
- مزارع القمم المريستيمية.
- مزارع الأنسجة.

3.4.4.المحافظة على النباتات الخالية من الفيروس

عند الحصول على نباتات خالية من الإصابة الفيروسية والتي تعتبر نويات (أمهات) للنباتات الجديدة فإنه يجب العمل على إكثارها تحت ظروف لا تسمح بإصابتها مرة أخرى مع التأكد من قيمتها الزراعية ومطابقتها للصنف الأصلي. يتم إكثار تلك النباتات للاستعمال التجاري تحت إشراف أفراد مدربين يمكنهم تطبيق إجراءات الوقاية اللازمة لمنع الإصابة، وفي حالة حدوث إصابات لبعض النباتات فيمكنهم تحديدها واستبعادها، ولتحقيق ذلك لا بد أن تكون لديهم الخبرة الكافية لملاحظة أي إصابة و توفر الإمكانيات الكافية للكشف والتعرف على الفيروسات المختلفة . (الحمادي وآخرون، 1995).

5.4.الممارسات الزراعية

- **تغيير مواعيد الزراعة والحصاد** : تؤثر الإصابة تأثيرا كبيًرا على المحاصيل ، خاصة إذا ما أصيبت النباتات وهى صغيرة. عموماً فكلما تقدم النبات في العمر كلما زادت درجة تحمله ومقاومته للإصابة بالفيروسات. يرتبط إنتشار الأمراض الفيروسية بوجه عام بانتشار الحشرات الناقلة لها وعلى هذا الأساس فإن اختيار موعد الزراعة قد يؤثر على حدوث ونسبة الإصابة .إن أنسب موعد للزراعة يعتمد على موعد هجرة النواقل الحشرية الحاملة للإصابة، فإذا كانت تهاجر مبكرا فإن تأخير الزراعة يقلل من الإصابة ، أما إذا كانت الحشرات الناقلة تهاجر متأخرة فإن الزراعة المبكرة سوف تسمح للنبات بأن ينمو ويكبر قبل أن تتم إصابته(Kawana, 2007).
- **مسافات الزراعة.**
- **الدورة الزراعية والنباتات المجاور.**
- **عوامل أخرى منها** : مساحة الحقل.التحميل المحصولي.

6.4. المكافحة المتكاملة للناقلات

لابد أن نتعرف أولاً على الناقل بدقة، لأنه قد يكون متواجد بصورة مؤقتة أو مزمنة، و في نفس الوقت قد يكون وحيدا أو مشترك مع ناقلات أخرى و تتفاوت النواقل في كفاءتها على نقل الفيروس.

1.6.4.مكافحة النواقل الهوائية باستعمال

- **المبيدات الحشرية :** يوجد بالفعل وفي متناول أي مزارع عدد كبير جداً من المبيدات الحشرية التي يمكنها مكافحة مختلف الآفات الحشرية التي تتغذى على أي محصول مسببة له أضرارًا مباشرة، ومثل هذه الحشرات (غير الناقلة للفيروسات) تكون مكافحتها أسهل بكثير حيث يكفي أن تنحصر المكافحة في تقليل أعدادها إلى الحد الذي لا يسبب خسارة اقتصادية للمحصول.

إلا أن مكافحة الحشرات الناقلة ومنعها من نقل الإصابة الفيروسية تعتبر مشكلة صعبة، إذ أن عدداً قليلاً من الحشرات الناقلة المجنحة قد يسبب انتشارا كبيرا للإصابة الفيروسية. إن الحشرات هي الناقل الرئيسي للعديد من الفيروسات تحت ظروف الحقل والبيوت البلاستيكية. و بالتالي فإن غالبية المزارعين يعتمدون على مكافحة الحشرات الناقلة باستخدام المبيدات الكيميائية . هناك عدة مخاطر لهذه الوسيلة إذ قد يؤدي ذلك إلى تحفيز وتطوير ظهور سلالات من الناقل مقاومة لفعل هذه المبيدات، وكذلك تؤدي إلى قتل الأعداء الطبيعية للحشرات الناقلة من طفيليات ومفترسات عموماً فإنه يجب الوضع في الاعتبار أن هناك فرقاً كبيرا في مكافحة الحشرات الناقلة للفيروسات غير الباقية/غير المثابرة والفيروسات الباقية/المثابرة إن الفيروسات التي تأتي من خارج المحصول تكون عادة عن طريق المن المجنح (Matthews 1991).

- **الرش بالزيوت :** اتجهت الأنظار إلى استخدام الزيوت لمكافحة الحشرات الناقلة للفيروسات عندما أظهر الباحثون أن المن الحامل لفيروس PVY قد انخفضت مقدرته على نقل الفيروس بشكل كبير عندما كانت النباتات مرشوشة ببعض الزيوت. و نظراً لعدم سمية الزيوت على الإنسان والحيوان فقد اعتقد أن رش هذه الزيوت سيحل مشكلة انتقال الفيروسات بالحشرات.
- **معاملات وعوامل أخرى** : هناك العديد من العوامل التي تقلل من إنتشار النواقل والتي يمكن تلخيصها بما يلي (Bos, 1999):

-التخلص من أو تجنب العوائل التي تقضى عليها الحشرات الناقلة فترة الشتاء سواء في الحقول المزروعة أو في المناطق المجاورة لها .

-الزراعة في مناطق لا يلائم مناخها النواقل (فالمن على سبيل المثال لا يلائمه وجود الرياح) أو يغيب فيها العوائل الشتوية.

الزراعة في أراضي خالية من الإصابات الفيروسية ومن نواقلها.

-زيادة الكثافة النباتية في الحقل مما يعمل على تقليل المساحات المتاحة للحشرات خلال فترات النمو المبكرة للمحصول وعلى تقليل حركة الحشرات داخل المحصول.

-زراعة المحصول في حقول ذات مساحات كبيرة، حيث أن الهجوم المكثف للحشرات يكون على النباتات المزروعة على حواف الحقول، وبالطبع فإن الحواف الخارجية تمثل نسبة كبيرة من الحقول الصغيرة بالمقارنة بالحقول ذات المساحات الكبيرة.

-الزراعة المبكرة أو المتأخرة والحصاد المبكر قبل تمام النضج (كما في حالة البطاطا) تؤدي إلى تفادي تعرض المحصول خلال فترة نموه النشط للأوقات التي يصل فيها تعداد الحشرات إلى أقصاه.

