مذكرة

علم الفيروسات العملي

اعداد :

أ – هلا الربيعة   أ – امل الموسى

اشراف د – نجوى عارف

الفهرس

- مقدمة
- نبذة عن المجهر الإلكتروني (*Electron Microscope*) .
- توجيهات عامة .
- اختبار المدى العوائلي لفيروسات النبات (*Host range*).
- زراعة وإكثار فيروسات النبات عن طريق الحقن الميكانيكي

  (*Mechanical Inoculation and propagation*).
- مظاهر الإصابة الفيروسية للنبات.

  1 – خارجية (*External*).

  2 – داخلية (*Internal*).
- الخواص الطبيعية للفيروس في العصير المصاب (*Physical*

  Properties in vitro).

1 – نقطة التخفيف النهائية *D.E.P(Dilution End Point)*.

2 – درجة الحرارة الفاقدة لنشاط الفيروس (*Termal*).

T.I.P. (Termal.Inactivation Point)

3 – مدة بقاء الفيروس *L.I.V*.

(Longevity in vitro, ageing)

- انتقال الفيروسات النباتية *(Plant viral us transmission*).
- تنقية الفيروس (*Virus Purification*).

- مورفولوجيا الفيروس (شكل وحجم الفيروس)

Morphology of Virus (Shape & Size)

- زراعة وإكثار فيروس الحيوان.

(Cultivation & Propagation of animal Virus)

- زراعة وإكثار فيروسات البكتريا

(Cultivation & Propagation of bacterial Virus)

المرجع : (كتاب فيروسات النبات)

د- عصمت خالد علام

د- السيد سلامة

د- رشيد عمر

الميكروسكوب الالكتروني:

هو عبارة عن ميكروسكوب جديد ذو قوة توضيح عالية أمكن بواسطته رؤية الأشياء الصغيرة جداً والتي قد يصل أبعادها إلى 100 انجستروم والتي لا ترى بالميكروسكوب الضوئي العادي.

يختلف هذا الميكروسكوب عن الميكروسكوب المضيء (العادي) في كثير من الخواص منها:

1. الميكروسكوب الالكتروني له قدرة عالية على التكبير تفوق مئات المرات القوة التوضيحية للميكروسكوب العادي ، حيث يستعمل في الميكروسكوب الالكتروني موجات الالكترونات ومجال مغناطيسي لإظهار الصورة ، بينما يستعمل في الميكروسكوب العادي موجات الضوء وعدسات زجاجية.
2. تحضر العينات المراد فحصها في الميكروسكوب الالكتروني كغشاء رقيق للغاية على شبكة نحاسية وتوضع داخل الميكروسكوب في مكان بين المكثف الممغنط والشيئية الممغنطة بالمقارنة بالمسرح في الميكروسكوب المضيء.

تركيب الميكروسكوب الالكتروني :

1. يستعمل في الميكروسكوب تيار الكتروني وحيث أن الهواء يعوق سير تيار الالكترونات لذلك فأن عمل الميكروسكوب الإلكتروني يكون في تفريغ تام ويقع مصدر الإلكترونات (الشمعة الإلكترونية *Electron gun*) في كثير من الميكروسكوبات الحديثة في أعلى الميكروسكوب.

2. يوجد مجال ممغنط كهربي أسفل مصدر إلكتروني مباشرة وكذلك يوجد

مكثف ضوئي *Condenser Lens* يركز تيار الإلكترونات على المادة المراد رؤيتها.

3. يلي ذلك وجود المسرح *Stage* توضع فوقه العينة المراد فحصها ويوجد أسفل المسرح مجال ممغنط مكهرب ثاني والذي يقابل العدسة الشيئية في الميكروسكوب العادي.

4. تسقط الصورة المتكونة في فراغ ثالث ممغنط والذي يقابل عدسات الميكروسكوب العارضة ، وفي قاع الفراغ توجد شاشة فلورسنت ومن فتحات جانبية بالميكروسكوب مركب عليها عدسات تكبير يمكن رؤية الصورة.

5. يوجد أسفل الشاشة ألواح حساسة للتصوير بحيث إذا أريد تصوير ما هو معروض على الشاشة يضغط على يد أو ضاغط فتتحرك الشاشة وتسقط الصورة على لوح حساس ويمكن طبع هذه الصورة المأخوذة على ورق خاص مع تكبيرها.

وكما هو معروف فان كمية الإلكترونات التي تنتشر وتسقط على الشاشة تتوقف على درجة تماسك جزيئات العينة ، فكلما زاد تماسكها تكونت على الشاشة صورة أوضح ، لذلك تستعمل طرق خاصة لتحضير العينات المراد فحصها.

بعض المقاسات المترية الهامة المستخدمة في صور المكروسكوب الالكتروني :

10^{-2} Cm

10^{-3} = M1 (mm)

$^{6-}10$ = u(micron)=um(micrometer)

$^{9-}10$ = nanometer(nm)=mu

$^{10-}10$ = Angestrom= A

توجيهات عامة في معمل فيروسات النبات:

حيث أن بعض الفيروسات تبقى خارج الخلية النباتية في حالة كمون لمدة طويلة وهذه يمكنها أن تنتقل عن طريق الاحتكاك البسيط بالنباتات لذلك لابد من الأخذ بالاعتبار بالعناية القصوى لتجنب هذا النوع من التلوث وعمل الاحتياطات اللازمة أهمها:

1. يجب تعقيم التربة المستخدمة لزراعة النباتات بالحرات الرطبة وهذه الطريقة من انجح الطرق للتخلص من الفيروسات الموجودة في التربة والتي قد تصيب النبات أثناء نموها. ومن أمثلة الفيروسات التي تنتقل عن طريق التربة بالاحتكاك الميكانيكي فيروس موزيك الدخان (*TMV*)
2. بالنسبة للبذور التي تزرع لابد من أجراء الاختبارات عليها حتى نتأكد من خلوها من الفيروس ، ويفضل الحصول على هذه البذور من نباتات سليمة أصلاً غير مصابة بالفيروس.

   ومن أمثلة الفيروسات التي تنتقل عن طريق البذور فيروس الفاصوليا وفيروس الكوسة.
3. يراعى ضرورة وضع النباتات في مكان معزول مثل الصوبة ، ولابد أن تكون نوافذ الصوبة المستخدمة في التهوية مغطاة بالسلك حتى نمنع دخول الحشرات وكذلك يلزم رش دوري للصوبة بالمبيدات الحشرية حتى نتخلص من أي حشرات داخل الصوبة (نظراً لانتقال الفيروسات عن طريق الحشرات)
4. لابد من مسح البنشات وغسل الأدوات بالماء والصابون ، ويفضل استخدام محلول 10% من ثلاثي فوسفات الصوديوم حيث يقوم بتثبيط نشاط الفيروس، وهذا يتم قبل عملية عدوى الفيروس (الحقن)

5. غسل الأيدي بالماء والصابون قبل وبعد عملية الحقن.
6. عند استخدام مادة الكاربورندام (*600mesh*) أثناء عملية الحقن لابد من تعقيمها.
7. يجب استخدام شاش معقم (لترشيح العصير الفيروسي).
8. أثناء تجهيز النبات للحقن يتم لمس والتعامل فقط مع النباتات المطلوب حقنها.
9. بعد حقن النباتات يجب عدم ملامسته لأي من النباتات السليمة أو الغير محقونة.
10. بعد الانتهاء من استخدام الأدوات يجب عدم تركها على البنش ويلزم تعقيمها كما سبق ذكره في خطوة (4).
11. يجب غسل الأهوان وحكها بعد الاستخدام للتخلص من بقايا الفيروس ثم تغسل بالماء والصابون ثم تعقم بالهواء الساخن.

المدى العوائلي للفيروسات

المدى العوائلي المستخدم لاختبار حساسية الفيروسات له يشمل مجموعات مختلفة من العائلات النباتية لها درجات استجابة مختلفة ترتبط بنوع الفيروس:

Species / cultivar	Age (days)	Stage of development
Beta vulgaris	20-25	2
Brassica pekinensis	20-25	4-5
Capsicum annuum	35	3
Chenopodium amaranticolor	28	3 well-developed
Chenopodium quunoa	28	4 well-developed
Crotalaria juncea	8	Cotyledons
Cucumis sativus	10	Cotyledons
Cyamopsis tetragonoloba	10	Cotyledons + first Undivided
Datura stramonium	22	2 well-developed
Glucine max	14	Cotyledons+1
Gompherna globosa	40-50	2-3 pairs
Helianthus annus	16	1 pair
Lycopersicon esculentum	21-28	2-3
Nicotiana benthamiana	35	3 well- developed
Nicotiana clevelandii	35	5-6
Nicotiana glutinosa	35	2 well- developed
Nicotiana occidentalis-37B	30	5
Nicotiana rustica	30	1 well- developed
Nicotiana tatacum		
"Samsun NN"	28-30	2 well- developed
" White Burley "	28-30	2 well- developed
Petunia hybrida	29	3 well- developed
Phaseolus vulgaris	10	2 primary
Physalis floridana	14(24)	2 (4)
Pisum sativum	13	2
Salanum melongena	30	2
Tertragonic expansa	28	8
Trifolium incarnatum	35	3-4
Vicia faba	14	1
Vigna unguiculata	10	2 primary
Zinnia elegans	24	2 well- developed

- All plants are grown in a glasshouse with an average temperature of 20C, All data are annul averages and may vary according to season.
- For Vigna unguiculata an average temperature of 23C is optimal; temperatures below 20C should be avoided.

زراعة وإكثار فيروسات النبات عن طريق الحقن الميكانيكي

المواد :

نبات دخان مصاب بفيروس الموزايك *tmv* ، هاون ،يد هاون ، شاش ، كؤوس زجاجية ، أنابيب اختبار ، شاش ، مسحوق الصنفرة ، عائل نباتي.

طريقة العمل : وتتم في أربع خطوات.

أ - استخلاص العصير.

ب ـ إعداد النبات السليم للحقن.

ت ـ اجراء عملية الحقن .

ث ـ وضع النباتات في الصوبة.

يجب قبل أجراء عملية الحقن كتابة البيانات على الأصيص وهي (اسم الفيروس ، تاريخ الحقن ، اسم المجموعة).

