

الفصل الأول

تطور علم الفيرويد

مقدمة:

إن اصطلاح فيرويد Viroid إستعمل ليدل على مجموعة من المسببات المرضية الجديدة والمميزة والتي هي أصغر من الفيروس Subviral. تتكون الفيرويدات المعروفة من وحدة قصيرة من سلسلة الحمض النووي RNA ذات وزن جزيئي يقارب ٧٥ - ١٠٠ ألف دالتون. عند دخول هذه الوحدات من RNA ذات الوزن الجزيئي المنخفض في عوائل قابلة للإصابة يحدث لها تضاعف بشكل واضح وتسبب امراضاً في العائل.

لقد ذكر اول إستعمال لكلمة فيرويد سنة ١٩٧١ وذلك أثناء المحاولات التي كانت تجرى لتنقية ومعرفة صفات العامل المسبب لمرض الدرنة المغزلية في البطاطس والذي كان يعتقد خطأ بأنه يتسبب عن فيروس. ففي سنة ١٩٦٧ ذكر كلاً من Diener & Raymer أن المسبب المعدى لهذا المرض هو عبارة عن خيط حر من الحمض النووي RNA وأن هذه الأجزاء الفيروسية (حسب ذلك الاعتقاد) يبدو أنها لا تتواجد في النسيج المصاب. وبعد فترة من الزمن وعند إستعمال طرق الترسيب والتحليل بالعزل الكهربائي في الجيل، فإنه تقرر وبشكل قاطع وحاسم أن هذا الحمض المعدى من آل RNA له وزن جزيئي صغير جداً، وبالتالي فإن هذا العامل المسبب للمرض يختلف وبشكل أساسي عن الفيروسات المتعارف عليها.

بعد أن تأكد بأن مرض الدرنة المغزلية فى البطاطس يتسبب عن عامل يختلف عن الفيروس ولكن كان فيه إلتباس مع الفيروس أطلق عليه العالم Diener اسم فيروس (قريباً من لفظ فيروس). ثم بعد ذلك تبين فى سنة ١٩٧٢ و ١٩٧٣ أن هناك امراضاً أخرى مثل تقزم الاقحوان *Chrysanthemum stunt* ومرض اكسوكورتز الحمضيات *Citrus exocortis* تتسبب عن الحمض النووى RNA ذو وزن جزيئى منخفض وسميت المسببات لتلك الأمراض فيروسيدات.

أدلة وجود الفيروسيدات Evidence For Existance of Virods.

١ - الصفات الترسيبية والحساسية لأنزيم نيوكليبيز:

لقد أظهرت الأبحاث المبكرة التى أجريت على المستخلص الخام من أوراق البطاطس أو الطماطم المصابة بمرض الدرنة المغزلية، أن معظم المواد المعدية ترسب على معدل بطيء جداً (Ca 10S) وأن هذه الصفة جعلت الباحثين أن يقرروا بشكل قاطع بأنه من غير المحتمل أن تكون المواد المعدية والموجودة فى العصير الخام هى أجزاء فيروس وكذلك وجد أن هذه المواد غير حساسة للمعاملة بالمذيبات العضوية المختلفة. إن جزيئات الفيروس المحتوية على دهون وذات الكثافة المنخفضة يبدو أنها غير واردة. كذلك فإن معاملة المستخلصات الخام بالفينول لا تؤثر على حيوية والصفات الترسيبية لهذا العامل الممرض. واعتماداً على هذه النتائج إفترض أن هذه العوامل المسببة للمرض هى حمض نووى حر.

وجد أن تخضين المستخلص الخام مع أنزيمات النيوكليبيز Nucleases أظهر أن هذه العوامل المسببة للمرض حساسة لأنزيم Ribonuclease وغير حساسة لانزيم De + oxyribonuclease. إن الملاحظات التى استنتجت من أن العامل الممرضى يمكن تركيزه وسهولة ترسيبه بالايثانول واعادال تعليقه Resuspension فى حجم صغير من منظم يكون متوافقاً مع فكرة أن هذا العامل الممرض هو حمض نووى حر.

وكذلك وجد أن تخضين المستخلصات مع أنزيم Ribonuclease فى بيئة ذات تركيز أيونى عال أظهرت أن هذا العامل الممرض يبقى حياً إلى حد ما بهذه المعاملة. إن هذه الصفة بالإضافة إلى صفة الغسل أو الأزالة من أعمدة Methylated serum albumin تؤدي إلى الاقتراح بأن هذا العامل الممرض المستخلص قد يكون خيط مزدوج من الحمض RNA.

لقد إستخلص كل من Singh & Bagnall حمض نووى معدى من نسيج مصاب بفيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس وقارنا بعض صفات هذا الحمض مع صفات الحمض النووى الموجود فى العصارة الخام فى المستخلص، فوجدا أن العامل الممرض فى العصارة الخام (الحمض النووى RNA) له قدرة على أحداث المرض على درجة عالية من التخفيف وله درجة تثبيط عالية وكان أكثر حساسية لأنزيم Ribonuclease، عند إزالة حيوية العصارة الخام باستعمال درجة حرارة عالية أو التخضين مع أنزيم Ribonuclease يمكن أن تسترجع هذه الحيوية بالمعاملة بالفينول. وبالدراسات التى أجريت باستعمال الطرد المركزى، تبين للباحثين أنه لا يوجد حمض نووى RNA ممرض حر فى العصارة الخام ولكنهما لم يبينا مع أية مادة كان مرتبطاً.

لقد ذكرت نتائج مشابهة لتلك التى ذكرها Diener & Raymer وذلك من قبل Semancik & Weathers سنة ١٩٦٨ عندما كانا يعملان على مرض اكسوكورنز الحمضيات. وجد الباحثان أن معظم المادة الحيوية تكون موجودة فى العصارة المنقاة والمحضرة من النسيج المصاب تبقى فى المادة الطافية فى المحلول بعد إجراء عملية الطرد المركزى عالية السرعة. من هذا استنتج الباحثان أن المادة المعدية المرضية تمتلك كفاءة ترسيب حوالى ١٠ - ٥١٥. بسبب هذه النتائج وبسبب عدم إمكانية ملاحظة أجزاء فيروسية نموذجية كاملة بواسطة التصوير بالميكروسكوب الالكترونى، فقد إقترح الباحثان أن الفيروس يمكن أن يمثل شكل من أشكال الحمض النووى المعدى، قد تكون هذه الأشكال مشابهة إما لشكل غير

ثابت من فيروس خشخشة الدخان، طفرات غير متجمعة لفيروس موزايك الدخان أو كجزئ حمض نووي RNA مزدوج السلسلة.

أما الكائن المرض الثالث الذي درس في تلك الفترة فهو مسبب مرض تقزم الاقحوان، حيث قام بدراسته Lawson سنة ١٩٦٨ وقد ذكر الباحث أن هذا المسبب يمتلك صفات إلى حد ما مشابهة لتلك التي يتصف بها مسبب مرض الدرنه المغزلية في البطاطس ومسبب اكسوكورتز الحمضيات. وقد تميز مسبب تقزم الاقحوان بزيادة طول المادة المعدية والمسببة للمرض والتي تكورت أثناء عملية الطرد المركزي عالية السرعة. تبين أن الكائن المسبب للمرض حساس للمعاملة بأنزيم Ribonuclease ويمكن تركيزه بالترسيب بالايثانول المتبوع باعادة التعليق. إن معاملة مثل هذه التحضيرات المركزة بالفينول يؤدي إلى ظهور عينات ذات حيوية مشابهة لتلك العينات غير المعاملة.

٢ - غياب الفيروسات : Absence of Virions

مع أن هناك قليل من الشك بأن الترسيب البطيء لهذه المواد المعدية في التحضيرات المأخوذة من الأنسجة المصابة بمرض الدرنه المغزلية في البطاطس، اكسوكورتز الحمضيات وتقزم الاقحوان تكون خالية من جزيئات الحمض النووي RNA الحر، فإن السؤال الذي يخطر على البال هو هل توجد هذه الكائنات المعدية بذاتها في مكان في الخلية أم أنها تنطلق من أجزاء الفيروس العادي أثناء الاستخلاص؟؟. وللإجابة على هذا السؤال فقد درس مرض الدرنه المغزلية في البطاطس باسهاب كبير، فقد قرر العالم Diener سنة ١٩٧١ أن الصفات الترسيبية للمواد المعدية (سريعة الترسيب) التي توجد في المستخلصات الخام (والتي من المحتمل أن تتكون من فايرونات) لم تتغير معنوياً بمعاملة المستخلصات الخام بالفينول فقط أو بالفينول في وجود مركب Sodium dodecyl sulfate. هذه النتائج أدت إلى القول بعدم احتمالية أن يكون RNA مرتبطاً مع بروتين أو أن يكون موجوداً بشكل فيروس كامل أو فيروسات محطمة جزئياً. لقد تأكدت هذه النتائج عن طريق

ملاحظة أن التحضيرات النقية جداً من RNA المأخوذة من نسيج مصاب بمرض الدرنه المغزلية تحتوي أيضاً مواد معدية والتي ترسب بمعدلات أسرع من تلك المتوقع الحصول عليها من RNA حر . وإذا كانت هذه المواد المعدية سريعة الترسيب مكونة من أجزاء من بروتين نووي فيروسي فإن هذه الأجزاء يمكن أن تكون بالتالي ذات صفات غير عادية . من هذه الصفات أن غلافها البروتيني يجب أن يكون فضفاضاً بشكل كبير وكاف ليسمح بوصول أنزيم Ribonuclease (نظراً لأن نشاط وحيوية هذه المواد تكون حساسة للمعاملة بهذا الأنزيم) . علاوة على ذلك وبعض من الصفات الأخرى ، فإن هذه التركيبات يمكن أن تكون مقاومة للمعاملة بالفينول ومركب Sodium dodecyl sulfate .