-استخدام المواد الطاردة للحشرات مثل شرائط الألومنيوم العاكسة وشرائط البولي إثيلين (السوداء أو الرمادية أو الشفافة) أو أي مهاد ملونة بين الخطوط يعمل على تقليل انجذاب الحشرات عندما يكون العرش النباتي مازال مفتوحاً، كما أن تغطية المهاد بالقش يجذب عموما الذباب الأبيض إليه (بسبب لونه) وتقتله الحرارة المنعكسة ليمثل وسيلة فعالة ضده.فإن فاعلية تغطية المهاد تعتبر مؤقتة حيث أنه مع نمو وتشابك النباتات فإنها تغطي سطح التربة، كما أنها تكون أقل فاعلية في حالة استمرار وجود السحب.

-استخدام المصائد اللاصقة(،Stickytraps)حيث تعلق شرائط البولي اثيلين الصفراء (المغطاة بمادة لاصقة) راسياً على الجوانب المواجهة للرياح فتقوم باصطياد حشرات المن وغيرها، وهذه أكثر كفاءة في بيوت الزراعات المحمية.

2.6.4.مكافحة النواقل الأرضية

تركزت مكافحة النواقل الأرضية من نيماتودا وفطريات على تعقيم التربة بواسطة بعض المواد الكيميائية بعد التعرف على أنواع النواقل باستعمال طرق التشخيص الجزيئي . فهناك العديد من الوسائل التي يمكن استخدامها في مكافحة النيماتودا مثل استبعاد وتجنب النيماتودا عن طريق الحجر الزراعي ، وزراعة نباتات خالية من تلك النواقل و إتباع الدورة الزراعية مع زراعة محاصيل ليست عوائل لهذه النواقل واستخدام بعض المبيدات الكيميائية ، ومكافحة الأعشاب العائلة وزراعة الأنواع النباتية المضادة للنيماتودا المستهدفة واستخدام بعض العوامل الحيوية المضادة للنيماتودا واستخدام محسنات التربة العضوية والأنواع النباتية المقاومة للنيماتودا (Barker &Koenning, 1998) ؛ (Satapathy, 1998)

7.4.استخدام أصناف نباتية مقاومة للفيروس

إن أعلى درجات المقاومة هو أن يكون الصنف ذا مواصفات تجارية مرغوبة وغير قابل للإصابة (منيع)، يليه استخدام نبات صنف أو أصناف تصاب بصعوبة ودون تأثير يذكر (مقاوم)، أو صنف يصاب ولكن تأثير الإصابة عليه يكون قليلاً (متحمل) .(يجب الوضع في الإعتبار أن للمقاومة أو القابلية للإصابة درجات مختلفة (عالية – متوسطة – قليلة). وترجع مقاومة النبات للفيروس إلى عدة عوامل مثل عدم مقدرة الفيروس على إحداث الإصابة، ومنع أو تأخير تضاعف الفيروس وتثبيط انتقال وتحرك الفيروسات داخل النبات ومقاومة النبات للناقل ولانتقال الفيروس منه (Jones, 1998)هناك نوع من المقاومة يطلق عليها الحساسية الزائدة(hypersensitivity) حيث يتميز النبات المعدي بمقدرته على حصر الإصابة الفيروسية في بقع محلية دون حدوث إصابة جهازية ، بالنسبة للمناعة فهناك بعض أنواع من اللفت

(*Brassicanapus*L) التي أظهرت مناعة ضد فيروس موزاييك اللفت (TuMV) وكذلك بعض أصناف الشعير ضد الإصابة بفيروس الموزاييك الأصفر للشعير(BaYMV).(Tomlinson & Ward, 1982)

8.4.لمحة عامة عن المقاومة الطبيعية للفيروسات في النباتات

اعتماداً على عدد الجينات المشاركة في توفير النمط الظاهري للمقاومة ، يمكن تصنيف مقاومة المضيف إلى أحادي الجين أو ثنائي المنشأ أو متعدد الجينات.العديد من أنواع المقاومة أحادية الجين ومولد ثنائي المنشأ نوعية بطبيعتها ، حيث تظُهر الأنماط الظاهرية الغياب التام لمسببات الأمراض في النبات المضيف. بينما تتجلى المقاومة متعددة الجينات في عدة جينات . موضع السمات الكمية (QTL)هو منطقة من الحمض النووي مرتبطة بنوع معين لسمة النمط الظاهري ، والتي تختلف في الدرجة ويمكن أن تعزى إلى التأثيرات متعددة الجينات ، أي ناتج اثنين أو أكثر من الجينات ، وتفاعلها مع البيئة. يمكن ربط العديد من QTLs بسمة واحدة .يتم تعيين QTLs بواسطة علامات وراثية باستخدام سلالات فطرية مأشوبة (RILs) مشتقة من تهجين بين الوالدين بنمطين ظاهريين متناقضين للمقاومة. يمكن أن يكون نمط وراثة سمة المقاومة سائداً أو متنحياً بطبيعته ونصف سمات مقاومة الفيروسات المعروفة حتى الآن متنحية بطبيعتها . تمنح جينات النبات R مقاومة لمسببات الأمراض النباتية بما في ذلك فيروسات النبات ويمنح كل جين Rمقاومة لنوع معين. أكثر من ٪80من جينات Rالتي تمت دراستها حتى الآن هي أحادية الجين بطبيعتها وثلث جينات R يتم تمييزها بعلامات وراثية جزيئية. يمكن أن تكون الجينات Rإما مهيمنة أو متنحية في الطبيعة. (باتيل و اخرون.2020)

9.4.المقاومة المشتقة من العوامل الممرضة وإسكات الحمض النووي الريبي

لاحظ الباحثون منذ فترة طويلة أن النباتات المحورة وراثيا التي تعبر عن الجينات مشتقة من مسببات الأمراض الفيروسية غالباً ما تظهر مناعة ضد العامل الممرض(لومونوسوف ، 1995).أدت هذه النتائج إلى فرضية أن التعبير خارج من الجينات المشفرة للبروتينات الفيروسية من النوع البري أو الطافرة يمكن أن تتداخل مع دورة الحياة الفيروسية(سانفورد وجونستون ، 1985).أظهرت دراسات أكثر حداثة أن هذه المناعة بواسطة *RNAi* . والذي يلعب دوراً رئيسياً في الدفاع المضاد للفيروسات في النباتات .كانت الآلية الجزيئية المفصلة لـ *RNAi* في الدفاع المضاد للفيروسات موصوفة في العديد من المراجعات الممتازة.(*Galvez et al*،2014 *Katoch and Thakur*2013 وانج وآخرون ، 2012).لقد أثبت تنشيط *RNAi*أنه نهج فعال للمقاومة الهندسية للفيروسات، (*Lindbo and Dougherty*2005، 2017 ؛*Lindbo and Falk*)، لأنها تعتمد على الآلات الخلوية المضيفة لإكمال دورة حياتها. معظم فيروسات النباتتحتوي على *RNA*أحادي السلسلة (*ssRNA*)كمعلومات وراثية. غالباً ما يؤدي الإفراط في التعبير

الجيني عن الحمض النووي الريبي الفيروسي إلى تكوين RNAالمزدوج الجيني بواسطة بوليميراز*RNA*المعتمد على الحمض النووي الريبي ، والذي يؤدي بدوره إلى تشغيل (*RNAi*) (*Galvez et al* ، 2014).

