

الفصل الثانى

الفيرويدات وتفاعلاتها مع العائل

Viroids And Their Interaction With The Host

مقدمة Introduction :

الفيرويدات هى عبارة عن أحماض نووية ذات وزن جزيئى منخفض (1,1 × 10⁵) دالتون وذات تركيب فريد، يمكن عزلها من أنواع معينة من النباتات الراقية التى تعانى من أمراض معينة مميزة. الفيرويدات لم تكتشف ولم تعرف فى الأفراد السليمة من نفس تلك الأنواع التى تظهر عليها الأعراض، ولكن عند ادخالها فى مثل تلك الأفراد فإنها تتضاعف (تنسخ) تلقائياً بذاتها بالرغم من صغر حجمها وتسبب مجموعة الأعراض المرضية التى تظهر على النبات. وبالتالي فإن الفيرويدات هى عوامل مسببة للأمراض.

إن الفيرويدات غير مشابهة للأحماض النووية الفيروسية حيث أنها أحماض نووية غير مغلقة، وكذلك فهى غير مشابهة للفيروونات Virons حيث أنه لم يعزل أى فايرون من النسيج المصاب (الفايرون هو جزيء واحد من الفيروس)، وتختلف فى جميع صفاتها عن الفايروونات. جميع أفراد الفيرويدات التى عرفت حتى الآن تتكون من حمض نووى RNA وجميعها قد عزلت من نباتات راقية. تشكل الفيرويدات صف Class جديد من الكائنات الممرضة تحت الفيروسية وهى أصغر العوامل المعروفة المسببة لأمراض معدية.

حصل تقدم كبير في مفهوم الفيروسات منذ تسميتها سنة ١٩٧١ بواسطة العالم Diener وذلك عندما وضع أسس جديدة لهذا العلم مبنية على صفات العامل المعدى المسئول عن مرض الدرنه المغزلية في البطاطس. لقد وجد أن هذه الصفات تختلف أساسياً عن تلك الصفات التقليدية والمعروفة للفيروسات على الأقل في خمسة اعتبارات هامة.

١ - يوجد الفيرويد في الطبيعة على شكل حمض نووي RNA غير مغلف بكبسولة أو غطاء بروتيني .

٢ - لم يكتشف فايرون أو أجسام شبيهة بالفايرون في النسيج المصاب بالفيروسات.

٣ - الحمض النووي RNA في الفيروسات ذو وزن جزيئي منخفض .

٤ - بالرغم من صغر حجم الحمض النووي RNA المعدى إلا أنه ينسخ ويتضاعف تلقائياً بذاته في الخلايا القابلة للإصابة، هذا يعني أنه لا يتطلب فيروس مساعد (كان في بداية الأبحاث يعتقد بضرورة وجود فيروس مساعد مع الفيرويد لكي يتكاثر) .

٥ - يتكون الفيرويد من حمض نووي ذو تركيب أولي وثانوي وثالث وفي النهاية يأخذ شكل دائرة.

مما سبق يمكن القول بأن الفيرويد عبارة عن كائن حيوى متميز عن مسببات الأمراض الأخرى.

إذا ما نظر الباحث إلى الكتب الحديثة التي تبحث في الكيمياء الحيوية، البيولوجيا الجزيئية أو الكائنات الحية الدقيقة، فإنه يمكن أن يلاحظ في هذه الكتب ما ملخصه أن الفيروسات هي أصغر مسببات الأمراض تتكون من RNA وهي أصغر التركيبات ذات التضاعف (التناسخ) الذاتي وهي أقل المستويات في التسلسل الهرمي في الحياة.

تعتبر الفيروسات من المسائل المثيرة والمربية، ليس فقط من ناحية البيولوجيا الجزيئية ولكن أيضاً من ناحية علم الفيروس، علم أمراض النبات، الفيزياء الحيوية وفي علوم أخرى ذات صلة بها. إن الزيادة الواضحة في معرفتنا عن الفيروسات يمكن أن تلاحظ بزيادة الأبحاث التي تجرى عليها باستمرار.

يمكن القول بأن الفيروس عبارة عن حمض نووي RNA احادى الخيط تتخلله أجزاء دائرية، يتكون من بضع مئات من النيوكليوتيدات ويكون ممرض في النباتات الراقية فقط. لوحظت الأهمية الاقتصادية للأمراض الفيروسية في النباتات منذ الربع الأول من القرن العشرين، ولكن في تلك الفترة كانت تعتبر هذه الأمراض متسببة عن فيروسات.

في بعض الاعتبارات هناك ظاهرة تشبه الفيروسات وهي الفيروسسايدات Virusoids، وهذه الأخيرة عبارة عن جزيئات من الحمض RNA بحجم وتركيب يشبه الفيروس وتكون مغلفة مع بعضها البعض بحجم كبير من RNA كما في كثير من الفيروسات النباتية وهي لا تتناسخ ذاتياً ولكن بعضها يسلك مثل RNAs المرافقة للفيروسات العادية والبعض الآخر يمكن أن يكون جزء مكمل في آلية التناسخ في الفيروس.

تفاعلات خلية عائل الفيروس Viriod - Host Cell Interactions

عندما تدخل الفيروسات في الخلايا القابلة للإصابة فإنها تتضاعف ذاتياً، هذا يعنى بدون الحاجة إلى فيروس مساعد. هذه القاعدة البيولوجية الحقيقية أثارت عدداً من الأسئلة مثيرة للاهتمام أهم هذه التساؤلات هي :-

١ - باى ميكانيكية تتضاعف الفيروسات؟؟. ونظراً لأن الفيروسات قد تحددت على أنها أنواع مميزة ذات وزن جزيئى منخفض من الحمض النووى RNA هذا الذى يدخل كمية قليلة جداً من المعلومات الوراثية في خلايا العائل. لذا يبدو أولاً أن أنزيمات العائل الموجودة قبل دخول الفيروسات، معمظها أو كلها تكون مسئولة عن تضاعف الفيروس.

٢ - باى ميكانيكية تحدث الفيروسات المرض فى عوائل معينة؟؟ علاوة على ذلك فإنها تتكاثر فى أنواع نباتية أخرى قابلة للإصابة بدون إحداث أضرار مميزة فى العائل!!.

فى الصفحات اللاحقة إن شاء الله سوف نجد أجوبة لهذه التساؤلات.

موقع الفيروسات فى الخلية Subcellular Location :

لقد أظهرت الإختبارات الحيوية للأجزاء تحت الخلوية من أوراق طماطم مصابة بفيروس PSTVd أن أجزاء النواة فقط تحتوى على فيروس يمكن تقديره. أما الكلوروبلاست، الميتوكوندريا، الرايبوسومات والأجزاء الذائبة تحتوى على آثار فقط من الفيروس. إن معظم كمية الفيروس فى النبات تكون مرافقة للكروماتين ويمكن استخلاصها على شكل حمض نووى RNA حر بدون منظم فسفاتى. إن فيروس اكسوكورتز الحمضيات CEVd يكون أيضاً بشكل أساسى فى مكونات النواة ملاصقاً تماماً للكروماتين أما بالنسبة لهذا الفيروس عندما يصيب نبات *Gynura aurantiaca* فإن كمية لا بأس بها من الفيروس تكون مرافقة لمكونات شبه غشائية للبلازما فى الجهاز الغشائى الداخلى، هذا ما ذكره العالم Semancik سنة ١٩٧٦.

إن الحقيقة التى تقول بأن PSTVd المعدى يكون موجوداً أولاً فى أنوية الخلايا لم تقدم الدليل على أنه يبنى هناك، وعلى أية حال فإن التجارب المعملية على نظام بناء RNA والتى فيها يستعمل أنوية خلايا نقية من أوراق طماطم مصابة كمصدر أنزيمى، أعطت هذه النتائج المذكورة، وبالتالي يبدو أن الفيروس المعدى الداخلى فى النبات يتحرك إلى النواة (بميكانيكية معينة) ويتكاثر هناك. إن غياب كميات معنوية من PSTVd من أجزاء أو مكونات السيتوبلازم فى الخلايا المصابة يؤدى إلى القول بأن معظم الذرية الناتجة من تكاثر الفيروس تبقى فى النواة.

وبشكل عام فإن الفيروسات توجد فى الطبيعة على شكل معقدات مع المكونات النووية وموجودة فى أجزاء خاصة أو عضيات الخلية. إن الدراسات

الحديثة التي بنيت على إختبارات الحيوية قد أثبتت أن الفيروسات مرافقة بشكل أساسي مع الأنوية و / أو الأغشية النووية. وفي أبحاث أخرى فإن الأنوية عالية النقاوة والكلوروبلاست من نسيج ورقة طاطم قد استعمل في الدراسة ومحتواها من PSTVd قد حدد كميأ بواسطة الاتجاه المزدوج من الهجرة الكهربائية في الجيل، فقد وجد أن ٩٥٪ من RNA الفيرويدي في الأنوية، لا يوجد تجانس في التوزيع داخل النواة ولكنه مترافقاً مع أجزاء النوية. عند زيادة القوة الأيونية، هذا يؤدي إلى إنطلاق الفيروسات. لقد استنتج من كل ما سبق أن الفيروسات مترافقة مع النوية بواسطة بروتين حمض نووي. اعتماداً على ما تقدم وجد أن متوسط عدد نسخ الفيرويد بين ٦٠٠ - ١٠٠٠٠ نسخة في الخلية.

ترجمة الفيرويد Viriod Translation :

إن الفيروسات ذات سلسلة طولها كاف لأن يشفر لعديد من الببتيدات حوالي ١٠٠٠٠ دالتون، مع أنه في حالة PSTVd الدائري فإن العدد الفردي للنيوكليوتيدات والذي من ناحية نظرية يسمح بثلاثة دورات في الترجمة بطريقة تتغير كل مرة.

الإختبارات التي أجريت في المعمل على RNA لفيرويد PSTVd و CEVd لكي يقوم بوظيفة tRNA في أنظمة مختلفة لبناء البروتين في الخلية المفردة الحرة، أعطى دليلاً على أنه لا يوجد أى من هذين الفيرويديين عنده كفاءة لمثل هذه الوظيفة. وجد أن CEVd أيضاً لا يترجم في بويضات *Xenopus laevis* حتى بعد أن أجرى له عملية polyadenylation في المعمل ولم يمكنه أن يتدخل في ترجمة mRNAs الداخلى. إن إفتقار PSTVd إلى حيوية ونشاط mRNA ليست غريبة بالنظر إلى حقيقة أنه لا يوجد كودون الابتداء AUG في ترتيب نيوكليوتيداته (هناك عديداً من المجموعات الثلاثية GUG من الممكن أن تعمل كبادئ).

مع أن الفيروسات لا تعمل مثل mRNA's في هذه الأنظمة، إلا أنها يمكن أن تترجم في الطبيعة عن سلسلة مكاملة من RNA مبنية بواسطة أنزيمات العائل الموجودة مسبقاً مع استعمال RNA الفيرويدي المعدى كقالب. لقد حددت

وعرفت تتابعات النيوكليوتيدات فى RNA المكمل للفيروس فى النسيج المصاب وذلك بواسطة العالم Owens سنة ١٩٨٠. ولقد اقترح أن هذه السلسلة المكمل للفيروس يمكن أن تعمل عمل RNA's. أما بالنسبة لفيروس PSTVd فإن السلسلة المكمل له (cPSTVd) كما أنشأت حسب تتابع نيوكليوتيدات الفيروس يمكن نظرياً أن تعمل عمل mRNA. مع أن cPSTVd لا يحتوى على أى من الوحدات الثلاثة الابتدائية (لبدء البناء) AUG إلا أنه يحتوى أربعة وحدات ثلاثية GUG وستة وحدات ثلاثية لتوقف البناء والتي نظرياً تؤدي إلى أربعة عديدات الببتين تحتوى ١٠٨، ٧٩، ٤٣ أو ٢٨ حمض أمينى. وسواء كان أم لم يكن RNA's المكمل للفيروس يعمل عمل mRNA's (لا يعرف حتى الآن) إلا أنها إذا كانت تعمل فإن بروتينات خاصة فيروسية غريبة يمكن أن تكتشف فى تخضيرات البروتين من نسيج العائل المصاب.

إن المقارنة بين أنواع البروتين فى الطماطم السليمة والمصابة بفيروس PSTVd وفى نباتات *Gynura aurantiaca* سليمة ومصابة بفيروس CEVd، على أية حال، لم تظهر إختلافات نوعية بين النباتات السليمة والمصابة. فى تلك الدراستين ظهر أن هناك زيادة فى بناء إثنين من البروتينات على الأقل فى النباتات المصابة عنه فى نسيج النباتات السليمة، ولكن تبين بعد ذلك أن هذين البروتينين خاصين بالعائل وليس بالفيروس. كذلك فإن التحليل بالهجرة الكهربائية فى الجيل ذات الاتجاهين للبروتينات المصنعة فى كل من خلايا الطماطم المصابة أو غير المصابة بفيروس PSTVd والمأخوذ من المزارع المعلقة أظهرت أنه لا يوجد تغيرات كمية ولا كيفية تنتج عن بقاء الفيروس داخل الخلية.

علاوة على ذلك برغم أن طرقاً أكثر حساسية فى التحليل يمكن أن تكشف عن وجود عديد من بروتينات خاصة بالفيروس فى الخلايا المصابة، إلا أنه فى ضوء المعلومات الحالية يجب أن نخرج بنتيجة أن الفيروسات لا تعمل عمل mRNA's. وإذا كان كذلك فإن ترتيب نيوكليوتيدات cRNA الموجود فى النسيج المصاب يجب أن يكون قد صنع كلية بواسطة أنزيمات العائل الموجودة سابقاً إلا أنها من الممكن أن تكون قد استحثت.

تركيب الجزيء Molecular Structure

مقدمة :-

الفيروسات هي جزيئات من RNA احادى السلسلة مكون من شكلين دائرى مغلق ومستقيم ويتخلل هذين الشكلين من RNA مناطق قصيرة تأخذ شكل قريب من الحلزون المزدوج والتي تتكون نتيجة لتكوين ما يسمى بتركيب دبوس الشعر hairpin بين تتابعات متكاملة كثيرة موجودة فى الجزيء بحيث تتزواج عند إتواءها وتكون مناطق مزدوجة السلسلة والتي تظهر تحت الميكروسكوب الالكترونى كأنها عصيات مزدوجة السلسلة.

لقد تحدد ترتيب النيوكليتيديات كاملاً فى فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس وذلك بواسطة العالم Gross سنة ١٩٧٨. واعتماداً على أساسيات هذا الترتيب بالإضافة إلى دراسات الدنميكما الحرارية Thermodynamic والنشاط الانتقالى لدرجات الحرارة المدنترة لهذا الفيروس، إقترح نموذجاً للتركيب الثانوى لفيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس. واعتماداً على هذا النموذج فإن الفيروسات توجد فى شكلها الطبيعى على هيئة تركيب يشبه العصى ممتد يتميز بسلسلة من قطع ذات شكل حلزونى مع وجود عروات داخلية. وبالتالي فإن التركيب شبه العصى الذى كان يفترض للفيروسات الطبيعية يعتبر الآن غير صحيح ومبنياً على النقص ويفضل عليه التركيب شبه العصى ذو العروات الداخلية وأطراف شبه دائرية مع تركيب دبوس الشعر.

بعد ذلك فإن الترتيب الكامل لنيوكليتيديات فيروس تقزم الاقحوان CSVd قد تحدد بواسطة العالم Haseloff سنة ١٩٨١. وبالمقارنة الواضحة مع فيروس الدرنه المغزلية PSTVd والذى يتكون من ٣٥٩ نيوكليتيديداً فإن فيروس CSVd يتكون من حمض نووى RNA وحيد السلسلة دائرى مغلق يتكون من ٣٥٦ نيوكليتيديداً، من

بين هذه النيوكليوتيدات المتتابعة هناك ٦٩٪ منها موجود في فيروس PSTVd وبالتالي فإن كلا الفيرويديين يمكن أن يشكلنا تركيب ثانوى متماثل.

كذلك فإن السلالات المعتدلة من PSTVd قد أجرى لها عملية ترتيب، وإن نتائج التركيب الأولى قورنت مع تلك التى حددت سابقاً للسلالات الشديدة. تبين أن السلالات المعتدلة تختلف عن السلالات الشديدة بثلاثة نيوكليوتيدات تتواجد فى مواقع مختلفة من الجزئ وهى AA إلى U فى الموقع ١٢٠ - ١٢١، A إلى U فى الموقع ٣١٠ ودخول U بين موقعى ٣١٢، ٣١٣ كما حدده Gross سنة ١٩٨١.

إن هذه النتائج متسقة مع النتائج السابقة والتي ذكرت أن الفيرويدات تتكون من أنظمة وراثية صفاتها مشفرة فى ترتيب النيوكليوتيدات فى RNAs. وبالتالي فإن ترتيب النيوكليوتيدات فى النوع المفرد من الفيرويدات يختلف بشكل واضح عن بعضها البعض، بينما ترتيب سلالات النوع الواحد يختلف إختلافاً بسيطاً فقط. ومن المهم أن نذكر أن الاختلافات البسيطة فى ترتيب السلالتين المعتدلة والشديدة فى فيروس PSTVd لم يكن يتوقع أن يكون لها مثل هذه النتيجة البيولوجية العميقة.

١ - التركيب الأولى والثانوى Primary and Secondary Structure

إن وصف الفيرويدات بأنها حمض نووى RNA خال من البروتين وثبوت صغر حجمها والتعرف على شكلها الدائرى، كل ذلك كان سبباً أساسياً لدراسة تتابع النيوكليوتيدات فيها وتركيبها الثانوى المعقد. وعلى كل حال فإن الإسهاب فى شرح التركيب، الشكل شبه العصى والخيط المفرد، موديل التركيب الثانوى الذى يتكون من عروات وحلزونات Loops and helices أصبحت معروفة جيداً قبل أن يتحدد تتابع النيوكليوتيدات.

هناك طريقة واحدة يبدو أنها تبشر بنجاح الحصول على تفصيل متقن للترتيب الكامل للنيوكليوتيدات في الفيرويد:

في المعمل فإن تعليم 5[′] لأجزاء الفيرويد التي حصل عليها بواسطة الهضم الكلى أو الجزئي باستعمال أنزيم رايونيوكليز النوعى مع 5[′]- polynucleotide Ki-nase و ATP (γ - p)³². إن أول تركيب كامل للفيرويد كان قد تحدد بواسطة هذه الطريقة، كان للفيرويد PSTVd. هذا يؤكد دون التباس وجود الشكل الدائرى فى الجزئ ويظهر عديداً من صفات التركيب والتي أصبحت نموذجية لجميع الفيرويدات. أما النيوكليوتيدات المتحورة نوعاً ما كما فى تلك الموجودة فى tRNA لم يمكن تعريفها.

إن التركيب الثانوى للفيرويدات كان قد أستنتج من نتائج التجارب ومن مدلولات النظريات. إن التركيب الثانوى للفيرويدات يكون فى شكل سلسلة غير متفرعة من لولب قصير مضاعف ذو عروات داخلية صغيرة. كل هذا كان واضحاً تماماً فى فيرويد PSTVd وتأكد بواسطة كل التتابعات التى حددت فيما بعد.