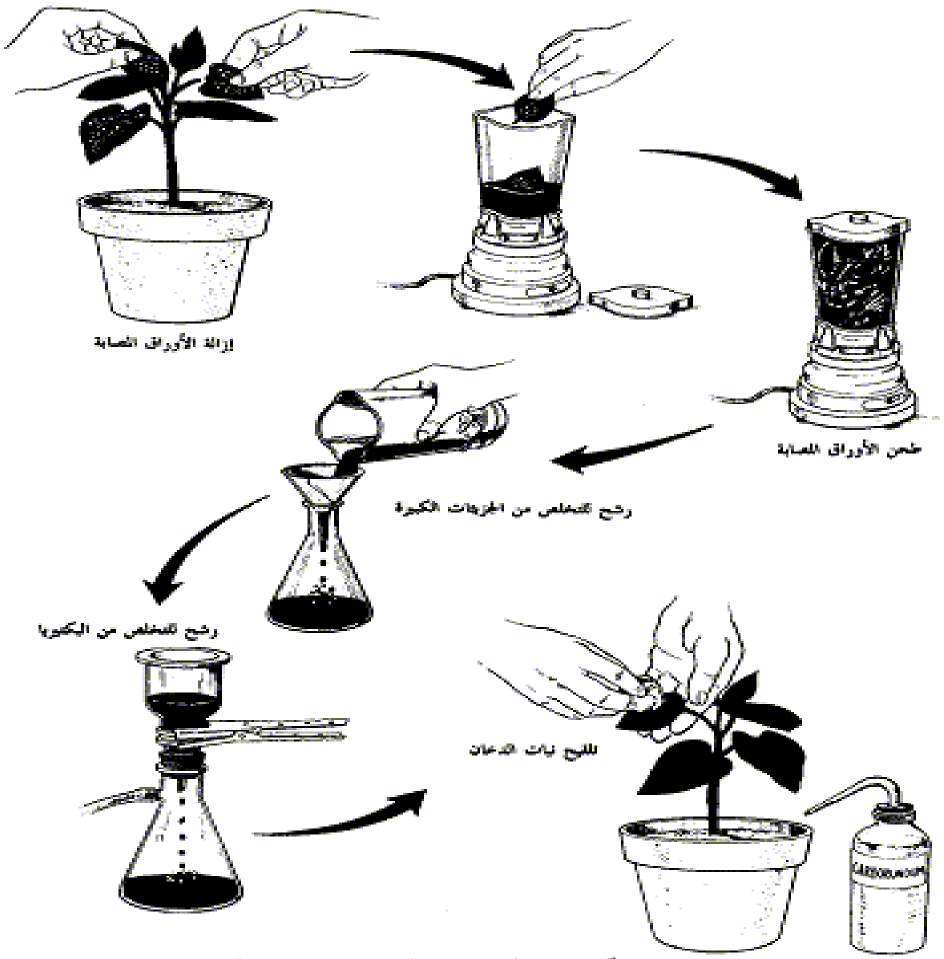
1 -يجهز العصير النباتي بواسطة هرس أوراق النبات المصاب في الهاون باستخدام المحلول المنظم *PH=7* بنسبة (1جرام من الأوراق : 5 مل من المحلول المنظم)

2 -يصفى العصير خلال طبقة أو طبقتين من الشاش ويستقبل العصير في كأس زجاجي.

3 -يرش سطح الأوراق بمسحوق الصنفرة ثم يدعك السطح العلوي للأوراق بشاش مشبع بالعصير المصاب (إحداث جروح يسهل التئامها).

4 -ترش الأوراق المحقونة بالماء بعد إتمام عملية الحقن .(لإعادة انتفاخ الخلايا بالماء)

5 ـتحفظ النباتات المحقونة في الصوبة مع متابعة ري النباتات وبداية ظهور الأعراض دورياً.



شكل (٢) : خطوات إحداث الإصابة بفيروس موزايك الدخان .

اسم الفيروس .... اسم العائل.................

تاريخ الحقن ....طريقة الحقن................

التاريخ	مظاهر الإصابة

التعليق :

مظاهر إصابة النبـات بـالفيـروس

Symptomatogogy

تنشأ مظاهر الإصابة بالفيروس نتيجة تغيرات في التفاعلات الكيميائية الطبيعية التي تأخذ مجراها في النبات.

وتنعكس إصابة النباتات بالفيروس في مظاهر إصابة أمكن تقسيمها إلى مظاهر خارجية تظهر على أجزاء النبات من الخارج وأخرى داخلية أي توجد داخل خلايا النبات.

أولاً :-

المظاهر الخارجية للإصابة symptoms

تختلف الأعراض التي تسببها الفيروسات للنباتات التي تصاب بها اختلافاً بيناً وتتأثر هذه المظاهر الخارجية بدرجة كبيرة بعدد من العوامل مثل الضوء والحرارة والرطوبة وعمر النبات عند حدوث العدوى ، ولهذا فمن الصعب تشخيص الفيروس المسبب عن طريق العرض الخارجي إذ لا يجب ربط عرض معين بفيروس معين.

وتعتمد الطريقة التي يتعامل معها النبات نتيجة الإصابة بالفيروس على مدى حساسيته لهذا الفيروس أو ذاك.

فبعض النباتات لا تتأثر بالفيروس إذ انها ذات درجة حساسية ضعيفة ولا تظهر مظاهر إصابة خارجية ويمكن في هذه الحالة التعرف على وجود الفيروس باستعمال نباتات حساسة للإصابة بالفيروس المذكور وتسمى مثل هذه النباتات (عوائل مشخصة) Indicator plants . وعلى عكس ما سبق مثل فإنه توجد نباتات حساسة جداً وتموت مباشرة بعد الإصابة . ويوجد بين هاتين الحالتين من الإصابة عديد من الحالات والتي فيها تختلف درجة القابلية أو درجة المقاومة

للإصابة.

ويمكن تقسيم مظاهر الإصابة الخارجية إلى الأتي :-

أولاً : التغير في اللون.

أ – الكلورسيس :- chlorosis

وتطلق على الاجزاء النباتية ذات المناطق الشاحبة ذات اللون الأخضر المصفر (توقف تكون البلاستيدات في بعض المناطق) وتسمى Mottling إذا كانت حواف هذه المناطق باهته غير محددة أي متداخلة . أما إذا كانت هذه المناطق أكثر استدارة وحوافها أكثر وضوحاً فيطلق عليها spotting .

ب – الموزيك :- Mosaic

توزيع منتظم لمناطق ذات شكل غير منتظم متبادلة الأخضر القاتم والفاتح أو المصفر محدداً على نصل الورقة (وهو اختلاف توزيع البلاستيدات في الورقة). وغالباً ما يرى التغير في اللون بوضوح في الأوراق العلوية من النبات الغير المسن ولزيادة الرؤية يجب تعريض الأوراق لضوء الشمس الغير مباشر وربما يتيسر لذلك بالتظليل باليد عليها أي يمنع عنها الضوء المباشر.

ج – الاصفرار :- Yellows

وفيه تتلون جميع أوراق النبات المسنه البالغة في اللون الأصفر (نتيجة هدم الكلورفيل المتكون) كما هو الحال في مرض اصفرار الخوخ.

د – زركشة الأزهار :- Varigation

قد يحدث نتيجة للإصابة ببعض الفيروسات انقسام في لون إزهارها كما هو الحال عند إصابة التيوليب بفيروس زركشة التيوليب أو إصابة البتونيا ببعض الفيروسات وكذلك في حال إصابة كثير من نباتات الزينة بالفيروس وتزيد هذه الإصابة من درجة تسويق الأزهار ولا تؤثر على صحة النبات.

Mosaic **Chlorosis**

Varigation

Ysellow

إرسمي واوصفي إصابة العينات التي أمامك وسجلي الفرق بينها :-

الكلورسيس chlorosis **الموزيك :- Mosaic**

زركشة الأزهار :- Varigation **الاصفرار :-Yellows**

ثانياً :- موت الأنسجة

أ- جهازي (في جهاز النبات)

1 - النيكروزيس Necrosis

يطلق هذا على حالات موت الخلايا والتي تظهر في صورة مناطق ميته تنتشر على جميع جهاز النبات المصاب وقد تظهر على الأوراق القمية فقط أو قد تنتشر على نصل الورقة باكمله . وقد تكون ذات شكل مثلث كما هو الحال في إصابة الشوفان بفيروس نيكروزيس الشوفان.

2 - Vein necrosis

قد تموت أجزاء من عروق الورقة ومن السطح السفلي.

3 - التخطيط Srteek

قد تأخذ الخلايا الميتة شكل خطوط قصيرة أو طويلة نوعاً متراصة بنية اللون على الساق في بعض النباتات كما هو الحال في مرض تخطيط الطماطم.

وقد يظهر التخطيط على الأوراق كما في حالة فيروس التخطيط في القصب ويكون على هيئة خطوط شفافة متجاورة ومتتالية.

4 - الحلقات الميتة Rings

وهي عبارة عن خلايا ميتة قد تكون دائرية أو حلقية ويظهر هذا العرض كحلقات دائرية تكون متداخلة مختلفة اللون (ذات لون اخضر فاتح أو اصفر مخضر) ومتحدة المركز وتظهر على أوراق الدخان المصاب بفيروس التبقع الحلقي.

ب - محلي (على الأوراق المحقونة فقط)

1 - النقط المحلية Local lesions

وهي عبارة عن خلايا ميتة تاركة نقط ميته مستديرة على الأوراق لها مركز وحافة . وتظهر هذه النقط على الأوراق المحقونة فقط بعكس مظهر النيكروسيس الذي يظهر على جميع أجزاء النبات وهي تحدد أماكن دخول الفيروس داخل الخلية المصابة

ومنها نوعان:

أ - بنية اللون   صفراء اللون

وتختلف في أحجامها فبعضها يبلغ عدة ملمترات والبعض الأخر بحجم رأس الدبوس.

Necrosis

Srteek

Rings

Local lesions

صفي مظاهر الإصابة على العينات التي أمامك وارسميها ودوني الفرق :-

تخطيط Streak

نقاط محلية Local lesion

نيكروسيس Necrosis

ثالثاً : التشوهات :-

هي نتيجة مباشرة للإصابة الفيروسية من حيث تأثيرها على نمو الخلايا أثناء نموها مما يؤدي خلل أثناء النمو من انحرافات في تركيب وفي شكل أجزاء النبات سواء أكان زيادة أو نقص في حجم الخلايا أو عدد الخلايا أو توقف الاستمرار في النمو، ومن الأمثلة ما يلي:-

1 -التفاف الأوراق : Leaf rool

وفيه تلتف أوراق النبات المصاب حول نفسها أو تلتوي حوافها إلى أعلا أو إلى أسفل إلى أن تتقابل الحافتين ، كما هو الحال في مرض التفاف أوراق البطاطس.

2 -انحناء الأوراق : Leaf curve

وفيه تنحني الحواف بدرجة بسيطة إلى الأعلى ا والى أسفل.

3 - تجعد سطح الأوراق : Leaf crinkling

وفيه يظهر سطح الورقة غير مستوي و غير أملس مجعد كما هو الحال في الإصابة بفيروس تجعد أوراق البطاطس.

4 - الأوراق الرفيعة الخيطية : Filiform shape

وفيه يظهر نصل الورقة ضيقاً رفيعاً حتى قد يصل إلى شكل خيط رفيع كالذي يظهر على نباتات الطماطم عند أصابتها بسلالة من فيروس الموزيك وهو اختزال كلي للنصل.

5 - نموات شاذة Enation

وهي نموات تظهر على السطح السفلي بجانب عروق الورقة أو قد تظهر على الساق على هيئة نموات طولية زائدة.

6 - تشوه قلف الساق : pitling

وهو إختلاف درجات النمو في خلايا الساق تؤدي إلى ظهور مناطق مرتفعة ومنخفضة في صورة مناطق غائرة.

7 – البثرات Blisters

وهي ذات لون اخضر قاتم تظهر مرتفعة على سطح الأوراق المصابة العلوية.