في السنوات الأخير، تم استخدام الأساليب الجزيئية مثل تداخل الحمض النووي الريبي (RNAi) و التحرير الجيني . تعتمد تقنيات تحرير الجينات على مبدأ إنشاء فواصل مزدوجة الشريطة (DSBs) في جين معين أو موضع الجينوم واستغلال آلية إصلاح الحمض النووي للمضيف. في الحمض النووي للمضيف ، يتم الإصلاح إما عن طريق الإصلاح الموجه بالتماثل (HDR) أو الانضمام غير المتماثل (NHEJ) . ينتج عن إصلاح الحمض النووي بواسطة (NHEJ)حذف و /أو إضافة عدد قليل من قواعد النوكليوتيدات ، مما يؤدي إلى بروتين مبتور أو تغييرات في تقارب ارتباط البروتينات أو الحمض النووي الريبي . تم توفير أدوات مختلفة بواسطة التكنولوجيا الحيوية الحديثة للتحكم في جينومات النبات. تعتمد تقنيات تحرير الجينات الشائعة الاستخدام على نوكلياز إصبع الزنك (ZFNs) و منشط النسخ مثل نوكلياز المستجيب (TALENs) وتكرارات متناغمة قصيرة متباعدة بشكل منتظم CRISPR-Casتم استخدام هذه التقنيات لعلم الجينوم الوظيفي ولتحسين المحاصيل(بالتيس و آخرون 2017.).

الخاتمة

من خلال الدراسة التي أجريت حول الفيروسات النباتية لدورها كمسبب رئيسي للأمراض النباتية تعرفنا على نشوء الفيروسات النباتية وما يوجد بداخلها من DNA أو RNA ومكونات أخرى نحميها محفظة بروتينية،تطرقنا إلي مختلف الأشكال والأنواع للفيروسات ،من خلال هذه الدراسة تعرفنا على أهم الأمراض الفيروسية التي تصيب النبات والمحاصيل الاقتصادية المهمة الذي ،يتم انتشارها بمختلف الوسائل أهمها الحشرات والتي تنقل العدوى بشكل كبير بين النبات المصاب .حيث نستطيع من خلال طريقة التشخيص الصحيحة معرفة إصابة النبات من سلامته ،التشخيص الصحيح يعتمد على عدت طرق و أهمها التي تتمثل في الاختبارات المصلية واختبارات الترسيب والتراس إضافة إلي الاختبارات المناعية وأكثرها دقة وشيوعا اختبار إليزا ELISA إضافة إلى اختبار الارتباط المناعي Dibaواختبار النسيج المناعي TBIA كما تم إضافة اختبارات أخرى تعتمد على الحمص النووي.

يجب حماية النباتات والمحاصيل الزراعية المهمة التي تضمن غذاء الإنسان وذلك بمكافحة الفيروسات النباتية وإتباع طرق الوقاية المختلفة والتي من خلال الدراسة تطرقنا إلى أهمها .

_بالتيس ، نيوجيرسي ، جيل . 2017. Humanes. J، Voytas، DF، هندسة الجينوم والزراعة: الفرص والتحديات. بروغ. مول. بيول. ترجمة. علوم.

_الحمادي، مصطفى، رمزي البديوي، فوزي أبو العباس، السيد عبد الرازق صادق وعبد العزيز عزام يوسف. 1995.طريقة مبسطة لإنتاج تقاوي بطاطس خالية من الأمراض الفيروسية تحت ظروف الحقل باستخدام البذور الحقيقية. مجلة اتحاد الجامعات العربية للدراسات والبحوث الزراعية. جامعة عين شمس، القاهرة، 13.

_الحمادي، مصطفى، رمزي البديوي، فوزي أبو العباس، السيد عبد الرازق صادق وعبد العزيز عزام يوسف1995.طريقة مبسطة لإنتاج تقاوي بطاطس خالية من الأمراض الفيروسية تحت ظروف الحقل باستخدام البذور الحقيقية. مجلة اتحاد الجامعات العربية للدراسات والبحوث الزراعية. جامعة عين شمس، القاهرة .

_الحمادي، مصطفي حلمي، جابر إبراهيم فجلة وحامد محمود مزيد.1976.الفيروس وأمراض النبات الفيروسية. دار المطبوعات الجديدة، الاسكندرية391 صفحة .

_د. على حسين حامد .2011.ابحاث في الامراض الفيروسية .قسم بحوث الفيروس والفيتوبلازما . معهد بحوث أمراض النباتات . مركز البحوث الزراعية.الجيزة بكالوريووس علوم زراعية . أمراض النبات.كلية الزراعة.

_الدسوقي أبو اليزيد عمار ،هاني محمد شتا.2008. طرائق إنتقال أمراض النبات الفيروسية والعوامل المؤثرة في وبائيتها. قسم الحشرات الاقتصادية والمبيدات، كلية الزراعة، جامعة القاهرة، الجيزة، مصر؛ جامعة ولاية أوهايو بالولايات المتحدة.

_الراوي، فرقد عبد الرحيم، فضل عبد المحسن الفضل، ورقيب عاكف العاني2001. .استخدام طرق تشريحية للكشف عن الفايتوبلازما وتحديد إنتشارها في بعض المحاصيل ونباتات الأدغال/الأعشاب في المنطقة الوسطى من العراق. مجلة وقاية النبات العربية، .19: 3-11.

_شوكت، عبد اللطيف بهجت1982. .فايروسات النبات. جامعة الموصل، الجمهورية العراقية. الصفحات: 165-182.

_الصالح، محمد على وإبراهيم محمد الشهوان.1996 استجابة أصناف مختلفة من أنواع القرعيات لعزلة من فيروس التبرقش الأصفر للكوسا (ZYMV). مجلة وقاية النبات العربية، 14: 10-14.

_العاني، رقيب عارف، محمد سعيد السامعي ومبشر صالح عمر.2003. تحديد وسط الزرع وتأثير مستخلص الحناءLawsonia inermis . في وسط الزراعة النسيجية على إنتاج نبيتات خالية من فيروس البطاطس/البطاطا Y.مجلة وقاية النبات العربية، 21: 90-95.

_العاني، رقيب عاكف، صالح حسن سمير وميسر مجيد جرجيس.1987. تشخيص ومكافحة تجعد أوراق التبغ. مجلة وقاية النبات العربية،5: 70-73.