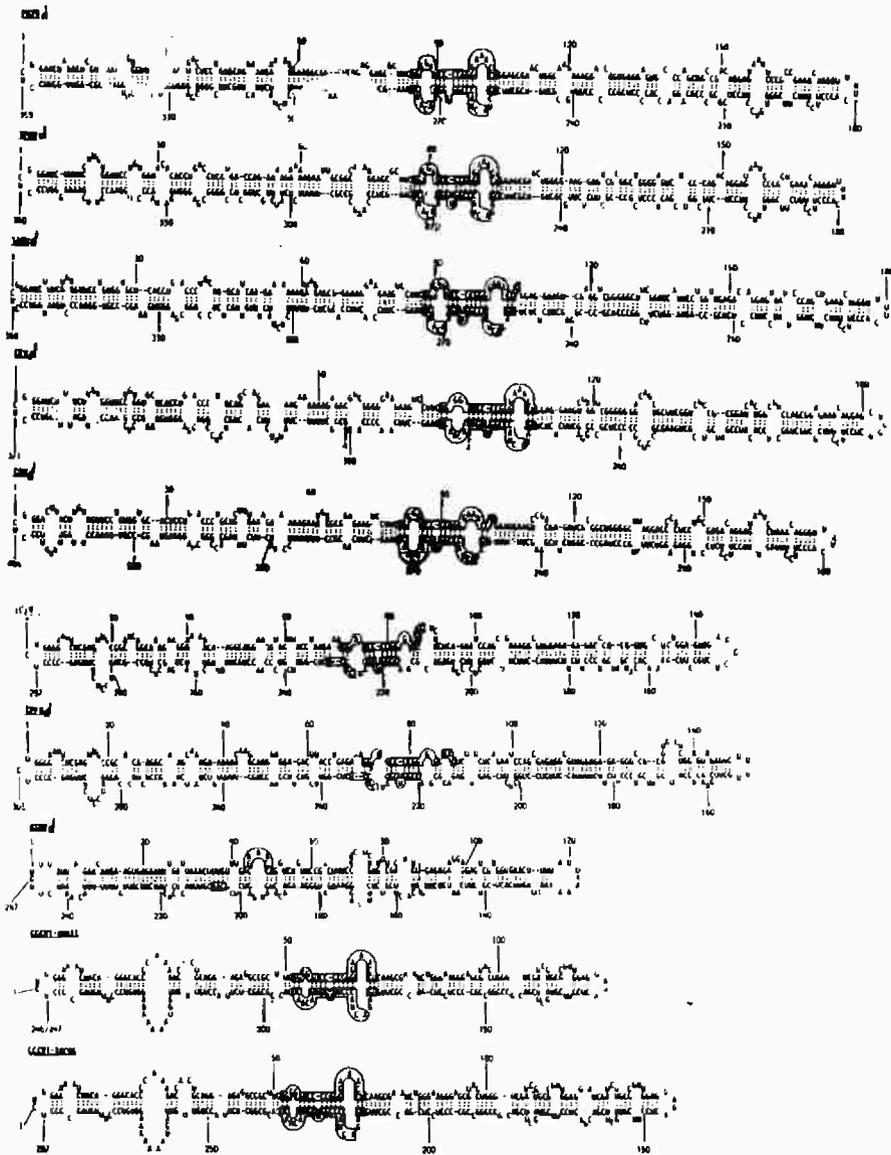
وأخيراً فإن نظام التتابع الثانوى قد استعمل بنجاح فى كل من :-

١ - نسخ الفيرويد المستقيم إلى cDNA.

٢ - الكلونة Cloning.

٣ - تتابع cDNA للفيرويد المكلون وذلك بالاعتماد على تكنيك تتابع ال DNA.

مع أن مراقبة التتابع بواسطة التعليم بالاشعاع فى المعمل قد أظهر بأن تجمعات الفيرويد تحتوى على تتابع مختلف وأن ترتيب العديد من cDNA المكلون للفيرويد



شكل رقم ٢ :

التتابع والتركيب الثانوي للفيرويدات. CCCVd 1 - small تحوى ٢٤٧ نيوكليوتيدة. التتابع فى المنطقة المحفوظة كعلب تسمى المنطقة عالية الحفظ.

الواحد يسمح بتوطيد وثبيت التتابع الفردي للمتغيرات حتى في تلك الحالات حيث أن عدم التجانس لا يعرف بواسطة التتابع المباشر للحمض RNA.

في شكل (٢) تتابع بعض الفيروسات مرسوم في تركيبها الثانوى والذى هو مأخوذ من ورقة البحث الأساسية وإن المقارنة بين تتابع هذه الفيروسات يدل على أن هناك على الأقل ثلاثة مجموعات من الفيروسات:-

١ - مجموعة PSTVd والتي تضم CEVd, TASVd, TPMVd, PSTVd, CSVd, وإلى حد ما تضم HSVd و CPFVd.

٢ - مجموعة ASBVd.

٣ - مجموعة CCCVd. إلا أن هذا سيوضح بالتفصيل في دراسة التصنيف فيما بعد.

في جدول رقم ٢ هناك بعض المعلومات الكمية عن التتابع والتركيب الثانوى للفيروسات. إن أفراد مجموعة PSTVd تتميز بالتتابع المتماثل (المتناظر) لحوالى ٦٠٪ أو أكثر من حيث نيوكليوتيداتها A:U, G:C, وبالتالي فإن نسبة البيورين إلى البيريميدين تكون واحدة تقريباً وهناك حوالى الضعف من ازواج القواعد G:C بالنسبة إلى A:U. إن بين ٤ - ١٦٪ من ازواج القواعد تكون ازواج G:U. بالقرب من منتصف التركيب الثانوى هناك يوجد منطقة تتابعها متناظر جداً تظهر كمنطقة مقلبة في شكل ٢. هناك خيط ممتد طويل من ال polypurine موجود بالقرب من هذه المنطقة المركزية المحفوظة وإن تماثل التناظر يكون عالياً فى النصف جهة اليسار من التركيب الثانوى عنه فى النصف اليمين. إن النصف اليسارى يكون أقل ثباتاً من ناحية ديناميكية عنه فى النصف اليمينى. وبشكل واضح فإن التركيب الثانوى لهذه الفيروسات يمكن تقسيمه إلى جزء يسارى والذى يحتاج تتابعات محفوظة مع بعضها البعض إلى حد ما بتركيب لولبى بسبب إنخفاض الثبات الديناميكي، والنصف اليمينى، والذى يكون فيه الثبات أكثر أهمية من تتابع النيوكليوتيدات.

بالنسبة لإثنين من الفيروسيدات في مجموعة PSTVd، فإن الفيروس PSTVd نفسه والفيروس CEVd هما عزلات مختلفة (طفرات) معروفة بأنها تختلف بواسطة تتبعها وجزئياً بشدة الإصابة مثل التعبير بالأعراض. أما ASBVd، CCCVd فهي تختلف عن بعضها البعض بمقدار ما تختلف عن فيروسات مجموعة PSTVd. فمثلاً ASBVd، CCCVd لا تحتوي على تنابع polypurin. في CCCVd يوجد منطقة محفوظة مركزية، بينما في ASBVd يوجد فقط تعاقب مشترك من GAAAC. كذلك فإن هذه الـ GAAAC موجودة في الفيروسات في المنطقة المركزية في التركيب الثانوي. كذلك فإن ASBVd يظهر أقل تناظراً مع الفيروسات الأخرى.

بالإضافة إلى أن CCCVd يختلف عن جميع الفيروسات بسبب أن هناك أربعة تنوعات من CCCVd ذات أطوال مختلفة تكون مترافقة مع مرض كادانج - كادانج في جوز الهند فهي تسمى:

١ - Small - 1 - CCCVd به ٢٤٦ نيوكليتيده وهو عبارة عن تضاعف تماماً في Small - 2 - CCCVd حيث يحوى الأخير ٤٩٢ نيوكليتيده. وهي تحدث في الأطوار المبكرة من المرض بينما يظهر إثنان من الأحماض النووية-RNA متأخراً بعد عدة سنوات من الإصابة.

٢ - Large - 1 - CCCVd فيه ٢٨٧ نيوكليتيده.

٣ - Large - 2 - CCCVd فيه ٥٧٤ نيوكليتيده.

يختلف CCCVd نوع Large - 1 عن نوع Small - 1 عن نوع في تضاعف ٤١ نيوكليتيده في النهاية اليمنى في التركيب الثانوي وهذا سبب ظهور العزلة Baa054. إن حجم المنطقة المضاعفة يختلف بين ٤١ - ٥٥ بين العزلات المختلفة من CCCV.

جدول ٢: التركيب الأولى والثانوى للفيريدات.

ازواج القواعد				اعداد النيوكليوتيدات المنتشرة بين العزلات			التتابع المتماثل %		التيروكلينوتيدات				الفيروس		
A:U %	G:C %	G:U %	العدد الكلى	درجة %	مزالة	محصنة	مستبدلة	مع العزلات	مع PSTVd	C	G	U		A	الجموع
٢٩	٥٨	١٣	١٢٦	٧٠	-	-	-	١٠٠	١٠٠	١٠٨	١٠١	٧٧	٧٣	٣٥٩	PSTVd
٣٠	٥٧	١٣	١٢٨	٧١	١	١	٢	٩٩	-	١٠٨	١٠١	٨٠	٧٠	٣٥٩	PSTVd عزلمستقلة
٣٠	٥٨	١٢	١٢٤	٦٩	٠	٠	٤	-	-	١٠٨	١٠٠	٧٧	٧٤	٣٥٩	PSTVd عزلة شبيهة
٣١	٦٠	٩	١٢٢	٦٨	-	-	-	٩٩	٨٣	١٠٨	٩٩	٨١	٧٢	٣٦٠	TPMVd
٣٢	٥٧	١١	١٣١	٧٣	-	-	-	-	٧٣	٩٩	١٠١	٩٠	٧٠	٣٦٠	TASVd
٢٨	٥٦	١٦	١٢٨	٦٩	-	-	-	١٠٠	٧٣	١١٢	١١٢	٧٥	٧٢	٣٧١	A-CEVd
٢٨	٥٦	١٦	١٢٨	٦٩	٠	٠	٤	٩٩	-	١١٢	١١٠	٧٦	٧٣	٣٧١	C-CEVd
٢٨	٥٦	١٦	١٢٥	٦٧	٠	٠	٤	٩٩	-	١١٣	١١٠	٧٦	٧٢	٣٧١	AM-CEVd
٢٨	٥٦	١٦	١٢٨	٦٩	٠	٠	٤	٩٩	-	١١٢	١١٢	٧٦	٧١	٣٧١	DE 25-CEVd
٢٨	٥٨	١٤	١٢٦	٦٨	٦	٦	١٥	٩٣	-	١١٠	١١٢	٨٠	٦٩	٣٧١	DE 26-CEVd
٣٤	٥٦	١٠	١٢٢	٦٩	-	-	-	١٠٠	٧٣	٩٧	٩٠	٩٣	٧٤	٣٥٤	E-CSVd
٣٥	٥٢	١٣	١٢٤	٧٠	٢	٤	٦	٩٧	٦٩	٩٩	٨٩	٩٣	٧٥	٣٥٦	A-CSVd
٢٩	٦٤	٧	١٠٠	٦٧	-	-	-	١٠٠	٥٥	٨٨	٧٩	٦٩	٦١	٢٩٧	HSVd
٣١	٦٥	٤	١٠٥	٦٩	١	٧	٨	٩٧	٥٥	٨٨	٨١	٧٠	٦٤	٣٠٣	CPFVd
٥١	٣٤	١٤	٨٣	٦٧	-	-	-	-	١٨	٤٣	٥١	٨٥	٦٨	٢٤٧	ASBVd
٢٤	٦٩	٨	٨٠	٦٥	-	-	-	١٠٠	١١	٧٢	٧٣	٤٧	٥٣	٢٤٦	CCCvd - J صغير
٢٥	٦٧	٨	٩٢	٦٤	٠	٤٦	٠	١٠٠	-	٨١	٨٦	٥٨	٥٩	٢٨٧	Baao 54 كبير
٢٤	٦٨	٨	٩٦	٦٥	٠	٥٠	٠	١٠٠	-	٨٧	٩١	٥٩	٥٩	٢٩٦	Ligao 14 B
٢٤	٦٨	٨	٩٧	٦٤	٠	٥٥	٠	١٠٠	-	٨٩	٩٣	٥٩	٦٠	٣٠١	Ligao T1
٢٤	٦٨	٨	٩٦	٦٥	٠	٥١	٠	١٠٠	-	٨٨	٩١	٥٩	٥٩	٢٩٧	San Nascisco

ملاحظات:

١ - يعتبر CPFVd بالنظر إلى تتابعه المتناظر تنوع من HSVd.

٢ - J - 1 CCCvd الصغير هو خليط من الأنواع واحد يحتوى 197 فى موقع C والآخر يحتوى CC فى ذلك الموقع. وهناك 2 - CCCvd لم يذكر فى الجدول لأنه تضاعف ل RNAs المتناظرة.

٣ - جميع عزلات CCCVd1 الكبير تختلف عن عزلة الصغير وذلك بتضاعف التابع على النهاية اليمنى فى التركيب الثانوى وبالتالي يكون تناظر التابع ١٠٠٪. إن المنطقة المتضاعفة قد ذكرت تحت بند المقحمة. أما عزلة 54 Baa، Ligoa 14B، Ligao T1 قد إشتقت من CCCVd1 الصغير مع ٢٤٦ نيوكليتيده. أما Aan Nascisco هو مشتق من CCCVd1 الصغير ٢٤٧ نيوكليتيده.

٢ . التركيب الثانوى Secondary Structure :

كما ذكر سابقاً فإن التركيب الثانوى للفيروسات قد استنتج من نتائج التجارب بالإضافة إلى الحسابات النظرية. إن التجارب باستعمال المواد الكيماوية المحورة مثل :-

١ - Dye binding .

٢ - Oligonucleotide binding .

٣ - تقدير الروابط الفسفورية (الفسفات ثنائية المجموعة الاسترية) القابلة للمهاجمة بواسطة الانزيمات.

أظهرت بوضوح وجود الخيط المفرد بالإضافة إلى مناطق ثنائية الخيط. وكذلك لقد استنتج أيضاً أن معظم الجزيئ يكون قابلاً للتفاعل الاشارى Ligand وغير مغلف بواسطة أى تركيب ثلاثى مؤدياً إلى شكل كروى. وعلى أية حال فإن حقيقة أن المناطق احادية الخيط والحلزونية المزدوجة تكون مرتبة فى نمط أو طريقة تسلسلية بدون تشعب أو تفرع، وهذا يمكن استنتاجه فقط من التقدير الكمى لمنحنيات الدنترة الحرارية للفيروسات.

إن الأصل النظري للتركيب الثانوى قام وفقاً لثلاثة مستويات:

الأول:- الشكل العصى المتطاوّل للجزئ وهذا كان قد أخذ من نتائج التجارب وبواسطة النظام التجريبي والخطأ، فإن مخططات القاعدة المزدوجة جعلته أقرب مايكون إلى أعلى رقم من القواعد المزدوجة، ٦٩ مثلاً.

الثانى:- المستوى العال من التنقية. إن الأبحاث الـثيرموديناميكية أثبتت وجود التركيب الثانوى للفيرويد.

الثالث:- إن نظام العد العشري والحساب الذى إتبعه كثير من العلماء مثل كل من Nussinov & Jacobson سنة ١٩٧١ و Zuker & Stiegler سنة ١٩٨٠ قد طبقوه فى الحساب الدقيق للتركيب الأقل حفظاً للطاقة. وإن هذا النظام قد أحدث فيه تحسناً وتحوّراً لحساب الخيوط الدائرية والقيم الأحدث لازواج القواعد الثابتة والعرواى.

يمكن القول باختصار إن أبسط الطرق للحصول على أقرب مايمكن من الدقة لأعلى رقم من القواعد المزدوجة وأكثر الحسابات تعقيداً أدت إلى القول بوجود تركيب ثانوى متناظر تقريباً. الاختلافات وجدت فقط فى مناطق محدودة من الجزئ. كما أن تركيبات ثانوية متماثلة جداً حصل عليها أيضاً عندما استعملت مجموعات مختلفة من معلومات الثبات العنصرى. فمثلاً إن التركيب الثانوى للفيرويد PSTVd الذى ذكر بواسطة Riesner et al سنة ١٩٧٩ أو الذى ذكر بواسطة Jacobson سنة ١٩٨٠ كان متوافقاً تماماً. يمكن القول بكل أمان أن تركيب الفيرويد غير غامض ولا عليه التباس وبالتالي حتى التقديرات التقريبية تؤدى إلى التركيب الصحيح. جدول رقم ٣.

جدول رقم ٣: القياسات التيرموديناميكية للتركيب المقطعي للفيرويدات،
الفيروسايدات وتتابعات عشوائية

	$\Delta G/N$ (KJ/mel)	T_m [c]	$\Delta T_{1/2}$ [c]	Mechanism
Viroids				
PSTVd	1.67	51	0.9	Formation of stable hairpins
CEVd	1.62	51	1.0	
CSVd	1.61	48.5	1.1	
CCCvd - 1- Large	1.53	49.1	1.2	
CCCvd - 1- small	1.53	49.1	1.4	
ASBVd	1.13	37.5	1.5	not determined
Virusoids				
SNMV2	1.43	38	2.8	—
VIMoV2	1.32	38	2.0	—
Random sequences	1.27 ∓ 0.1	36 ± 5	> 5	—

ملاحظات:

في التابع العشوائي عدد النيوكليوتيدات ومحتويات من G, C, U, A مأخوذة من PSTVd. التابع العشوائي متوسط لخمسة مكررات. T_m و $\Delta T_{1/2}$ قيمها تشير إلى قوة أيونية $0.11, Na^+$ ، رقم حموضة ٦,٨.

٣ - التركيب المقطعي Structural Transitions :

إن التراكييب المقطعية للفيرويدات قد درست بعدة طرق منها: -

أ - منحنيات الدنترة بالحرارة.

ب - طرق قياس الحرارة الدقيقة.

ج - الطرق الديناميكية.

د - طرق الارتفاعات المفاجأة لدرجات الحرارة.