نظراً لعدم وجود (التأكد من وجود) بروتينات نووية في هذه الجزيئات فإن العالم Diener سنة ١٩٧١ إستنتج أن هذه المواد المعدية ذات سرعة الترسيب العالية لا يوجد فيها بروتين نووي فيروسي وبالتالي ليست أجزاء فيروسية . لقد تأكدت هذه الاستنتاجات السابقة تأكيداً جديداً بملاحظة (تجارب في الموضع In situ) أن مسبب مرض الدرنه المغزلية في البطاطس يكون حساساً للمعاملة بأنزيم Ribonuclease . وجد أن الترشيح بالتفريغ Vacuum in filtration لعصارة الأوراق المصابة بمسبب مرض الدرنه المغزلية في البطاطس والموجود فيها أنزيم Ribonuclease يؤدي إلى الفقد الكلي إلى حد ما في نشاط وحيوية هذا المسبب ، في حين أنه تحت هذه الظروف لا تتأثر حيوية ونشاط جزيئات الفيروس العادي .

قام العالم Zaitlin سنة ١٩٧٢ بتجربة حلل فيها بروتينات معزولة من أوراق مصابة بمسبب مرض الدرنه المغزلية في البطاطس وأوراق مصابة بفيروس موزايك الدخان ، وقارن ذلك مع بروتينات معزولة من أوراق غير مصابة فوجد أنه لا دليل على وجود بروتينات في الأوراق المصابة بمرض الدرنه المغزلية تعتبر كغطاء بروتيني لمسبب المرض في حين أنه تحت هذه الظروف يتكون الغطاء البروتيني لسلاسل فيروس موزايك الدخان ويكون واضحاً تماماً .

تساءل الباحث إذا كان الحمض النووي RNA فى المواد المعدية والتي هى سريعة الترسيب لا يقع تحت مجموعة الفيروسات فماذا عساه أن يكون؟؟. بالنظر إلى صفة سرعة التفكك بالفينول، فمن الصعوبة الاعتقاد أن معدل سرعة الترسيب لبعض المواد المعدية يكون راجعاً إلى ترافقها مع بروتين، والأكثر احتمالاً هو أن RNA يكون مرتبطاً مع مكونات خلوية فى معقدات والتي لا تتحطم بالفينول، أو أنها تتواجد فى مجموعات ذات أحجام مختلفة. وبالتالي يجب التقدم خطوة أخرى فى التعرف على هذا المسبب وذلك بتحديد موقع المسبب المرضى بالنسبة للخلايا المصابة.

٣ - موقع مسبب المرض فى الخلية Subcellular Location :

أجريت إختبارات حيوية على مكونات الخلية من النسيج المصاب بمرض الدرنه المغزلية فى البطاطس أظهرت أن هناك حيوية يمكن تقديرها موجودة فقط فى أجزاء من حطام الخلايا وفى الأجزاء المحتوية على الأنوية. أما البلاستيدات، الميتوكوندريا، الرايبوسومات والأجزاء الذائبة فإنها لا تحتوى إلا على آثار بسيطة جداً من الحيوية (المسبب). زيادة على ذلك عندما عزل الكروماتين من النسيج المصاب كانت هناك حيوية أكثر (وجود مسبب المرض) مرافقة لهذا الكروماتين ويمكن استخلاص مسبب المرض من هذا الكروماتين بمنظم فسفاتى وتبين أنه RNA حر.

إن هذه التجربة وتجارب أخرى أدت إلى القول بأن مسبب مرض الدرنه المغزلية فى البطاطس يكون مترافقاً مع الأنوية وبشكل خاص مع الكروماتين فى الأنسجة المصابة. وجد أن المقدار المعنوى لحيوية المسبب تكون موجودة بانتظام فى حطام النسيج المحتوى على الأنوية، أما عن احتمال وجود بعض جزيئات المسبب مترافقاً مع الأغشية الخلوية لا يمكن القول بأنها تأخذ صفة اللزوم لغاية سنة ١٩٧٢.

نظراً لأن المسبب المرضى لمرض الدرنه المغزلية فى البطاطس يكون مترافقاً مع الكروماتين، هذا يمكن أن يوضح صفاته الترسيبية المتغايرة فى المستخلص الخام.

بالإضافة لوجود جزيئات من مسبب المرض حرة، إلا أن الغالبية العظمى من جزيئات مسبب المرض تكون مترافقة مع أجزاء الكروماتين ذات الأحجام المختلفة وأن هذه الأجزاء قد تكون هي المسبب الرئيسي لصفات الترسيب السريعة للمواد المعدية المرضية.

أما التجارب التي أجريت على مسبب مرض اكسوكورترز الحمضيات أظهرت أن الحمض النووي RNA المعدى (المسبب للمرض) يكون مشابهاً لما سبقه من حيث الموقع، إذ أنه يوجد في أنوية الخلايا المصابة ويكون وجوده مترافقاً تماماً مع الكروماتين، هذا ما قرره Sanger سنة ١٩٧٢ .

٤ - تقدير الوزن الجزيئي للفيروسات المعروفة:

Molecular Weight Estimates of Native Viroids

في أواخر الستينات أجريت محاولات كثيرة لتحديد الصفات الفيزيائية والكيميائية للفيروسات، إلا أن هذه المحاولات وقفت أمامها عوائق كثيرة أهمها (في تلك الفترة) أن الأحماض النووية RNAs يمكن تمييزها فقط بواسطة نشاطها الحيوي وليس اعتماداً على صفاتها الفيزيائية. إنعكست هذه العوائق بشكل خاص وبشدة على الجهود التي بذلت في تحديد الوزن الجزيئي للأحماض النووية.

مع أنه قد عرف لبعض الوقت أن فيروس الدرنه المغزلية في البطاطس يترسب بمعدل منخفض أقل من جزيئات الحمض النووي الفيروسي RNA وحيد الخيط، إلا أن هذه الملاحظة لم يمكن الاستفادة منها في تحديد الوزن الجزيئي للفيروسات وذلك نظراً لأن التكوين البنائي لهذا الحمض لم يكن معروفاً.

لقد إستعمل العالم Loening سنة ١٩٦٧ طريقة متطورة واعتمد عليها في إمكانية تقدير الوزن الجزيئي، هذه الطريقة مبنية على النشاط الحيوي فقط. لقد إقتنع هذا العالم بأن تأثيرات التركيب الثانوي لهذا الحمض RNA على صفاته الترسيبية تكون متعاكسة مع تأثيراتها على حركتها في الهجرة الكهربائية في

مركب Polyacrylamide gels وبالتالي فإن دمج هاتين الطريقتين (الهجرة الكهربائية وسرعة الترسيب) سيكون ذو فائدة في تمييز الاختلافات في التركيب نتيجة للاختلافات في الأوزان الجزيئية للأحماض RNAs. وذكر أنه مع أى من هذه الطرق فإن النشاط الحيوى هو المقياس الوحيد الضرورى لتقدير النتائج.

إن تطبيق هذا المبدأ على فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس أدى إلى استنتاجات غير متوقعة حيث تبين أن الحمض RNA المسبب للمرض له وزن جزيئى منخفض جداً وكان هذا التقدير حوالى 5×10^4 دالتون فى نتائج معظم التجارب. هناك تأكيدات أخرى ظهرت بشكل أوضح تؤيد الوزن الجزيئى المنخفض لهذا الفيروس، أمكن الحصول عليها من ملاحظة أن الحمض النووى RNA له القدرة على الدخول فى الجيل Gels ذو التركيز العالى من أل Polyacrylamide (يعنى ثقوب صغيرة الحجم) والتي لا تستطيع أن تمر منها الأحماض النووية ذات الوزن الجزيئى المرتفع. فى مثل هذا الجيل فإن فيروس الدرنه المغزلية يتحرك كحزمة متماثلة محددة جيداً بمعدل هجرة يتفق مع الوزن الجزيئى المقدر سابقاً وهذا ما تم تقريره بواسطة العالم Diener سنة ١٩٧١.

أما كلاً من العالم Singh & Clark سنة ١٩٧١ فقد ذكروا بعض النتائج التى أظهرت أيضاً أن فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس هو عبارة عن RNA ذو وزن جزيئى منخفض واستنتجوا من تحديد حركة الفيروس فى الهجرة الكهربائية فى Polyacrylamide gel ٧,٥٪ أن قمة الحيوية والنشاط للفيروس تكون متوافقة مع حجم الجزيئات ذات ٤ - ٥ وحدة من وحدات Svedberg.