Leaf curve

Leaf rool

Blisters

Leaf crinkling

Filiform shape

صفي مظاهر الإصابة الخارجية على العينات التي أمامك وراسميها موضحة الفرق بينها:

تجعد الأوراق : Leaf crinkling

التفاف الأوراق : Leaf roll

نموات شاذة : Enations

الأوراق الرفيعة الخيطية :Filiform shape

البثرات : Blisters

الحلقات : Ring

4–شفافية العروق : Vein clearing

وفيه تأخذ عروق الورقة لوناً شفافاً سرعان ما يزول ببداية ظهور الموزيك وهي علامة مميزة لبداية ظهور الإصابة الفيروسية الجهازية وخاصة الموزايك.

Vein clearing

ثانياً:-

المظاهر الداخلية للإصابة :Internal Symptoms

تحدث تغيرات داخل النبات نتيجة للإصابة الفيروسية وتكون على نوعين:

1 - تغير طبيعة الأنسجة العادية والعضيات الداخلية الخلوية.
2 - إنتاج محتويات "أجسام " داخل الخلايا المصابة ذات طبيعة بروتينية ولا توجد في خلايا النباتات السليمة.

المحتويات الداخلية :

هذا النوع من التغير أكثر تمييزاً للأمراض الفيروسية إذ أن هذه المحتويات لا توجد مصاحبة لأي مرض معدي خلاف الأمراض الفيروسية وهي بدون شك نتيجة مباشرة للإصابة ببعض الفيروسات وهي احد أهم وسائل تشخيص الفيروسات سواء الحيوانية أو النباتية نظراً للشكل المميز لكل محتوى داخلي و الفيروس المسبب له .
ولا توجد مصاحبة للإصابة بكل الفيروسات بل أن بعض الفيروسات يسببها والبعض الأخر لم يكتشف تكوينه لمثلها وهي مميزة للفيروس الذي يسببها وتعتبر وسيلة من وسائل التشخيص.
وتتبع هذه الأجسام احد الأشكال الآتية :

1 -محتويات امورفية تسمى أجسام × وشكلها غير منتظم وأحيانا تكون ذات تركيب حبيبي.
2 -محتويات تشبه البلورات شكلها بلوري واضح وغير حبيبي.

وتوجد هذه الأشكال من الأجسام داخل النباتات المصابة إصابة جهازية.
وثبت أنها تحتوي على نسبة عالية من البروتين ويمكن رؤيتها بسهولة بالصبغ وباستعمال صبغات البروتين.
وتظهر الأجسام الامورروفيه متراكمة ككتل متلاحمة مميزة في السيوتوبلازم وهي ذات شكل مستدير أو بيضي وأحياناً مغزلي ولكن غالباً غير منتظم.

1 – فحص الأجسام البلورية لفيروس موزيك الدخان.

تجربة -1-

المواد والأدوات اللازمة :

نبات دخان مصاب وأخر سليم – موس حاد – شرائح زجاجية – ملقط – ميكروسكوب عادي.
طريقة العمل :
يمكن رؤية الأجسام البلورية للفيروس بوضوح في شعيرات أوراق النبات المصاب والتي عليها أعراض واضحة من الموزايك.

1 -بواسطة موس حاد يعمل سلخ بسيط في العرق الوسطي للسطح السفلي للورقة المصابة.
2 -يوضع السلخ باحتراس في ماء على الشريحة الزجاجية (حتى لا تتكسر الشعيرات) ثم تغطي بغطاء الشريحة.
3 -تفحص التحضيرات أولاً بالعدسة الصغرى والشعيرات التي تلاحظ بها المحتويات تفحص بتكبير اكبر.

في حالة الإصابة بفيروس موزايك الدخان يمكن مشاهدة منظر بلوره زجاجية بشكل سداسي في جميع خلايا الشعيرة المصابة أو في بعض الخلايا.

2 - صبغ المحتويات الداخلية الاامورفيه (أجسام ×) bodies × ذات الطبيعة البروتينية.

تعتبر المحتويات الداخلية للفيروسات من :
(الوسائل المشخصة للفيروسات فقط)
وهي تستجيب للصبغ بواسطة بعض الصبغات المختلفة التي من بينها صبغة التريبان . Trypan-blue

-طريقة الصبغ :

الأدوات : مشرط – ملقط – زجاجات ساعة – قطارات باستير – ما ء مقطر – شرائح – غطاء شرائح – زين – عينات مصابة – عينات سليمة للمقارنة .

-طريقة إعداد الصبغة :

Nac1 بتركيز 0.9% (وزن / حجم)

تريبان بلو.

تذاب 1 جم صبغة في 100 ملم من المحلول السابق ليعطي محلول أساسي مركز

يؤخذ منه لتحضير تخفيفات تتراوح بين 1:2000 – 5000 : 1 .

طريقة العمل :

1 -يتم عمل عدد من السلخات لطبقة الابيديرم في الأوراق المصابة من على السطح السفلي لها بحرص شديد أو من أعناق الأوراق أو السيقان وأحيانا الجذور.

2 -توضع السلخة في محلول كلوريد الصوديوم 0.9% لعدة ثواني في زجاجة الساعة المخصصة.

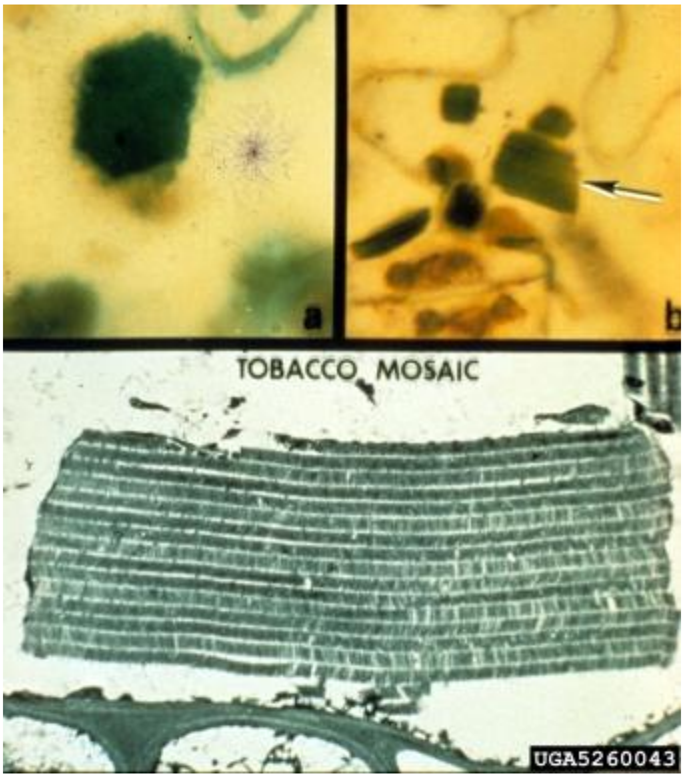
ملاحظة : يجب أن توضع على السطح الممزق وليس على طبقة الكيوتكل حيث أن الصبغة لا تخترق هذا الحاجز.

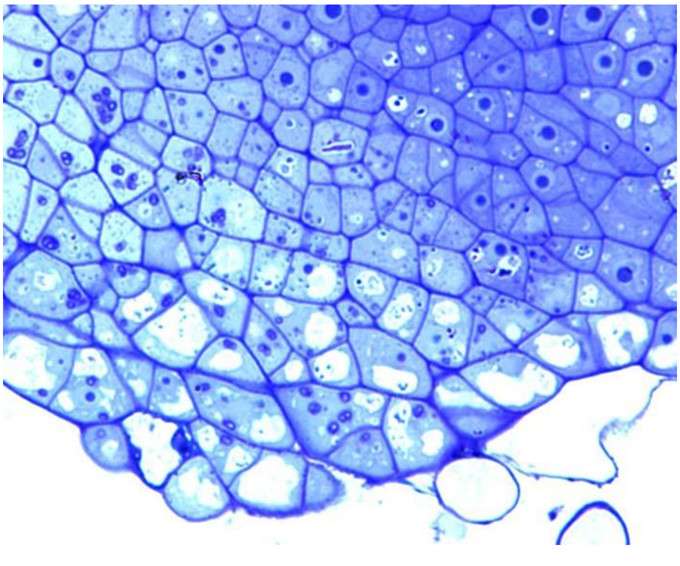
3 -تنقل بحرص ورفق السلخا إلى محلول الصبغة المحضر في زجاجة ساعة بلملقط ويترك لمدة 2 دقيقة.

4 -تغسل السلخات بمحلول Nacl 0.9% وتنقل بعد ذلك للفحص.

5 -تفحص العينات باستخدام المكير وسكوب الضوئي وباستخدام العدسة الزيتية (100×).

6 -أوصفي ما تشاهدينه من المحتويات الداخلية البروتينية وألوان المكونات المختلفة للخلية.





المحتويات الداخلية

الخواص الطبيعية للفيروس في العصير المصاب

الحساسية للعوامل الطبيعية

تختلف الفيروسات في العصير invitro في درجة تحملها للعوامل الطبيعية والكيماوية المختلفة ، واستغلت هذه الخلافات في تميز الفيروسات عن بعضها والتفرقة بين الفيروسات في مخاليطها.

أهم اختبارات الحساسية التي سوف تتم دراستها بإذن الله:

- تقدير أعلى نقطة تخفيف للعصير المحتوي على جزيئات الفيروس والذي يستمر في إعطاء الإصابة والتخفيف الذي يليه لا يعطي أصابه.
- تقدير درجة الحرارة التي تؤثر على الفيروس في العصير والتي عندها تفقده القدره على العدوى إذا ما عرض لها لمدة عشر دقائق.
- تقدير أطول فترة زمنية الذي يظل عندها العصير المصاب معدياً عند حفظه في درجة حرارة المعمل العادية.

ملاحظة :

قد يكون العامل الأساسي في عدم توافق التقديرات بالدقة الكافية هو الاختلاف في كمية جزيئات الفيروس الموجودة في العصير المصاب المحضر في أوقات مختلفة أو من عوائل مختلفة.

تقدير نقطة التخفيف النهائية

(Determination of the dilution end point)

تعريفها:

هي درجة التخفيف النهائية للعصير الفيروسي (بالماء أو المحلول المنظم) الذي بعده لا يعطي الفيروس أي إصابة.

حيث أن تركيز جزيئات الفيروس في العصير المصاب من العوامل المحددة للإصابة فعند درجة معينة من التخفيف بالماء أو المحلول المنظم تصبح الإصابة متعذرة وذلك نتيجة لقلة عدد جزيئات الفيروس التي تدخل الخلية وتحدث العدوى.

الأدوات المطلوبة :

أوراق مصابة بفيروس الدخان (tmv) ، عائل نباتي سليم ، هاون ،يدهاون، شاش، أنابيب اختبار مدرجة ، ماصات ، محلول منظم PH = 7

طريقة العمل :

1. يستخلص العصير الفيروسي المصاب كما سبق ذكره .
2. حيث يتم عمل سلسلة من التخفيفات للعصير باستخدام المحلول أو PH المتعادل كما يلي : ننقل 1 مل من العصير باستخدام الماصة إلى أنبوبة مدرجة تحتوي على 9 مل من المحلول المنظم وتخلط جيداً وبذلك يكون التخفيف (1 : 10) .

3. بواسطة ماصة ثانية ننقل 1 مل من الأنبوبة السابقة المخففة إلى أنبوبة تحتوي على 9 مل من المحلول المنظم وبالتالي نحصل على التخفيف (1 : 100) وهكذا نستمر في عملية التخفيف حتى نصل إلى التخفيف (1 : 10000).
4. بعد ذلك نبدأ نحقن النبات ميكانيكاً حيث كل تخفيف يحقن على ورقة من ورقات النبات العائل.
5. يوضع العائل النباتي المحقون في الصوبة.