إن منحنيات التفكك سواء التي حصلت بواسطة UV - hypochromicity أو بواسطة الاختلافات الحرارية، تظهر مقطع رئيسي ضيق على حوالى ٥٠م في ٠,٠١١ أيون صوديوم Na^+ ودرجة حموضة (6.8) pH. كذلك فإن درجة حرارة النقطة الوسطى T_m تكون أقل بحوالى ٢٠م عن قيمة ال T_m للحمض DNA ثنائى الخيط وأقل بحوالى ٣٠م عن الحمض RNA ثنائى الشريط عند مقارنة كليهما بمحتوياتهما من GC. إن قيمة T_m لمعظم أنواع الفيروسات تتراوح ما بين ٥١ - ٣٦م. أما قيمتها لمنتصف العروض لمعظم التراكيب المقطعية للفيروسات هي $1/2 \Delta T$ تتراوح ما بين ٩,٠ إلى ٥,٠م. إن متوسط الطاقات الحرة لكل نيوكليتيده $\Delta G / N$ يتراوح ما بين ١,٦٧ إلى ١,٢٧ كيلو جول (KJ) لكل مول. إن مقطع واحد أو اثنين من ذات ال hypochromicity المنخفض وذات ΔT $1/2$ قد لوحظت على درجة حرارة ١٠ - ٢٠م اعلى من المقطع الرئيسى. فى المقطع الرئيسى عال التعاون فإن جميع ازواج القواعد فى التركيب الطبيعى تفكك وتكون قطع متكاملة تكون فى أجزاء متباعدة من التركيب الطبيعى تعود تتحد ثانية لتكون شكل دبوس الشعر الأكثر ثباتاً. فى درجات الحرارة العالية فإن دبائيس الشعر هذه يحدث لها دنترة على شكل مقاطع أو أشكال حرارية منفصلة. ولقد لوحظت هذه الأشكال فى Electron micrographs. لقد وجدت دبائيس الشعر الثابتة فى التجارب على درجات الحرارة العالية. يجب أن نذكر أن دبوس الشعر رقم I موجود فى المنطقة المحفوظة جيداً.

إن شكل رقم ٣ يوضح أشكال دبائيس الشعر فى بعض الفيروسات.

إن طريقة اعادة الترتيب لشكل الفيرويد من التركيب المتطاوول الطبيعى إلى تركيب مدنتر جزئياً مع تكوين أشكال دبوس الشعر جديدة لوحظت أول مرة

بالتجارب. نفس الميكانيكية يمكن الحصول عليها نظرياً بدون إفتراض سابق عن التركيب الثانوى. إن الحسابات التى إتبعها العالم Nussinov سنة ١٩٨١ قد استعملت على درجات حرارة مختلفة وأظهرت أن الشكل المتحصل عليه يمكن أن يلتوى ويأخذ شكل ضيق يتراوح ما بين الشكل المتطاوول إلى الشكل المتفرع وأن الشكل الرئيسى يسهل عليه القيام بهذه الأشكال إلى حد كبير. وإن الحسابات قد أظهرت أن الدنترة تبدأ فى النصف اليسارى من التركيب الثانوى. هناك منطقتان حيث يكون التركيب الثانوى أكثر قابلية للتغير هما منطقة البولى بيورين الأكثر قابلية للمط polypurine stretch والمنطقة المجاورة إلى الجانب اليسارى من المنطقة المحفوظة. هاتان النقطتان الضعيفتان فى التركيب تقريباً متماثلتان فى الفيروسيدات CSVd، CEVd، PSTVd.

Viroids	-Hairpins-		
	I	II	III
PSTVd	<pre> 79 87 CGCUUCAGG : : : : : GCGAGGUCC 110 102 </pre> <p>14</p>	<pre> 227 236 CCUCGCCCC : : : : : GGGAGCGGG 328 319 </pre> <p>82</p>	<pre> 127 135 CGUGGGGA : : : : : GCCGCCU 168 160 </pre> <p>28</p>
CEVd	(possible but not studied)	<pre> 239 251 CCCUCGCCCCGAG : : : : : GGGAGCGGGCCUC 339 327 </pre> <p>79</p>	not possible
CSVd	(possible but not studied)	<pre> 223 233 CCUAGCCCGG : : : : : GGGAUCGGGCC 322 312 </pre> <p>76</p>	not possible
CCVd-large	<pre> 46 54 CGCUUGAGG : : : : : GGAACUCC 77 69 </pre> <p>14</p>	not possible	not possible

شكل رقم ٣ :

دبابيس الشعر لأربعة فيروسيدات. العدد يدل على منطقة القواعد المزدوجة والرقم فى الدائرة يدل على حجم العروة. يلاحظ دبوس الشعر رقم ٣ لا يوجد إلا فى الفيروسيد PSTVd.

الوزن الجزيئي والشكل Molecular Weight and shape :

إن الأوزان الجزيئية قد حددت أصلاً من ١ - الهجرة الكهربية في الجيل . ٢ - Sucrose gradient ٣ - Electron micrographs . إن اولى الأوزان الجزيئية الدقيقة (الصحيحة) قد حصل عليها باستعمال آلة الطرد عن المركز فائقة السرعة ثم بعد ذلك يتم إجراء توازن على الترسيمات بطرق معينة . ونظراً لأن تتابع تركيب الفيرويدات معروف الآن، فإن معظم الأوزان الدقيقة يمكن حسابها من هذا التتابع . يمكن الحصول على قيم جيدة بمعدل وزن جزيئي ٣٣٣ لكل نيوكليتيده تشمل Bound cations .

أما بالنسبة للشكل، فتظهر الفيرويدات في الصور المأخوذة بواسطة Electron micrographs على شكل تركيب عصوي إذا ما حضرت تحت ظروف طبيعية (١,٠ . مول كلوريد صوديوم و pH 7) . هذه النتيجة معروفة بالنسبة لكثير من الفيرويدات مثل PSTVd، CPFVd، CCCVd، و HCVd . كذلك أيضاً من دراسات سرعة الترسيب على فيرويد PSTVd والأشكال الأربعة لفرويد CCCVd، أمكن الاستنتاج بأن الفيرويدات تمتلك تركيب شبه عصوي في المحلول، زيادة على ذلك فإنها تأخذ في المحلول بعض المرونة التي تجعل شكلها شبه دائري والتي يمكن تمييزها أيضاً بوجود مسافة قصيرة تتكرر في الفيرويد، هذا الطول المتكرر يكون تقريباً نصف قطر الدائرة التي يمكن أن ينحني إليه البوليمر، هذا الطول يساوي ٣٠٠ أنجستروم . وعند إجراء مقارنة بين هذا الطول والطول المتكرر في حمض DNA ثنائي الشريط فيكون ٦٠٠ أنجستروم، يعنى الضعف تقريباً . إن هذا الطول ليس له علاقة بطول الفيرويد نفسه لأن طول الفيرويد لا يتجاوز ٥٠ نانوميتر .

نتيجة التحليل بطريقة Sedimentation coefficient أمكن الاستنتاج بأنه حتى في الأشكال المضاعفة من CCCVd والتي تسمى RNA2 فإنها تتخذ في المحلول الشكل المتطاوّل . العالم Haseloff et al سنة ١٩٨٢ استنتج بدراسته على أساس

التتابع فى النيوكلييتيدات أن الفيرويدات تأخذ الشكل المتطاوول بالإضافة إلى الشكل الصليبي .

يمكن القول بأن الفيرويد يأخذ الشكل المتطاوول ذو الانتفاخات فى النهايتين ويتكون عروات بين هذين الانتفاخين، بالإضافة إلى حدوث إنثناءات التى تشكل ما يسمى دبوس الشعر.

هناك وصف آخر لشكل الفيرويد يذكره Agrios سنة ١٩٨٧ يقول فيه تظهر الفيرويدات على شكل جزئيات دائرية من RNA وحيد الخيط بأزواج عديدة من القواعد فى أجزاء هذا الخيط، تؤدى ازواج القواعد هذه إلى ظهور بعض أنواع تركيبات تشبه دبوس الشعر بخيط مفرد ومناطق مزدوجة الخيط على نفس الفيرويد.

مع أن الفيرويدات تمتلك كثيراً من صفات الأحماض النووية RNAs المفردة الخيط، إلا أنه عندما تفحص بالميكروسكوب الالكترونى تظهر بطول حوالى ٥٠ نانوميتر ولها سمك الخيط المزدوج من الحمض النووى DNA.

ولقد ذكر Maramorosch فى كتابه سنة ١٩٩١ «قال» تتخذ جزئيات الفيرويد غير المدنترة كثير من أزواج القواعد الداخلية بحيث تكون هذه الأزواج مرتبطة لتعطى تركيب شبه عصوى بطول ٥٠ نانوميتر، أما عند دنترة هذه الجزئيات فإنها تعطى دوائر احادية الشريط يكون طول محيطها ١٠٠ نانوميتر. أما الوزن الجزيئى يساوى $(١٢٢ - ٨٠) \times ٣١٠$ أما $S_{20w} = ٨ - ١٠$ أما T_m فى ١٠ ملى مول أيون صوديوم = ٥٠م. أما الكثافة فى كبريتات السيزيوم تساوى تقريباً ١,٦ غم / سم^٣.

أما الصفات الكيماوية فذكر أن الفيرويدات تتكون من ٢٤٦ - ٣٧٠ نيوكليتيده. كل الفيرويدات باستثناء ASBVd غنية بأزواج القواعد G:C بالمنطقة المحفوظة المركزية إن ال oligomers عندها الكفاءة لتشكل تركيبات بلاندرميه

(من الأمام تشبه التركيب من الخلف) تشمل الجزء العلوى من المنطقة المحفوظة المركزية. إن الفيرويدات ليس لها القدرة على أن تشفر للبروتين.

تناسخ (تضاعف) الفيرويدات

VIROIDS REPLICATION

إن تضاعف الفيرويد من ناحية نظرية يشمل النسخ إما عن قالب RNA أو DNA. إن ميكانيكية RNA الموجه تتطلب وجود تتابع مكمل للحمض RNA فى الفيرويد الكامل فى النسيج المصاب، بالإضافة إلى وجود أنزيمات مسبقة فى العائل مع أنزيم RNA - polymerase المتخصص للحمض RNA الموجه.

أما ميكانيكية توجيه DNA فإنها تتطلب أيضاً وجود تتابعات مكاملة للحمض DNA للفيرويد الكامل. هذه التتابعات للحمض DNA يمكن أن تكون موجودة مسبقاً - بشكل مثبت - فى العوائل غير المصابة أو أنها يمكن أن تصنع نتيجة للإصابة بالفيرويد، وفى هذه الحالة فإن أنزيمات العائل الموجودة مسبقاً مع أنزيم DNA - polymerase المتخصص للحمض RNA الموجه أيضاً تكون ضرورية الوجود.

هل يحدث تضاعف لـ RNA أو DNA الموجه:

هناك أبحاث قديمة فى أوائل السبعينات ذكرت أن التضاعف يحدث فى كلا الحمضين RNA و DNA، إلا أنه تبين واضحاً أن تضاعف الفيرويد يحدث على قالب من RNA وليس من DNA، وإن الفيرويد الداخلى هو الذى يعمل كقالب لبناء ذرية جديدة من الفيرويد وليس DNA الخاص بالعائل.

ولكى نميز بين تضاعف RNA أو DNA الموجه، فإنه تأثيرات بعض مركبات المضادات الحيوية على تضاعف الفيرويد قد درست جيداً. فى الدراسة على الطبيعة كانت تؤخذ شرائح من ورقة نبات سليم وأخرى مصابة بفيرويد PSTVd وكانت

تعامل بالماء أو بـ Actinomycin - D، وجد أن تضاعف الفيرويد كان حساساً للمثبط الذى يثبط بناء RNA من DNA الموجه وهذا وجده العالم Diener سنة ١٩٧٥. وحصل على مثل هذه النتائج فى الدراسة المعملية على نظام بناء RNA والذى فيه كانت تؤخذ أنوية الخلايا من النباتات السليمة أو المصابة بالفيرويد PSTVd من نباتات الطماطم وتنقى جيداً وتستعمل كمصدر للانزيم.

إن حساسية تضاعف الفيرويد لمادة Actinomycin - D قد تأكدت فى دراسة قام بها العالم Muhlbach سنة ١٩٧٩ وذلك على فيرويد الثمرة الباهتة فى الخيار (CPFVd) الذى يبنى فى البروتوبلاست المعزول من أوراق الطماطم. فى نفس هذه الدراسة فإن تأثير amanitine - ∞ على بناء الفيرويد قد تميزت تماماً. إن وجود مادة amanitine - ∞ بتركيز ١٠-٨ مول بين الخلايا يكون كافياً لتثبيط أنزيم RNA polymerase II (الذى يختص بنسخ سلاسل جزيئات RNA المراسل mRNA) على DNA الموجه فى نباتات الطماطم، إلا أنه لا يثبط أنزيم RNA polymerase III (الذى يقوم ببناء عدد من سلاسل RNA القصيرة الناقل tRNA و rRNA) وبالتالي لا يثبط تضاعف الفيرويد CPFVd. وعلى النقيض من الدراسات التى أجريت باستعمال Actinomycin - D التى استعمل فيها amanitine - ∞ والذى فيها يكون تأثير هذا المركب على بناء الفيرويد ذو نتيجة غير متوقعة ليس بتثبيط نوعى لبناء RNA من DNA الموجه، ولكن تأثير سام كلى على البناء الحيوى، وأن التأثير المثبط لمادة amanitine - ∞ ليس من المحتمل أن يكون بسبب عدم التخصص النوعى ولكن بسبب التأثيرات الثانوية للمركب على ميتابولزم الخلية. إن هذا الملخص قد تأكد بالتقريرات التى بينت أن تركيز مادة- ∞ amanitine بين الخلايا الكاف لتثبيط تضاعف الفيرويد بحوالى ٧٥٪ لم يكن له تأثير ملحوظ على البناء الحيوى لكل من RNA لفيروس موزايك الدخان أو أنواع RNA الخلوية مثل tRNA، 5S RNA، 7S RNA و rRNA.

هناك بعض الدراسات تبين أن بناء RNA من DNA الموجه هو الداخلى فى

تضاعف الفيرويد وهذا يكون أكثر وضوحاً بالتجارب التي يستعمل فيها α -amanitin، هذه النتائج التي لم توافق تلك المتحصل عليها باستعمال Actinomycin - D فقط ولكن بالإضافة إلى استعمال أنزيم نوعى والذي يسمى RNA polymerase II الذى يعمل على DNA.

إن هذه النتائج أدت إلى القول بثقة أن أنزيم polymerase II يكون داخلاً مباشرة أو غير مباشر فى تناسخ الفيرويد. زيادة على ذلك فإن الاعتماد فى بناء CEVd على أجزاء النواة فى النبات *Gynura aurantiaca* وعلى التركيز الأيونى مثل Mg^{2+} ، Mn^{2+} ، $(NH_4)_2SO_4$ مستوى خط بناء CEVd حتى على تركيز عال من α -amanitin 10^{-10} - 10^{-6} مول يمكن إعتبار تشارك RNA polymerase رقم I و III.

إن امكانية تناسخ الفيرويد بواسطة polymerase II قد دعمت بالدراسات المعملية باستعمال أنزيم RNA polymerase II نقى من نسيج طماطم سليمة أو من جنين قمح. ولقد تبين أنه بوجود أيونات Mn^{2+} فإن الأنزيم ينسخ RNA الفيرويدى إلى خيوط مستقيمة سالبة ذات طول كامل وأن هذا الفيرويد يكون مقبولاً لأن يكون قالب ذو كفاءة عالية بالمقارنة مع RNA الطبيعى أو المبنى. زيادة على ذلك أنه خلال بناء الوسيطات للطول المعين فإنه يتجمع، هذا يدل على إفتراض واضح فى ادخاله فى المعمل. ولقد ذكر أن أيونات Mn^{2+} والتي عادة تخفض تخصص القالب لانزيم البولى ميريز polymerase لا يحتاج إليها هنا (وأن الفيرويدات) حتى إذا قورنت مع الفيروسايدات تظهر درجة أعلى فى الأهمية لنشاط القالب.

فى تجارب التحليل بواسطة الة الطرز عن المركز فائقة السرعة، فإن الارتباط الثابت بين polymerase II من جنين القمح والفيرويد PSTVd وجد أنه $7.10 M^{-1}$. إن هذا الرقم منخفضاً بالمقارنة مع إرتباط محفز ال polymerase، ولكن حوالى درجة أعلى من التكبير منه فى ارتباط ال polymerase إلى أحماض نووى RNAs طبيعية شاملة الفيروسايدات. فى التصوير الالكترونى Electron micrographs لقد

تبين أن RNA polymerase II من جنين القمح يمكن أن يرتبط من كلتا النهايتين لفيروس PSTVd التركيب الثانوى.

إن الحقيقة التى تقول بأن الفيروسات من الممكن أنها تستطيع أيضاً أن تنسخ فى الطبيعة بواسطة أنزيم العائل RNA polymerase II والذى عادة يقبل العمل على ال DNA ثنائى الخيط كقالب، يمكن أن تؤدى إلى الاقتراح بأن الفيروسات تكون أخطاء فى الخلية لقطع من ال DNA. هذا يمكن أن يعكس التركيب الاستثنائى والصفات الديناميكية للفيروسات والتى قد وصفت سابقاً بأنها شبيهة بـ DNA.

فى المعمل فإن النسخ للحمض RNA للفيروس PSTVd إلى نسخ كاملة الطول بواسطة أنزيم RNA polymerase المعتمد على RNA من نسيج ورقة سليمة قد ذكرت أيضاً. هذا الأنزيم يكون بوضوح مرشح لتناسخ RNA الفيروسي للنبات. لا يكون تناسخ الفيروس فى المعمل مثبطاً بواسطة amanitine - ∞. وبالتالى فإن هذه النتائج سوف لا تشرح الحساسية فى الطبيعة لمادة amanitine - ∞ لبناء الفيروس الملاحظة فى البروتوبلاست.

الانزيمات الداخلة فى تضاعف الفيروس Enzymes Involved :

لقد أظهر العالم Rackwitz سنة ١٩٨١ أن أنزيم RNA polymerase II (الذى يعمل على DNA الموجه) المأخوذ من جنين القمح أو من خلايا كالوس أو أوراق خضراء من أنواع طماطم برية *Lycopersicon peruvianum* تكون قادرة فى المعمل على نسخ العديد من قوالب RNA طبيعياً وتخليقياً، مع أنه على كفاءة أقل بمقدار الضعف من كفاءة قوالب ال DNA، ولقد أظهر الباحث أنه فى جميع قوالب ال RNA الطبيعية المختبرة، فإن الفيروسات تنسخ بكفاءة عالية بواسطة أى أنزيم. إن التحليل بواسطة الهجرة الكهربائية فى الجيل تحت ظروف الدنترة فى منتجات النسخ فى المعمل مع فيروسات منقاة تستعمل كقوالب كشفت بالإضافة إلى عديد من الجزئيات المكتملة للفيروسات الصغيرة.

باعتبار كل النتائج السابقة نستنتج أن الفيرويدات تتضاعف بطريقة غريبة والتي فيها تكون جزيئات RNA المعدى منسوخة كلية بواسطة أنزيم العائل الموجود سابقاً، وبالتالي فإن هذا الأنزيم يكون عادة RNA polymerase II لحمض DNA الموجه. يبدو واضحاً أن الأنزيم المسئول عن بناء حمض mRNA الموجود مسبقاً تحت ظروف معينة يمكن أن يعمل كأنزيم polymerase أو RNA replicase للحمض RNA الموجه. إن هذا يكون حائماً على التأمل بأن التركيب الطبيعي للفيرويدات يكون عبارة عن تركيب يشبه DNA ثنائي الشريط والذي يسمح للأنزيمات أن تقوم بعملها بشكل جيد نسبياً بهذه الكفاءة. لقد تبين أن الفيرويدات يمكنها بسهولة أن تشكل معقدات ثنائية مع RNA polymerase II والتي تشترك (تتنافس) مع DNA لعمل قالب لمواقع الربط على الأنزيم، وبالتالي فإنها تثبط وبشدة بناء RNA من DNA الموجه. من هذه الناحية فإن جزيئات الفيرويد المعدية تجند وتجر RNA polymerase II الموجود في النواة لتكاثرها الخاص. بالتالي يمكن اعتبار الفيرويدات بأنها أحماض نووية RNA أنانية (هذا ما قاله Lewin سنة ١٩٨١).