لقد ذكر العالم Diener سنة ١٩٧٣ أن الفيروس المسبب لمرض تقزم الاقحوان هو أيضاً حمض نووى RNA ذو وزن جزيئى منخفض، وقد استعمل فى تجاربه على هذا المرض تنقية جزيئية أكثر تطوراً عن التنقية التى استعملت فى دراسة فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس، وكانت هذه التنقية متبوعة بالترسيب والتحليل بالهجرة الكهربائية. وجد أن RNA المعدى يترسب بمعدلات تتوافق مع القيم 5 - 7.5 S، وأن عمود الهجرة الكهربائية لفيروس تقزم الاقحوان وفيروس الدرنه

المغزلية فى البطاطس فى ٢٠٪ polyacrylamide gels أظهرت أن الحمض النووى RNA يهاجر فى مثل هذا الجيل ويتحرك خلاله كحزمة متناسقة محددة تماماً بمعدل هجرة أكثر منه لمسبب الدرنة المغزلية فى البطاطس.

أما بالنسبة لفيروس أكسوكورتز الحمضيات فإن الهجرة الكهربائية للتحضيرات المعدية فى ال polyacrylamide gels تدل على أن الوزن الجزيئى للحمض النووى RNA لمسبب هذا المرض هو $1,25 \times 10^6$ دالتون وإقتراح أن إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية لمكوناته تتناسب مع الانتشار فى الجيل وهذا ما وجده Semancik سنة ١٩٧٢.

كذلك فإن العالم Sanger سنة ١٩٧٢ وجد فى أبحاثه على فيروس أكسوكورتز الحمضيات باستعمال polyacrylamide gels أن الوزن الجزيئى للحمض النووى RNA لمسبب هذا المرض هو $6 - 5 \times 10^4$ دالتون.

مما تقدم تبين أن الفيروسات المعروفة حتى ذلك الوقت سنة ١٩٧٢ عبارة عن حمض نووى RNA ذو وزن جزيئى منخفض، إلا أن هناك إنتقادات كثيرة وجهت لطريقة حساب الوزن الجزيئى لهذه الفيروسات أهم هذه الانتقادات هى:-

١ - كانت جميع التقديرات مبنية على حركة الإنتشار الكهربائى فى polyacrylamide gels لجزيئات الحمض النووى RNA المعروفة فى ذلك الوقت، ومقارنة هذه الحركة مع RNA قياسى معروف وزنه الجزيئى. وبالتالي فإنه كلما كان الحمض النووى الفيروى قريبا الشبه فى التركيب مع الحمض النووى القياسى كلما كانت النتائج أكثر دقة والعكس صحيح.

٢ - إن نتائج الدراسات التى أجريت على فيروس الدرنة المغزلية فى البطاطس أدت إلى الاقتراح بأن RNA الفيروى قد يتواجد فى تجمعات بحالات عديدة وبالتالي فإن الوزن الجزيئى المقاس بهذه الطريقة قد يكون مبنياً على هذه التجمعات وليس على الخيط المفرد الوحيد من RNA.

٣ - يختلف الوزن الجزيئى المقاس بهذه الطريقة وذلك حسب تركيز الجيل (له تأثير على حجم الثقوب) فوجد مثلاً أنه إذا كان تركيز الجيل أقل من ٨ - ١٠٪ فإن RNA موضوع الدراسة يكون ذو وزن جزيئى 1×10^6 دالتون، بينما إذا كان التركيز للجيل أكبر من ٨ - ١٠٪ فإن الوزن الجزيئى لنفس الحمض موضوع الدراسة يكون 5×10^4 دالتون.

وتتقدم الأبحاث أمكن التغلب على مثل هذه الانتقادات كما سيذكر فى الفصول القادمة إن شاء الله.

٥ . التنقية Purification :

حيث أن هذه الأشياء (الفيروسات) مجهولة وفى بداية دراستها، أصبح من الواضح أن التقدم المستمر فى معرفة صفات الفيروسات يتطلب عزلها وتحضيرها بشكل نقى ثم يتبع ذلك تحليلات بيوكيميائية وبيوفيزيائية عادية.

إن الخطوة الأولى التى تستعمل فى تنقية فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس كما ذكرها Diener سنة ١٩٧٢، عبارة عن الحصول على الأحماض النووية من كميات كبيرة نسبياً من الأوراق المصابة والسليمة. بعد استبعاد كل من ال DNA ، rRNA ، tRNA والسكريات العديدة، فإن العينات المتبقية تحلل بواسطة الفصل الكهربائى فى الجيل Gels electrophoresis .

لقد ظهر فى الإختبارات الحيوية للشرائح المفردة من الجيل أن حيوية الفيروس متوافقة مع هذا المكون الموجود فى الشريحة. هذا التوافق (المستوى العال من الحيوية) بالإضافة إلى أن هذه المادة لا تتواجد فى تحضيرات الأوراق السليمة، هذا يشكل دليلاً قوياً على أن هذه المادة الموجودة فى شرائح الجيل هى المكون الأصلى لفيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس.

أما بالنسبة لفيروس اكسوكورتز الحمضيات فقد ذكر العالم Semancik ومساعدوه سنة ١٩٧٢ وسنة ١٩٧٣ أن امتصاص الأشعة فوق البنفسجية يكون

من قبل مواد موجودة في تحضيرات من أوراق مصابة (وإن هذه المواد غير موجودة في التحضيرات المأخوذة من الأوراق السليمة) وأن هذه المواد يمكن تعريفها بواسطة الهجرة الكهربائية في الجيل. إن الانحراف عن هذا التوافق (قمة منحني الامتصاص وقمة الإنتشار النشط في الجيل) ظهر في هذه التجربة ولكن هذه الانحرافات عزيت إلى الصعوبات التقنية (التقنية) الداخلة في تقطيع وقراءة الجيل أثناء التجربة.

إن تنقية فيروس الدرنه المغزلية في البطاطس بكميات كافية لكي يجرى عليها التحليلات الكيموحيوية والفيزيوحيوية حصل عليها عن طريق إخضاع التحضيرات النباتية إلى الهجرة الكهربائية في ٢٠٪ polyacrylamide gels (مع اطالة وقت الجريان للتأكد من الفصل الكامل للحمض RNA من المكونات الطبيعية للعائل) مع ازالة أجزاء الجيل المحتوية على فيروس الدرنه المغزلية واسترداد الحمض RNA من شرائح الجيل باستعمال طريقة Diener سنة ١٩٧٣ الداخلة فيها الكروماتوغرافي Hydroxyapatite chromatography ثم رجها مع ميثوكسي إيثانول.

باستعمال التحليل بالهجرة الكهربائية للتحضيرات النهائية وجد أن هناك مكوناً واحداً فقط يمتص الأشعة فوق البنفسجية، وأن هذا المكون له نفس الحركة في الهجرة الكهربائية مثل فيروس الدرنه المغزلية في البطاطس الموجود في تحضيرات أقل تنقية، وأن هذه المادة الممتصة للأشعة فوق البنفسجية تتوافق مع نشاط الإنتشار في الجيل.

الصفات الفيزيائية والكيميائية للفيروسات

Physical and Chemical Properties of Viroeids

١ - الوزن الجزيئي لفيروس الدرنه المغزلية في البطاطس:

Molecular Weight of PSTVd

عند توفر التحضيرات النقية من فيروس الدرنه المغزلية في البطاطس، فإن تحديد الوزن الجزيئي لهذا الفيروس يكون مبنياً على، ليس على نشاطه البيولوجي، بل على

إمتصاصه للأشعة فوق البنفسجية وأصبحت هذه الطريقة ممكنة. ولتحديد الوزن الجزيئى للفيروس، فقد ذكر العالم Boedtker سنة ١٩٧١ طريقة لذلك وقد إختار هذه الطريقة لأنها تسمح بتحديد الوزن الجزيئى للأحماض النووية RNAs بشكل منفصل عن تركيبها (ثنائى أو ثلاثى)، وبهذه الطريقة فإن الأحماض النووية RNAs يجرى لها دنتره denatured بمادة الفورمالدهيد ثم تقارن حركتها النسبية فى الانتشار الكهربائى مع حركة أجزاء مشابهة لها من حمض نووى RNA مدنتر وقياسى ومعروف وزنه الجزيئى.

لقد تم تطبيق هذه القاعدة على فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس باستعمال RNA المدنتر فى كل من الفيروس المرافق للتبقع الحلقي فى الدخان، الخول، الرايوسوم، 5S، وفيروس تبرقش القرنفل كأوزان جزيئية قياسية، كانت النتيجة أن الوزن الجزيئى لفيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس يقع فى مجال (٥,٧ - ٥,٨) × ١٠^٤ دالتون وهذا ما ذكره Diener سنة ١٩٧٣.

إن هذا التعارض الواضح بين هذه القيمة للوزن الجزيئى والقيمة السابقة التى ذكرت بأنها ٥ × ١٠^٤ دالتون يكون أكثر احتمالاً إلى التركيب المندمج (منضغط) للحمض النووى RNA ويوضح الخطأ الحقيقى الملازم للمحاولات التى أجريت لتقدير الوزن الجزيئى للفيروسيدات بالهجرة الكهربائىة فى الجيل بالمقارنة للجزيئات المعروفة.