_فجلة، جابر، يحيى الفحام ومرفت فتح الله.2007.فيروس موزاييك البرسيم الحجازى/الجت: مداه العائلي،
تنقيته، طرق انتقاله وتفاعلاته السيرولوجية. مجلة وقاية النبات العربية. 25: 71.

_قمري، صفاء غسان وخالد مكوك.1993. مقارنة كفاءة طرائق مختلفة من إختبار اليزا ELISA في الكشف عن فيروسي موزاييك البازلاء المنقول بواسطة البذور وتلون بذور الفول في عصارة نباتات العدس. مجلة وقاية النبات العربية، 11: 86-91.

_قمري، صفاء محمد غسان2002. دراسة الفيروسات المسببة للإصفرار Luteovirusesالتي تصيب البقوليات الغذائية الشتوية. أطروحة دكتوراه، قسم وقاية النبات، كلية الزراعة جامعة حلب، سورية. 230صفحة.

_مصطفى حلمي الحمادي وجابر ابراهيم فجلة وحامد محمود مزيد.2018 . الفيروس وامراض النبات الفيروسية الجزء والصفحة : 27_34 .

_المعاضيدي، مثنى عكيدي وحبيب شوكت عبد الله.2006. .وجود فيروسي البطاطا/ البطاطس في دغل/عشب كرز الأرض (Physalis wrighii Gray) في العراق. مجلة وقاية النبات العربية، 84-88. :24

_المعاضيدي، مثنى عكيدي، ميسر مجيد جرجس وزبير نورى سلمان2001. التخلص من بعض فيروسات البطاطا باتسخدام تقنيات العلاج الحرارى وزراعة أطراف البراعم. مجلة وقاية النبات العربية، 19: 35-39.

_مكوك، خالد محي الدين وصفاء قمري1996. .الكشف عن عشرة فيروسات تصيب المحاصيل البقولية بالإختبار المصلي لبصمة النسيج النباتي. مجلة وقاية النبات العربية.14: 3-9 .

_مكوك، خالد محي الدين ونوران عطار.2001.تأثير التخزين والمعاملة الحرارية في حيوية فيروس الموزاييك المخطط للشعير. مجلة وقاية النبات العربية، 54.

_مكوك، خالد وريما منسي1985. الحد من إنتشار فيروس موزاييك واصفرار الكوسى بواسطة المـّن إلى الخيار باستعمال زيت معدني. مجلة وقاية النبات العربية، 2.

_نبيل عزيز قاسم . فايروسات النبات .2011. الجزء والصفحة : ص 13-25 .القسم الزراعة. آفات وامراض النبات وطرق مكافحتها. امراض النبات ومسبباتها. الفايروسات والامراض التي تسببها للنبات .

_نبيل عزيز قاسم. فيروسات النبات .2011. طرق نقل الفيروسات النباتية. عدد الصفحات 534.الغلا للطباعة و النشر.

_Abo El-Nil, M.M. and F.W. Zettler. 1976. Natural occurrence of dasheen mosaic virus in Egyptian taro, Colocasia antiquorun. Plant Disease Reporter, 60: 281-285.

_ Brown, D.J.F., D.L. Trudgill and W.M. Robertson. 1996. Nepovirus transmission by nematodes. Pages 187-209. In: The Plant Viruses, Vol. 5: Polyhedral Virions and Bipartite RNA Genomes, B. D. Harrison and A. F. Murant (eds). Plenum Press N.Y.

_ Iyer LM, Balaji S, Koonin EV, Aravind L (2006). Evolutionary genomics of nucleo-cytoplasmic large DNA viruses. Virus Res.

_Abou-Jawdah, Y., H. Sobh, N. Cordahi, H. Kawtharani, G. Nemer, D.P. Maxwell and M.K. Nakhla. 2004. Immunodiagnosis of Prune dwarf virus using antiserum produced to its recombinant coat protein. Journal of Virological Methods, 121: 31-38.

_Abou-Jawdah, Y., K.H. Soubra and W.A. Shebaro. 1996. Evaluation of the reaction of tomato genotypes to tomato yellow leaf curl geminivirus in Lebanon. Phytopathologia Mediterranea, 35:91-99 .

_Adams, A.N. 1978. The detection of plum pox virus in Prunus species by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).Annals of Applied Biology, 90: 215–221.

_Agrios, G. N. 1978. Plant Pathology. Second Edition. Academic press. INC, Orlando, Florida. USA .

_Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. Florida, 922 LK. USA .

_Albrechtesn. S.E. 1997. Seed-borne viruses. (lecture notes) Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries. 34 pp.

_Almond, N., S. Jones, A.B. Heath and P.A. Kitchin. 1992. The assessment of nucleotide sequence diversity by the polymerase chain reaction is highly reproducible. Journal of Virological Methods, 40: 37–44.

_Al-Moudallal, Z., D. Altschuh, J.P. Briand and M.H.V. van Regenmortel. 1984. Compartive sensitivity of different ELISA procedures for detecting monoclonal antibodies. Journal of Immunological Methods, 68: 35-43.

_Avrameas, S. 1972. Enzyme markers: their linkage with proteins and use in immunhistochemistry. Histochemistry Journal, 47: 321–330.

_Baker, K.K., D.C. Ramsdell and J.M. Gillett. 1985. Electron microscopy: current applications to plant virology. Plant Disease, 69: 85–90.

_Ball, E.M. 1974. Serological tests for the identification of plant viruses. American Phytopathological Society Monograph. 31 pp.