لغاية الآن لا يوجد تقارير على بناء الفيرويد باستعمال RNA polymerase رقم I أو III المعتمد على DNA النقي، وبالتالي لا يمكن اعتبارها داخلية في تضاعف الفيرويد. إن موقع الفيرويدات الناضجة في النوية سوف تظهر لصالح polymerase I الذي عادة يجري تناسخ RNA الرايبوسومي في النوية. إن تماثل التتابع بين تتابع محفز DNA من كائن حي آخر مع التتابعات على النهاية اليمنى في التركيب الثانوي للفيرويد PSTVd، CSVd أو CEVd قد وجد بواسطة كثير من الباحثين. ومن ناحية أخرى فإن موقع الفيرويدات الناضجة في النوية لا يستثنى بناؤها بواسطة الأنزيم polymerase II والذي يعرف بأنه موجود في البلازما النووية أو مترافقاً مع الكروماتين. هذا يمكن أن يكون متوقعاً من المقارنة مع الحمض النووي الصغير U3 والذي على الأقل في الخلايا الحيوانية ينسخ بواسطة polymerase II من الكروماتين وبعد ذلك يصبح مترافقاً مع النوية.

المنقبات Probes :

هناك طريقة أخرى لدراسة تناسخ الفيروس تكمن في تطوير المنقبات أو جزيئات من المنقبات الخاصة بالفيروس وتعريف تتابع القواعد في DNA أو RNA المتعلق بالفيروس قياساً على الحمض النووي المستخلص من النباتات وذلك بواسطة التهجين الجزيئي.

لقد استعملت ثلاثة أنواع من المنقبات هي :-

- ١ - فيروسات نقية معلمة في المعمل باليود المشع ١٢٥ .
- ٢ - خيط مفرد (محضر في المعمل) من DNA تكميلي للفيروس (cDNA).
- ٣ - خيط مزدوج من الفيروس ومكملة من ال DNA يحصل عليه بطرق فنية معينة.

في البداية يمكن القول بأن استعمال الفيروسات الممثلة باليود المشع ١٢٥ كمنقبات في تجارب التهجين أدى إلى نتائج متضاربة. على أساس مثل هذه التجارب فإن مجموعتين من الأبحاث قد ذكرتا وجود تعاقب مكمل للفيروس في DNA الفيروس المعدي وحتى في نباتات العائل غير المصابة، لكن الأبحاث اللاحقة أثبتت بوضوح خطأ النتائج السابقة. وبالمثل فإنه في تجارب التهجين الجزيئي بين cDNA المعلم بالفسفور المشع ٣٢ وفيروس تقزم الاقحوان CSVd فإن أَل Genomes سواء في العوائل السليمة أو المصابة بفيروس CSVd لم يلاحظ فيها تطابق في ترتيب وتعاقب النيوكليوتيدات.

وعلى أية حال فإن أى من هذه التجارب لم تستبعد إمكانية أن التتابعات المتعلقة بالفيروس قد تكون موجودة عشوائياً على كروموزومات العائل أو أن ال DNA للعائل يحتوى على مجموعة صغيرة فقط من جينوم PSTVd. وفي هذه الحالة الأخيرة فإنه من الممكن تصور أن هناك ترتيب قصير من قواعد ال DNA المكمل للفيروس قد تقوم بعملها كمواقع تمييز وقد تتدخل في تولد المرض بواسطة

الفيرويد. إنه من الواضح على أية حال أن أى من مثل هذه التتابعات من DNA المتعلقة بالفيرويد لا يمكن أن تعمل كقوالب لبناء أفراد جدد من الفيرويدات، ويصبح بالضرورة أن الفيرويدات يجب أن تتناسخ عن قوالب RNA. وإن هذا التقرير الأخير قد دعم بعدة ملاحظات تدل على أن التركيب الرئيسى للفيرويد لا يتغير بغض النظر عن العائل الذى يتناسخ فيه، وكما هو متوقع من أن الفيرويد الداخلى هو الذى يعمل كقالب لبناء ذرية جديدة من الفيرويد وليس DNA الخاص بالعائل.

المركبات الوسيطة فى تناسخ الفيرويد:

Intermediates of Viroid Replication

إن أكثر البراهين إقناعاً على أن RNA الموجه هو المسئول الرئيسى عن ميكانيكية تضاعف الفيرويد تكمن فى النتائج التى حصل عليها عدة مجموعات من الباحثين بأن جزيئات RNA المكتملة للفيرويد تتكون فى مستخلصات أحماض نووية من نباتات مصابة ولا تتكون فى مستخلصات الأحماض النووية من النباتات غير المصابة. ويبدو واضحاً أن مثل هذه الجزيئات تمثل مركبات وسيطة فى عملية تناسخ الفيرويد. إن تعاقب RNA المكمل للفيرويد أمكن التعرف عليه لأول مرة فى مستخلصات من نباتات طماطم مصابة بفيرويد CEVd وأوراق نبات *Gynura auran-tiaca* بواسطة التهجين فى المحلول بمنقّب فيرويد معلم بيود مشع ١٢٥. كما أن بعض الأحماض النووية RNAs المكتملة للفيرويد أمكن التعرف عليها فى الأجزاء الطافية من كلوريد الليثيوم، ولكن الغالبية العظمى كانت فى الأجزاء المترسبة من كلوريد الليثيوم. لقد ذكر العالم Grill سنة ١٩٧٨ أن RNA المكمل للفيرويد يكون مرافقاً لـ DNA العائل يكون على شكل جزيئات RF (شكل تناسخى) وRI (وسيط التناسخ) وكذلك مرافقاً لجزيئات تكثر فيها مناطق ذات خيط واحد وأخرى طويلة ذات مناطق ثنائية الخيط واحادية الخيط وأخرى على شكل بلمرة بالإضافة إلى تجمعات أو تكتلات ذات وزن جزيئى عال من الجزيئات المكتملة للفيرويد، إلا أن الباحث Grill سنة ١٩٨٠ لم يوافق على مثل هذه التصنيفات.

إذا فرض أن الأحماض النووية RNAs المكملة للفيروسات تقوم كقالب ينسخ عنه فيروسات جديدة فمن الواضح أنها يجب أن تحتوى على تعاقب كامل مكمل للفيروس، هذا يعنى أنها يجب أن تكون مساوية فى الطول أو أطول من الفيروس. ونظراً للطريقة غير السليمة التى إتبعها العالم Grill سنة ١٩٨٠ فى تحديد أحجام مكملات الفيروس لفيروس CEVd فإنه لم يصل إلى نتيجة فى تحديد حجم مكملات الفيروس. ويعود الخطأ فى طريقة Grill إلى أنه استعمل RNA غير مدنتر قبل التحليل وكانت تجرى عملية الفصل الكهربائى على الجيل تحت ظروف غير مدنتر.

إن الدليل المقنع لوجود جزيئات كاملة الطول من RNA مكمل للفيروس حصل عليه بواسطة كل من Owens و Cress سنة ١٩٨٠ فى تجارب Blot hybridization والتى فيها يستعمل خيط مزدوج من DNA معاد تركيبه كمنقب خاص للفيروس. إن هذا المنقب قد تم بناؤه عن طريق تخضين PSTVd polyadenylated مع أنزيم النسخ العكسى ويتبع ذلك ازالة قالب الفيروس بالتسخين. كانت النتائج بأن الشريط المفرد من DNA (الذى هو cDNA تكملى للفيروس PSTVd) قد إنقلب إلى cDNA ثنائى الخيط مقاوم لأنزيم S1 nuclease فى تفاعل استعمل فيه أنزيم DNA polymerase I للبكتيريا E. coli. إن cDNA الثنائى الشريط المكمل للفيروس PSTVd بعدئذ قد غرس فى pst I فى مواقع أنزيمات القطع الداخلى للبلازميد PBR 322 عن طريق استعمال اجراءات تعاقبات Oligo (dc) و Oligo (dG). إن المقاومة للتراسيكلين، تحول الحساسية للبنسلين، تحتوى على تنابعات مكمل لـ cDNA الفيروسى PSTVd المعلم بالفسفور المشع ٣٢ و كلون واحد أعيد تركيبه (29 - pDc) يحتوى ٤٦٠ زوج من القواعد المغروسة فيه. إن هذا الحمض ثنائى الخيط cDNA PSTVd يحتوى مواقع للتقسيم لسته مواقع محددة لانزيمات القطع الداخلى مؤكدة بالتتابع المذكور سابقاً للفيروس PSTVd. إن نتائج هذه التجارب وغيرها تدل على أن كل التعاقب الكامل للفيروس PSTVd قد حصل لها كلونة.

إن تجارب التهجين بواسطة بعض المنقبات أثبتت وجود جزيئات RNA في مستخلصات من خلايا مصابة لها نفس قابلية التحرك (ووزن جزيئي محتمل) كما في فيروس PSTVd المستقيم ولكن ذو قطبيه عكسية. إن جزيئات RNA المكمل للفيروس PSTVd التي لها نفس هذا الحجم قد وجدت بعد معاملة مستخلصات الحمض النووي بأنزيم RNase، دنتره الأحماض النووية RNAs باستعمال الحرارة لمدة دقيقتين على درجة حرارة ١٠٠م في ٥٠٪ Formamide ثم تبرد وبعد ذلك تحلل بالهجرة الكهربائية بالجيل على درجة ٥٥م في وجود ٨ مول يوريا. إلا أن العالم Branch ومرافقه سنة ١٩٨١ قد ذكروا نتائج تخالف هذه النتائج حيث استعمالاً أحماض نووية RNAs مدنتره قبل التحليل وإن التحليل بواسطة الجيل كان يفضل تحت ظروف يعرف أنها تمنع إعادة التقوية الكبيرة للحمض RNA.

وعلى العكس من ذلك فإن نتائج التجارب التي أجريت على فيروس CEVd، فإن cPSTVd كان موجوداً دائماً على وجه الحصر في الأجزاء الطافية من كلوريد الليثيوم (وزن جزيئي منخفض وخيط ثنائي)، وكذلك فإن النتائج أكدت أن معظم إن لم يكن كل cPSTVd كان موجوداً في مستخلصات الحمض النووي في شكل جزيئات مزدوجة مقاومة لأنزيم RNase، هذا يعني قاعدة مزدوجة مع PSTVd. هذا أمكن تفسيره بواسطة الملاحظات التي تدل على أن إنتاج cPSTVd لم يخف بشكل كاف إذا أزيلت تقوية RNA - RNA قبل المعاملة بأنزيم RNase.

ولقد أورد بعض الباحثين عدة براهين تثبت أن الخلايا المصابة بالفيروس تحتوي بالإضافة إلى خيط مكمل للفيروس كامل الطول تحتوي على جزيئات خاصة بالفيروس أطول من وحدة الفيروس الواحدة. إن أول إقتراح يدل على أن مثل هذه الأحماض النووية RNAs القريبة من الفيروس يمكن أن توجد في الخلية حصل عليه بواسطة إختبارات Blot hybridization مع مستخلصات حمض نووي من النباتات المصابة بالفيروس PSTVd، والتي فيها نوعين من RNA يحتويان على

مكمل للفيرويد cPSTVd لوحظ أن هجرتهما أكثر بطلاً من هجرة PSTVd. هذا ما ذكره Hadidi سنة ١٩٨١.

إن جزيئات RNA الخاصة بالفيرويد PSTVd تكون ذات حركة أثناء الهجرة الكهربية أكثر بطلاً من جزيئات الفيرويد PSTVd الدائرية والمستقيمة، هذا ما لوحظ في بعض الدراسات والتي فيها استعمل مستخلص حمض نووي من نباتات مصابة بالفيرويد PSTVd والتي استعمل فيها الهجرة الكهربية على الجيل والتي فيها كانت الجزيئات الخاصة بالفيرويد قد عرفت بواسطة طريقة التهجين Northern bolt التي استعمل فيها منقبات معلمه إما بيود مشع ١٢٥ مع PSTVd أو فسفور مشع ٣٢ مع cDNA. لقد لوحظ سبعة أنواع من cPSTVd، ستة منها تحركت في الهجرة الكهربية أكثر بطلاً من الفيرويد PSTVd الدائري والآخر تحرك تقريباً بنفس سرعة PSTVd الخيطي، إلا أن هذه التجارب قد إنتقدتها Hadidi سنة ١٩٨١ وأثبت عدم دقتها.

إن البرهان المقنع على وجود جزيئات من cPSTVd ذات طول أطول من وحدة الطول قد حصل عليه في دراسة مشابهة لطريقة Blot hybridization والتي فيها استعمل نظامين من الدنترة الكاملة في الجيل. لقد ظهرت وعرفت أربعة حزم متميزة من جزيئات cPSTVd. وباستعمال حسابات معينة تبين أن هذه الحزم تحتوي أطوال ٧٠٠، ١٠٥٠، ١٥٠٠ و ١٨٠٠ نيوكليتيده وهذا أدى إلى القول بأنها تمثل مرادفات للفيرويد PSTVd والتي تحتوي ٧١٨ قاعدة (ثنائي)، ١٠٧٧ قاعدة (ثلاثي)، ١٤٣٦ قاعدة رباعي، ١٧٩٥ قاعدة خماسي. لم يمكن التعرف على حزم لوحدة الطول من cPSTVd، قد يكون هذا بسبب التداخل في التهجين بكميات كبيرة من PSTVd غير المعلمة الموجودة في RNA من النباتات المصابة متحركة إلى نفس الموقع في الجيل كما في cPSTVd الاحادي. إن الدراسات الأنزيمية دلت على أن حزم cPSTVd تتكون على وجه الحصر من RNA موجود في معقدات محتوية على مناطق ذات خيط مضاعف. وبسبب التعريف الجيد للحزمة من cPSTVd فقد تبين أن حوالي ٤٠ نيوكليتيده تكون زيادة في طول

الوحدة الواحدة من PSTVd يمكن ملاحظتها بعد المعاملة بأنزيم RNase T₁، كذلك فلقد اقترح الباحث أن هناك كمية قليلة من RNA الداخلة في cPSTVd، يبدو أنها مكونة من مناطق ذات وحدات طول ثنائية الخيط محاطة جانبياً بمناطق احادية الخيط ويبدو أن هذه المناطق الأخيرة تتكون من تتابعات مقاومة لـ RNase T₁.

وبناء على النتائج السابقة فإن الباحثين افترضوا أن الحزم التي هي أطول من وحدة الطول الواحدة من cPSTVd تلعب دوراً في تناسخ الفيروس وأن معقدات cPSTVd تحتوى مناطق ثنائية الخيط من طول PSTVd تمثل مركبات وسيطية في التناسخ تدخل في تركيب حزم cPSTVd بطول تقريباً يساوى طول الفيروس مكرراً ترادفياً وأن حزم PSTVd الموجودة في هذه المعقدات تكون مساوية لطول الوحدة الواحدة من الفيروس. إن هذه الفرضيات بالإضافة إلى الاقتراح بميكانيكية تناسخ الفيروس بطريقة الدائرة الملتفة كلها كانت إفتراضات يمكن إثباتها وستكلم عنها فيما بعد.

هناك أبحاثاً أخرى وهي أيضاً مبنية على الفصل بالتفريد الكهربائي في الجيل للأحماض النووية RNAs تكون متنوعة بعملية Blot hybridization أثبتت أن التركيب الجزيئى للجزئيات الخاصة بالفيروس كانت أكثر وضوحاً وإن بعض الأدلة قد أثبتت أن هذه التركيبات هي فعلاً قد تمثل مركبات وسيطية في تناسخ الفيروس.

بالاتفاق مع الأبحاث السابقة فإن تجارب Blot hybridization المستعملة منقبات DNA أعيد تركيبها أظهرت أن معظم مكونات الفيروس هي RNA ثنائى الخيط (وذلك باستعمال مستخلصات RNA من نسيج مصاب) والتي تهجر في الجيل أكثر بطئاً من الوحدة الكاملة من PSTVd. إن أكثر الأحماض النووية RNAs شهرة والتي هي أكثر بطئاً في الهجرة هما حمضان قد فصل كل منهما عن الآخر بواسطة الكروماتوغرافى السيليلوزية والهجرة الكهربائية في الجيل، وإن

التركيب والحجم والشكل ومكونات PSTVd و cPSTVd لكل منهما قد تحللت في نظام الجيل والذى لا يحدث دنتره للحمض RNA ثنائى الخيط، ولكن يمنع إعادة التقوية والتركيب للأحماض RNAs المدنترة مسبقاً. إن هذا النظام من الجيل له فوائد أخرى فى فصل الجزيئات الدائرية عن الجزيئات المستقيمة فى PSTVd. إن المكونات ثنائية الخيط المعاملة وغير المعاملة بأنزيم RNase قد حللت بهذا النظام مع أو بدون الدنتره المسبقة. لقد أظهرت نتائج هذه التحليلات أن هناك مركبان كبيران هما أحماض نووية RNAs ثنائية الخيط خاصة بالفيرويد وتهاجر ببطء ذات تركيب قريب الصلة وأنها تتكون من حزم ذات وحدة طول دائرية وخطية وذات قطبية تشبه PSTVd مختلطة مع حزم RNA أطول من وحدة الطول للفيرويد وعكسية القطبية.

بعد ذلك أجريت تجارب عديدة كانت نتائجها قد بددت السر الذى كان يحيط بميكانيكية تناسخ الفيرويد، وبالرغم من أن هناك إختلافاً فى تفصيل تلك النتائج، إلا أنها كانت تكمل كل منها الأخرى وتميل بوضوح إلى الالتقاء فى مفهوم واحد وفكرة واحدة عن جزئ الفيرويد وميكانيكية تناسخه هذا المفهوم يشمل الفرضيات الآتية:-

١ - تنسخ الفيرويدات عن RNA تكميلي complementary وليس عن قوالب DNA.

٢ - هذه القوالب (RNA تكميلي) بالإضافة إلى الفيرويدات الناشئة (الذرية المتكونة) كلها تبنى بواسطة أنزيم العائل الموجود مسبقاً والأكثر احتمالاً هو أنزيم RNA polymerase II ويقوم بعمله مثل أنزيم Replicase أو كأنزيم RNA polymerase للحمض النووى RNA الموجه.

٣ - ينسخ الحمض النووى RNA المكمل للفيرويد من جزئ فيرويد دائرى بواسطة ميكانيكية اللف الدائرى والتي تؤدى إلى تكوين قوالب Multimeric وكميات كبيرة من معقدات تناسخ شبه وسيطية.