٢ . الدنترة الحرارية لفيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس:

Thermal Denaturation of PSTVd

لتحديد فيما إذا كان فيروس الدرنه المغزلية احادى أو ثنائى الخيط، درست الدنترة الحرارية للحمض النووى RNA وكان منحنى الدنترة يدل على أن تركيب الفيروس ليس مزدوج القواعد بانتظام مثل RNA مزدوج الخيط، وبالتالي فإنه فى هذه الحالة

فمن المتوقع أن تحدث الدنترة على معدل درجات حرارة أكثر تقارباً وذات قيمة عالية. وعلى أبه حال فإن منحنى الدنترة لا يقرر بأن جزيء RNA احادى الخيط ذو قواعد مزدوجة بدون إنتظام مثل RNA المحول الذى فيه مناطق احادية الخيط تتبادل مع مناطق مزدوجة الخيط.

إن تحديد صفات الدنترة الحرارية لفيروس الدنترة المغزلية فى البطاطس المذاب فى منظم قوى عالية الايونية ($0.1 \times SSC$) قد أكد الاستنتاجات السابقة وهى أن الدنترة تحدث على معدل عال من درجات الحرارة. ولقد وجد Diener سنة ١٩٧٣ أنه تحت هذه الظروف فإن درجة حرارة الدنترة تقارب 54°C .

٣ - الحساسية للإشعاع Radiation Sensitivity :

بعد أن تبين أن فيروس الدنترة المغزلية ذو وزن جزيئى منخفض، كان هناك اهتماماً فى تحديد حساسيته للإشعاع بواسطة الأشعة فوق البنفسجية، مع أن الباحث يمكن أن يتوقع أن الوزن الجزيئى المنخفض (كما فى هذا الفيروس) سيكون أكثر حساسية للإشعاع بواسطة الأشعة فوق البنفسجية من الاحماض RNA أو DNA الفيروسية ذات الحجم الأكبر بشكل واضح، إلا أن تأثير الحجم على الحساسية بالأشعة فوق البنفسجية فى الأحماض النووية لم يتوضح تماماً حتى سنة ١٩٧٠.

إن تعريض الحمض النووى RNA الموجود فى كل من فيروس الدنترة المغزلية، فيروس البقعة الحلقية فى الدخان والفيروسات المرافقة، للأشعة فوق البنفسجية 254 نانوميتر أظهر أن التثبيط حصل بنسبة $70 - 90$ ضعف فى فيروس الدنترة المغزلية والفيروسات المرافقة بالمقارنة مع فيروس البقعة الحلقية فى الدخان، هذا ما وجدته Diener سنة ١٩٧٤. هذه النتائج ذات الاختلاف الواضح فى الحساسية للإشعاع بالأشعة فوق البنفسجية يكون تفسيرها بسبب الحجم الصغير للحمض RNA فى

فيروس الدرنه المغزليه والفيروسات المرافقه إذا ما قورنت بحجم RNA فى فيروس البقعة الحلقيه فى الدخان.

لقد قام العالم Semancik سنة ١٩٧٣ بتعريض تحضيرات من فيروس اكسوكورنز الحمضيات وفيروس موزايك الدخان إلى أشعة مؤينة، وحدد بالمعدلات المقارنة للتثبيط البيولوجى، الوزن الجزيئى فوجد أنه $1,1 \times 10^6$ دالتون للحجم المحدد من فيروس اكسوكورنز الحمضيات.

٤ - الفحص بالميكروسكوب الالكترونى لفيروس الدرنه المغزليه:

Electron Microscopy of PSTVd

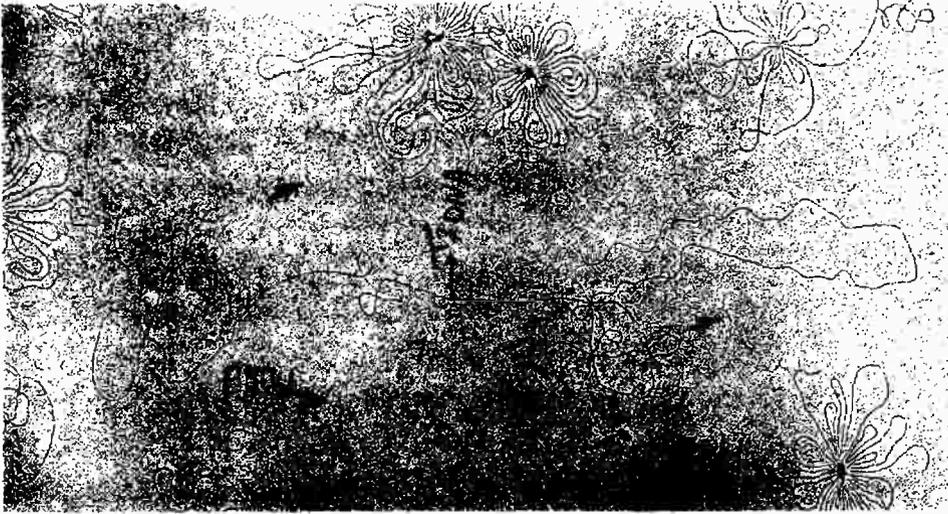
إستعمل العالم Sogo ومرافقوه سنة ١٩٧٣ طريقة لدراسة فيروس الدرنه المغزليه بالميكروسكوب الالكترونى، فقد عامل تحضيرات نقيه من فيروس الدرنه المغزليه بطبقة احادية من البروتين واستعمل الطريقة التى ذكرها Zahn و Kleinschmidt سنة ١٩٥٩.

عند رش تحضيرات من فيروس الدرنه المغزليه الموجوده فى ٤ مول من محلول أسيتات الصوديوم على الصورة تحت المائيه للماء المقطر، تكشفت تركيبات قصيره جداً غالباً فى تجمعات منضغطه ولكن احياناً على شكل أجزاء منفصله، هذه الأجزاء لم يمكن اكتشافها فى حالة الكنترول لأحماض نوويه حرة وكانت غير موجوده فى التحضيرات المعامله بأنزيم Ribonuclease.

بسبب إتحاد جزيئات فيروس الدرنه المغزليه فى البطاطس فى تجمعات كان من الصعب وضع تصورات عن طول وتركيب الجزئ، بناء على ذلك فإن الطرق التى يكون بمقدورها تفكيك التجمعات وتجعل هناك امكانيه رؤيه جزيئات فيروس الدرنه المغزليه فى البطاطس بمفرده قد وضعت تحت الإختبار. وبالفعل كان هناك اعداداً كثيره من السلاسل القصيره ذات طول متناسق نسبياً لوحظت عندما نشرت تحضيرات من فيروس الدرنه المغزليه فى البطاطس فى محلول يوريا ٨ مول، هذا ماوجده Sogo ومرافقوه سنة ١٩٧٣. لم يمكن تمييز وملاحظه مثل تلك

السلاسل في عينات الكنترول أو بعد المعاملة بأنزيم Ribonuclease . كان متوسط الطول لهذه الجزيئات حوالي ٥٠٠ أنجستروم.

نظراً لأن الكتلة لكل وحدة طول غير معروفة، فإن أطوال جزيئات فيروس الدرنه المغزلية للبطاطس كانت تقارن مع تلك الجزيئات من الأحماض النووية معروفة الوزن الجزيئي التي كانت تضاف إلى تحضيرات الفيروسات وكانت عندئذ تعامل بالتطابق بين المعلوم والمجهول.



شكل رقم ١ :

صورة الكترونية لفيروس PSTVd مختلطاً مع DNA ثنائي الخيط و DNA للفاج T₇ بالمقارنة النسبية يلاحظ الحجم الصغير جداً للفيروس بالمقارنة مع DNA للفاج.

يظهر شكل ١ صورة ميكروسكوبية لمخلوط من حمض DNA ثنائي الخيط، Coliphage T7 و RNA لفيروس الدرنه المغزلية في البطاطس. تدل القياسات أن DNA للفلاج T-7 حوالى ٢٨٠ ضعف طول فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس، يظهر كذلك أن سمك فيروس الدرنه المغزلية مشابهاً لسمك DNA للفلاج T-7. واعتماداً على أن الوزن الجزيئى للحمض T7-DNA يساوى ٢٥ × ٦١٠ دالتون كما ذكر العالم Lang سنة ١٩٧٠ فإن الوزن الجزيئى لفيروس الدرنه المغزلية هو ٨,٩ × ٤١٠ دالتون.

إن الفحص الميكروسكوبى لخليط من فيروس الدرنه المغزلية وحمض RNA لفيروس تبرقش القرنفل مدتر بالفورمالدهيد أظهر أن RNA الفيرويدى أسمك من الخيط المفرد من RNA الفيروسى، إلا أن طول RNA الفيروسى حوالى ١٧ ضعف طول RNA الفيرويدى المدتر. هذه المقارنة ادت إلى تقدير الوزن الجزيئى للفيروسى بحوالى ٧,٩ × ٤١٠ دالتون.