_Banttari, E.E. and P.H. Goodwin. 1985. Detection of potato viruses S, X, and Y by enzymelinked immunosorbent assay on nitrocellulose membranes (dot-ELISA). Plant Disease, 69: 202–205.
_Bariana, H.S., A.L. Shannon, P.W.G. Chu and P.M. Waterhouse. 1994. Detection of five seedborne legume viruses in one sensitive multiplex polymerase chain reaction test. Phytopathology, 84: 1201–1205.
_Bock, K.R. 1982. The identification and partial characterization of plant viruses in the tropics. Tropical Pest Management, 28: 399–411.
_Candresse, T., G. Macquaire, M. Lanneau, M. Bousalem, L. Quiot-Douine, J.B. Quiot and J. Dunez. 1995. Analysis of plum pox potyvirus variability and development of strainspecifi c PCR assays. Acta Horticulturae, 386: 357–369.
_Candresse, T., M. Cambra, S. Dallot, M. Lanneau, M. Asensio, M.T. Gorris, F. Revers, G. Macquaire, A. Olmos, D. Boscia, J.B. Quiot and J. Dunez. 1998b. Comparison of monoclonal antibodies and polymerase chain reaction assays for the typing of isolates belonging to the D and M serotypes of plum pox potyvirus. Phytopathology, 88: 198–204.
_Candresse, T., R.W. Hammond and A. Hadidi. 1998a. Detection and identification of plant viruses and viroids using polymerase chain reaction (PCR). Pages 399–416. In: Control of plant virus diseases. A. Hadidi, R.K. Khetarpal and K. Koganezawa (eds.). APS Press, St. Paul, MN, USA.
_Chirkov, S.N., A.M. Olovnikov, N.A. Surguchyova and J.G. Atabekov. 1984. Immunodiagnosis of plant viruses by a virobacterial agglutination test. Annals of Applied Biology, 104: 477- 483.
_Clark, M.F. 1981. Immunosorbent assays in plant pathology. Annual Review of Phytopathology, 19: 83–106.
_Clark, M.F. and A.N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzymelinked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology, 34: 475– 483.
_Clark, M.F. and M. Bar-Joseph. 1984. Enzyme immunosorbent assays in plant virology. Pages 51–85. In: Methods in virology. K. Maramorosch and H. Koprowski (eds.). Academic Press, New York, USA.
_Cooper, J.I. and M.L. Edwards. 1986. Variations and limitations of enzyme-amplified immunoassays. Pages 139–154. In: Developments and applications in virus testing. R.A.C. Jones and L. Torrance (eds.). Association of Applied Biologists, Wellesbourne, UK.
_Derrick, K.S. 1973. Quantitative assay for plant viruses using serologically specific electron

microscopy. Virology, 56: 652–653.
_Dietzgen, R.G., J.E. Thomas, G.R. Smith and D.J. Maclean. 1999. PCR-based detection of viruses in banana and sugarcane. Current Topics in Virology, 1: 105–118.
_Dietzgen, R.G., Z. Xu and P.-Y. Teycheney. 1994. Digoxigenin-labeled cRNA probes for the detection of two potyviruses infecting peanut (Arachis hypogaea). Plant Disease, 78: 708–711.
_Edwardson, J.R., R.G. Christie, D.E. Purcifull and M.A. Petersen. 1993. Inclusions in diagnosing plant virus diseases. Pages 101–128. In: Diagnosis of plant virus diseases. R.E.F. Matthews (ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
_Eun, A.J.-C., M.-L. Seoh and S.-M. Wong. 2000. Simultaneous quantitation of two orchid viruses by the TaqMan real time RT-PCR. Journal of Virological Methods, 87: 151– 160.
_Eweida, M., H. Xu, B.P. Singh and M.G. Abouhaidar. 1990. Comparison between ELISA and biotin-labelled probes from cloned cDNA of potato virus X for the detection of virus in crude tuber extracts. Plant Pathology, 30: 623–628.
_ Farr, A.G. and P.K. Nakane. 1974. Immunohistochemistry with enzyme labeled antibodies: a brief review. Journal of Immunological Methods, 47: 129–144.
_ Fegla, G.I., I.A. El-Samra, K.A. Noaman and H.A. Younes. 1997. Host range, transmission and serology of an isolate of tomato yellow leaf curl virus from tomato of plastic. houses in northern Egypt. Proceeding of the 1st Scientific Conference of Agricultural Sciences, Faculty of Agriculture, Assiut University, Assiut, 1: 549-567.
_Fegla, G.I., I.A. El-Samra, H.A. Younes and M.H. Abd El-Aziz. 2000a. Optimization of dot immunobinding assay (DIA) for detection of tomato mosaic virus (ToMV). Advances in Agricultural Research, 5: 1495-1506.
_Fegla, G.I., Y.M. El-Faham, H.A. Younes and M.M. Fath-Allah. 2000b. Detection of alfalfa mosaic Alfamovirus in seeds, seed parts and seedlings of two alfalfa cultivars, Mansoura University Journal of Agricultural Sciences, 25: 7599-7609.
_Fegla, G.I., I.A. El-Samra, H.A. Younes and M.H. Abd El-Aziz. 2001. Comparative studies for detection of tomato mosaic Tobamovirus (ToMV), cucumber mosaic Cucumovirus (CMV) and potatoY Potyvirus (PVY). Journal of the Advances in Agricultural Research, 6: 239-253.
_Fegla, G.I., M.M. Fath-Allah and H.A. Younes. 2004. Alfalfa mosaic Alfamovirus in alfalfa floral parts, pods and seeds at different stages of development. Mansoura University Journal of Agricultural Sciences, 29: 4931-4939.
_Francki, R.I.B. 1980. Limited value of the thermal inactivation point, longevity in vitro and

dilution end point as criteria for the characterization, identification, and classification of plant viruses. Intervirology, 13: 91–98.
_Fridlund, P.R. 1980. Glasshouse indexing for fruit tree viruses. Acta Horticulturae, 94: 153–158.
_Frison, E.A., L. Bos, R.I. Hamilton, S.B. Mathur and J.D. Taylor. 1990. FAO/IBPGR technical guidelines for the safe movement of legume germplasm. Food and Agriculture Organization of the United Nations and International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy.
_Garger, S.J., T. Turpin, J.C. Carrington, T.J. Morris, R.L. Jordan, J.A. Dodds and L.K. Grill. 1983. Rapid detection of plant RNA viruses by dot blot hybridization. Plant Molecular Biology Reporter, 1: 21–25.
_Gould, A.R. and R.H. Symons. 1983. A molecular biological approach to relationships among viruses. Annual Review of Phytopathology, 21: 179–199.
_Graddon, D.J. and J.W. Randles. 1986. Single antibody dot immunoassay: a simple technique for rapid detection of a plant virus. Journal of Virological Methods, 13: 63–69.
_Hadidi, A., L. Levy and E.V. Podleckis. 1995 Polymerase chain reaction technology in plantvpathology. Pages 167–187. In: Molecular methods in plant pathology. R.P. Singh andvU.S. Singh (eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
_Hamilton, R.I., J.R. Edwardson, R.I.B. Francki, H.T. Hsu, R. Hull, R. Koenig and R.G. Milne.v1981. Guidelines for the identification and characterization of plant viruses. Journal ofvGeneral Virology, 54: 223–241.
_Hampton, R., E. Ball and S. De Boer. 1990. Serological methods for detection andvidentification of viral and bacterial plant pathogens. American PhytopathologicalvSociety, St. Paul, MN, USA.
_Harrison, B.D., X. Zhou, G.W. Otim-Nape, Y. Liu and D.J. Robinson. 1997. Role of a novel type of double infection in the geminivirus-induced epidemic of severe cassava mosaic in Uganda. Annals of Applied Biology, 131: 437–448.
_Hauser, S., C. Weber, G. Vetter, M. Stevens, M. Beuve and O. Lemaire. 2000. Improved detection and differentiation of poleroviruses infecting beet or rape by multiplex RTPCR. Journal of Virological Methods, 89: 11–21.
_Henson, J.M. and R. French. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. Annual Review of Phytopathology, 31: 81–109.
_Hewings, A.D. and C.J. D'Arcy. 1984. Maximizing the detection capability of a beet western yellows virus ELISA system. Journal of Virological Methods, 9: 131–142.