النتيجة :
تظهر نقط محلية على الأوراق المحقونة ، ويختلف عدد النقط المحلية باختلاف التخفيف.

ملاحظة :
تدون النتائج في جدول مع رسم بياني للتوضيح.

عدد النقط المحلية في كل تخفيف

اسم الفيروس.................... اسم العائل...................

تاريخ الحقن .... طريقة الحقن..................

التخفيف	عدد النقط المحلية في المكررات المختلفة				مجموع عدد النقط المحلية	المتوسط

التعليق :

تقدير درجة الحرارة الفاقدة لتأثير الفيروس

Thermal Inactivation Point

نقطة فقدان الفيروس لنشاطه الباثولوجي:

هي عبارة عن درجة الحرارة التي إذا ما تعرض لها الفيروس لمدة عشر دقائق فقد تأثيره على إحداث الإصابة .

وقد لوحظ أن درجة الحرارة المثبطة لكثير من فيروسات النبات التي تنتقل بالحقن الميكانيكي تقع عند درجة حرارة بين (55 – 75)م.

الأدوات المطلوبة :

أوراق مصابة بفيروس الدخان ، عائل سليم ، هاون ، يد هاون ، شاش ، أنابيب اختبار مدرجة ، ترمومترات.

طريقة العمل:

1. يتم تحضير عصير الفيروس كما سبق ذكره.
2. بواسطة الماصة ينقل 2 مل من العصير في 6 أنابيب اختبار.
3. تسخن الحمامات المائية وتضبط درجة الحرارة لها باستخدام الترمومتر عند (30 ، 50 ، 70 ، 80 ، 90 ، 100).

4. توضع كل انبوبة في حمام مائي ويلاحظ أن يكون سطح العصير في الأنبوبة منخفض عن سطح الماء في الحمام المائي حتى لا يترك جزء من العصير غير معرض لنفس درجة الحرارة الذي عرض له باقي العصير في الحمام المائي.
5. تترك الأنابيب لمدة عشر دقائق وبعد هذا الزمن ترفع الأنابيب مباشرة وتبرد تحت تيار مائي ثم تفرغ في زجاجة ساعة حتى تستعمل لحقن العائل.
6. تحقن أوراق نبات العائل (حيث تحقن كل ورقة من أوراق النبات بمعاملة واحدة أو كل نبات) ثم يوضع العائل بالصوبة وتدون النتائج.

النتيجة :

ظهور عدد من النقط المحلية على النبات العائل ، وتختلف عدد النقط باختلاف درجة الحرارة.

ملاحظة :

تدون النتيجة في جدول مع الرسم البياني .

عدد النقط المحلية

اسم الفيروس .... اسم العائل.................

تاريخ الحقن .... طريقة الحقن................

درجة الحرارة	عدد النقط المحلية (المكررات)			مجموع النقط المحلية	متوسط عدد النقط المحلية

التعليق :

تقدير مدة بقاء الفيروس نشطاً

Determination of Longevity in Vitro

تختلف الفيروسات اختلافاً كبيراً في مدة بقائها نشطة وهي في العصير فبعضها يحتفظ بنشاطه في العصير إذا ما حفظ في المعمل لمدة عام أو أكثر بينما يفقد البعض القدرة على العدوى إذا ما حفظ لقليل من الساعات أو الدقائق ، وترجع هذه الخلافات إلى حساسية الفيروس لعوامل الأكسدة.

ويمكن إطالة مدة بقاء الفيروس نشطاً إذا ما أضيف له مواد حافظة.

الأدوات المطلوبة:

نبات مصاب بفيروس الدخان ، عائل سليم ، هاون ، يدهاون ، شاش معقم ، أنابيب اختبار ، مواد حافظة (مثل الكلوروفورم وذلك لمنع نمو البكتريا أو الفطريات).

طريقة العمل :

1. يتم تحضير العصير كما سبق ذكره.
2. يوضع العصير في أنبوبة ثم يضاف له بضع نقط من الكلوروفورم.
3. بعد تحضير العصير مباشرة يحقن العائل من العصير المصاب ؟، ثم بعد 24 ساعة ، ثم بعد 72 ساعة ، ثم بعد 120ساعة.
4. يوضع العائل في الصوبة ثم تدون النتيجة.

النتيجة :

وصف مظاهر الإصابة مع كتابة تاريخ فقدان الفيروس لتأثيره المعدي.

مدة بقاء الفيروس نشطاً

اسم الفيروس..................... اسم العائل................

تاريخ الحقن .... طريقة الحقن................

المعاملة	مظاهر الإصابة

التعليق:

طرق انتقال الفيروسات النباتية

تنتقل الفيروسات النباتية كغيرها من مسببات الأمراض عن طريق نواقل حية مثل الحشرات وغيرها من طرق نقل أخرى بيولوجية مما يعطي لها صفة الانتشار والاستمرارية في البيئة.

أهم وسائل انتقال الفيروسات:

1 - الانتقال عن طريق التكاثر الخضري:

تعتبر هذه الطريقة ذات أهمية كبيرة في النباتات التي تتكاثر خضرياً مثل البطاطس والقلقاس والموز .... الخ ومن أمثلة الفيروسات التي تنتقل بهذه الطريقة فيروس التفاف أوراق البطاطس.

2 - النقل الميكانيكي:

أ -الانتقال عن طريق التكاثر الخضري :

يتم نقل الفيروس نتيجة احتكاك ميكانيكي سواء الاحتكاك الناتج عن أوراق أفرع النباتات أو الناتج عن مرور الإنسان أو الحيوان بين النباتات السليمة والمصابة.

ب - النقل بالطرق الصناعية:

تستخدم هذه الطريقة لنقل الفيروسات من نبات مصاب إلى أخر سليم وذلك بغرض البحث والتي يتم فيها وضع عصارة النبات المصاب على سطح أوراق نبات سليمة وفردها بأحد أصابع اليد أو حتى بقطعة شاش ويلاحظ اشتراط تعفير الأوراق في العدوى الصناعية بواسطة الكاربورندم أو الرمل.

وهذه المواد تسبب إحداث جروح دقيقة تسهل دخول دقائق الفيروس خلال الجدار الخلوي وادمصاصها على سطح الغشاء البلازمي فتبدأ عملية دخول الجزئيات وحدوث العدوى.

3 - النقل بواسطة البذور وحبوب اللقاح :

تمثل الفيروسات التي تنتقل بالبذور نسبة ضئيلة إذا ما قورنت بكثير من وسائل النقل الأخرى.

ويصل الفيروس للبذور أثناء تكوينها في النبات (أي في حالة النبات المصاب نفسه أو بحبة لقاح قادمة من نبات مصاب وحاملة للفيروس) ، حيث ينتقل من حبة اللقاح إلى الجاميت أثناء عملية الإخصاب وتتكون بذرة حاملة للفيروس حتى ولو كانت محمولة على نبات سليم . كما في فيروس التخطيط الكاذب في الشعير.

4 - النقل بواسطة التطعيم :

بصورة عامة كل الفيروسات التي تسبب إصابة جهازية تنتقل بهذه الطريقة. وطرق التطعيم عديدة بعضها يصلح للنباتات العشبية والبعض الأخر لا يصلح.

ويعتبر التطعيم عموماً وسيلة فعالة لنقل الكثير من الأمراض الفيروسية التي لا يمكن نقلها بالوسائل الأخرى . ومن الفيروسات التي تنتقل بهذه الطريقة فيروس الفراولة وفيروس تخطط العروق وهناك أشكال مختلفة للتطعيم من أهمها : التي تعتمد أساسا على كون جزء من النبات مصاب بالفيروس المراد نقله ، حيث يطعم الجزء المصاب مع نبات سليم ويلف في أحيان كثيرة بجبيرة حتى يلتئم الجزان أو

الأعراض بالظهور . وهذه الطريقة تتم في الطبيعة أو عن طريق الإنسان لغرض الدراسة والبحث.

5 - النقل بالحشرات :

تعتبر الحشرات أهم مسببات نقل الأمراض الفيروسية في الطبيعة أي ما يقارب 94% من النواقل.

غير أن الحشرات بأنواعها المختلفة غير قادرة على نقل كل الفيروسات النباتية المعروفة ، وتعتبر رتبة Homoptera أهم رتبة حشرية مسئولة عن نقل الكثير من الفيروسات وتأتي حشرة المن Aphids في المرتبة الأولى بين حشرات هذه الرتبة حيث أنها الغالبية العظمى من الفيروسات النباتية . ويلي حشرة المن في المرتبة نطاطات الأوراق Leaf hoppers . ويتم النقل غالباً أثناء تغذية الحشرة على نبات سليم بعد أن تكون قد سبق لها التغذية على نبات مصاب وتتراوح العلاقة بين الفيروس والحشرة بمجرد نقل ميكانيكي خالص غير متخصص إلى حد كبير إلى حد وجود علاقة بيلوجية حقيقية لذلك فإن النقل بواسطة الحشرات تقسم إلى قسمين رئيسيين :-

1. النقل الغير مستديم (الغير باقي)

في هذه الطريقة تكتسب الحشرة الفيروس عند تغذيتها على النبات المصاب وتكتسبه بسرعة ومباشرة خلال دقائق من بدء التغذية أو حتى في ثواني . ولكنها تفقد القدرة على نقله أيضا بسرعة شديدة وتصبح حشرة غير معدية ي خلال دقائق أو أحياناً ساعات والواقع أن الفيروس والحشرة هنا لا تربطهما علاقة بيولوجية لذلك فدرجة

التخصيص ليست عالية ونقل الفيروس من نبات إلى آخر يكون نتيجة التصاق الفيروس بأجزاء فم الحشرة.

2. النقل المستديم (الباقي):

في هذه الطريقة لا تستطيع الحشرة أن تنقل الفيروس بمجرد التغذية على النبات المصاب ولكنها تحتاج إلى فترات حضانة قد تطول إلى أيام أو عدد طويل من الساعات ، تستطيع بعدها أن تنقل الفيروس من نبات إلى أخر وفي حالات كثيرة أمكن إثبات أن الفيروس يمر بدوره معينة خلال الأجهزة المختلفة الداخلية للحشرة قبل أن يعود مرة أخرى إلى فم الحشرة وتستطيع نقله أو تصبح معدية والمعروف أيضاً انه بعد فترة الحضانة هذه تظل الحشرة قادرة على نقل هذا الفيروس إلى مدة طويلة قد تمتد إلى بقية حياة الحشرة ، بل قد تنتقل بعض الحشرات الفيروس إلى البيض ومنه إلى الأجيال التالية ، ودرجة التخصص في هذه الحالة بين الفيروس والحشرة تكون عالية جداً ، وأيضاً من المعروف أن هذه الطريقة تتم إذا كانت الحشرة لا تتغذى على الطبقات السطحية من النبات ولكنها ترسل ممصات إلى المناطق الداخلية مثل اللحاء لامتصاص غذائها.