إن تقديرات الوزن الجزيئى (للفيروسى) المتحصل عليها بواسطة الميكروسكوب الالكترونى تكون بالتالى متوافقة تماماً مع القيم المتحصل عليها من تحليل الفيروسى المدتر بالحرارة أو بالفورمالين والمستعمل فى polyacrylamide gels.

٥ - تركيب جزئى الفيروس Molecular Structure of Viroid

مع أن الوزن الجزيئى المنخفض للفيروسيات قد تحدد نهائياً، إلا أن الاختلاف فيما يتعلق بالتركيب الدقيق لجزئياتها لم يكن واضحاً بشكل جيد فى ضوء المعلومات فى أوائل السبعينات. فى بعض الأنظمة التحليلية فإن الفيروسيات تظهر صفات نموذجية لصفات الحمض RNA ثنائى الخيط، وفى أنظمة أخرى تظهر صفات RNA أحادى الخيط.

إن نظام الازالة المتبع مع فيروس الدرنه المغزلية من أعمدة Methylated serum al-bumin أدت إلى القول بأن حمض ال RNA الفيرويدى هو ثنائى الخيط، بينما

طرق الازالة من أعمدة CF - II cellulose أظهرت بأن الحمض RNA يتألف من جزيئات ثنائية السلسلة وجزيئات أحادية السلسلة. إن هذه النتائج المتضاربة قدم لها العالم Engelhardt سنة ١٩٧٢ تفسيراً وذلك بأن أظهر أن إمتداد أو طول التركيب الثانوى للحمض RNA تمتلك تأثيراً عميقاً على طرق إزالته من مثل هذه الأعمدة. لقد وجد أنه كلما زادت كمية التركيبات الثانوية للحمض RNA فى وقت الاضافة للعمود، كلما زادت القطع أو الأجزاء التى سوف تزال فى منظم Ethanol - free هذه تعنى أن الازالة التى كانت تحدث اولاً كانت تؤدي إلى الاعتقاد بأنه يتكون من حمض RNA ثنائى السلسلة فقط. بالاحتكام إلى هذا المعيار فإن فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس له تركيبات ثانوية عديدة.

من ناحية أخرى فإن إستعمال Hydroxyapatite فإن فيروس الدرنه المغزلية يزال غالباً بمنظم فسفاتى تركيزه أكثر إنخفاضاً من ما هو متوقع لو كان الحمض ثنائى السلسلة. كما أن بعض الأجزاء من الفيروس تزال على تركيزات أعلى من المنظم.

أما إختبارات المناعة التى أجريت مع السيرم المضاد الذى يتفاعل بشكل خاص مع RNA ثنائى السلسلة لم يعط أية دلالة لوجود RNA ثنائى السلسلة فى التحضيرات عالية الإصابة من الفيروس. إن الدترة بالحرارة، الفيروس المعامل بالفورمالين، على أية حال، كان يتبين أنه يتكون من مركبين لهما حركة مختلفة إلى حد ما فى الهجرة الكهربائية.

أما فيما يتعلق بفيروس اكسوكورتر الحمضيات فإن العالمان Semancik & Weathers سنة ١٩٧٠ ذكرا بأن الحمض النووى RNA المعدى يتواجد على شكلين. الشكل الأول يترسب فى مجال (10 - 15S) أما الشكل الثانى يترسب فوق S25. وجد أن ازالة فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس وفيروس اكسوكورتر الحمضيات من أعمدة Methylated serum albumin يكون فى مجال ازالة الحمض DNA من العائل ولكن لا يشابهما عند الازالة من أعمدة سليولوزية باستعمال منظم إيثانول حر فقط. مع أن هذه الصفات منسجمة مع صفات

الحمض ثنائي السلسلة، إلا أن هناك محاولات أجريت لتفكيك هذا الحمض RNA المتوقع أنه ثنائي السلسلة أو ملاحظة أية مقاومة يديها لأنزيم Ribonuclease فى وسط أيونى عال، وكل هذه المحاولات لم تنجح. أخيراً إتجه الباحثون إلى عملية فصل السلاسل بالحرارة وسرعة التبريد، وخلصوا إلى نتيجة بأن RNA مقاوم جزئياً عند تحضينه مع مادة Diethylpyrophosphate عندئذ ظهرت نتائج مشابهة لفيروس الدرنه المغزلية والتي ذكرها Sing & Clark سنة ١٩٧١ وإقترحاً بأن تركيب RNA الفيرويدي هو على الأقل ثنائي السلسلة جزئياً. أما بالنسبة لفيروس اكسوكورتز الحمضيات تثبط كلية بمادة الفورمالدهيد.

عند مقارنة RNA الفيرويدي مع RNA الفيروسي وحيد السلسلة، تبين أن فيروس اكسوكورتز الحمضيات مقاوم للتشيط بالحرارة وبأنزيمات القطع الخارجى Exonucleases وفى هذه الصفة الأخيرة يشارك RNA الفيرويدي للحمضيات فيروس الدرنه المغزلية، إلا أن المقاومة للتشيط بأنزيمات اكسوكورتز أنزيمات القطع الخارجى Exonucleases قد تؤدي إلى القول بأن تركيب RNA الفيرويدي يكون دائرياً، وهذا ما قرره Diener سنة ١٩٧١ والعالم Semancik سنة ١٩٧٠، إلا أن درجة المقاومة هذه أدت إلى زيادة الأبحاث فى هذا المجال.

واعتماداً على مبدأ الكثافة المنخفضة والتي تجعل الحمض النووى RNA الفيرويدي عائماً فى محلول متدرج الكثافة من محلول كبريتات السيزيوم القياسى، فإن بعض العلماء إقترحوا أن فيروس اكسوكورتز الحمضيات إما أن يكون حمض نووى منخفض الوزن الجزيئى أو RNA ناقل يشبه mRNA أو جزئ هجين-RNA DNA، ولكن تبين لهم فيما بعد أن مدة الترسيب غير كافية للحصول على أحماض نووية متوازنة منخفضة الوزن الجزيئى من RNA.

وبكلمة موجزة يمكن تلخيص أبحاث العلماء على تركيب جزئ الفيرويد بأنه
أما:-

١ - أن يكون عبارة عن حمض نووى احادى السلسلة من RNA مع وجود بعض التركيبات مثل تركيب دبوس الشعر تكون ذات قواعد مزدوجة.

٢ - أن يكون الفيروس حمض نووي RNA ثنائي السلسلة ولكن بجزيئات غير كاملة ازدواج القواعد.

الصفات الحيوية

BIOLOGICAL PROPERTIES

١ . التضاعف (التناسخ) Replication

إن إنخفاض الوزن الجزيئي للفيروسات آثار تساؤلاً، وهو إلى أى مدى تستطيع هذه الأحماض النووية RNAs أن تمتلك معلومات وراثية كافية لتحت على تضاعفها في العوائل القابلة للإصابة. إن الوزن الجزيئي لفيروس الدرنه المغزلية يكون كافياً فقط لعمل شفرة لـ ٧٠ - ٨٠ حمض أميني، هذا يعني أنه لا يكاد يستطيع أن يشفر إلا لمقدار صغير من البروتين، ولكن لا يستطيع أن يشفر إلى تحت وحدة خاصة لعمل أنزيم RNA - polymerase (للتضاعف) بحجم يمكن مقارنته مع تلك الوحدات المعروفة في التضاعف.

وعلى كل حال فإن ما يمكن تصوره هو أن فيروس الدرنه المغزلية ليس نوعاً من الجزيئات المفردة ولكن إلى حد ما عبارة عن تجمعات من جزيئات RNA عديدة متشابهة في الطول بترتيب نيوكليوتيدات مختلف والتي مع بعضها يمكن أن تشكل جينوم فيروسى بحجم عادى تقريباً. هناك بعض إنتقادات وجهت إلى هذا الرأى.

ربما يكون بناء الفيروسات بطاقة عادية من جينوم العائل والتي تبدأ نشاطها بوجود الفيروس في العائل، إلا أنها تكون مكبوتة كلية في النباتات غير المصابة. إذا كان ذلك صحيحاً فإن الفيروسات تعمل كمانعات كبت لهذه الطاقة الكامنة، إما مباشرة أو عن طريق ببتيدات عديدة مترجمة من الحمض النووي RNA. إن مثل هذا التصور يجلب سؤالاً هو لماذا قطع حمض ال DNA المكبوتة كلية والتي تحتوى معلومات وراثية غير مرغوبة للكائن الحى يجب أن يحافظ عليها أثناء النمو والتطور؟؟ أيضاً فإن الباحث يجب أن يتوقع أن الكبح الذاتى لقطع حمض

ال DNA أحياناً يمكن أن تحدث. وهذه الأسئلة بقيت بدون جواب حتى منتصف السبعينات.