بعد هذه المقدمة الطويلة نستطيع أن نقول أن نتائج دراسات التهجين من عدة معامل قد أثبتت أن نباتات العائل سواء كانت سليمة أو مصابة لا تحتوي كميات يمكن التعرف عليها من DNA خاص بالفيروس. عندما إختبر RNA الموجود في الخلية للتتابع الخاص بالفيروس فإن RNA المكمل للفيروس وجد للفيروسات PSTVd، CEVd، وفي ASBVd. إن الأنسجة المصابة بالفيروس PSTVd تحتوي RNA تكميلي للفيروس الكامل. ولقد ثبت نهائياً أن RNA فقط هو الوسيط الداخلى فى تناسخ الفيروس، ولزيادة الوصف للحمض RNA الخاص بالفيروس فإن التهجين بالمنقبات الخاصة بتتابع الشريط (-) أو الشريط (+) قد إستعمل. إن المنقبات الخاصة بالأشرطة السالبة كانت فيروسات معلمة باليود المشع ١٢٥، أما الشريط الموجب دى او كسى نيوكليوتايدز، 93 M13 mp ملونة تحتوي تتابع الشريط الموجب. لقد إختبر تتابع الشريط الموجب بشريط دى او كسى نيوكليوتايد سالب cDNA، معلم بفسفور مشع ٣٢ أو كلونات M13 mp 99 تحتوي تتابع شريط سالب.

إن التحليل بطريقة Northern Blotting للشريط السالب ذو التتابع الفيرويدي أظهر أن الشرائط السالبة من نوع كثير الوحدات (multimers) باثنين إلى خمسة أضعاف طول وحدة الفيروس، ولقد أمكن التعرف على تتابع أطول من طول وحدة الطول فى فيروس CEVd، ASBVd. إن الشرائط السالبة لوحدة الطول لا يمكن التعرف عليها بسهولة، وعلى أية حال متى وجد زوج واحد من الشرائط التكميلية فى كميات كبيرة أكثر من الأخرى فإن الشريط الأقل من الصعب أو لا يمكن أن يتعرف عليه بطريقة Northern hybridization.

لقد أمكن التعرف على الشرائط الموجبة قليلة ازواج الوحدات Oligomeric للفيروسات. فى النسيج المصاب بالفيروس PSTVd هناك مستوى قليل من ال dimers و trimers وفى النسيج المصاب بالفيروس ASBVd قد أمكن التعرف على مستويات عالية من ال Oligomers إلى حد eightmers. أما فى

الفيرويد ASBVd فقد وصفت أجزاء دائرية ثنائية مشابهة لتلك الموجودة في RNA2 في الكاداغ - كاداغ.

إنشطار بوادئ الفيرويد قليلة الأزواج والتخليق في الفيرويدات

Splitting of Oligomer Viroid Precursors and Circularization of Viroids

إن التركيب الدائري للفيرويدات يمنحها فائدة القدرة الهائلة على الانتقاء أو الاختيار، نظراً لأن أنزيم ال polymerase حالماً يترافق مع RNA يكون عنده القدرة لإنتاج نسخاً عديدة الأزواج طويلة والتي عندئذ يمكن أن تنشطر إلى نسخ وحيدة (هذا يعنى إلى جزيئات تكون ذات طول يساوى طول وحدة واحدة). إن الوحدات المستقيمة، على الأقل الشروط الموجبة يجب أن تتحلل لتشكيل فيرويدات ناضجة.

ليس من الواضح تماماً بأي كفاءة تنشطر الوحدات العديدة إلى وحدة طول واحدة من الأحماض RNAs. إن الوحدات العديدة من الممكن أن تحتوى على تركيبات ثانوية مسبقة من وحدات monomers، وبالتالي فإن أنزيم Ribonuclease يمكن أن يحرر هذه الوحدات. أما في مجال الدراسات التي أجريت على تخكيم الفيرويدات، فإن هناك نوعان من الجزيئات المستقيمة قد عرفت في تحضيرات الفيرويد PSTVd الدائري والتي تختلف بوجود فتحة بين C181 و C182 وبين C348 و A349 بالترتيب. على الأقل فإن واحداً من هذه المستقيمات الطبيعية كان يعتقد أنها نتجت من إنشطار بادئ ال multimers. ولأسباب ثيرموديناميكية يجب على الباحث أن يتوقع تركيب لـ multimers يشبه تسلسل التركيبات الثانوية للفيرويد المتطاوول. في هذا التسلسل فإن الفتحة موجودة بين C181 و C182 يمكن أن تكون الواصلة بين التركيبات المتطاولة. إن تجاوز كل من C - A قد عرف أيضاً في RNAs كنقط ضعيفة بشكل خاص، وذكر أيضاً في بادئ RNA من البكتروفاج T₄ إنشطار ذاتي على هذه المنطقة. بجانب أنزيم Ribonuclease فإن

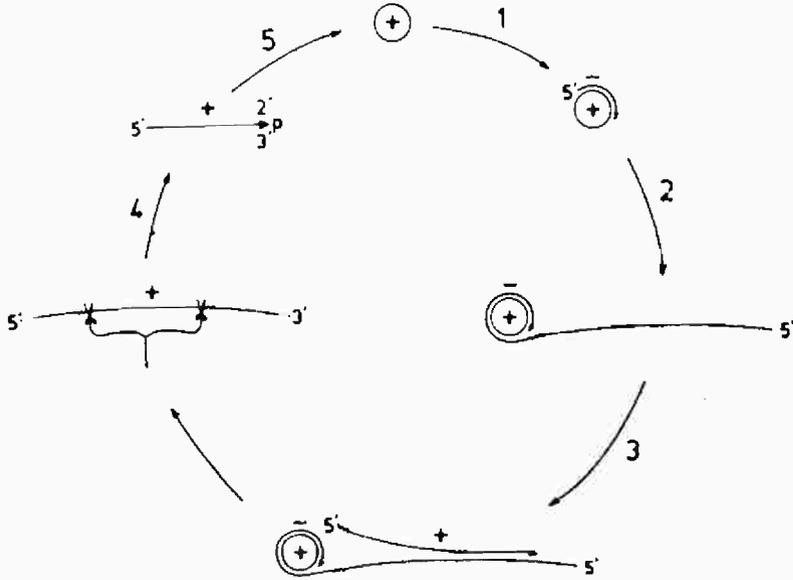
الهضم والتقطيع (الانشطار) الذاتى يتم حتى إتحاد القطع الذاتية وتوصيلها (هذا يعنى وصل ذاتى للقطعة ليشكل وحدات دائرية مباشرة كما هو واضح فى - Pre (rRNA Tetrahymena). ومن ناحية أخرى فإذا كان الانشطار والوصل هى تفاعلات منفصلة فيجب أن يتعرف على أنزيم فى النبات الذى يربط - 2', 3'- cyclophosphate - terminated to 5 - phosphorylated RNA ليشكل روابط - 2'- phosphodiester - 3', 5'- phomonoester. هذا الأنزيم قد تبين أنه يحلق بكفاءة ما يسمى جزئيات الفيرويد المستقيمة فى وضعها الطبيعي بالإضافة إلى جزئيات الفيرويد التى حدث لها استقامه صناعياً.

أشكال التناسخ Models of Teplication :

إن أشكال تناسخ الفيرويد استنتجت بشكل أساسى من نتائج التجارب والتى عرف فيها التتابعات الخاصة بالفيرويد لأطوال مختلفة وقطبية مختلفة. مع أنه لم يثبت بشكل كامل إلا أنه من المفروض أن الخيوط ال Oligomeric الموجبة والسالبة تعتبر وسيطات فى التناسخ إذا قورنت بالمنتجات النهائية وهى تعتبر ملازمة لتقدم المرض. ولقد ذكر Branch & Robertson سنة ١٩٨٤ وصفاً طويلاً لتناسخ الفيرويد.

على أساس الدليل بأن الخيوط السالبة هى ال multimeric للفيرويد PSTVd وعلى أساس تحلق الفيرويدات الناضجة فقد إفترض ميكانيكية الالتفاف الدائرى فى تحليق الفيرويدات وتتم كالاتى: - يبدأ بناء الشريط السالب من الشريط الدائرى الموجب المعدى (خطوة رقم ١ فى شكل ٤). تؤدى ميكانيكية الالتفاف الدائرى إلى شريط سالب multimeric (خطوة رقم ٢). عندئذ تسلك الشرائط السالبة multimeric كقالب لانتاج أشرطة موجبة multimeric (خطوة رقم ٣) هذه الشرائط يجب أن تقطع لتعطى جزئيات مكونة وحدة طول واحدة بصفات نهاية المجموعات (خطوة ٤) ثم تتحلق (خطوة ٥) لتنتج ذرية من الدوائر. إن هذا الشكل الافتراضى يطبق على وجه الحصر على أنواع الحمض النووى لخاص بالفيرويد

والذى يمكن بسهولة التعرف عليه فى النباتات المصابة بالفيروس PSTVd. زيادة على ذلك وكما ذكر سابقاً فإن النشاطات الأنزيمية المفترضة قد وجدت أيضاً فى خلايا النبات، مع أن أى منها لم يبرهن عليه بشكل محدد بأنه يدخل كجزء فى تناسخ الفيروس فى الطبيعة كما إقترح فى شكل ٤.



شكل رقم ٤ :

رسم إفتراضى لتناسخ فيروس PSTVd. الشكل مأخوذ من Robertson و Branch سنة ١٩٨٤.

لقد تبين من دراسات Bruening et al سنة ١٩٨٢ أن هناك مستويات عالية من الشرائط الموجبة multimeric من ASBVd ومستويات منخفضة جداً من المتابع السالب، وهذا أدى إلى الاستنتاج بوجود ميكانيكية لف دائرى مختلفة. إن الفيروس ASBVd المخترق للنبات والذى هو monomeric يمكن أن ينقلب بواسطة أنزيمات العائل إلى جزئى دائرى سالب والذى عندئذ يعمل كقالب لبناء الدائرة الملتفة من متابع ASBVd موجب مستمر والذى يعامل ليعطى ASBVd monomeric مستقيم كامل الطول بعد ربط ASBVd الدائرى ال monomer السائد.

هناك ميكانيكية ثالثة تشمل التفاف دائرتين. تبنى الشرائط السالبة Multimeric كما في شكل (٤) ولكنها تعامل لتعطي دائرة monomeric من شريط سالب والذي يعمل كقالب للتفاف دائرة ثانية لينتج شريط موجب multimers. يؤدي القطع والتوصيل إلى إنتاج ذراري من الفيرويد.

تناسخ الدائرة الملتفة Rolling circle Replication :

هناك إتفاق عام على أن RNAs في الفيروسات تتناسخ بواسطة ميكانيكية الدائرة الملتفة. هناك طريقتين أمكن تعريفهما في هذا المجال كما في شكل ٤ ب. في الجزء الأول من شكل (٤ب) فإن الدائرة الغازية ذات الخيط الموجب تنسخ بأنزيم RNA polymerase المعتمد على RNA ويسمى RNA dependent RNA polymerase ويتكون خيط سالب مرتبط مع بعضه (ملتف) خطوة ١. يحدث في مناطق معينة إنشطار لهذا الخيط خطوة ٢ تعطي مونومير monomer والذي عندئذ يتحلق بواسطة أنزيم اللحام في العائل RNA ligase خطوة ٣. يتكون RNA دائري سالب هذا ينسخ بواسطة أنزيم RNA polymerase خطوة ٤. RNA الموجب المستقيم الطويل ينشطر في أماكن مخصصة ويكون Monomers خطوة ٥، هذه تتحلق لتعطي الذرية الجديدة RNA دائري والذي يكون عادة الشكل السائد في الطبيعة. إن فيرويد واحد هو ASBVd وفيروسايد واحد هو vLTSV ومرافق واحد sTRSV و HDV RNA أكثر احتمالاً لأن تتبع هذا الطريق في تناسخها.

أما الميكانيكية الثانية فهي في شكل ٤ ب القسم الأيمن. وهي تشبه شكل القسم الأيسر باستثناء أن الخيط السالب الملتف في الخطوة الأولى لا يحدث فيه إنشطار ولكنه ينسخ مباشرة ليعطي خيط مستقيم موجب (خطوة ٣) والذي ينشطر ليعطي Monomers ثم تتحلق الذرية الناتجة. إن مجموعة PSTVd من الفيروسات والثلاثة أنواع الأخرى من الفيروسسايدات تتكاثر كما في هذه الطريقة.

إن الدليل على هذه الطرق المذكورة يستند على وجود RNAs السالب الموجب المتحلق في الأنسجة المصابة ومعلومات مفصلة أخرى مثل وجود RNA ligase في

النباتات الذى يمكن أن يُحَلَّق RNAs الفيرويدي المستقيم فى المعمل. كما وان RNA polymerase (s) فى نسخ RNAs السالبة والموجبة لم يمكن تحديدها مع أن RNA polymerases الأول والثانى والثالث (I, II, III) كلها قد استخدمت فى تجارب مختلفة.

الإِنْشِطَارُ الْمُتَخَصِّصُ لـ RNA أَثْنَاءُ تَنَاسُخِ الدَائِرَةِ الْمُلتَفَةِ

Specific Cleavage of RNA during Rolling Circle Replication

تفاعلات الانشطار فى شكل ٤ يجب أن تكون فى مواقع متخصصة لانتاج Monomeric ونظراً لأن جميع البراهين توضح فى الفيروسات، الفيروسات وجميع مرافقات RNAs الصغيرة لا يمكن أن تشفر لأى بروتينات من الحجم المطلوب لأنزيم Ribonuclease وبالتالي فإن هذا الانشطار يجب أن يتم بواسطة أنزيمات العائل أو بواسطة بعض الميكانيكات غير الأنزيمية كلاهما ذو تخصص عال فى التتابع. من الواضح أنه يجب أن يكون هناك نقطة إنشطار واحدة لكل وحدة Monomeric.

إن الفيروسات vVTMov, vSCMoV, vSNMN, vLTSV بالإضافة إلى الفيروس ASBVd كلها تخضع لتفاعل الانشطار الذاتى فى المعمل فى الغياب الكامل للبروتين. يكون التفاعل عبارة عن إنشطار غير مائى بسيط حيث أن الرابطة داخل النيوكليتيده تخضع لتفاعل نقل فسفرة فى وجود Mg^{2+} تهاجم بواسطة 2'-hydroxyl على الفسفور تقود إلى 3'-cyclic phosphate، 2'، 3' على النهاية 3' لواحد من أجزاء RNA المنشطرة و 5'-hydroxyl على النهاية الأخرى. يكون التفاعل أبسط ومختلف تماماً عن العملية غير الأنزيمية للانترونات من بوائى الرايوسومال فى Protozoan Tetrahymena حيث Guanosine عامل مساعد يكون مطلوباً والنهايات المنشطرة تحتوى 5'-phosphate و 3'-hydroxyl.

يكون تفاعل الانشطار الذاتى هذا بشكل واضح هو الأساس للانشطار المتخصص المطلوب فى الطبيعة خلال تناسخ الدائرة الملتفة.

العقبة الكبرى التي تعترض هنا هي الميكانيكية التي بواسطتها جميع الفيريودات التابعة لمجموعة PSTVd تكون قد نشأت من أطول من وحدة طول نواتج تناسخ الدائرة الملتفة. لا يبدو أنها محتوية النيوكليوتيدات المحفوظة المطلوبة لتفاعلات الانشطار الذاتى الموصوفة لغاية الآن. هناك محاولات أجريت للحصول على إنشطار ذاتى هام تخصصى فى المعمل إلا أنها كانت غير ناجحة، إلا أن بعض الباحثين استطاع الحصول على انشطار تخصصى معقول لبودائى من PSTVd وإنتاج monomers دائرية عندما استعمل بودائى أطول من وحدة طول وحضنها مع مستخلصات أنوية النبات. أخذت هذه النتائج لتدل على أن عمليات الانشاء فى الطبيعة لبودائى من PSTVd تتطلب عمل أنزيمات RNase التخصصية فى النبات.

بالرغم من هذا الدليل المفصل، إلا أن الميكانيكية الأكثر احتمالاً فى الطبيعة سوف تكون نوعاً من تفاعل الانشطار الذاتى. هناك ثلاثة أنواع من تفاعل الإنشطار الذاتى قد تم تحديدها فعلاً فى ١٢ إنشطار ذاتى فقط لـ RNAs التى تم وصفها لغاية ١٩٩١. تسعة خلال تركيب رأس المطرقة و تركيب غير معروف فى RNA السالب من sTRSV و تركيب آخر غير معروف لـ RNAs الموجب والسالب فى HDV. يبدو من المعقول جداً أن هناك نوعاً آخر من تفاعل الانشطار الذاتى يمكن أن يحسب لمعاملة (بناء) البودائى فى جميع أفراد مجموعة PSTVd.

تظهر نتيجة الأبحاث المنشورة أن كلونات cDNA المونوميرك PSTVd أو CEVd معتمدة على وجود التتابع فى النهاية 5' للفيريود المقحم والتي تتكرر بعد النهاية 3' فى هذه القطعة المنقرزة. دراسات أخرى على الطفرات إقترحت بأن مواقع البناء فى بودائى ال CEVd تحدث فى واحد من ثلاثة مواقع فى الجهة العلوية من النطاق C.

تفاعل الإنشطار الذاتى لرأس المطرقة فى ASBVd

Hammerhead selt - cleavage Reaction in ASBVd

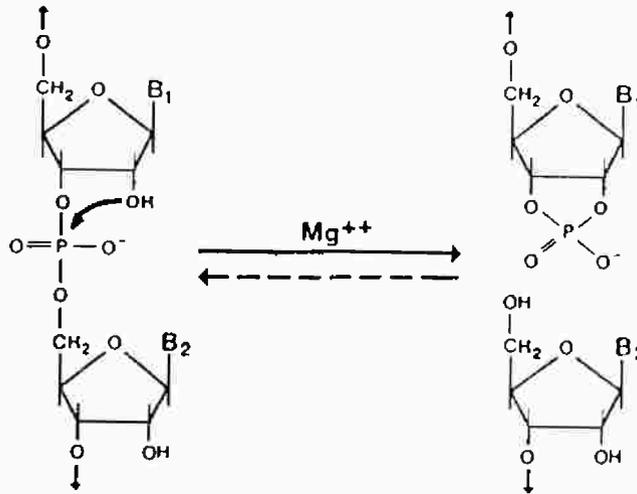
لقد درس هذا الموضوع من قبل كثير من الباحثين منذ سنة ١٩٨٩ وحتى سنة ١٩٩١ وفيما يلى نذكر ملخصاً لهذا الموضوع:-

تخضّر نسخاً من RNA سالب وموجب من كلونات cDNA من ASBVd و vLTSV ذات إنشطار ذاتي بصفة تخصصية عالية أثناء النسخ وبعد العزل في الغياب الكامل للبروتين. يشمل التفاعل Mg^{2+} عامل مساعد لتفاعل نقل الفسفرة الذي يشطر ال RNA ليعطي نهايات ذات 2', 3'- cyclic phosphate و 5'- hy-droxy شكل (٥). على أساس مواقع متخصصة في الانشطار يتكشف تركيب رأس المطرقة ثنائي الأبعاد محفوظ (شكل ٦) هذا يمكن أن يضاف إلى RNAs ذاتي الانشطار من ASBVd سالب وموجب.