6 - النقل بواسطة النيماتودا:-

تعتبر ديدان من أهم ناقلات الأمراض الفيروسية في الطبيعة نظرا لأنها تعيش في التربة والفيروسات التي تنقلها تسبب أمراض تعرف بالأمراض المنقولة بالتربة وتفقد النيماتودا قدرتها على نقل الفيروس إذا جفت التربة لمدة أسبوع ومن أهم أجناس النيماتودا:-

1- ***Trichodorus*** sp

2- ***Longidorus*** sp

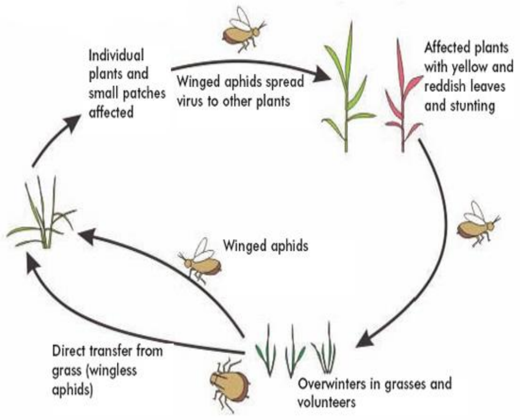
7 - النقل بواسطة النباتات المتطفلة :-

من أمثلتها نبات الحامول الذي يتطفل على أكثر من نبات ويكون وسيلة لنقل الفيروس من نبات مصاب إلى آخر سليم .

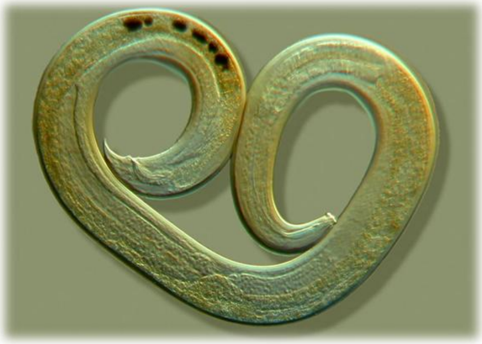
8 - النقل بواسطة الفطريات :-

تعتبر بعض الفطريات ذات أهمية كبيرة في نقل العديد من الفيروسات ومن أشهرها في هذا الصدد ***Olpidium brassicae*** الذي يصيب المجموع الجذري للعديد من النباتات وهذا الفطر هو أول فطر تثبت علاقته بفيروس موت أنسجة مثل النقل بالنيماتودا يعرف بالنقل الأرضي ولكن الفطريات تتميز عن النيماتودا بقدرتها على تحمل الجفاف لفترات طويلة لأنها تكون ابواغ تتحمل الظروف الصعبة والغير ملائمة لذلك تستخدم هذه الخاصية للكشف عن مسبب نقل مرض فيروسي من نبات إلى أخر عن طريق التربة للتفرقة بين الفطريات والنيماتودا كأداة لنقل الفيروسات.

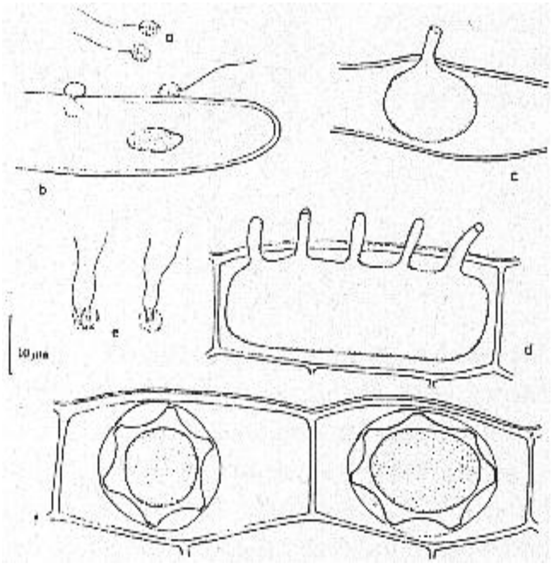
Aphids

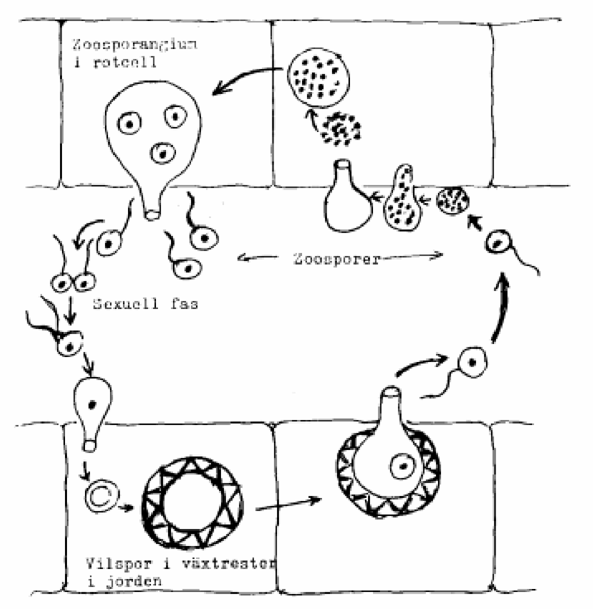


دورة حياة الحشرةالناقلة



النيماتودا





Olpidium brassicae

تنقية الفيروس

(Virus Punrification)

تعني عملية التنقية الحصول على جزيئات الفيروس بحالة منفردة وبتركيز عالي وعلى درجة عالية من القدرة على الإصابة.

ونظراً لارتباط الفيروس (الجزيئات الفيروسية) بالخلية دائماً فأنه يلزم للحصول على الفيروس استخلاصه من الخلايا النباتية في صورة معلق بالعصير النباتي .

ونظراً لكثرة البروتينات والأصباغ التي تتواجد في العصير النباتي يلزم أجزاء سلسلة من عمليات التنقية على العصير النباتي المحتوي على الجزيئات الفيروسية ، والهدف من عمليات التنقية هذه هو الحصول على جزيئات الفيروس منفردة مع المحافظة على فعاليتها في الإصابة وفي شكل خالص بقدر الإمكان عن المكونات التي لا تحدث إصابة وحتى يمكن الحصول على الجزيئات الفيروسية لابد من أجزاء العمليات اللازمة على المادة الفيروسية لاستنتاج خواصها الطبيعية والكيميائية.

ولتنقية جزيئات فيروس ما يراد دراسة خواصه الطبيعية أو الكيميائية يلزم الأجزاء الآتي :

1. اختيار العائل (Selection of host plant):

يجب قبل البدء في الدراسة أن يختار العائل الملائم للفيروس وذلك للحصول على العصير المحتوي على الفيروس (الجزيئات الفيروسية) التي ستجرى عليها عمليات التنقية.

وأهم الشروط الواجب توفرها في العائل هي :

- سهولة تكاثر النبات العائل.
- سهولة أجراء المعدوى فيه.
- وفرة الحصول الورقي.
- زيادة محتوياته من العصير.
- سهولة انتقال الفيروس داخل أنسجته المختلفة خصوصاً أنسجته الوعائية.
- خلوه من الصبغات القاتمة Dark Pigments التي تنتشر في العصير النباتي والتي تكون كثيراً مرتبطة مع الجزيئات الفيروسية ويصعب استخلاصها.
- خلوة من المثبطات inhibitors التي تؤثر في نشاط الفيروس خاصة بعد خروجها و استخلاصها من الخلية.
- خلوة بقدر الإمكان من البروتينات الغير نشطة ذات الجزيئات المتشابهة شكلا وحجما مع الجزيئات الفيروسية المراد استخلاصها مثل الريبوسومات.
- أن يحتوي على نوع واحد فقط من الفيروسات أي خالي من التلوث بفيروسات أخرى.

2-اختيار السلالة الفيروسية (Selection of Virus strain):

في حالات الفيروسات التي يكون لها أكثر من سلالة فيروسية يلزم قبل البدء في دراستها تحديد السلالة التي ستتجري عليها الدراسة . ويشترط في حالة اختيار السلالة الفيروسية توفر الشروط التالية :

- غزارة إنتاجها من الجزيئات الفيروسية أو بمعنى آخر سرعة تضاعفها داخل العائل النباتي حيث تختلف السلالات الفيروسية في سرعة زيادة تركيزها داخل الخلية.
- توفر الصفات التي تساعد على إجراء عمليات التنقية وعمليات الدراسة المختلفة عليها مثل مقاومتها للانحلال وثبات خواصها الطبيعية.
- ثباتها الوراثي Gemitic Stability والمقصود بذلك هو قدرتها على الاحتفاظ بصفاتها الوراثية بدون تغير أو حدوث طفرات أثناء فترة التنقية والدراسة.
- عدم ارتباطها بالبروتينات النووية للعائل أو الرايبوسومات أو بمعنى آخر سهولة تحضيرها حرة عن الجزيئات البروتينية التي لا تحتمل النشاط الفيروسي.
- قدرتها العالية على إصابة العوائل المختلفة وسرعة تكوينها لمظاهر الإصابة على العوائق التي تصيبها.

3- اختيار طريقة التنقية المناسبة (Selection of Purification method):

لتنقية الفيروسات عدة طرق مختلفة تعتمد في أساسها على كيمياء البروتين للحصول على تحضير متجانس أي يحتوي على مكون واحد كل على حده فيه مكونة من جزيئات موحدة التركيب الكيميائي بإتباع طرق تفصل أما المواد الغريبة وأما جزيئات الفيروس من المخلوط أو تفصل المخلوط إلى محتويات مختلفة والذي منها واحد أو أكثر يحتوي الفيروس .

وتشمل عمليات التنقية للفيروسات المختلفة النقاط الآتية:

1 ـاستخلاص العصير الخام المصاب المحتوي على الفيروس في نسيج العائل Extration.

2 ـترويق العصير المصاب Clarification.

3 ـالحصول على الفيروس Purification (ترسي وتجميع الفيروس)

وهناك قواعد مهمة يجب مراعاتها عند تنقية بروتين ما (بروتين الفيروس):

- معرفة درجة ثبات البروتين (الفيروس) لدرجات الحرارة المختلفة ولدرجات ال PH المختلفة.

في أي المذيبات (غير الماء) يمكن أن يترسب البروتين دون حدوث تغير ي خواصه الطبيعية والكيميائية.

أولاً :

- استخلاص العصير :

1. يتم وزن 1 جم من الأوراق المصابة المثلجة ثم يضاف لها 6 مل من المحلول المنظم وبذلك تكون النسبة (1 : 6).
2. تطحن الأوراق بالهاون .

يصفى العصير باستخدام الشاش المعقم ثم يوضع في أنبوبة الطرد المركزي ويراعى أن يكمل الحجم في أنبوبة الطرد إلى 6 مل من المحلول المنظم.

ثانياً :

- ترويق العصير :

1. يتم عمل طرد مركزي للأنبوبة السابقة عند 3000 لفة في الدقيقة لمدة 5 دقائق.
2. باستخدام الماصة ينقل الرائق من الأنبوبة إلى أنبوبة طرد أخرى ثم يضاف لها ½ مل من الكلوروفورم (مذيب عضوي) ثم يتم الرج الشديد لمدة 5 دقائق ، ثم يعمل لها طرد مركزي عند 3000 لغة في الدقيقة لمدة 5 دقائق مباشرة بعد الرج.