إن الأكثر معقولة من الوهلة الأولى هو إفتراض أن فيروس الدرنه المغزليه مشابهاً للحمض RNA فى الفيروسات المرافقة والتي تتطلب فيروس مساعد لها لتضاعف نفسها. إن الجهود التي بذلت لاثبات وجود مثل هذا الفيروس المساعد فى نباتات الطماطم غير المحقونة أعطى نتائج سلبية. ولقد أظهر العلماء أنه إذا كان مثل هذا الفيروس موجوداً فيجب أن ينتقل رأسياً خلال البذور إلى أى وحدة تكاثرية أخرى فى النبات. وكما هو معروف فإن إنتقال فيروسات النبات عن طريق البذور بمعدلات كبيرة هو فى الواقع نسبة بسيطة جداً. نظراً لأن فيروس الدرنه المغزليه فى البطاطس عنده القدرة على التناسخ فى عدد من أنواع نباتات العائلة الباذنجانية بالإضافة إلى البطاطس والطماطم، فبالتالى يجب أن يتكاثر الفيروس المرافق والمفترض وجوده مع الفيروس فى هذه الأنواع النباتية أيضاً. لقد أظهر Diener سنة ١٩٧٢ أن أنواع نباتات العائلة الباذنجانية والتي يمكن أن تصاب عن طريق مستخلص خام يحتوى على فيروس الدرنه المغزليه يمكن أن تصلب أيضاً بحمض RNA ذو وزن جزيئى منخفض مفصلاً من polyacrylamide gels. وبالتالي إذا كانت الفيروسات المساعدة داخله فى تضاعف فيروس الدرنه المغزليه فإن مثل هذه الفيروسات يجب أن تكون موجودة بشكل عام فى النباتات التي تبدو سليمة من أنواع نباتات العائلة الباذنجانية.

من تلك النتائج ومن غيرها يبدو من غير المحتمل وجود فيروسات مساعدة مع الفيروس، وبالتالي فإن فيروس الدرنه المغزليه بالرغم من حجمه الصغير يبدو أنه ذو مقدرة على التضاعف تلقائياً بذاته فى النباتات العائل.

٢ - نشوء المرض Pathogenesis

نظراً للكمية الصغيرة من المعلومات الوراثية التي تدخلها الفيروسات فى خلايا عوائلها، فإنه من المدهش أنه (فى بعض العوائل) يمكن لبعض الفيروسات أن

تحدث أمراضاً خطيرة بأعراض متنوعة مشابهة لتلك الأعراض النموذجية المتسببة عن الإصابة الفيروسية. نظراً لأن هناك كمية صغيرة جداً من الفيروسات المعروفة تكون موجودة في الأنسجة المصابة، فإنه من غير المحتمل أن يكون هناك نقصاً في النيوكليوتيدات المتوفرة لبناء الحمض النووي للعائل وتكون مسؤولة عن هذه الاضطرابات في العائل. لقد تأكد هذا الرأي بحقيقة أنه في كثير من العوائل فإن الفيروسات تتضاعف بكفاءة عالية بدون حدوث اضطراباً ظاهرة للعائل، هذا ما ذكره Sanger سنة ١٩٧٢ .

هناك عدة آراء تفسر دور الفيروسات في نشوء المرض منها: -

١ - هناك تدخلاً نوعياً من قبل الفيروسات يحدث في وظائف ميتابولزم العائل مما يؤدي إلى حدوث الأمراض .

٢ - يمكن أن تعمل الفيروسات، مثلاً، كأحماض نووية RNAs ناقلة غير عادية وهذا يؤدي إلى تكوين أو بناء بروتينات ذات عيوب تركيبية .

٣ - يمكن أن تتدخل الفيروسات مع جينوم العائل من ناحية نسخ الجينوم إما بالكبح العادي للمسترونات Cistrons المعبرة أو عن طريق وقف الكبح للمسترونات المثبطة عاديًا .

٤ - يمكن أن يكون التداخل إختيارياً عن طريق عديدات الببتين المترجمة عن RNA الفيرويد. بناءً على ما تقدم ويسبب محتويات الفيروسات من المعلومات المحدودة وراثياً، فإن هذه الفيروسات يمكن أن تكون موديلات أنظمة نافعة للجهود المبذولة في شرح الميكانيكية البيوكيميائية لنشوء المرض على مستوى الجزئ.

٣ - الإنتقال Transmission

إن الفيروسات المعروفة لغاية سنة ١٩٧٣ تنتقل بالطرق الميكانيكية، إما بسهولة مثل فيروس الدرنه المغزلية في البطاطس وفيروس تقزم الاقحوان، وإما بصعوبة إلى حد

ما مثل فيروس ايسوكورتز الحمضيات. بالنسبة لفيروس الدرنه المغزليه فإن الانتقال الميكانيكى يكون المسئول الرئيسى عن إنتشار المرض فى الطبيعة، هذا ما قرره Dien-er سنة ١٩٧١. ونظراً لغياب الغطاء الواقى البروتينى فإن مدة بقاء ال RNA حياً خلال عملية الانتقال من الصعوبة بمكان فهمها حتى أصبح من الواضح تماماً أن فيروس الدرنه المغزليه وفيروس ايسوكورتز الحمضيات يكونان موجودان ضمن الأنوية فى الخلايا المصابة، حيث فى هذه الحالة يكونان محميان جيداً من المهاجمة الانزيمية، هذا ما وجده العالم Sanger سنة ١٩٧٢. من المحتمل أثناء الإنتقال الطبيعى أن أجزاء من الأنوية المحتوية على فيروس الدرنه المغزليه أو قطعاً من الكروماتين المحتوية على فيروس الدرنه المغزليه تنتقل من الخلايا المصابة إلى الخلايا العادية بطريقة أفضل من إنتقال ال RNA الحر. إن فيروس الدرنه المغزليه ينتقل عمودياً إما خلال حبة اللقاح أو المبيض فى نباتات الطماطم والبطاطس المصابة، وإن هذا الانتقال العمودى يحدث بمعدل يختلف من صفر إلى ١٠٠٪ معتمداً على اختبارات الجمع الفردية.

أصل الفيرويدات Viroids Origin

هناك تساؤل عن أصل الفيرويدات. هل الفيرويدات تنتمى إلى الفيروسات أو أنها تنتمى إلى الأحماض النووية الخلوية RNAs؟؟.

فى الوقت الذى ظهر فيه مفهوم الفيرويد حدث تقدم سريع فى هذا النوع من الدراسة فكان من المعقول فى البداية أن ينظر إلى الفيرويد بأنه ذو قرابة مع الفيروسات العادية واقترح بأنه إما أن يكون شكل بدائى جداً للفيروس أو أنه نشأ عن الفيروسات بطريقة معينة (مثل التفكك) بحيث تكون النتيجة هى الفيرويد النموذجى. بعد ذلك فإن المعلومات التى تجمعت عن الفيرويدات قد جعلت كل الباحثين تتخلى عن هذه الأفكار بتزايد مستمر.

هناك عدة آراء عن أصل الفيرويدات قد لخصها العالم Diener سنة ١٩٧٩. ثم

ناقشها وأوضح كثير منها وأضاف عليها العالم Sanger سنة ١٩٨٤. من هذه الآراء.

١ - إن أهم الملاحظات فيما يتعلق بأصل الفيروسات يختص باكتشافها:

وهذا يمكن توضيحه بحقيقة أن كل الأمراض الفيروسية قد أمكن التعرف عليها خلال هذا القرن، في حين أن بعضاً منها اكتشف حديثاً. وهذا بجملته يختلف عن أمراض النبات المتسببة عن الفيروسات العادية حيث أن كثيراً منها لوحظ في القرن التاسع عشر وإن أول الأمراض الفيروسية قد اكتشف في هولندا في القرن السابع عشر. أما بالنسبة للأمراض المتسببة عن فيروسات مثل فيروس الدرنه المغزلية في البطاطس وفيروس اكسوكورنز الحمضيات كانت أولى الملاحظات لهما في أوائل العشرينات من هذا القرن، بينما مرض تقزم حشيشة الدينار الفيرويدي، وفيروس الثمرة الباهتة في الخيار كان أول وصف لهما في الفترة من ١٩٦٣ - ١٩٧٠ واستمر لغاية ١٩٧٤. وبشكل خاص تدل البيانات أن المرض المتسبب عن فيروس الثمرة الباهتة في الخيار كانت أول ملاحظة له في صوبه زجاجية مفردة ثم إنتشر منها، بينما مرض كادانخ - كادانخ في جوز الهند أول ذكر له كان عند ظهوره في جزيرة صغيرة في الفلبين.

من كل ما سبق يتبين أن الفيروسات حديثة الأصل، وقد افترض أنها نشأت من نشاطات الانسان مثل ادخال الزراعات الاحادية Monocultures حيث أنها قد تكون ساهمت في تكاثر وانتشار الفيروسات والأمراض الفيروسية. ونظراً لأن الفيروسات غالباً لا تسبب اعراضاً في النباتات البرية، بالتالي افترض بأنها نشأت من عائل نباتي برى غير معروف لم تكن ممرضه عليه، ثم بعد ذلك إنتقلت إلى نباتات مزروعة حساسة بواسطة التطعيم أو بالمصادفة وهذا يكون باعثاً على تكوين RNA متناسخ وممرض وهو الفيرويدي.