إن تركيب رأس المطرقة لشكل ٦ يتركب من ثلاثة سيقان زوجية القاعدة (III, II, I) حول منطقة احادية الخيط مفتوحة ذات ١٣ نيوكليتيده (شكل صندوق) والتي تكون محفوظة في تسعة RNAs ذات إنشطار ذاتي معروفة (لغاية ١٩٩١) والتي تنشطر خلال هذا التركيب. مع أن الدليل الواضح لم يحصل عليه، إلا أنه يبدو من المحتمل أن تفاعل الانشطار الذاتي الموصوف في المعمل يكون أيضاً مسؤولاً عن بناء بوادئ من ال Oligomeric في الطبيعة.

تركيب رأس المطرقة ثنائي الأبعاد كما في شكل ٦ لا يستطيع أن يشرح بوضوح لماذا يكون هناك إنشطار غير أنزيمي لـ RNA على مواقع معينة. من المعتبر أنه في وجود Mg^{2+} ، فإن تركيب رأس المطرقة يتخذ تركيب ثلاثي نشيط والذي يخفض كفاءة الطاقة التنشيطية ويختص بعمله على رابطة النيوكليتيده الداخلية من مواقع الانشطار الذاتي ليسمح بنقل الفسفرة في تفاعل الانشطار الذاتي. عند الإنشطار فإن التركيب يتراخى وبالتالي يمنع التفاعل العكسي من الحدوث مع العلم أنه من ناحية نظرية جميع التفاعل يكون منعكس.

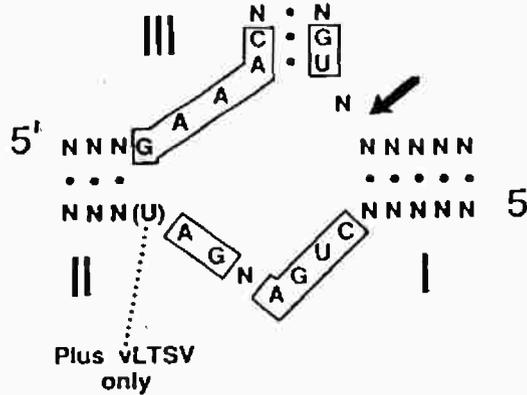
أما في حالة ASBVd فإن التتابعات الداخلة في تفاعل رأس المطرقة تزودنا بمعلومات عن الخطوة التي تعتبر مفتاحاً في دورة التناسخ، وهو أيضاً التابع الوحيد في هذه الممرضات RNAs. وبالتالي ففي حالة ASBVd فإن مواقع الانشطار الذاتي الموجب والسالب تكون ١٤ نيوكليتيده منفصلة وأن التابع في تركيبات رأس المطرقة تشمل تقريباً الثلث المركزي لجميع الجزئ.



شكل رقم ٥ :

تفاعل الانشطار الذاتي الذي يشمل تفاعل نقل الفسفرة من

5'- hydroxyl of the 3' nucleotide residue to the 2'- hydroxyl of the 5' residue.



شكل رقم ٦ :

تركيب رأس المطرقة حول منطقة الانشطار الذاتي لفيروس ضربة الشمس في الافوكادو والأربعة فيروسات ومرافقات. هناك ١٣ نيوكليتيده محفوظة في عليه والنيوكليتيدهات غير المحفوظة يشار إليها N.

غياب منتجات الترجمة : Absence of Translation Products

تعتبر الفيروسيدات هي الكائنات الوحيدة ذات نظام التناسخ الذاتي والذي لا يعمل شفرة لتناسخه ولا وحدات صغيرة subunit لأنزيم التناسخ الخاص به. مع أنه لا يوجد برهان تجريبي نهائي يدل على أن المعلومات الوراثية للفيروسيدات لا تعبر عن نفسها في بروتين صغير، هناك عدة نقاط ذات توضيح سلبي في مناقشة ذلك.

إن كفاءة الفيروسيدات على التشفير يمكن أن تؤدي إلى بروتين ليس أكثر من ١٢٠ حمض أميني، فمثلاً بالنسبة للفيروسيد PSTVd فإن أطول بروتين، يمكن أن ينتج من أكثر من دورتين من الترجمة، شريطة أنه في هذه الحالة أن مشطبات كودون UGA يجب أن تكبح. إن الافتقار إلى مواقع ربط الريبوسومات وغياب التركيب القلنسوي، التابع المجاور مباشرة، ثبات التركيب الثانوي والدائرية كلها لاتناسب نشاط mRNA. أما في المعمل فإن أنظمة الترجمة لا يمكن التعرف على منتجات خاصة بها إذا كان الفيروسيد PSTVd أو CEVd يمكن أن يظهر عمل مثل mRNA. إن المقارنة الدقيقة لنماذج بروتين من نبات *Gynura aurantiaca* المصابة بالفيروسيد CEVd ونباتات الطماطم المصابة بالفيروسيد PSTVd مع نباتات كتنترول متماثلة من نباتات سليمة أظهر بأنه لا يوجد شفرة فيروسية مختلفة. وباختصار يمكن القول بأن تناسخ الفيروسيد يعتمد على أنزيمات polymerase العائل ولا يشفر لنفسه.

دراسة المرض الفيرويدي

١ - المصادر The Sources :

تمتلك بعض الفيروسيدات مدى عائلي واسع بشكل واضح، وهذا يعني أن RNA الفيرويدي يمكن تحضيره ليس فقط من العائل الذي فيه اكتشف الفيرويد أصلاً، ولكن أيضاً من النباتات الأخرى والتي يمكن أن تكون أكثر ملائمة لتحضير الفيرويد. في كثير من الحالات فإن نقل الفيروسيدات إلى عوائل نباتية أخرى لا يؤدي إلى ظهور أعراض معبرة عن الإصابة وبالتالي يجب أن

يستعمل طرق تشخيصية أخرى. ذكرت أنواع كثيرة من النباتات بأنها قابلة للإصابة بفيروس PSTVd معظمها يتبع العائلة الباذنجانية. كذلك فقد تبين أن فيروس تقزم قمة الطماطم TASVd يكون مشابهاً لفيروس PSTVd فى المدى العائلى. أما فيروس اكسوكورنز الحمضيات CEVd فإنه يتضاعف ليس فقط فى نباتات الحمضيات ولكن أيضاً فى نباتات العائلة المركبة مثل نبات *Gynura auran-tiaca* وفى نباتات العائلة الباذنجانية. أما فيروس الاقحوان (التقزم والشحوب المتبرقش) تنتقل فقط إلى أنواع أخرى من العائلة المركبة. أما فيروس الثمرة الباهتة فى الخيار يبدو أنه منحصر أساساً فى العائلة القرعية وذكر أنه ينتقل إلى الطماطم. وكذلك فإن فيروس تقزم حشيشة الدينار يصيب العائلة الباذنجانية، القرعية، التوتية. لقد وجد أن فيروس ضربة الشمس فى الافوكادو يصيب فقط الافوكادو والقرفه وكلاهما يتبع العائلة الشفوية. إن المدى العائلى لفيروس كادانج - كادانج فى جوز الهند يختلف عن بقية الفيروسات فى أنه يصيب نخيل جوز الهند فقط وهو الفيروود الوحيد الذى يصيب نباتات احادية الفلقه.

إن نقل الإصابة الفيروودية إلى نباتات العائل تحت الإختبار يكون مهماً للدراسات الكيموحيوية وذلك لأن العوائل الاصطناعية فى بعض الحالات تنمو بسرعة أكثر تحت ظروف جوية متحكم بها، وتكون أنسجتها أكثر سهولة فى التعامل لتحضير عزلات من الفيروود. لقد ثبت بالبرهان العملى أن نباتات الطماطم أكثر ملائمة لتجارب المدى العوائلى. ولقد تبين أن PSTVd و CEVd تخضع لتغيرات بسيطة فقط بعد نقلها من نباتات الطماطم إلى نباتات *Gynura*.

وكقاعدة عامة فإن التعبير بالأعراض يحدث فى نباتات الطماطم بعد ١٠ - ١٤ يوم من الحقن عندما تنمو النباتات تحت كثافة ضوئية عالية ودرجة حرارة مرتفعة ٣٠ - ٣٥ م خلال النهار وحوالى ٢٠ م خلال الليل. هذه المدة يمكن أن تطول إلى ٢ - ٣ شهور إذا نمت النباتات تحت درجة حرارة ٢٠ م. ولقد تبين أن تناسخ الفيروود وتعبيره بالأعراض يأخذ مجراة تقريباً فى نفس الوقت وأن أفضل إنتاج من RNA الفيروودى يحصل عليه بعد ٣ - ٦ أسابيع من الحقن.

نظراً لأن الفيرويدات تصيب النبات جهازياً فمن الممكن أن تخضر بشكل رئيسي من أى جزء فى النبات. إذا نمت نباتات طماطم مصابة تحت ظروف مثلى فى الصوبا الزجاجية، فإن طريقة التنقية تضم كبريتات السيزيوم Cs_2SO_4 ، آلة الطرد عن المركز عالية السرعة - سائل كروماتوغرافى عال الكفاءة HPLC. استعمال هذه المواد يؤدى إلى الحصول على كمية من PSTVd كالآتى :-

كمية الفيرويد	وزن الجزء النباتى
٥٠٠ ميكوگرام	$\frac{1}{4}$ كيلو غرام اوراق
٣٠٠ ميكوگرام	$\frac{1}{4}$ كيلو غرام سيقان
١٨٠ ميكوگرام	$\frac{1}{4}$ كيلو غرام جذور

تم معظم طرق التحضير اساساً من الأوراق، ولكن السيقان يمكن أن تستعمل أيضاً، إذا كان من الممكن عمل مسحوق متجانس منها كما فى حالة نباتات الطماطم.

تستطيع الفيرويدات أن تنمو باستمرار فى المعلقات الخلوية، فى البروتوبلاست وفى مزارع الكالوس كما كان واضحاً فى التجارب على مزارع من الطماطم والبطاطس.

٢ - التشخيص Diagnosis :

يكون هناك نوعاً من الالتباس عند تمييز الاصابة الفيرويدية اعتماداً على الأعراض فقط، حتى بعد نقل الإصابة الفيرويدية إلى العوائل المشخصة والنظر إليها نظرة خبير متمرس فى أمراض النبات، فإن التشخيص بواسطة التعرف على الأعراض يكون غير موثوق ولا ملائم بشكل عام. كذلك فإن الفيرويدات لا يمكن تعريفها بالطرق السيرولوجية وذلك بسبب عدم المقدرة على الحصول على أجسام مضادة ضد RNA الفيرويدي بالرغم من المحاولات العديدة التى أجريت بهذا الشأن.

إن التشخيص السليم يتم الحصول عليه بواسطة التعرف على الحزم الفيروية في الهجرة الكهربائية في الجيل Gel electrophoretic أو بواسطة التهجين الجزيئي. إن طرق الهجرة الكهربائية في الجيل Gel electrophoretic تتضمن الحصول على محلول متجانس من غرام أو بضعة غرامات من النسيج النباتي، مستخلص حمض نووي. في بعض الحالات تستبعد الأحماض النووية ذات الوزن الجزيئي العال وذلك بواسطة الترسيب في كلوريد الليثيوم، ثم الترسيب بالايثانول للأحماض النووية الباقية. يحلل المستخلص الخام من الحمض النووي الناتج على مادة polyacrylamide slab gels. أيضاً يستعمل ٥٪ polyacrylamide gels بالنسبة للفيروسات ذات الوزن الجزيئي لغاية ١٢٠٠٠٠ دالتون (PSTVd) أو ٢,٥ - ٣٪ للفيروسات الكبيرة مثل كادانج - كادانج. عند إضافة ٨ مول يوريا يحصل على حزم ضيقة. هناك زيادة يمكن ادراكها في الحساسية وخفض في الزمن مطلوبة للتشخيص بالهجرة الكهربائية حصل عليها عندما كان السير في ظروف طبيعية مشتركاً مع سير متعاقب تحت ظروف دنترية في الهجرة الكهربائية ذات الاتجاهين. هذه الطريقة ادت إلى فصل نقي لجزيئات الفيروس الدائرية عن جميع الأحماض النووية الخلوية. يمكن أن تستعمل مع مستخلصات خام غير مجزأة كلية. علاوة على ذلك فإن طريقة الصبغ بالفضة أدت إلى الحصول على كمية قليلة تقدر ٦٠ نانو غرام من ال RNA الفيرويدي لكل غرام من نسيج ورقة الطماطم وأعطت ٦٠٠ بيكوغرام في حزمة مفردة، وفي أبحاث أخرى أعطت ٢ نانوغرام فيرويد لكل غرام من نسيج الطماطم و ٨٠ بيكوغرام في حزمة مفردة. إن استعمال الهجرة ذات الاتجاهين في العزل الكهربائي سهلت العمل في تطبيقات روتينية لكثير من عينات الأنسجة في وقت واحد.

إن إختبارات التشخيص للفيروسات المبنية على تهجين DNA تكميلي ذو قوة إشعاعية عالية قد استعملت مع كثير من الفيروسات وكانت الإختبارات تجرى بواسطة Dot - spot hybridization مع cDNA مكلون للفيروس

cDNA أو عن طريق Liquid hybridization مع منقبات HSVd، CSVd، PSTVd وذلك بالنسبة لكل من RNA في فيروس كادانج - كادانج وفيروس ASBVd. أما هذا الفيروس الأخير ASBVd فقد أمكن تعريفه بالتهجين الذاتي self-hybridization مع RNA للفيروس نفسه المعلم بالفسفور المشع ³²P. إن حساسية إختبارات التهجين قد ذكرت بأنها تصل ما بين ٢٠ - ٨٠ نانوغرام فيرويد لكل غرام من النسيج المصاب. وتتقدم طرق التهجين وباستعمال منقبات معلمة M13 يمكن زيادة حساسية الإختبار إلى الضعف. يعتبر إختبار الهجرة الكهربائية بالجيل أسرع حيث يحتاج إلى يوم واحد بالمقارنة مع أربعة أيام بالنسبة لطرق التهجين، إلا أن طرق التهجين تحتاج إلى عينات أكثر. تكون طريقة الهجرة الكهربائية في الجيل حساسة لتركيب فيرويد معينة (الدائري) كما أنها لا تستطيع التفريق بين تنابعات مختلفة، بينما طريقة التهجين تعرف فقط تعاقبات معينة بغض النظر عن التركيب، وبالتالي فإن كلتا الطريقتين تكمل كل منها الأخرى في صفاتها.

٣ - كلونة الجزيء Molecular Cloning :

في الوقت الحالي فإن تنابعات الفيروس المكلون وجدت لها مجالاً كبيراً في التطبيق في أبحاث الفيروس مثل :-

أ:- التنابع Sequencing .

ب: التهجين لتشخيص الفيروس، الدراسات التي تجرى لمعرفة المركبات الوسيطة في تناسخ الفيروس وانتشار الفيروس في الخلية.

ج: حيوية cDNA المكلون والمواقع الموجهة للمطفرات.

إن جدول رقم ٤ يلخص الطور الكامل، والكلونات ذات الحجم الصغير مذكورة مع البلازميد، موقع وإتجاه الإدخال والمحفزات. بالإضافة إلى الكلونة الجزيئية لكل من TASVd، TPMVd، CPFVd .

جدول ٤ : كلونات cDNA لبعض الفيرويدات.

الفيرويد	البلازمو	المحفز	موقع الادخال	الحجم والاتجاه
PSTVd	pGI 101 H	lac	Hae III 146	monomerid (+) and (-)
PSTVd	pBR 322	tet	Bam H I 87	monomeric (+) and (-) dimeric (+) and (-)
PSTVd	pBR 322	_	Bam H I 87	monomeric +
HSVd	pGL 101	lac UV5	Eco R I 296	monomeric (+) and (-) dimeric (+) and (-) tetrameric (+) and (-)
CEVd	pBR 322	_	Bam H I 87	monomeric (+)
ASBVd	pBR 322	_	-	-

٤ . التنقية Purification :

تكمن تنقية الفيرويد في خطوتين أساسيتين هما: -

١ - تحضير مستخلص من RNA ذو وزن جزيئي منخفض.

٢ - التنقية النهائية للحمض الفيرويدي RNA من هذا المستخلص.

في معظم الاجراءات فإن الحمض النووي الكلي يستخلص من مزيج النسيج المتجانس بواسطة نظام Buffer / phenol المحتوى على بديل الصوابين SDS وعلى benfonite مثبت أنزيم RNase. تفصل عديدات التسكر وال DNA من ال RNA بواسطة استعمال نظامى الاستخلاص والترسيب بمادة Cetyl trimethyl ammonium bromide. عندئذ يستبعد RNA ذو الوزن الجزيئى العال عن طريق الترسيب باستعمال ٢ مول من كلوريد الليثيوم. بعد ذلك يمكن الحصول على

المحتويات الخصبية من الفيرويد في مستخلص RNA ذو الوزن الجزيئى المنخفض بعدة خطوات من العملية التى تسمى كروماتوغرامى. هناك طرق حديثة مشابهة لما سبق تستعمل فى تحضير مستخلص خام من فيروسات HSVd، TPMVd، TASVd.

فى بعض الطرق المختلفة فإن مستخلص RNA ذو الوزن الجزيئى المنخفض كان يحصل عليه بعد استعمال كبريتات السيزيوم الكثيفة فى آلة الطرد عن المركز، هذا يعنى أن عديدات التسكر، ال DNA، RNA ذوات الوزن الجزيئى العال ومكونات أخرى فى النسيج يمكن استبعادها بخطوة واحدة. إن استعمال طريقتى الترسيب باستعمال ٢ مول من كلوريد الليثيوم والترسيب المتعاقب للمواد الطافية باستعمال ٥,٠ حجم من الايثانول يعطى مستخلص RNA خال من أى من ال DNA وال RNA ذوات الوزن الجزيئى المرتفع مع بقاء قليل من tRNA. إن ترسيب RNA من محلول عال الملوحة باستعمال تركيز منخفض من الايثانول يمكن أيضاً إستعماله للاستعادة السريعة للحمض RNA ذو الوزن الجزيئى المنخفض من كبريتات السيزيوم المنحدرة إذا ما ضبطت الأجزاء المتماثلة على كثافة نهائية ١,١٨ غم / سم^٣.

أما الخطوة الثانية فإن الفيروسات تنقى من مستخلص RNA الخام إلى الحالة المتجانسة ثم تستعمل طريقة Polyacrylamide gel electrophoresis. ويفضل استعمال هذه الطريقة ذات الاتجاهين (سذكر ذلك بالتفصيل إن شاء الله فى الفصل الثالث). أو يمكن استعمال هذه الطريقة باستعمال الجريان مرتين، المرة الأولى تحت الوضع الطبيعى أما الثانية فتكون تحت ظروف الدنترة. إن المأخذ على هذه الطريقة Preparative gel electrophoresis هو الكمية القليلة المتحصل عليها من الفيرويد وطول الوقت، يمكن التقليل من هذه العيوب باستعمال عامل التبادل الأيونى وهو الراتنج للاستعمال فى سائل الكروماتوغرافى ذو الكفاءة العالية. لقد أمكن الحصول على ٢٠٠ ميكروغرام RNA للفيرويد PSTVd متجانس من مستخلص خام للحمض RNA (محضر بواسطة كبريتات السيزيوم فى آلة الطرد عن المركز) من جريان مرة واحدة فى الكروماتوغرافى. كانت نسبة الانتاج والتنقية تزيد عن ٩٥٪.