ثالثاً :ترسيب وتجميع الفيروس باستخدام أحد الطرق الكيميائية من أهمها:

طريقة التمليح (Salting out) .

أول من استخدم هذه الطريقة هو Stanly (1935) حيث تمكن من فصل فيروس موزيك الدخان على شكل بللوري باستخدام محلول كبريتات الأمونيوم 100% لما لها من تأثير طبيعي على البروتين حيث وجد أن الألبيومين يترسب عند تشبع 100% ، أما الجلوبيولين فيترسب عند تشبع 50% ، حيث يضاف إلى الراشح المحتوي على الجزيئات الفيروسية ويقلب لمدة 15 دقيقة ثم يترك فيحدث ترسيب لجزيئات الفيروس ، ثم يستبعد الراشح ويعلق الراسب في ماء ليكون محلول مرة أخرى ، ثم تكرر عملية إضافة محلول كبريتات الأمونيوم فيتكرر ترسيب جزيئات الفيروس الذي يمكن إعادة تعليقه و ترشيحه.

- إضافة كبريتات الأمونيوم المشبعة:

يتم تحضير كبريتات الأمونيوم المشبعة في حمام ثلجي.

1. باستخدام الماصة يتم نقل الرائق من الأنبوبة السابقة في عملية الترويق إلى أنبوبة طرد أخرى وعلى حسب حجم الرائق من العصير المصاب يضاف إليه نصف حجمه من كبريتات الأمونيوم المشبعة ثم تترك لمدة 24 ساعة في الثلاجة.
2. بعد هذه الفترة يتم عمل طرد مركزي عند 9000 لفة في الدقيقة لمدة 20 دقيقة.

3. بعد ذلك يتم التخلص من الرائق أما الراسب فيضاف له المحلول المنظم بكمية معلومة ويترك فترة ساعة حتى يعاد انتشار جزيئات الفيروس مرة أخرى في المحلول بعد ادمصاصها على سطح كبريتات الامونيوم ثم يعمل طرد مركزي عند 6000 لفة في الدقيقة لمدة 30 دقيقة.
4. المحلول الرائق الناتج هو عبارة عن فيروس نقي + كمية من أملاح الكبريتات .
5. يتم التخلص منها عن طريق الخاصية الأسموزية (الانتشار خلال الأغشية الشبه منفذة في المحاليل بأستخدام محلول منظم فوسفاتي ذو درجة PH متعادلة)

- **اختبار مدى كفاءة عملية التنقية في إصابة النبات:**

يتم توفير العائل المناسب ثم يتم حقنه ميكانيكياً بالفيروس النقي ثم يوضع في الصوبة وتدون النتائج.

ملاحظة :

هناك طرق طبيعية أخرى لترسيب جزيئات الفيروس وذلك باستخدام أجهزة الطرد المركزي فائقة السرعة والطرد المركزي ذو عمود الكثافة المتدرج من السكروز أو أملاح السيزيوم.

أشكال الفيروسات وقياس أحجامها

تنقسم أشكال فيروسات النبات إلى الأشكال التالية :

1 ـالشكل الكروي أو الدائري Spherical Shape .

2 ـالشكل العصوي Rod shape.

3 ـالشكل الخيطي Filament shape.

أمثلة على الفيروسات :

**** الفيروسات العصوية الصلبة:**

1 ـفيروس موزايك الدخان TMV

2 ـفيروس X البطاطس.

**** فيروسات عصوية مرنة (خيطية).**

1 ـفيروس Y البطاطس PVY

2 ـفيروس التفاف أوراق البطاطس PLRV

**** فيروسات كروية (متعددة الأوجه)**

1 ـفيروس موزيك الخيار CMV

2 ـفيروس موزايك الكوسة SqMV

– طرق قياس أبعاد الفيروس:

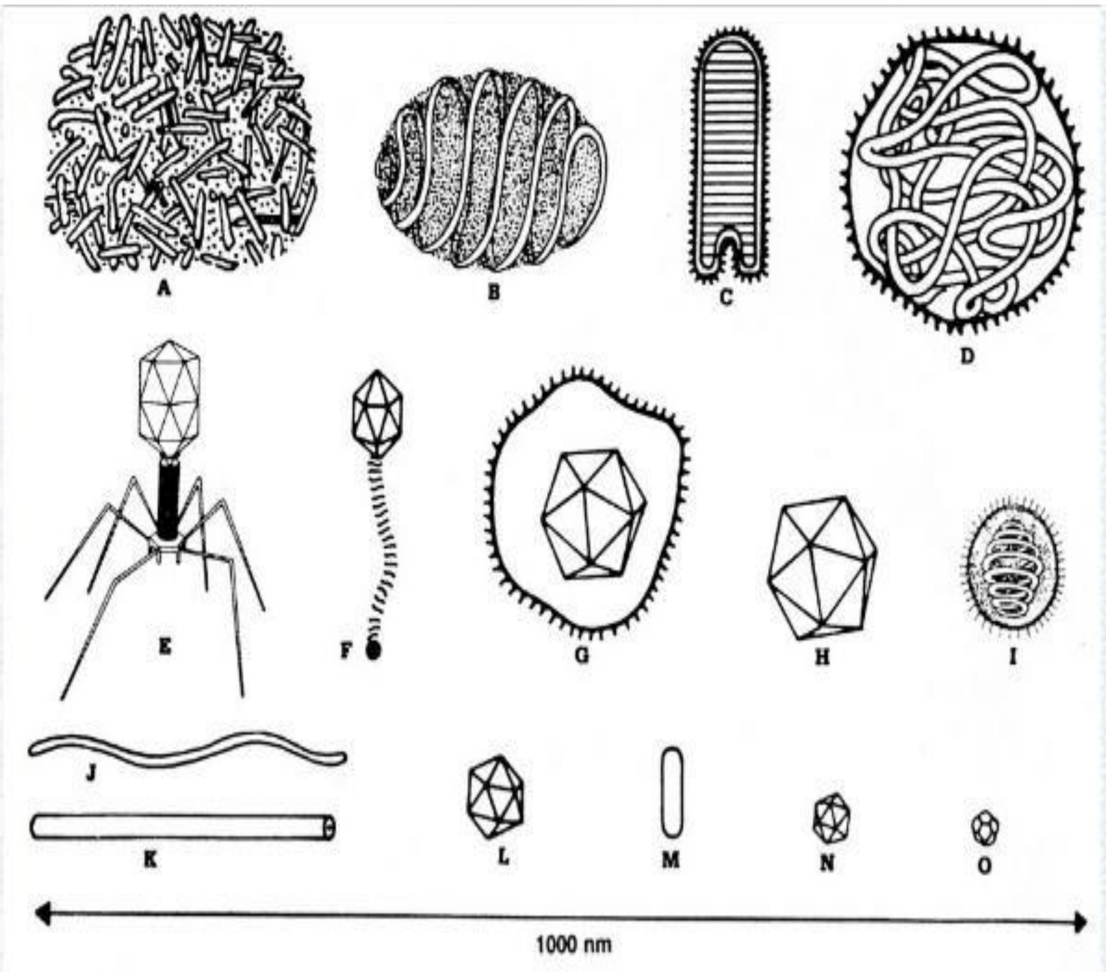
1 ـخيطي = الطول

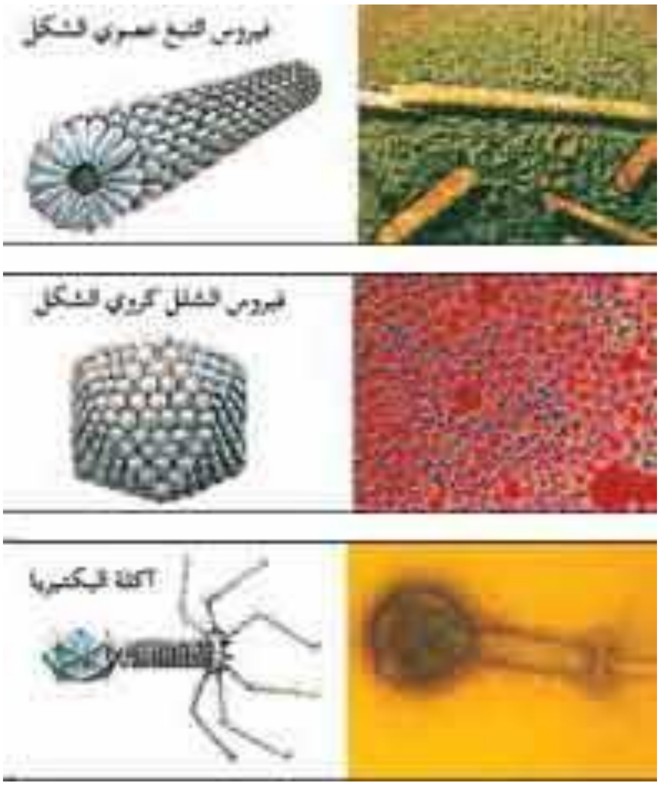
2 ـكروي = مجموع القطرين المتعامدين /2

3 ـعصوي = الطول × العرض.

– **يتم القياس بالملميتر** :

– القياس بالميكرون (Mµ) = الرقم الناتج × 1000 × 1000) / قوة التكبير.


A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
1000 nm


فيروس التبغ عصوي الشكل
فيروس الشلل كروي الشكل
آكلة البكتيريا

جدول يبين مقايس فيروس النبات

العدد	كروي	عصوي	خيطي
القياس	مل µ	مل µ	مل µ

فيروسات الحيوان
Animal Viruses

عزل فيروسات الحيوان :

هناك ثلاث خطوات رئيسية لعزل الفيروس من العينات المصابة :

1. جمع العينات:

توجد علاقة بين كل من الفيروس والعائل الذي يصيبه وهذه العلاقة ممثلة في الآتي:

- دخول الفيروس في نسيج العائل.
- انتشار الفيروس داخل الأعضاء.
- تركيز الفيروس في أماكن معينة من جسم العائل.

2-تدوين المعلومات الخاصة بالعائل (الحيوان) من حيث عمر الحيوان ، بداية ظهور الأعراض ، عدد الحيوانات المصابة ، طبيعة الأكل ، مكان الإصابة الأمصال واللقاحات التي أخذها الحيوان ومواعيد أخذها.

كذلك مكان تكاثر الفيروس داخل العائل ، ويتوقف ذلك على مواقع الاستقبال على الخلايا التي يدمص عليها الفيروس ، وكذلك على بعض الاحتياجات الخاصة يتضاعف جزيئات الفيروس في الخلايا.