٢ - نشوء الفيروس بالمصادفة من أحماض نووية RNAs عادية :

هذا الاقتراح الثانى لاصل الفيروسات يذكر أن الفيروس قد نشأ بالمصادفة المحضة فى الطبيعة من أحماض نووية RNAs عادية منتظمة فى النباتات المزروعة طبيعياً أو فى النباتات البرية وتحول إلى تركيبات عالية الثبات وذات كفاءة على التناسخ الذاتى وذات قدرة على الحركة داخل وبين الخلايا. واعتماداً على ذلك فإن العالم Dien-er قد تنبأ بأن أمراض فيروسية جديدة على النباتات المزروعة سوف تستمر فى الكشف والظهور بشكل غير متوقع.

إن الأحماض النووية RNAs ذات الأوزان الجزيئية المنخفضة بالإضافة إلى mRNA وإلى rRNA ذوات 5S تتواجد فى الخلايا العادية بشكل خاص فى الأنوية والنويات وتكون مترافقة مع الكروماتين. بالرغم من أن وظيفة هذه الأحماض غير معروفة، إلا أنه كان هناك إقتراحاً بأن بعض RNAs فى النواة قد يكون لها دوراً فى تنظيم بعض وظائف النواة وتتدخل أيضاً فى تنظيم نسخ RNA من الجينوم. كذلك وجد أن بناء RNA فى نظام الخلية الحر بواسطة أنزيم Polymerase بكتيريا *E. coli* باعتبار الكروماتين قالب شجعت بإضافة RNA كروماتينى ذو الوزن الجزيئى المنخفض بينما (فى حالة DNA كقالب) فإن بناء RNA كان يشبط بإضافة مثل هذا الحمض RNA.

إن فيروس الدرنه المغزلية المتصور والذى يكون مرافقاً للكروماتين والذى يكون فى نفس مجال الوزن الجزيئى يمكن أن يكون متعلقاً ببعض الأحماض النووية RNAs فى النواة والنوية. وبالتالى فإن الباحث قد يتأمل فى أن فيروس الدرنه المغزلية، ومن المحتمل فيروسات أخرى نشأت من RNAs من النواة والتي تكون مكونات عادية للكائن والتي تكون أيضاً أساسية لتكشفه. إن تحول RNA من مكون عادى فى الخلية إلى مسبب مرضى ممكن أن يحدث إما بواسطة طفرة أو بواسطة دخوله مصادفة فى نوع غريب والذى يتناسخ فيه هذا ال RNA. فى أى من الحالتين فإن المرض سيكون هو نتيجة التداخل مع الوظائف العادية للأحماض RNAs فى النواة.

٣ . حدوث تداخل فى تتابع النيوكليوتيدات فى الحمض النووى RNA :

قد تكون الفيروسات نشأت من حدوث تداخل فى تتابع النيوكليوتيدات فى الحمض النووى RNA. هذا الافتراض يبدو أنه مدعماً بتمائل التتابع بين معظم تنوعات التتابع وتتابعات الفيروسات (باستثناء فيروس ضربة الشمس فى الافوكادو) والنهائية 5' للحمض RNA U1، حمض نووى صغير RNA يعتقد بأنه يدخل فى عملية التراكب للحمض mRNA.

عندما اكتشفت الجينات المنشقة Split genes فى الكائنات مميزة النواة وتراكب RNA (عملية التراكب تشبه القص واللصق وتتم بواسطة معقد اسمه Spliceosome)، عندئذ إقترح بأن الفيروسات من الممكن أن تكون قد نشأت بواسطة الانترونات Introns. يمكن تعريف الانترونات بأنها التتابعات التى توجد فى DNA مميزة النواة ولكنها تحذف من mRNA أثناء تجهيزه بحيث يصل إلى الطور الناضج خال منها.

يستطيع الباحث أن يتأمل بأن مثل هذه التتابعات يمكن أن تتيح الفرصة لكثير من الجزئيات الوسيطة ذات القواعد المزدوجة (كما تفعل الفيروسات)، وإذا ما أصبحت دائرية (كما هى الفيروسات) وبالتالي فإن هذه الجزئيات تصبح ثابتة وتنجو من التحطيم. إن إتخاذ الانترونات للشكل الدائرى قد لوحظ فى دراسات Borst سنة ١٩٨١ وذكر أن بعضاً منها تأخذ حجم الفيروسات تقريباً. والذى يمكن تصوره أن مثل هذه الانترونات يمكن أن تشكل تتابع ملائم مميز ويمكن أن تنسخ بواسطة أنزيم العائل القادر على العمل كأنزيم RNA polyme-rase للحمض RNA الموجه وبالتالي تنجو من ميكانيكية التوجيه فى خلية العائل.

إن الأحماض النووية الصغيرة من RNA المترافقة مع أجزاء من رايبونوكلو بروتين يعتقد بأنها داخلة فى علمية النسخ الأولية لمنتجات الجينات المنشقة. إن النهاية رقم 5' من حمض نووى مثل RNA U1 قد تبين بأنه يسلك كمكمل مع

نهايات الانترونات، ومن المعتقد أن هذا يعطى ميكانيكية تؤكد الاصلاح بالحذف لتتابع الانترون ودقة ارتباط تتابع التشفير.

مع أن التركيب الأولى للأحماض النووية الصغيرة SnRNA's غير مؤكد تماماً، إلا أن الدراسات الحديثة للجين المنشق فى أنواع النباتات الراقية ومثيلاتها من تتابع أطراف إنترون - إكسون مع تلك التى فى مميزة النواة، أدت إلى الاقتراح بان SnRNA مماثل لـ RNA U1 الموجود فى النباتات الراقية وأن تتابع النهاية 5' مشابهة لـ UIRNA. وإذا كان هذا صحيحاً فإن نظرية الانترون لاصل الفيرويد تنبأ أن تتابع نيوكليتيدي معين على الفيرويدات أن تسلكه كمكمل للنهاية 5' لهذا الحمض النووى الصغير المزعوم SnRNA بالإضافة إلى UIRNA.

ومن ناحية هذه التشابهات كان من الأفضل تحديد فيما إذا كانت تتابعات النيوكليتيديات فى فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس تحتوى على مطاطية كافية لتكوين تكامل مع النهاية 5' للحمض UIRNA أو لا تحتوى، ولكن الأستقصاء عن مثل هذه التتابعات فشل فى الكشف عن امكانية تكوين معقدات ثابتة بين RNA لفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس و UIRNA. وعلى أية حال لأن RNA الفيرويدي فى البطاطس يبدو بأنه ينسخ عن قالب RNA، فإن الخيط الكامل وليس الفيرويد نفسه يمكن أن يمثل إنترون ثابت ويسلك سلوك تكميلي مع UIRNA.

٤ - احتمالية نشوء الفيرويدات من الفيروسايدات Virusoids :

يمكن أن تكون الفيرويدات قد نشأت من الفيروسايدات وهى أحماض نووية RNAs دائرية صغيرة مغلفة فى بعض الفيروسات النباتية بجينوم ثنائى الشق dipartite. إن الاختلافات الاساسية بين الفيرويد والفيروسايد virusoid يبدو أنه فى كون الفيرويد يتناسخ بواسطة أنزيم العائل polymerase، بينما الفيروسايد يعتمد على أنزيم Replicase الفيروسي لتناسخه. وتختلف الفيرويدات عن الفيروسايدات فى النقاط الآتية:-

أ - لا يوجد تماثل في التتابع يمكن تقديره بين الفيرويدات والفيروسايدات.

ب - تختلف الفيروسايدات عن الفيرويدات في الصفات الثيرموديناميكية والهيدروديناميكية وهي بهذه الصفات تتشابه جداً مع التتابع العشوائي ومع طول وتركيب القاعدة ودائرية الفيرويدات.

٥ - يمكن أن تكون الفيرويدات قد نشأت من نظام تبادل المعلومات الوراثية بين خلايا مميزة النواة وعضيات الخلية:

يمكن أن تكون الفيرويدات والحمض RNA الفيروسي قد نشأت من نظام تبادل المعلومات الوراثية بين خلايا مميزة النواة وعضيات الخلية. هذا الاعتقاد متوقع جداً وهو يفترض أن الفيرويدات قادرة على إصابة النبات جهازياً ويمكنها أن تعتمد على ميكائزم العائل في الانتقال داخل الخلايا والتضاعف بسبب أن خلايا العائل (النبات) العادية تحتوي تركيبات لها صلة مع الأحماض RNAs والتي هي أيضاً قادرة على الانتقال والتضاعف لكي تسهل تكبيرها و-Extrachromosomal inheri- tance ومن الواضح أن مثل هذا النظام إذا وجد يمكن أن يكون مصدراً لتطور الفيرويدات وحمض RNA الفيروسي.

٦ - يمكن أن تكون الفيرويدات نشأت من كائنات أولية النواة:

لقد افترض أن الفيرويدات نشأت من الحمض النووي RNA في الكائنات أولية النواة عن طريق إصابة النباتات الراقية بواسطة كائنات غير مميزة النواة. بنى هذا الافتراض على ما وجد من أنه ليس فقط RNA polymerase في مميزة النواة ولكن أيضاً أنزيمات RNA and DNA - Polymerase من البكتريا E. coli قادرة على نسخ RNA الفيرويدي في المعمل إلى نسخ مكتملة من RNA و DNA. وعلى أية حال فإن التتابع المتعلق بالفيرويد لغاية الآن لم يمكن اكتشافه في أولية النواة.