_Höltke, H.-J., W. Ankenbauer, K. Mühlegger, R. Rein, G. Sanger, R. Seibl and T. Walter. 1995. The digoxigenin (DIG) system for nonradioactive labelling and detection of nucleic acids: an overview. Cellular and Molecular Biology, 41: 883–905.
_Horvath, J. 1993. Host plants in diagnosis. Pages 15–48. In: Diagnosis of plant virus diseases. R.E.F. Matthews (ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
_Hourani, H. and Y. Abou-Jawdah. 2003. Immunodiagnosis of cucurbit yellow stunting disorder virus using polyclonal antibodies developed against recombinant coat protein. Journal of Plant Pathology, 85: 197-204.
_Hsu, H.T. and R.H. Lawson. 1991. Direct tissue blotting for detection of tomato spotted wilt virus in Impatiens. Plant Disease, 75: 292–295.
_Hu, J.S., D.M. Sether, X.P. Liu and M. Wang. 1997. Use of tissue blotting immunoassay to examine the distribution of pineapple closterovirus in Hawaii. Plant Disease, 81: 1150– 1154.
_Hughes, J.d'A. and L.A. Ollennu. 1993. The virobacterial agglutination test as a rapid means of detecting cocoa swollen shoot virus. Annals of Applied Biology, 122: 299–310.
_Jain, R.K., S.S. Pappu, H.R. Pappu, A.K. Culbreath and J.W. Todd. 1998. Molecular diagnosis of tomato spotted wilt tospovirus infection of peanut and other field and greenhouse crops. Plant Disease, 82: 900–904.
_James, D., P.A. Trytten, D.J. Mackenzie, G.H.N. Towers and C.J. French. 1997. Elimination of apple stem grooving virus by chemotherapy and development of an immunocapture RT-PCR for rapid sensitive screening. Annals of Applied Biology, 131: 459–470.
_Johansen, E., M.C. Edwards and R.O. Hampton. 1994. Seed transmission of viruses: current perspectives. Annual Review of Phytopathology, 32: 363–386.
_Jones, A.T. 1993. Experimental transmission of viruses in diagnosis. Pages 49–72. In: Diagnosis of plant virus diseases. R.E.F. Matthews (ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
_Köhler, G. and C. Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature (London), 256: 495–497.
_Kolber, M., M. Nemeth and P. Szentivanyi. 1982. Routine testing of English walnut mother trees and group testing of seeds by ELISA for detection of cherry leaf roll virus infection. Acta Horticulturae, 130: 161–172.
_Konaté, G. and B.J. Neya. 1996. Rapid detection of cowpea aphid-borne mosaic virus in cowpea seeds. Annals of Applied Biology, 129: 261–266.
_Konaté, G. and N. Barro. 1993. Dissemination and detection of peanut clump virus in groundnut seed. Annals of Applied Biology, 123: 623–627.

_Krawetz, S.A. 1989. The polymerase chain reaction: opportunities for agriculture. AgBiotech News and Information, 1: 897–901.
Kwok, S. and R. Higuchi. 1989. Avoiding false positives with PCR. Nature, 339: 237–238.
_Lange, L. and M. Heide. 1986. Dot immuno binding (DIB) for detection of virus in seed. Canadian Journal of Plant Pathology, 8: 373–379.
_Langer, P.R., A.A. Waldrop and D.C. Ward. 1981. Enzymatic synthesis of biotin-labelled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. Proceedings of National Academy of Sciences USA, 78: 6633–6637.
_Latvala, S., P. Susi, A. Lemmetty, S. Cox, A.T. Jones and K. Lehto. 1997. Ribes host range and erratic distribution with in plants of blackcurrant reversion associated virus provide further evidence for its role as the causal agent of reversion disease. Annals of Applied Biology, 131: 283–295.
_Leong, M.M.L., C. Milstein and R. Pannell. 1986. Luminescent detection method for immunodot, western, and southern blots. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 34: 1645–1650.
_Lin, N.S., Y.H. Hsu and H.T. Hsu. 1990. Immunological detection of plant viruses and mycoplasmalike organisms by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. Phytopathology, 80: 824–828.
_Makkouk K.M. and A. Comeau, 1994. Evaluation of various methods for the detection of barley yellow dwarf virus by the tissue-blot immunoassay and its use for virus detection in cereals inoculated at different growth stages. European Journal of Plant Pathology, 100: 71–80.
_Makkouk, K. M., H.T. Hsu and S. G. Kumari. 1993. Detection of three plant viruses by dotblot and tissue-blot immunoassays using chemiluminescent and chromogenic substrates. Journal of Phytopathology, 139:97-102

_Martelli, G.P. 1993. Leafroll. Pages 37–44. In: Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis. G.P. Martelli (ed.). ICVG/FAO, Rome, Italy.
_Martin, R.R., D. James and C.A. Le'vesque. 2000. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. Annual Review of Phytopathology, 38: 207–239.
_Mas, P., J.A. Sanchez-Navarro, M.A. Sanchez-Pina and V. Pallas. 1993. Chemiluminescent and colorigenic detection of cherry leafroll virus with digoxigenin-labeled RNA probes. Journal of Virological Methods, 45: 93–102.
_Matthews, R.E.F. 1980. Host plant responses to virus infection. Pages 297–359. In:

Comprehensive virology, vol. 16, virus-host interaction, viral invasion, persistence, and diagnosis. H. Fraenkel-Conrat and R.R. Wagner (eds.). Plenum Press, New York, USA.
_Maule, A.J., R. Hull and J. Donson. 1983. The application of spot hybridization to the detection of DNA and RNA viruses in plant tissues. Journal of Virological Methods, 6: 215–224.
_Maury, Y., C. Duby, J.M. Bossennec and G. Boudazin. 1985. Group analysis using ELISA: determination of the level of transmission of soybean mosaic virus in soybean seed. Agronomie, 5: 405-415.
_McLaughlin, M.R., O.W. Barnett, P.M. Burrows and R.H. Baum. 1981. Improved ELISA conditions for detection of plant viruses. Journal of Virological Methods, 3: 13–25.
_Milne, R.G. 1991. Immunoelectron microscopy for virus identification. Pages 87–120. In: Electron microscopy of plant pathogens. K. Mendgen and D.E. Lesemann (eds). Springer-Verlag, Berlin, Germany.
_Milne, R.G. 1993. Electron microscopy of in vitro preparations. Pages 215–251. In: Diagnosis of plant virus diseases. R.E.F. Matthews (ed.). CRC press, Boca Raton, Florida, USA.
_Minafra, A. and A. Hadidi. 1994. Sensitive detection of grapevine virus A, B, or leafroll associated III from viruliferous mealybugs and infected tissue by cDNA amplification. Journal of Virological Methods, 47: 175–188.
_Mullis, K.F., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 51: 263–273.
_Mumford, R.A. and S.E. Seal. 1997. Rapid single-tube immunocapture RT-PCR for the detection of two yam potyviruses. Journal of Virological Methods, 69: 73–79.
_Mumford, R.A., K. Walsh, I. Barker and N. Boonham. 2000. Detection of potato mop top virus and tobacco rattle virus using a multiplex real-time fluorescent reversetranscription polymerase chain reaction assay. Phytopathology, 90: 448–453.
_Nassuth, A, E. Pollari, K. Helmeczy, S. Stewart and S.A. Kofalvi. 2000. Improved RNA extraction and one-tube RT-PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extracts. Journal of Virological Methods, 90: 37–49.
_Navot, N., R. Ber and H. Czosnek. 1989. Rapid detection of tomato yellow leaf curl virus in squashes of plants and insect vectors. Phytopathology, 79: 562–568.
_Nolasco, G., C. de Blas, V. Torres and F. Ponz. 1993. A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtitre plate for the detection of plant viruses and subviral

pathogens. Journal of Virological Methods, 45: 201–218.
_Noordam D. 1973. Identification of plant viruses, methods and experiments. Centre forbAgricultural Publishing and Documentation, Wageningen, The Netherlands. 207 pp.
_Omunyin, M.E., J.H. Hill and W.A. Miller. 1996. Use of unique RNA sequence-specificboligonucleotide primers for RT-PCR to detect and differentiate soybean mosaic virusbstrains. Plant Disease, 80: 1170–1174.
_Ouchterlony, O. 1962. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis II. Progress in Allergy 6: 30–154.

_Bos, L. 1999. Plant Viruses: unique and intriguing pathogens, a textbook of plant virology. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands. 358 pp.

_Campbell, R.N. 1996. Fungal transmission of plant viruses. Annual Review of Phytopathology, 34: 87-108.
_Rochon, D'A., K. Kakani, M. Robbins and R. Reade. 2004. Molecular aspects of plant virus transmission by Olpidium and Plasmodiophorid vectors. Annual Review of Phytopathology, 42: 211-241.

_Fegla, G.I., E.E. Wagih, Y.M. El-Fahaam and H.A. El-Karyoni. 1990b. Thermotherapy of lettuce mosaic virus infected seeds. Journal of King Saud University, Agricultural Sciences, 2: 261-269.

_Fegla, G.I., E.E. Wagih, Y.M. El-Fahaam and H.A. El-Karyoni. 1990b. Thermotherapy of lettuce mosaic virus infected seeds. Journal of King Saud University, Agricultural Sciences, 2: 261-269.

_Fegla, G.I., Y.M. El-Fahaam, E.E. Wagih and H.A. El-Karyoni. 1990a. Occurrence of lettuce mosaic Virus in Alexandria and effect of infection on seed yield and transmissibility. Journal of King Saud University, Agricultural Sciences, 1: 93-103.

_Fegla, G.I., Y.M. El-Fahaam, E.E. Wagih and H.A. El-Karyoni. 1990a. Occurrence of lettuce mosaic Virus in Alexandria and effect of infection on seed yield and transmissibility. Journal of King Saud University, Agricultural Sciences, 1: 93-103.

_Hadidi, A., R.K. Khetarpal and H. Koganezawa (eds.). 1998. Plant Virus Diseases Control. APS Press St. Paul. MN. 684 pp.

_Hull, R. 2002. Matthews' Plant Virology, 4th ed. Acad. Press, N.Y. 1001pp.
Maule, A.J. and D. Wang. 1996. Seed transmission of plant viruses: A lesson in biological complexity. Trends in Microbiology, 4: 153-158.

_Johansen, E., M.C. Edwards and R.O. Hampton. 1994. Seed transmission of viruses: current prospects. Annual Review of Phytopathology, 32:363-386.

_Jones, A.T. 1998. Control of virus infection in crops though breeding plants for vector resistance. Pages 65-78. In: Plant Virus Disease Control. A. Hadidi, R.K. Khetarpal and H. Koganezawa (eds.). APS Press, St. Paul , MN., USA.

_Jones, A.T. 1998. Control of virus infection in crops though breeding plants for vector resistance. Pages 65-78. In: Plant Virus Disease Control. A. Hadidi, R.K. Khetarpal and H. Koganezawa (eds.). APS Press, St. Paul , MN., USA.

_Kawana, M.A.I. 2007. Viral diseases of faba bean in northern Egypt. PhD Thesis, Faculty of Agriculture, University of Alexandria, Egypt. 157 pp.

_Kawana, M.A.I. 2007. Viral diseases of faba bean in northern Egypt. PhD Thesis, Faculty of Agriculture, University of Alexandria, Egypt. 157 pp.

_Matthews, R.E.F. 1970. Plant Virology. 1st ed. Academic Press, New York. 778 pp .

_Matthews, R.E.F. 1991. Plant Virology. 3rd ed. Academic Press, London. 835 pp.

_Owens, R.A. and T.O. Diener. 1984. Spot hybridization for the detection of viroids andbviruses. Pages 173–189. In: Methods in Virology Vol. VII. K. Maramorosch and H.bKoprowski (eds). Academic Press, New York, USA.

_Palukaitis, P. 1984. Detection and characterization of subgenomic RNA in plant viruses. Pages 259–317. In: Methods in Virology Vol. VII. K. _Maramorosch and H. Koprowski (eds.). Academic Press, New York, USA.
Polston, J.E., P. Burbrick and T.M. Perring. 1991. Detection of plant virus coat proteins on whole leaf blots. Analytical Biochemistry, 196: 267–270.
_Roberts, C.A., R.A. Dietzgen, L.A. Heelan and D.J. Maclean. 2000. Real-time RT-PCR fluorescent detection of tomato spotted wilt virus. Journal of Virological Methods, 88: 1–8.
_Robertson, N.L., R. French and S.M. Gray. 1991. Use of group specific primers and the polymerase chain reaction for the detection and identification of luteoviruses. Journal of