ميكانيكية نشوء المرض (المرضية)

Mechanism of Pathogenesis

هناك تساؤلاً يطرح نفسه على الباحث وهو ما هي الميكانيكية التي بها تحدث الفيروسات أمراضاً في عوائل معينة، علاوة على ذلك فإنها تتضاعف (تتناسخ) في أنواع نباتية أخرى بدون إحداث أضراراً مميزة؟؟.

للإجابة على هذا السؤال هناك ثلاثة تفسيرات قد تكون موضحة لهذا التساؤل وإلا فإن الأبحاث المستقبلية سوف توضح ذلك. هذه التفسيرات هي:-

١ - إن وجود الفيروس في نواة العائل وعدم قدرته الظاهرة ليعمل عمل mRNA يؤدي إلى القول بأن أعراض المرض المتسببة عنه قد تكون ناتجة عن التداخل أو التفاعل المباشر للفيروس مع جينوم Genome العائل، هذا يعني عن طريق تداخله في التنظيم الجيني في الخلايا المصابة.

٢ - إذا كان التفسير السابق حادثاً بالفعل، فإن الفيروسات يجب أن تعتبر بأنها جزيئات تقوم بإحداث خلل في التنظيم الطبيعي في الخلية أو تقوم بتنظيم غير طبيعي في الخلية. وإذا كانت الفيروسات نشأت فعلاً من إنترونات، فإن تأثيراتها الضارة على وظائف خلية العائل قد تكون نتيجة التداخل في عمليات نضج mRNA.

٣ - هناك إقتراحاً ثالثاً لنشوء المرضية بالفيروس، هذا الإقتراح يفترض بأن الفيروس يقوم بتجنيد RNA polymerase II للحمض DNA التابع للنوى بواسطة جزيئات الفيروس المعدى وذلك لاستكمال أو إنجاز تناسخه (الانانية في التناسخ)، ويشط أو يكبح بناء mRNA's جينومي في خلية العائل وبالتالي يعوق أو يفسد عمليات التمييز أو التخليق في الخلية.

يجب أن نؤكد على أن جميع هذه التفسيرات هي عبارة عن إقتراحات إلى حد بعيد ولكي يكون أى من هذه التفسيرات الثلاثة المذكورة سابقاً معقولاً يجب أن لا ينظر إلى نتيجة الإصابة الفيروية الملاحظة وهي الأعراض، ولكن أيضاً يجب النظر إلى الحقيقة المذكورة سابقاً وهي أنه في بعض الأنواع النباتية فإن الفيروسات تتناسخ بشكل كاف دون أحداث ضرر واضح مميز على العائل، وفيما يلي بعض المعلومات قد تلقى بعض الأضواء على هذا الموضوع.

١ - علاقة المرض مع البروتينات والمركبات الأخرى:

كما ذكر سابقاً فإنه لم يوجد فيروس يعمل شفرة لبناء البروتين. وعلى أية حال فإنه في نسيج مصاب بالفيروس CEVd من نبات *Gynura aurantiaca*، طماطم والبطاطس، فإن هناك نوعان من البروتينات ذات أوزان جزيئية تتراوح ما بين ١٢ - ١٨ ألف دالتون، تتراكم في النسيج. وفي نسيج نبات الطماطم المصاب بالفيروس PSTVd وجد بروتين ذو وزن جزيئي ١٤ ألف دالتون، وهذا كان وجوده بتركيز أعلى في النباتات المصابة عنه في النباتات السليمة، إلا أن هذه البروتينات ليست متخصصة بالإصابات الفيروية، ولكنها تظهر أيضاً بعد الإصابة الفيروسية وفي النباتات الطبيعية التي وصلت طور الشيخوخة. قد ينظر إلى هذه البروتينات على أنها إستجابة فيسيومرضية Pathophysiological للنبات العائل. كذلك ذكر حدوث بعض التغيرات بعد حدوث الإصابة بالفيروس، في التركيز الكلي للأحماض DNA ، RNA ، والبروتينات وفي المحتوى والتركيز للعناصر المعدنية وفي تركيز حمض الكلورجنك. هذا يدعم التفسير الأول الذي ذكر سابقاً.

٢ - تعائل التتابع مع الأحماض النووية RNAs الصغيرة:

عند إجراء دراسات حول الفيروسات والأحماض النووية الصغيرة RNAs (U1 - U6) في الكائنات الحية الدقيقة مميزة النواة، أمكن التعرف على بعض التماثل في تتابع النيوكليوتيدات هذا التتابع كان واضحاً بشكل جيد.

إن الأكثر وضوحاً في هذا المجال هو تماثل التابع بين النهاية⁵ في UI RNA والمنطقة الأكثر حفظاً في الخيط السفلى في التركيب الثانوي (سيذكر ذلك بالتفصيل إن شاء الله في الفصل الثالث) في الفيرويدات من مجموعة PSTVd. وبالاعتماد على الأبحاث اللاحقة فإن UI RNA يتدخل في عملية التراكب splicing (سبق ذكرها) والتي فيها تقطع الانترونات من الحمض النووي RNA غير المتجانس ويتكون mRNA المطلوب. في هذه الأشكال فإن النهاية⁵ من UI RNA تشكل أزواج قواعد بنهائيتين من الانترون. ويعتقد أن الفيرويد يمكن أن يحل محل UI RNA ويتدخل في عملية التراكب، وأيضاً يعتقد أن خيط الفيرويد السالب يتفاعل مع ويوقف عمل UI RNA. إن تكوين دبابيس الشعر (في تركيب الفيرويد) يمكن أن تكون ناتجة عن مثل هذا التفاعل أو أن دبابيس الشعر الثابتة يمكن أن تناسب هذا التفاعل. وفي أشكال مختلفة من PSTVd يمكن أن يحدث تفاعل بواسطة منطقتين غير متجاورتين مع مواقع التراكب في mRNA للعائل. هناك مناطق مشابهة ولكن غير متماثلة تماماً وتكون أيضاً موجودة في العزلات المعتدلة من الفيرويدات PSTVd و CSVd. إن الأعراض غير الشديدة في الاقحوان والتي تظهر بعد الإصابة بثلاثة فيرويدات تكون في حالة توازي مع التفاعل المتوقع للفيرويدات مع مواقع التراكب على الأحماض mRNAs.

وعلى أية حال فإن تواجد الفيرويدات الناضجة في النوية ووجود UI RNA في أجزاء الرايونيسوكليوبروتين تبطل الشكل المذكور سابقاً في نشوء المرض. فقط فإن الحمض النووي الصغير-RNA U₃B المعروف بأنه موجود في النوية. وكذلك وجد أن تابع متماثل بين PSTVd و snRNA U₃B من خلايا No-vik off hepatoma قد وجد فعلاً في النوية. لم يمكن التوصل إلى أشكال (من هذه المذكورة) تساهم في نشوء المرضية تشبه هذا التماثل.

٣ - إختلاف التتابع Sequence Variation :

إن تتابع النيوكليوتيدات فى سلالات الفيرويد ذات الاختلافات فى تعبيراتها بالأعراض المرضية قد حددت لكل من PSTVd، CEVd. أما فى هذا الأخير فإن الأعراض الناتجة عن عزلات مختلفة لا يمكن تقسيمها من المعتدلة إلى البقع الميتة ولا يمكن أن تفسر فى اصطلاحات محددة تماماً متضمنة مناطق الشدة على الفيرويد. يمكن أن تصنف الأعراض بسهولة من المعتدلة إلى أعراض البقع الميتة وإن الاختلافات فى التتابع يكون محدوداً على الجزء الكبير من التركيب الثانوى المتكون بواسطة النيوكليوتيدات ٤٠ - ٥٥، ٣٠٥ - ٣٢٠ وإلى مقدار بسيط حول النيوكليوتيدات ١١٥ - ١٢٥. إن العالم Sanger وتلاميذه قد إقننا بأن الاختلاف الكبير يؤثر فى الشدة وذلك عن طريق تغيير الثبات الثيرموديناميكى لتلك المنطقة، وأن الاختلاف القليل يعدل بحيث يحدت توازناً مع العدد الكلى من النيوكليوتيدات والتي هى ٣٥٩ لجميع السلالات. تقع المنطقة ذات الإختلاف البسيط المرنة من ال Oligopurine. ولقد تبين أن هذه المنطقة هى واحدة من المناطق ذات الثبات الثيرموديناميكى المنخفض جداً والذي يمكن أن يخضع إلى عملية التفكك المسبقة. إن تقدير الثبات الحرارى لهذه المناطق المتفككة مسبقاً ينتج العلاقة التى تقلل الثبات، هذا يعنى كلما كان هناك زيادة فى إظهار التفكك المسبق يكون هناك زيادة فى الشدة يتبع ذلك.

٤ - cDNA المكون للفيرويد المعدى Infectious Viroid cDNA Clones :

لقد ذكر العالم Owens سنة ١٩٨١ أن DNA للبلازميد المحتوى cDNA dimers للفيرويد PSTVd كانت معدية. عندما ينسخ RNA من هذه البلازميدات وعندما يحتوى التتابع لـ PSTVd تكون أيضاً معدية. إن التتابع فى ذرية الفيرويد و DNA المكون كانت متماثلة. أما عن الحيوية فلم يمكن إظهارها بالبلازميدات المحتوية monomers للحمض cDNA للفيرويد PSTVd. لقد تمكن Ohno et al

سنة ١٩٨٣ فى المعمل من بناء جزيئات RNA معدية من cDNA مكملون للفيروس HSVd. لقد ذكر Meshi et al سنة ١٩٨٤ حتى الخيوط المزدوجة من cDNAs تحتوى من ١ - ٣ وحدات من تتابع الفيروس HSVd بدون محفزات promoters كانت معدية. كانت حيوية تتابع الوحدة الواحدة منخفضة، لكنها وجدت فى cDNA الذى أخذ من قطع فى دائرة الفيروس فى مواقع مختلفة. كما أن الباحثين قد توقعوا أن وحدة الطول الواحدة cDNA من يمكن أن تلتحم مع Dimers فى النباتات المصابة قبل أن يبنى RNA معدى.

لقد أكد جميع الباحثين الذين يعملون على cDNA المكملون الفيروسى المعدى على أن تتابع الفيروس يمكن أن يحدث فيه تغير بواسطة مطفرات تعمل مباشرة على المواقع المخصصة لذلك، وهذا يمكن أن يستعمل كأداة مؤكدة لدراسة ميكانيكية نشوء المرضية وتناسخ الفيروس.

ونستطيع أن نختم هذا الموضوع بالفقرة التى ذكرها العالم Symons فى مقاله المنشور فى مجلة Virology عدد واحد صفحة ٨٠ لسنة ١٩٩٠ حيث قال:

بالرغم من معرفتنا الكبيرة عن تتابع الفيروسات وتركيبها وتفهمنا الزائد لتناسخها، إلا أننا بشكل أساسى لا نمتلك الإدراك الحقيقى لكيفية حدوث الأعراض من قبل الفيروسات. ونظراً لأن الفيروسات لا يبدو بأنها تشفر لأى بروتين أو عديد بيتايد، فمن المحتمل أنها تمارس تأثيرها خلال تتابعها والتركيب الثانوى والثلاثى Tertiary structure، حيث أن هذه الصفة وهذا التركيب تتداخل بشكل خاص مع واحد أو أكثر من مكونات الخلية. إن كفاءة الفيروسات لتتداخل مع بعض الأحماض النووية RNAs فى الخلية له أهمية ونتائج كبيرة.

ومن ناحية أخرى فإن أهمية تتداخل الفيروسات وطرق هذا التداخل مشروحة باسهاب كبير من قبل العالم Sanger فى بحثه سنة ١٩٨٨.

مقارنة بين الفيروسات وبعض الكائنات الأخرى

١ - مقارنة بين الفيروسات والفيروسات :-

كما سبق وذكرنا فإن الفيروسات هي كائنات صغيرة ذات وزن جزيئي منخفض من الحمض النووي RNA والتي تستطيع أن تهاجم خلايا النبات وتكاثرت نفسها اعتماداً على نفسها وتسبب أمراضاً للنبات. تختلف الفيروسات عن الفيروسات في بعض الصفات هي :-

أ - حجم الحمض النووي RNA. إن حجم هذا الحمض في الفيروسات له وزن جزيئي صغير يتراوح ما بين (١١٠٠٠٠٠ - ١٣٠٠٠٠٠) دالتون. أما في الفيروسات فيكون وزنه الجزيئي من مليون إلى عشرة ملايين دالتون.

ب - الصفة الثانية وهي حقيقة أن الحمض النووي RNA الفيروسي أو ال DNA يكون مغلفاً بغطاء بروتيني، بينما الفيروسات لا يوجد عليها غطاء بروتيني، وتوجد بوضوح بدون غطاء بروتيني يعني أنها حمض نووي حر ليس عليه غطاء.

ج - تنابع النيوكليوتيدات ووجود النطاقات في الفيروسات تختلف عنه في الفيروسات.

د - الفيروسات تستطيع أن تشفر للبروتين أما الفيروسات فلا تستطيع.

هـ - تتناسخ الفيروسات ويزداد عددها بطرق مختلفة عن التي تتبعها الفيروسات.

و - تظهر أعراض الأمراض الفيروسية بعد فترة حضانة تقل كثيراً عن التي تحتاجها الأمراض الفيروسية حيث أن بعض الأمراض الفيروسية تحتاج إلى سنتين بعد الحقن لتظهر الأعراض على العائل.

ز - الفيروسات تهاجم النباتات الراقية والحيوانات والفطريات والبكتريا أما الفيروسات لم يعرف حتى الآن أنها تهاجم غير النباتات الراقية.

وإن جدول رقم ٥ يبين بعض الفروق بين الفيروسات والفيروسات والكائنات الدقيقة.

جدول رقم ٥: بعض الفروق بين مسببات مرضية

الفيروسات	الفيروسات	الكائنات الحية الدقيقة	الصفة
لا يحدث نمو	لا يحدث نمو	يحدث فيها نمو	النمو
لا تنقسم	لا تنقسم	تنقسم	الانقسام
مطلقة التطفل	مطلقة التطفل	غير مطلقة التطفل	التطفل المطلق
RNA	DNA أو RNA	DNA و RNA	نوع الحمض النووي
$10^3 \times (1,3 - 1,1)$	$3 \times (10^6 - 10^8)$	أكبر من 3×10^8	الوزن الجزيئي للحمض النووي
غير مغلف	مغلف مع بعض الاستثناء	غير قابل للاستعمال	التغليف
لا تشفر	تشفر	تشفر	تشفير للبروتين

٢ - مقارنة بين الفيروسات والفيروسات:

Comperison of Viroids and Virusoids

تعتبر الفيروسات Virusoids من مرافقات RNAs النباتية. حيث أن هذه المرافقات تقسم إلى مجموعتين:

المجموعة الأولى: مجموعة مغلفة توجد بشكل دائري مثل الفيروس و يوجد ضمن هذا الغلاف فيروس مساعد. ويوجد من هذه المجموعة أربعة أفراد معروفة وتسمى Virusoids (يعنى فيها RNA شبيه بالفيروسات (Viroid-like RNAs) واعطيت هذا الاسم لتمييزها عن المجموعة الأخرى.

المجموعة الثانية: مجموعة مغلقة وتوجد بشكل مستقيم وتسمى مرافقات RNAs أو Satellite RNAs ويعرف من هذه المجموعة واحد فقط ويسمى sTRSV وقد درس جيداً.

جميع أفراد هذه المرافقات تتكاثر بميكانيكية الدائرة الملتفة. في حالة sTRSV الأشكال الدائرية تكون موجودة في النباتات المصابة ولكن فقط الشكل المستقيم هو الذى يختار ويكون مغلفاً مع جزيئات الفيروس.

إن مرافق RNA الحيوانى الوحيد والذى يشارك صفات الإنشطار الذاتى فى المعمل والمفترض تناسخه بالدائرة الملتفة والانشطار الذاتى فى الطبيعة مثل المرافقات النباتية هو فيروس دلتا الكبد hepatitis ويسمى Hepatitis delta virus (HDV) RNA. وإن هذا ال RNA الدائرى يتكون من 1700 نيوكليتيده وحجمه خمسة أضعاف RNA فى النبات ويكون مغلفاً على شكل أجزاء فيروسية منفصلة عن RNA الفيروسي.

ويبين جدول رقم ٦ مرافقات RNAs التى تخضع للانشطار الذاتى.

جدول رقم ٦ : مرافقات RNAs التى تخضع للانشطار الذاتى

طول النيوكليوتيدات	الاسم باختصار	الفيروس المساعد	
324	vLTSV	أ- فيروس التخطيط المنقول فى البرسيم الحجازى Lucerne transiend strak virus	النبات ١ - RNAs شبيه بالفيروس مغلقة Virusoide
377	vSNMV	ب- فيروس التبرقش العقدى فى البطاطس Solanum nodiflorum mottle virus	
332 & 388	vScMov	ج- فيروس تبرقش البرسيم الأرضى Subterranean clover mottle virus	
365 - 360	vVTMoV	د- فيروس التبرقش القطيفى فى الدخان Velvet tobacco mottle virus	
359	STRSV - sTobTSV	فيروس البقعة الحلقية فى الدخان Tobacco ringspot virus	٢ - RNA مستقيم مغلف
1,700	HDV RNA	Hepatitis B virus	٣ - الحيوان RNA دائرى مغلف لفيروس دلتا الكبد

إن الصفات الخاصة للفيروسات يمكن ملاحظتها جيداً عند إجراء مقارنة مع جزيئات RNA الشبيهة بالفيروسات مثل الفيروسسايدات virusoids، الأحماض النووية RNAs الدائرية ذات الحجم المشابه المحتوى المماثل من GC ولكن بشكل عشوائي مثل التتابع المخلوق بالكومبيوتر. إن تتابع النيوكليوتيدات والتركييب الثانوى لاثنين من الفيروسسايدات تختلف عن فيروسايد vTMOV فيس التبعع المخملى (القيطفى) فى الدخان، وفيرس تبعع نبات (SNMV) *Solanum nodiflorum*. إن درجة تزواج القواعد يكون ٥٦٪ فى vTMOV و ٥٧٪ فى SNMV وقيمة متوسطة من ٥٧٪ حسبت من أقرب ما يمكن من التركييب الثانوى لخمسة تتابعات مختلفة عشوائية. هذا ويظهر أن درجة تزواج القواعد فى بعض الفيروسات ٦٤٪ فى CCCVd ليست أعلى بكثير من الفيروسسايدات أو التتابعات العشوائية. إن غياب التشعبات صفة مميزة والتي هى من مميزات الفيروسات. كذلك فإن هناك صفة مميزة أخرى هى الثبات التيرموديناميك، وهى إما أن توضح بواسطة $\Delta G/N$ أو بواسطة قيمة T_m . إن التعاون الممثل بواسطة $\Delta T_{1/2}$ يكون فقط عال فى التراكييب المقطعية للفيروسات. وأن تكوين دبوس الشعر الثابت خلال تكون تركيب مقطعى مترافق يحدث فقط فى الفيروسات.