٧ - يمكن أن تكون الفيروسات إشتقت من عناصر وراثية مترجمة:

يمكن أن تكون الفيروسات قد إشتقت من عناصر وراثية مترجمة Transposable genetic elements. لقد ذكر Kiefer et al سنة ١٩٨٣ أن تركيبات الفيروسات تحتوي تتابعات مشابهة لتلك الحادثة في نهايات بعض العناصر الوراثية القابلة للتحرك وكل من Retroviral - proviruses شاملة وجود التكرار المعكوس الذى يكون غالباً منتهياً بثنائية النيوكليوتيدة U - G و C - A مطوقاً بشكل غير كامل مباشرة التكرار ومطاطية طويلة من البيورين موجودة فى كثير من الفيروسات والتي تشابه التابع التمهيدي لانزيم النسخ العكسي للخط الموجب فى بناء DNA لـ Retroviral proviruses. وبالتالي يمكن القول بأن الفيروسات نشأت من العناصر القابلة للانتقال أو Retroviral proviruses عن طريق ازالة معظم المناطق الداخلية بالإضافة إلى التدخل فى تتابعات العائل.

إن تماثل التابع لأكثر من ٧٠٪ من فيروسات مجموعة PSTVd (فيروس الدرنة المغزلية فى البطاطس) يمكن أن يدل على أن اصولها من جد واحد أو (هذا أكثر احتمالاً) أن نشوءها فى مناطق جغرافية. متفرقة يدل على أنها نشأت من حدود مختلفة من RNA. ونظراً لأن تتابع الفيروس لا يحدث فى DNA العائل يستبعد أن تكون الفيروسات من أصل RNA ناتج من DNA. ونظراً لأن التابع المتماثل مع U RNA والصفات التركيبية تشبه العناصر القابلة للانتقال وتشبه Retroviral proviruses الناشئة من الأحماض RNAs غير المرضية من الأنواع غير المتقاربة من مميزة النواة.

تتابع اكتشاف الفيروسات:

إن أول كائن ممرض امكن تمييزه وتعريفه على أنه فيروس هو العامل المسبب لمرض الدرنة المغزلية فى البطاطس Potato spindle tuber viroid (كان يكتب

باختصار PSTV ولكن بعد سنة ١٩٩٢ إتفق العلماء على إضافة حرف (d) لتمييزها عن اسم الفيروسات واصبح يكتب PSTVd. لذا يلاحظ أن الفيرويدات كانت تكتب بدون حرف d ثم بعد الاتفاق أصبحت جميع الأسماء يضاف إليها هذا الحرف)، والذي كان ينظر إليه لمدة طويلة بأنه فيرس. كان أول إثبات على خطأ هذا الاعتقاد بواسطة العلماء Diener & Raymer سنة ١٩٦٧ حيث ذكرا بأن الكائن الممرض عبارة عن حمض RNA حر ولا يوجد أى جزئيات يطلق عليها علمياً إسم فيرس فى النبات المصاب. عندما تأكد الوزن الجزيئى لهذا الكائن الممرض سنة ١٩٧١ بواسطة كل من Diener و Singh فقد استعمل اصطلاح فيرويد = Viroid = لكى يمكن التفريق بين هذه الأحماض النووية RNAs المعدية والخالية من البروتين، وبين الفيروسات الكلاسيكية المألوفة التى تكون مغلفة بكبسولة من البروتين.

أما الكائن الثانى الذى أمكن تمييزه كفيرويد يصيب النباتات هو مسبب مرض اكسوكورتز الحمضيات Citrus Exocortis Viroid وأطلق عليه CEVd وذلك بواسطة Semacik & Sanger سنة ١٩٧٢. ثم بعد ذلك اكتشف فيرويد تقزم الاقحوان Chrysanthemum stunt viroid (CSVd) وذلك بواسطة Hollings و Diener سنة ١٩٧٣. ثم بعد ذلك توالى اكتشافات الأمراض الفيرويدية ومسبباتها كما فى جدول رقم ١، وإن معظم هذه الأمراض ذات أهمية إقتصادية فى المحاصيل النباتية. فمثلاً فيرويد كاذانج - كاذانج Cadang - Cadang الذى يصيب نخيل جوز الهند يسبب خسائر شديدة فى مزارع واسعة وهدد بشدة إقتصاد جميع المناطق التى يزرع فيها فى الفلبين.

جدول ١ : الأمراض الفيرويدية المكتشفة حتى سنة ١٩٨٣

العالم المكتشف	سنة الاكتشاف	الاختصار	المدى العائلي	اسم المرض الفيرويدي
Diener	١٩٧١	PSTVd	معظم نباتات العائلة الباذنجانية	١ - Potato spindle tuber Viroid الدرة المغزلية في البطاطس
Singh & Clark				
Sanger	١٩٧٢	CEVd	الحمضيات، العائلة المركبة	٢ - Citrus exocortis Viroid اكسوكورتز الحمضيات
Semancik & Weathers			العائلة الباذنجانية	
Hollings & Stone	١٩٧٣	CSVd	أنواع من العائلة المركبة	٣ - Chrysanthemum Stunt Viroid تقرم الاضحوان
Diener & Lowson				
Remaine & Horst	١٩٧٥	CCMVd	أنواع من العائلة المركبة	٤ - Chrysanthemum chlorotic mottle Viroid الشحوب المترقش في الاضحوان
Van Dorst & Peters	١٩٧٤	CPFVd	العائلة القرعية والطماطم	٥ - Cucumber pale Fruit الثمرة الباهتة في الخيار
Sanger et al	١٩٧٦			
Randles	١٩٧٥	CCCVd	نخيل جوز الهند	٦ - Coconut cadang - cadang كادانج - كادانج في جوز الهند
Randles et al	١٩٧٦			
Sasaki & Shikata	١٩٧٧	HSVd	العائلة الباذنجانية القرعية	٧ - Hop Stunt تقرم حيشية الدينار
Owens et al	١٩٧٨	---	---	٨ - Columnea erythrophae كولينا الكامن
Thomas & Mohamed	١٩٧٩	ASBVd	الافوكادو	٩ - Avocado sun blotch ضربة الشمس في الافوكادو
Mohamed & Thomas	١٩٨٠		القرعة	
Waite	١٩٨١	TASVd	معظم نباتات العائلة الباذنجانية	١٠ - Tomato apical Stunt تقرم قمة الطماطم
Galindo et al	١٩٨٢	TPMVd	الطماطم وبعض نباتات العائلة الباذنجانية	١١ - Tomato planta mucho النبات الذكور في الطماطم
Chen et al	١٩٨٣	BSVd	الباردوك	١٢ - Burdock Stunt

ملاحظة هامة :

١ - كان يكتب اسم الفيرويد بأخذ الحرف الأول من كل كلمة لغاية سنة ١٩٩٢ ثم بعد ذلك إتفق العلماء على إضافة حرف (d) بعد حرف الـ (V) لتمييزه عن الفيروس ولزيادة عدد الفيرويدات المكتشفه.

٢ - كان المرض رقم (١٠) يسمى سابقاً Tomato bunchy top disease.

مراجع خاصة بالفصل الأول

- 1 - Diener, T. O., Raymer, W. B. 1967. Science 158 : 378 - 381.
- 2 - —————1971. Comparative Virology ed. K. Maramorosch E. Kurstak, 433 - 467 New York Academic Press. 584.
- 3 - —————1972. Advance Virus Res. 17 : 295 - 313.
- 4 - —————1963. Virology 8 : 7 - 30.
- 5 - ————— et al. 1974. Virology 57 : 577 - 581.
- 6 - ————— 1979. science 205 : 859 - 866.
- 7 - Semancik, J. S., Weathers, L. G. 1968. Virology 36 : 326 - 328.
- 8 - ————— . 1970. Phytopathol. 60 : 732 - 736.
- 9 - ————— . 1972. Nature New Biol., 237 : 242 - 244.
- 10 - ————— . 1973. Virology 53 : 448 - 456.
- 11 - Singh, R. P., Bagnall, R. H. 1968. Phytopathol. 58 : 696 - 699.
- 12 ————— and Clark, M. C. 1971. Biochem. Biophys. Res. Commun 44 : 1077 - 83.
- 13 - Lawson, R. H. 1968. Phytopathol. 58 : 885 Abs.
- 14 - Loening, U. E. 1967. Biochemist J. 102 : 251 - 257.
- 15 - Kleinschmidt, A. K., Zahn, R. K. 1959. Z. Naturforsch B 14 : 770 - 779.
- 16 - Engelhardt, D. L. 1972. J. Virol. 9 : 903 - 908.

- 17 - Sogo, J. M., Koller, T., Diener, T. O. 1973. *Virology*: 55 : 168 - 170.
- 18 - Boedtker, H. 1971. *Biochem. Biophys. Acta.* 240 : 299 - 308.
- 19 - Sanger, H. L. 1972. *Advan. Biosci*, 8 : 103 - 116.
- 20 - ————— . 1984. *Microb*, 281 - 334.
- 21 - Zaitlin, M., Hariharasubramanian, V. 1972. *Virology* 47 : 296 - 305.