- أمثلة لبعض الأمراض الفيروسية التي تصيب الحيوانات:

اسم الفيروس	المكان الذي تؤخذ العينة منه
الحمى القلاعية	السائل الليمفاوي للأنسجة المصابة
الطاعون البقري	الطحال ، بعض الغدد الليمفاوية ، الدم
النيوكاسل	المخ ، الغدد الليمفاوية في الأمعاء
جدري الطيور	البثرات على الجلد والأغشية المخاطية للفم والعين

3-تجهيز العينات للفحص ويجب ملاحظة الاتي :

- يفضل دائماً عند جمع العينات أن تكون من حيوانات حية مصابة لأن الحيوانات الميتة تكون تعرضت للتلوث بالبكتريا والفطريات.
- يفضل دائماً عند جمع العينات أن تكون من حيوانات حية مصابة لأن الحيوانات الميته تكون تعرضت للتلوث بالبكتريا والفطريات.
- وضع العينات في زجاجات معتمة كل عينة على حدة مع أحكام القفل.
- وضع عينات الفحص الهستولوجي في زجاجات معقمة محكمة الغلق تحتوي على 10% فورمالين.
- العينات المأخوذة على صورة سائل مثل الدم واللعاب والبول والإفرازات تحفظ كما هي في الزجاجات ، ويضاف إلى عينات الدم سترات الصوديوم أو مركب EDTA

خطوات تجهيز العينة:

1. تؤخذ العينة من المكان المفضل تواجد العائل فيه.
2. تؤخذ العينات التي تم جمعها في زجاجات معقمة إلى المعمل وتحفظ مباشرة في الثلاجة عند درجة حرارة – 20م لحين العمل عليها.
3. توضع العينة في هاون معقم بعد وزنها ثم يضاف لها بنفس وزنها رمل معقم أو مسحوق زجاج معقم ثم تهرس جيداً وذلك يتم تحت ظروف التعقيم.
4. يضاف إلى العينة محلول منظم بواقع 10 سم لكل 10 جم من العينة المهروسة مع التقليب للحصول على مستحلب.
5. تجري عملية الطرد المركزي عند 3000 لفة في الدقيقة لمدة عشر دقائق ثم يجمع الرائق في زجاجات معقمة ويضاف إليها بنسلين وستربتوميسين بنسبة 100 وحدة دولية و 100 مليجرام للعينة على التوالي.
6. من العينة السابقة يتم تلقيح المرق المغذي أو الأخبار المغذي ثم تحضن عند 37م لمدة 48 ساعة للكشف عن التلوث البكتيري.
7. يحفظ معلق الفيروس السابق في الفريز عند – 20 أو بالتجفيد.

ملاحظة

في حالة اخذ عينات الدم يضاف 1 سم من محلول 2% سترات الصوديوم ومحلول فسيولوجي لكل 9 سم من الدم ثم تحفظ في الثلاجة حتى يتم فصل البلازما ثم يعمل لها طرد مركزي عند 3000 لفة في الدقيقة لمدة 5 د ثم نأخذ الرائق ويضاف له مضادات حيوية ثم تحفظ.

زراعة الفيروس في جنين بيض الدجاج

Virus culture in Embryonation Chicken Eggs

الفيروسات متطفلة حتما ، ولقد كانت الطرق الأولى لتنمية الفيروسات المسببة للمرض للحيوان لأغراض الدراسة ، تستخدم إما العائل الطبيعي ، أو أحد الحيوانات المعملية الملائمة لزراعة الفيروسات . ولقد أظهرت الدراسات فيما بعد بخصوص زراعة فيروسات الحيوانات ، أن جنين الدجاج ، يمكن استخدامه لزراعة كثير من هذه الفيروسات ، ولما كانت الزراعة في جنين الطيور أكثر اقتصادية من الزراعة في حيوانات التجارب فقد استخدمت عادة في عزل وتعريف وتقدير أعداد ، وحفظ كثير من فيروسات الحيوان ، وأيضاً في إعداد اللقاحات المضادة لها . وفي هذا التدريب .. سوف تشاهد على أجنة الدجاج chick embryos فيروس مرض النيوكاسل الذي يصيب الدجاج.

طريقة العمل PROCEDURE

1 - ضع بيضتين محتويتين على أجنة في مواجهة الضوء باستخدام الشمعة الكهربائية ، بحيث يكون محوراهما الطوليان أفقياً ، ثم حدد وضع علامة على موضع الغرفة الهوائية للبيضة(شكل 1) .

عقم قشرة البيضة في منطقة الغرفة الهوائية ، وذلك بمسح المنطقة المعلمة بمحلول اليوم مع الكحول الذي أمامك . عقم إبرة مقاس   18 بغمسها في محلول قاتل

للميكروبات ، ثم تعريضها للهب ، واستخدامها في ثقب قشرة بيضة واحدة في أعلى نقطة من الغرفة الهوائية

تحذير: احرص على عدم ثقب الغشاء الموجود عند قاعدة الغرفة الهوائية . وفي الدراسات التي تجري في المعمل على أعداد كبيرة من البيض ، يستخدم ثاقب كهربائي لثقب القشرة.

2 - باستخدام حقنة سعة 1 مل وباستخدام إبرة مقاس 27 (2سم) ... لقح التجويف الأنتيوزي allantoci cavity بمعلق فيروس النيوكاسل المخفف الذي أمامك ، وذلك بإدخال الإبرة عمودية من خلال ثقب القشرة ، ثم إدخال كل طول الإبرة موازية للمحور الطول للبيضة ، ثم احقن 0.2 مل من المستحضر الفيروسي، ثم اسحب الإبرة وأغلق الثقب باستخدام مادة لاصقة duco cement أو شمع البرافين.

3 - كمقارنة ... احقن البيضة المخصبة الثانية بواسطة 0.2 مل محلول ملحي معقم مستخدما الخطوات 2.1 ن ثم أغلق الثقب أيضاً بالمادة اللاصقة أو شمع البرافين.

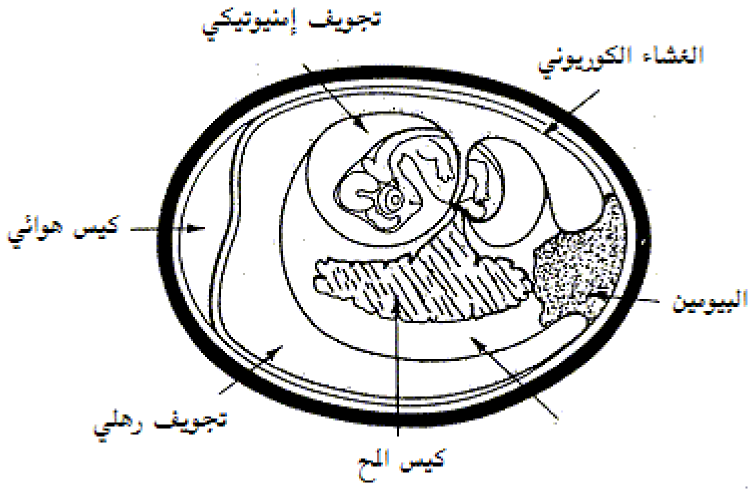
4 - حضن البيض على درجة 37^o في محضن يحتوي على صوان بها ماء للمحافظة على رطوبة الجو المناسبة.

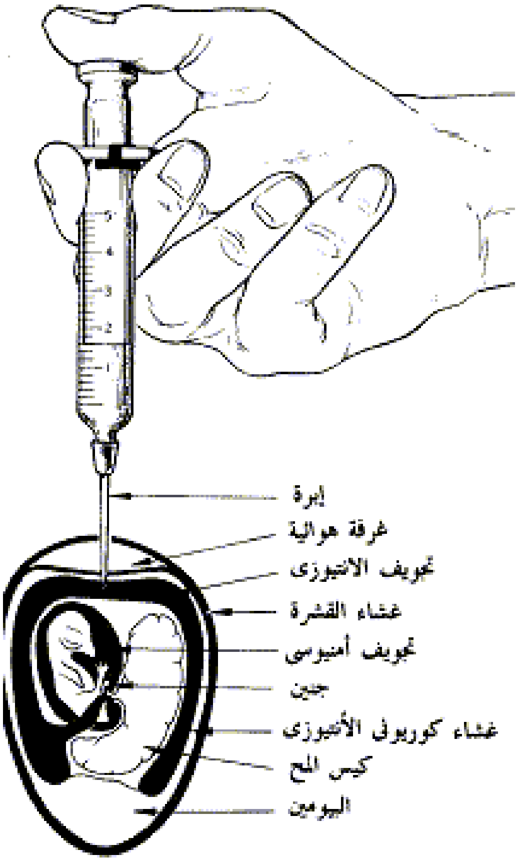
5 - افحص البيض الملقح تحت الضوء بواسطة الشمعة الكهربائية في الدرس العملي التالي ، وذلك بالنسبة لموت الجنين ، والذي يمكن التأكد منه بتوقف الحركة ، أو اختفاء العروق من قشرة البيض . ويسبب فيروس النيوكاسل

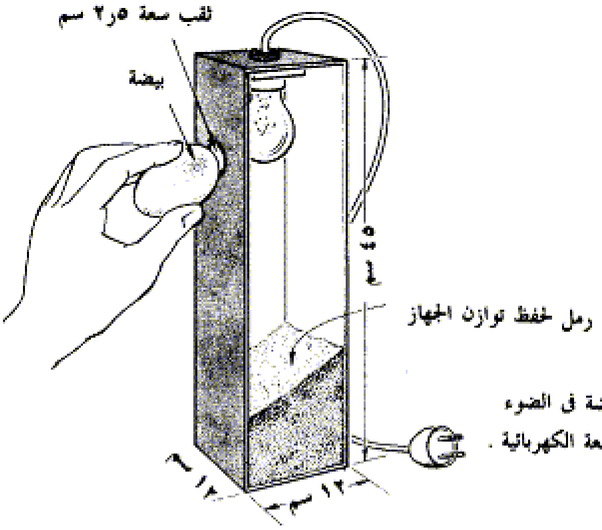
موت الجنين خلال 3 ، أو 4 أيام بعد التلقيح . إذا تأكدت من موت الجنين اكسر قشرة البيضة ، وقم بتفريغ محتوياتها في طبق بترى آخر . قارن شكل الجنين في الحالتين – لاحظ وجود أي علامات شاذة على جنين البيضة الملحقة ، مثل ... إصابات ، ووجود بقع ميتة ، ووجود نزيف دموي .

(ملحوظة : إذا حدث الموت خلال 24 ساعة من التلقيح ، فمعنى هذا أنه حدث بسبب إصابة بكتيرية ، وليس بسبب فيروس مرض النيوكاسل).

تحذير : اغسل جيداً بالماء والصابون بعد هذه التجربة . لا تلمس عينيك ؛ حيث أن فيروس النيوكاسل يمكنه أن يسبب التهابا لملتحمة العين conjunctivitis في الإنسان.







، : فحص البيضة فى الضوء
بواسطة الشمعة الكهربائية .

فيروسات البكتريا

BacterioPhage

تعتبر فيروسات البكتريا من المتطفلات إجبارياً على خلايا البكتريا وأكثرها تخصص وذلك لوجود تركيبات خاصة تساعدها على الادمصاص واختراق الجدار الخلوي مثل fibers، حيث يتم حقن الحمض النووي الخاص بالفيروس داخل الخلية البكتيرية ثم يتضاعف الفيروس بداخلها ويزداد تعداده بها . ويمكن رؤية الفاجات على البيئات الصلبة عن طريق تكوين مناطق خالية من النمو ، أما المزارع البكتيرية السائلة فتعمل البكتريوفاجات على إزالة التعكير من البيئة أو (تعمل على ترويق المزرعة السائلة).

عزل فيروسات البكتريا:

تختلف الفاجات على حسب الفلورا الطبيعية الموجودة في الوسط مثل (مياه الأنهار ، مياه المجاري ، براز الإنسان والحيوان ، التربة).

العينات المطلوبة للدراسة :

1. العزل من التربة (*Rhizobium* , *Azotobacter*).
2. العزل من المياه (*E, coli*).
3. العزل من اللبن الزبادي(*Streptococcus* , *lactobacillus*)..