General Virology, 72: 1473–1477.
_Rosner, A., R.F. Lee and M. Bar-Joseph. 1986. Differential hybridization with cloned cDNA sequences for detecting a specific isolate of citrus tristeza virus. Phytopathology, 76: 820–824.
_Rush, C.M., R. French and G.B. Heidel. 1994. Differentiation of two closely related furoviruses using the polymerase chain reaction. Phytopathology, 84: 1366–1369.
_Rybicki, E.P. and M.B. Von Wechmar. 1982. Enzyme-linked immune detection of plant virus proteins electroblotted onto nitrocellulose paper. Journal of Virological Methods, 5: 267–278.
_Sambrook, J., E.F. Fritsch and J. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
_Scott, S.W., P.M. Burrows and O.W. Barnett. 1989. Effects of plant sap on antigen concentrations calibrated by ELISA. Phytopathology, 79: 1175.
_Shalaby, A.A., M.K. Nakhla, A.M. Soliman, H.M. Mazyad, A. Hadidi and D.P. Maxwell. 2002. Development of a highly sensitive multiplex reverse transcription polymerase chain reaction (m-RT-PCR) method for detection of three potato viruses in a single reaction and nested PCR. Arab Journal of Biotechnology, 5:275-286.
_Singh, M. and R.P. Singh. 1995. Digoxigenin-labelled cDNA probes for the detection of potato virus Y in dormant potato tubers. Journal of Virological Methods, 52: 133–143.
_Singh, S. and H. Barker. 1991. Comparison of penicillinase-based and alkaline phosphatasebased enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of six potato viruses. Potato Research, 34: 451–457.
_Smith, G.R. and R. Van de Velde. 1994. Detection of sugarcane mosaic virus and Fiji disease virus in diseased sugarcane using the polymerase chain reaction. Plant Disease, 78: 557–561.
_Spiegel, S., E.A. Frison and R.H. Converse. 1993. Recent developments in therapy and virusdetection procedures for international movement of clonal plant germ plasm. PlantDisease, 77: 1176–1180.
_Sudarshana, M.R. and D.V.R. Reddy. 1989. Penicillinase-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of Virological Methods, 26: 45–52.

_Satapathy, M.K. 1998. Chemical control of insect and nematode vectors of plant viruses. Pages 188-195. In: Plant Virus Disease Control. A. Hadidi, R.K. Khetarpal and H.

Koganezawa (eds.). APS Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.
_Barker, K.R. and S.R. Koenning. 1998. Developing sustainable systems for nematode management. Annual Review of Phytopathology, 36: 165-205.

_Satapathy, M.K. 1998. Chemical control of insect and nematode vectors of plant viruses. Pages 188-195. In: Plant Virus Disease Control. A. Hadidi, R.K. Khetarpal and H. Koganezawa (eds.). APS Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.
_Barker, K.R. and S.R. Koenning. 1998. Developing sustainable systems for nematode management. Annual Review of Phytopathology, 36: 165-205.

_Sussman, Max; Topley, W. W. C.; Wilson, Graham K.; Collier, L. H.; Balows, Albert (1998). Topley & Wilson's microbiology and microbial infections. London: Arnold.
_Tenllado, F., I. Garcia-Luque, M.T. Serra and J.R. Diaz-Ruiz. 1994. Rapid detection anddifferentiation of tobamoviruses infecting L-resistant genotypes of pepper by RT-PCRand restriction analysis. Journal of Virological Methods, 47: 165–174.
_Torrance, L. and C.A. Dolby. 1984. Sampling conditions for reliable routine detection byenzyme-linked immunosorbent assay of three ilarviruses in fruit trees. Annals ofApplied Biology, 104: 267–276.
_van Regenmortel, M.H.V. 1982. Serology and immunochemistry of plant viruses. Academic Press, New York, USA.
_van Regenmortel, M.H.V. and M.-C. Dubs. 1993. Serological procedures. Pages 159–214. In: Diagnosis of plant virus diseases. R.E.F. Matthews (ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
_Walkey, D.G.A., N.F. Lyons and J.D. Taylor. 1992. An evaluation of a virobacterialagglutination test for the detection of plant viruses. Plant Pathology, 41: 462–471.
_Wesley, S.V., J.S. Miller, P.S. Devi, P. Delfosse, R.A. Naidu, M.A. Mayo, D.V.R. Reddy andM.K. Jana. 1996. Sensitive broad-spectrum detection of Indian peanut clump virus bynonradioactive nucleic acid probes. Phytopathology, 86: 1234–1237.
_Wetzel, T., T. Candresse, G. Macquaire, M. Ravelonandro and J. Dunez. 1992. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. Journal of Virological Methods, 39: 27–37.
_Younes, H.A. 1995. Studies on certain virus diseases affecting some vegetable crops under

green house conditions. Ph.D. Thesis. Faculty of Agriculture (Saba-Basha), Alexandria University, Egypt. 220 pp. Hadidi, A., R.K. Khetarpal and H. Koganezawa (eds.). 1998. Plant Virus Diseases Control. APS Press St. Paul. MN. 684 pp.

مذكرة لأجل شهادة الماستر في قسم البيولوجيا و علم البيئة النباتية

فرع العلوم البيولوجية
تخصص بيولوجيا و فيزيولوجيا التكاثر

مذكرة تخرج بعنوان:

دراسة حول الفيروسات النباتية والأمراض الناتجة عنها

الملخص

الفيروسات النباتية عبارة عن جسيمات صغيرة تحتوي على حمض نووي داخل محفظة بروتينية لها فيروسات مرافقة و تتواجد على عدة أشكال وأنواع مختلفة يتم تنقية الفيروسات النباتية لمعرفة خصائصها الفيزيائية والكيميائية. يصاب النبات بالفيروسات فيتحرك الفيروس ويتضاعف داخله، وينتقل من نبات إلى نبات آخر وينشر العدوى بطرق مختلفة. يتم تشخيص النبات المصاب بالعدوى بطرق مختلفة إما عن طريق الأعراض أو طرق الانتقال أو بالمجهر أو عن طريق الاختبارات المختلفة كال ELISA. يتم مكافحة انتشار العدوى أو الفيروس عن طريق الحجر الزراعي أو استخدام مواد خضرية خالية من الفيروس أو من خلال معاملات أخرى لتقليل الإصابة والحد منها.

الكلمات المفتاحية : الفيروسات النباتية، يصاب النبات بالفيروسات ، ينشرالعدوى ،مكافحة انتشار العدوى.

أعضاء لجنة المناقشة :

- **رئيسة اللجنة :** د.حمودة دنيا .أستاذة محاضرة قسم (أ) بجامعة الإخوة منتوري قسنطينة 1
- **المشرفة:** د. بوشيبي بعزيز نصيرةأستاذة محاضرة قسم (ب) بجامعة الإخوة منتوري قسنطينة 1
- **الممتحنة:** د. بوشوخ إيمان .أستاذة محاضرة قسم (ب) بجامعة الإخوة منتوري قسنطينة 1

من إعداد : بوقزيوة نبيل

العام الدراسي :2021-2020