ماذا عن الفيروسات الحيوانية

Question of Animal Viroids

مع أن الفيروسات قد عرفت تماماً بأنها تصيب النباتات الراقية، إلا أن هناك عوامل مشابهة قد توجد فى أشكال الحياة الأخرى. يبدو من المعقول البحث عن الفيروسات فى كثير من الحالات التى فيها مسببات الأمراض يفترض أنها فيروسية ولكن العامل المسبب لم يتأكد تعريفه. وبكلمة أدق يمكن البحث عن الفيروسات فى الأمراض التى يشك فى أنها تسبب عن فيروسات.

هناك أمراضاً كثيرة تصيب الإنسان والحيوان وتعزى إلى فيروسات ولكن العامل

المسبب الحقيقي مشكوك فيه، من هذه الأمراض، المرض شبه الحاد من التهاب الدماغ وبعض أمراض الالتهابات المفصلية، ومرض سكرابيا Scrapie فى الحيوانات، يشك فى أنها تتسبب عن فيروسيدات.

على أساس مقارنة الصفات المعروفة عن فيروس PSTVd وصفات العامل المسبب لمرض سكرابيا تبين من ناحية نظرية أنه يتسبب عن فيروس، لكن من ناحية عملية لم يثبت بشكل قاطع أنه يتسبب عن فيروس.

إن المحاولات التى بذلت لعزل الحمض النووى المعدى من عينات الدماغ التى أخذت من الحيوانات المصابة بالمرض باءت بالفشل. كذلك فإن الادعاءات التى تقول إن هناك DNA منخفض الوزن الجزيئى مكون أساسى وضرورى لظهور أعراض مرض سكرابيا لم تتأكد. ومن ناحية أخرى فإن هناك أدلة مقنعة على أن وجود hydrophobic protein فى العامل المسبب للمرض يكون أساسياً للتعبير عن حيوية العامل الممرض. إلا أن نفس الباحثين لم يكونوا قادرين على إثبات المتطلبات الضرورية من الحمض النووى لإحداث المرض.

لقد ذكر كثير من الباحثين أن مرض سكرابيا هو محل خلاف كبير. إن مسبب المرض شديد العدوى، ثابت ظاهرياً، غير صعب فى تنقيته ويبدو أنه مقاوم للإجراءات العادية لتنقية العوامل المعدية. ولقد ذكر أن هناك أدلة وافرة لثبات سلالاته الوراثية مع المتطلبات التالية من جينوم حمض نووى. وعلى أية حال فإن المحاولات للتأكد المطلق من وجود أو عدم وجود الحمض النووى فى المادة المنقاه جيداً لحد الآن لم يكتب لها النجاح.

عند مقارنة العامل المسبب لمرض سكرابيا مع الفيروسيدات من حيث صغر الحجم والمقدرة على إحداث أعراض واضحة فى العوائل القابلة للإصابة، والوقت الطويل الذى يحتاجه بالمقارنة مع الفيروسات، أصبح هناك احتمالاً من أن يكون عامل المرض يحتوى على جينوم شبيه بالفيروس.

إن الصعوبة في اكتشاف حمض نووي في تخضيرات سكرابيا المختلفة النقية يمكن أن يكون راجعاً إلى الوزن الجزيئي المنخفض جداً لجينوم سكرابيا. وإذا كان هذا المسبب المرضي يتكون من جزئ دائري ٥٠ نيوكليتيده، فإن تناسخ الدائرة الملتفة لهذا ال RNA سوف يولد جزيئات concatameric والتي يمكن أن تكون الشكل الوظيفي للمادة الوراثية. زيادة على ذلك فإن الانشطار الذاتي الجزيئي لهذه ال concatamers يمكن أن تولد جزيئات أصغر بأطوال مختلفة كل منها ينجز وظيفة مختلفة إلى حد ما بسبب اختلاف الطول.

بعد كل هذا من الممكن أن نتخيل جزئ RNA دائري صغير جداً يبدو قادراً على إحداث تأثيرات Phenotypic معنوية كتتابعات لتكاثر concatameric RNAs مختلفة، مثل هذه ال RNAs يمكن أن تتداخل مع العمليات الطبيعية الخلوية بطرق مشابهة لتلك التي تقوم بها الفيروسات. إن جميع المعلومات المتوفرة عن مسبب مرض سكرابيا تسمح بأن يكون من ناحية نظرية فيرويد، ولكن هذا التأكيد يحتاج إلى أبحاث طويلة حيث أن العمل على هذا المسبب قد بدأ في سنة ١٩٧٤ ولغاية ١٩٩٢ لم يتأكد الموضوع.

فرضية Diener: هل الفيروسات مستحاثات (بقايا) جزئ من عالم RNA

Are Viroids Molecular Fossils of the RNA World

لقد تقدم العالم Diener سنة ١٩٨٩ بفرضية يقول فيها إن الفيروسات عبارة عن مستحاثات أو بقايا جزئ من عالم RNA. وإن هذه الفرضية لاقت معارضة كثيرة من قبل كثير من الباحثين، إلا أن هناك من وافق عليها وقدم الأدلة والبراهين على صحتها. وفيما يلي نعرض التقرير الذي تقدم به J.C.Flores سنة ١٩٩٤ وفيه يؤكد صحة فرضية Diener ويدعمها بالبراهين والاثباتات.

تقرير العالم J.C.Flores :

نحن نناقش اعتراضاً قد ارتفع ضد فرضية العالم Diener والذي يقول فيها أنه يمكن تفسير ظهور الفيروسات على أنها جزئى مستحاث من عالم RNA. نحن سلطنا طريقاً سليماً لازالة مثل هذا الاعتراض ونكون بذلك قد عضدنا وساندنا فرضية Diener. وعلى أية حال فإن استنتاجاتنا تستلزم زيادة فى العمل من قبل علماء أمراض النبات فى هذا الموضوع. يبدو أن هذه الفرضية لها أهمية من ناحية بيولوجية ومن ناحية تطورية.

مقدمة :-

١ - عالم RNA :

هناك بعض الافتراضات التى وضعها كثير من العلماء حول عالم RNA وكانت هذه الافتراضات ناجحة فى كثير من الحالات وقد قمنا بتلخيص هذه الافتراضات وهى كالتى :-

أ- ازدواجية الفيوتايب والجينوتايب لـ RNA :

إن هذه الجزيئات الكبيرة جداً من RNA تعتبر بأنها تقوم بالعملين فى تجارب تطور الخلية الحرة. إن تتابع النيوكليتيده فى القواعد يكون الـ Genotype، بينما التركيب الفراغى أو الحيزى لجزئى الـ RNA هو الـ Phenotype، ويمكن الاستفادة من الشرح الذى ذكر عن التركيب الثالثى Tertiary المعروف جيداً لـ tRNA مع الانتيكودونات Anticodons.

ب - التطور لأنواع ظاهرية إلى حد ما جديدة على طول أنابيب الجيل يزودنا بأمثلة من الحيز الاختيارى Spatial selection فى أعمال كثير من العلماء.

ج - إن التراكب الذاتى Self - Splicing فى Protozoan genomes يمكن أن يفسر كأنه بقايا من عالم الـ RNA، ومن الضرورى أن نذكر فى هذا

المجال أنه عند تتبع سلسلة مراحل التطور، هذا يؤدي إلى التعرف على أصل الحياة وإن عالم RNA اعتماداً على هذه المعلومات يظهر أنه قد تطور متأخراً. يمكن القياس على أعمال العالم De Duve سنة ١٩٩١ عندما بحث في عالم Thioester وعالم ال Pyrophosphate. وعلى أية حال إذا تركنا المراحل الأولى من عالم ما قبل النيوكليتيده إلى عالم النيوكليتيده، فمن الممكن أن نلمح إشارات مفيدة لا يزال يستدل بها على مستحاثات الجزئ موجودة في الخلايا المعاصرة.

٢ - إن ال RNAs الممرضة للنبات يمكن أن تكون بقايا من التطور ما قبل الخلوى:

في هذا المجال يمكن أن نقوم بتلخيص إقتراحات العالم Diener والتي يقول فيها إن ال RNAs الممرضة للنبات تتصف بأنها دائرية صغيرة يمكن أن تكون بقايا من التطور ما قبل الخلوى. ونؤكد هذا الكلام بقولنا إن الفيروسات قد درست جيداً خاصة تلك التي لها أهمية في الزراعة منذ ظهور تأثيرها الأول على العائلة الباذنجانية خاصة *Solanum tuberosum* (البطاطس)، فمثلاً إن أول فيروس عرف هو فيروس الدرنة المغزلية في البطاطس PSTVd وفيه ٣٥٩ نيوكليتيده (Diener 1971). وإن أول تتابع للنيوكليتيدهات الكاملة في الفيروس قد حدد أيضاً في PSTVd سنة ١٩٧٨ من قبل العالم Gross.

من هذا يتبين أن هناك ثقة واسعة لصالح تفسير الفيروسات كجزئ مستحاث. بعد ذلك ظهر هناك آراء معارضة كثيرة تفند هذه الفرضية وتطلب توضيحاً على استفساراتها. وقبل أن نذكر الآراء المعارضة فإننا نقوم بتوضيح بعض النقاط التي تدعم البراهين التي تؤيد بأن الفيروسات هي بقايا من عالم RNA هذه النقاط هي :-

أ - طول الفيروسات القصير ٢٤٦ - ٣٧٥ نيوكليتيده.

ب - بعض الفيروسات يحدث فيها ظاهرة الانشطار الذاتي الذى فيه تحدث ظاهرة مثيرة للاهتمام. إن أنزيمات العائل RNase لا تتدخل. فعلاً فإن عملية الانشطار الذاتي تحدث فى الغياب الكامل للبروتينات. ومن ناحية أخرى ففي حالة الفيروسات غير ذاتية الانشطار، فإن بعض العوامل أو الوسطاء تتدخل فى ذلك. من الممكن أن يكون RNase تزود به الفيروسات من قبل خلايا العائل.

ج - إن البناء الداخلى للفيروسات يعطيها ميكانيكية دفاعية، نظراً لأنها تتكون من دوائر أحادية الخيط مع وجود أزواج قواعد عديدة تسمح لهذا ال RNA ليشكل حلزون ثنائي كامل بأبعاد تجعل الفيروس مقاوم للأشعة UV.

د - إن تتابع النيوكليوتيدات فى الفيروسات يبرز قليلاً من النشاط لـ RNA أو لا يظهر أى شئ من هذا النشاط فى الفيروس PSTVd، فمثلاً هناك stop codons متكررة فى كل القراءات للطار العام للفيروس.

الآراء المعارضة لنظرية Diener والرد عليها

١ - التناقض الظاهرى لهذه الفرضية:

هناك تناقض ظاهرى ينشأ من الفرضية التى تقول بأن الفيروس قد يكون جزئ مستحاث من عالم RNA. إن الفيروسات فى إحداثها المرض متخصصة مع نباتات مغطاة البذور فقط. إن هذه النباتات قد ظهرت فوق سطح الأرض فى العصر الطباشيرى فمن المفترض حسب رأى Diener أن الفيروسات يجب أن تكون ظهرت مع مغطاة البذور منذ تلك الفترة، ولكن هذا لا يؤيده الواقع.

إن أقدم مستحاثات لمغطاة البذور يؤرخ من نهاية العصر الجيولوجى المتوسط ١٠٠ - ١٤٠ مليون سنة قبل ظهور الأوراق الحالية وحبوب اللقاح الحالية. كذلك فإن

التقارير التي تتكلم عن أجزاء التكاثر في مغطاة البذور تؤرخ من العصر الطباشيري المتأخر وهي في فترة Turonian، كذلك فإن الترسبات القديمة للنباتات المتحجرة كانت قبل العصر الطباشيري وبعده بمدة طويلة جداً أنتجت تركيبات تكاثرية. وبالتالي فإن عالم ال RNA قد ظهر أولاً على الأقل في الدهور السحيقة إذا لم يكن قبل ذلك. اعتماداً على هذا الكلام فمن المفروض أن الفيرويدات بقايا من الدهور السحيقة (3.9 - 3.3 Gybp)، إلا أن الأقرب للصحة أنها متخصصة للحياة في فترة العصر الطباشيري وخاصة على مغطاة البذور.

للرد على هذه المعارضة يجب أن نطرح السؤال التالي.

أين كانت هذه الأجزاء المحفوظة على حياتها منذ الدهر السحيق قبل أن تصبح متخصصة على النباتات في العصر الجيولوجي المتوسط نسبياً؟.

مع أن طرق إحداث المرضية من قبل الفيرويدات ليست واضحة تماماً، إلا أن إحدى هذه الطرق الممكنة وقد اعتمدها كثير من الباحثين وهي إحداث تغير في مستويات البروتين في خلية العائل قد يكون مسئولاً عن إحداث الأعراض عند الإصابة، أو يمكن أن يحدث تحورات في البروتين بعد نسخه في خلية العائل، فمثلاً، بواسطة عملية Phosphorylation. إن الاحتمالين المذكورين سابقاً، إلى حد ما، قد يكونا من خصائص البكتيريا الزرقاء كطور من مراحل الحياة الحرة لبدايات النواة، إلا أن هذا لم يتأكد حتى الآن، ولكن الذي تأكد هو أن الفيرويدات متخصصة في خلايا النبات الذي فيه الكلوروبلاست عبارة عن عضيات organelles نشأت من البكتيريا الزرقاء عن طريق التكافل. نحن نتذكر هذا الافتراض ونعتمد عليه بالاعتماد على نظرية التكافل الداخلي المتسلسل Serial endosymbiosis theory، بأن بعض الكلوروبلاست نشأت خلال مرافقة ال polyphyletic بين البكتيريا الزرقاء المختلفة أسلاف خلايا مميزة النواة.

٢ - البحث عن البكتيريا الزرقاء المميزة:

في هذا الموضوع، بين الاختيارات المختلفة المتوفرة في البحث عن البكتيريا الزرقاء المميزة يجب أن نذكر أن صفة الفيروسات ذات التضاعف الموجب بسبب أنزيمات العائل تؤدي إلى الاقتراح بأن Cyanobacteria RNA replicase قد استكشف من وجهة النظر هذه (هذا يعني أن RNA - polymerase المعتمد على RNA الذي يمكن أن يكون مسؤولاً عن تضاعف الفيروس، من الآن فصاعداً نشير إلى هذا البروتين باسم العامل X. نحن لا نملك إلا القليل من المعلومات عن طرق تناسخ البكتيريا الزرقاء باستثناء الهستونات شبيهة بالبروتينات ذات الحجم المشابه لبروتين HU في E. coli.

لكي نرد على هذا الاعتراض يجب أن نستذكر تسلسل فرضيات التكافل الداخلي Endosymbiosis. يجب أن نفترض أن الاسترقاق Holobionts (متكافل Symbionts وعائل hosts) الأول يستفيد من العائل ولا يقدم للعائل أية فائدة، هي أهداف جديدة للانتخاب الطبيعي بسبب التداخل بين المشاركين في التكافل، في هذه الحالة فإن المشارك قوة رائدة مهمة جداً في التطور، وهذا دعم بأسانيد قوية من كثير من الباحثين. مثل هذا التداخل بين العوائل والمتكافلين يمكن، مثلاً، أن يكون إنتقال وراثي أو متكافل مشارك مثل العضيات Organelles. نرجع ثانية إلى العلاقة مع الفيروسات فإن الاحتمالات المتوقعة والقائمة تكمن في:

بعض الانزيمات المعروفة في نسخ الفيروسات مثل (QB replicase). بعض التكافل بين الخلايا البكتيرية التي تمتلك فعلاً جينومات مخفضة، فمثلاً الكائن Cyanophora paradoxa وحيد الخلية ذو أسواط، يوجلينا تأوى Cyanelles والتي تكون مثل البكتيريا الزرقاء متكافل ينقصه جدران الخلية وتكون له كلوروبلاست عاملة. ولقد عرفت ال Cyanelles بأنها تمتلك ١٠٪ فقط من

محتويات ال DNA فى البكتيريا الزرقاء غير المتكافلة. هذه المتكافلات الداخلية من بدائية النواة يمكن أن تقترب من الطور الذى وصل إليه بواسطة الكلوروبلاستس الذى يرجع بناء بروتينها الذى فصل. ولكن كثيراً من هذه البروتينات شفرت بواسطة جينات نووية.

والذى يهمنى هنا احتمال واحد ومهم أن نذكره هو أنه فى فرضيتنا أن-Viroid Containing cyanobacteria وتكاثر الفيرويد يكون بسبب العامل X، بعد التكافل فإن الفرد المتكافل يمكن أن يمتلك جينوم أصغر كثيراً كما فى Cyanelles. الفيروسات يجب عليها أن تعتمد على جينوم العائل لبناء عامل X.

هذه إبتاتات نظرية وبقي على علماء أمراض النبات أن يثبتوا ذلك عملياً بالتطبيق على أمراض النبات والعوائل القابلة للإصابة منذ العصر الجيولوجى الأول إلى هذا الزمن.

مراجع خاصة بالفصل الثاني

- 1 - Agrios, M. J. 1987. Plant Pathology. Academic Press. 800 pp.
- 2 - Branch, A. D., Robertson, H. D., Dickson, E. 1981. Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A. 78: 6381 - 6385.
- 3 - ——— A. P., ——— 1984. Science 223 : 450 - 455.
- 4 - Bruening, G. et al. 1982. FEBS Lett. 148 : 71 - 78.
- 5 - Diener, T. O., Smith, D. R. 1975. Virology 63 : 421 - 427.
- 6 - ——— , ——— 1989. Proc. natn, Acad. Sci U. S. A. 86 : 9370 - 9374.
- 7 - D. Duve, C. 1991. Blueprint for a cell: The nature and origin of life, Neil Patterson Publishers.
- 8 - Grill, L. K., et al. 1980. Virology 107 : 24 - 33.
- 9 - ——— , ——— , Semancik, J. S. 1978. Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A. 75 : 896 - 900.
- 10 - Gross, J. H., Dometry, H., Lossow, C. 1978. Nature 273 : 203 - 208.
- 11 - ——— , ——— , ——— 1981. Biosci, Rep., 1 : 235 - 241.
- 12 - Hadidi, A., Cress, D. E., Diener, T. O. 1981. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 78 : 6932 - 6935.
- 13 - Haseloff, J., Symons, R. H. 1981. Nucleic Acids Res. 9 : 2491 - 2452.
- 14 - Lewin, R. 1981. Science 213 : 634 - 636.
- 15 - Meshi, T. et al. 1984. J. Biochem., 95 : 1521 - 1524.

- 16 - Muhlach, H. P., Sanger, H. L. 1979. Nature 278 : 185 - 188.
- 17 - Ohne, T., Takamatsu, N., Meshi, T., Okado, Y. 1983. Nucli Acid Res. 11 : 6185 - 6197.
- 18 - Owens, R. A., Cress, D. E. 1980. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 : 5302 - 5306.
- 19 - Owens, R. A., Diener, T. O. 1981. Science 213 : 670 - 672.
- 20 - Rackwitz, H. R., Rohde, W., Sanger, H. L. 1981, Nature 291 : 297 - 301.
- 21 - Riesner, D., et al. 1979. J. Mol. Biol. 133 : 85 - 115.
- 22 - Semancik, J. S., Tsurnda, O., Zaner, L. 1976. Virology 47 : 456 - 466.