طريقة العمل :

1. يتم تحضير 25 مل من بيئة مناسبة لإكثار البكتريا (مرق مغذي) في دورق حجمه 500 مل.
2. تلقح البيئة بالعينة المطلوبة للدراسة ، فمثلاً عينة التربة نوزن منها 1 جم ، أما مياه المجاري واللبن الزبادي فننقل منها 1 مل باستخدام الماصة المعقمة.
3. بعد عملية التلقيح يحضن الدورق عند 37م لمدة 24 ساعة على جهاز هزاز shaker.
4. بعد التحضين يترك الدورق في درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة حتى تترسب حبيبات التربة والشوائب وجدر البكتريا المتحللة.
5. ينقل الرائق باستخدام ماصة معقمة إلى أنبوبة الطرد المركزي ثم تتم عملية الطرد عند 7000 لفة في الدقيقة لمدة 30 دقيقة.
6. يتكون بعد عملية الطرد الراسب (pellet) (الجدر البكتيرية المتهتكة كبيرة الحجم) و (supernatant) الراشح (معلق فيه الفاج بالإضافة إلى ميكروبات صغيرة) يتم نقل الـ (supernatant) باستخدام ماصة معقمة إلى أنبوبة ويضاف لها كلوروفورم بنسبة 1 : 10 ويحكم غلق الأنبوبة (أي 1 مل من الكلورفورم إلى 10 مل من العينة) وترج جيداً لمدة 5 دقائق.
7. يتم عمل طرد مركزي للأنبوبة السابقة عند 3000 لفة في الدقيقة لمدة 10 دقائق ،

8. بعد عملية الطرد ينقل المعلق (الفاج) باستخدام ماصة معقمة إلى أنبوبة معقمة ويحفظ عند 4 م .

الكشف عن وجود الفاج

Spot test

أولاً : تحضير آل Base layer

الغرض من تحضير هذه البيئة هو إمداد الميكروبات بكمية كافية من المادة الغذائية.

1. تحضير بيئة أجار مغذي (500 مل) ثم تعقم ثم تبرد عند 45 م ثم تصب في أطباق بتري (من 30 إلى 40 مل في كل طبق) وتتم هذه العملية تحت ظرف التعقيم.
2. تترك الأطباق في درجة حرارة المعمل حتى تتصلب.

ثانياً : تحضير أل over layer

وهي عبارة عن بيئة نصف صلبة

1. يوزن 7 جرام من الاجار / لتر ثم تعقم بالحرارة الرطبة.
2. توزع هذه البيئة في أنابيب معقمة في كل أنبوبة 3 مل .
3. بعد تبريد البيئة تلقح كل أنبوبة ب 1 مل من معلق بكتيري ثم ترج بين راحتي اليد.
4. بعد ذلك تصب في الأطباق السابقة التحضير (Base layer) ويتم تحريك الطبق لتوزيع الـ (Over layer) بتجانس ثم تترك فترة حتى تتجمد.

ثالثاً : الكشف عن وجود الفاج :

1. توضع قطرة من معلق الفاج المراد الكشف عنه على الأطباق السابقة وتترك لمدة ربع ساعة في درجة حرارة المعمل حتى يحدث أد مصاص للقطرة.
2. تحضن الأطباق عند 37م لمدة 48 ساعة.
3. تحضن أطباق بدون تلقيح من معلق الفاج (كنترول) للمقارنة.
4. يكشف عن الفاج بتكون مناطق رائقة plaque.

طريقة أخرى للكشف عن الفاج : (قياس درجة التعكر):

1. نحضر أنبوبتين تحتوي على بيئة سائلة وتلقح بالميكروب المتخصص للفاج المراد الكشف عنه عن عمر 24 ساعة.
2. ثم تلقح أنبوبة واحدة ب 1 مل من معلق الفاج والأنبوبة الأخرى ب 1مل من ماء مقطر معقم (كنترول) للمقارنة.
3. تحضن الأنابيب عند 37 م لمدة 24 ساعة.
4. بعد التحضين توضع الأنابيب في جهاز قياس درجة التعكير ، وتسجل النتيجة.

النتيجة :

في حالة وجود الفاج البيئة تكون رائقة والعكس في حالة إضافة ماء معقم.

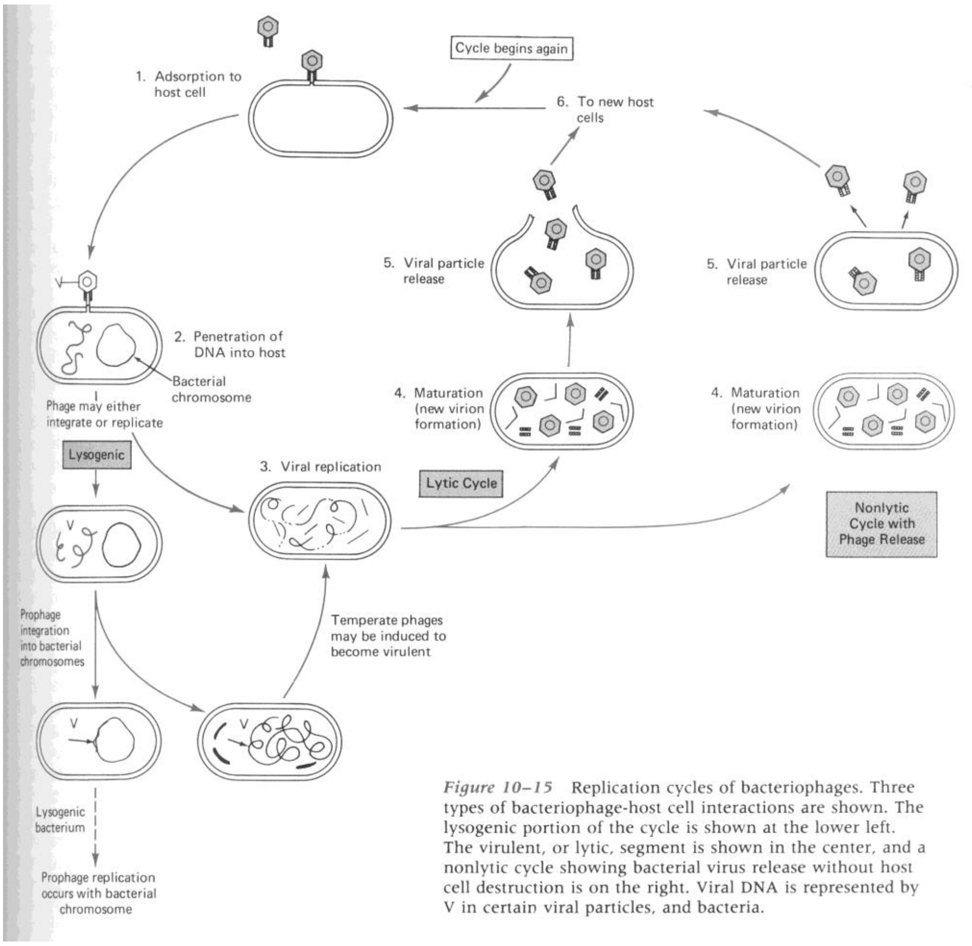
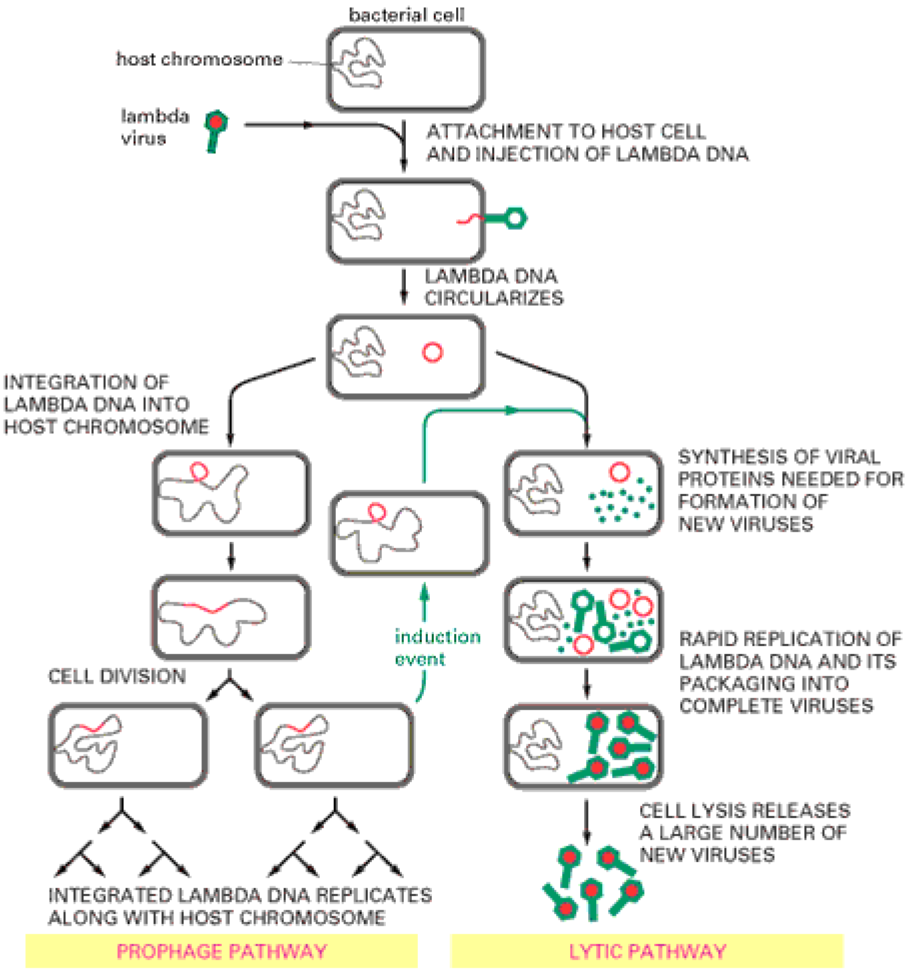


Figure 10–15 Replication cycles of bacteriophages. Three types of bacteriophage-host cell interactions are shown. The lysogenic portion of the cycle is shown at the lower left. The virulent, or lytic, segment is shown in the center, and a nonlytic cycle showing bacterial virus release without host cell destruction is on the right. Viral DNA is represented by V in certain viral particles, and bacteria.


bacterial cell
host chromosome
lambda virus
ATTACHMENT TO HOST CELL AND INJECTION OF LAMBDA DNA
LAMBDA DNA CIRCULARIZES
INTEGRATION OF LAMBDA DNA INTO HOST CHROMOSOME
SYNTHESIS OF VIRAL PROTEINS NEEDED FOR FORMATION OF NEW VIRUSES
induction event
RAPID REPLICATION OF LAMBDA DNA AND ITS PACKAGING INTO COMPLETE VIRUSES
CELL DIVISION
CELL LYSIS RELEASES A LARGE NUMBER OF NEW VIRUSES
INTEGRATED LAMBDA DNA REPLICATES ALONG WITH HOST CHROMOSOME
PROPHAGE PATHWAY
LYTIC PATHWAY

تم بحمد الله
إن أصبت فمن الله
وان أخطأت فمن نفسي والشيطان

هلا الربيعة