الفصل الأول

تطور علم الفيرويد

مقدمة:

إن اصطلاح فيرويد Viroid إستعمل ليدل على مجموعة من المسببات المرضية الجديدة والمميزة والتى هى أصغر من الفيرس Subviral. تتكون الفيرويدات المعروفة من وحدة قصيرة من سلسلة الحمض النووى RNA ذات وزن جزيئى يقارب ٧٥ ـ ١٠٠ ألف دالتون. عند دخول هذه الوحدات من RNA ذات الوزن الجزيئى المنخفض فى عوائل قابلة للاصابة يحدث لها تضاعف بشكل واضح وتسبب امراضاً فى العائل.

لقد ذكر اول إستعمال لكلمة فيرويد سنة ١٩٧١ وذلك أثناء المحاولات التى كانت تجرى لتنقية ومعرفة صفات العامل المسبب لمرض الدرنة المغزلية فى البطاطس والذى كان يعتقد خطأ بأنه يتسبب عن فيرس. ففى سنة ١٩٦٧ ذكر كلاً من Diener & Raymer أن المسبب المعدى لهذا المرض هو عبارة عن خيط حر من الحمض النووى RNA وأن هذه الأجزاء الفيروسية (حسب ذلك الاعتقاد) يبدو أنها لا تتواجد فى النسيج المصاب. وبعد فترة من الزمن وعند إستعمال طرق الترسيب والتحليل بالعزل الكهربائى فى الجيل، فإنه تقرر وبشكل قاطع وحاسم أن هذا الحمض المعدى من أل RNA له وزن جزيئى صغير جداً، وبالتالى فإن هذا العامل المسبب للمرض يختلف وبشكل أساسى عن الفيروسات المتعارف عليها.

obeikandl.com

بعد أن تأكد بأن مرض الدرنة المغزلية فى البطاطس يتسبب عن عامل يختلف عن الفيرس ولكن كان فيه إلتباس مع الفيرس أطلق عليه العالم Diener اسم فيرويد (قريباً من لفظ فيرس). 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 فيرويدات.

أدلة وجود الفيرويدات Evidence For Existance of Virods.

١ ـ الصفات الترسيبية والحساسية لأنزيم نيوكلييز:

لقد أظهرت الأبحاث المبكرة التى أجريت على المستخلص الخام من أوراق البطاطس أو الطماطم المصابة بمرض الدرنة المغزلية، أن معظم المواد المعدية تترسب على معدل بطئ 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 فيرس وكذلك وجد أن هذه المواد غير حساسة للمعاملة بالمذيبات العضوية المختلفة. إن جزيئات الفيرس المحتوية على دهون وذات الكثافة المنخفضة يبدو أنها غير واردة. كذلك فإن معاملة المستخلصات الخام بالفينول لا تؤثر على حيوية ولاالصفات الترسيبية لهذا العامل الممرض. واعتماداً على هذه النتائج إفترض أن هذه العوامل المسببة للمرض هى حمض نووى حر.

وجد أن تحضين المستخلص الخام مع أنزيمات النيوكلييز Nucleases أظهر أن هذه العوامل المسببة للمـرض حساسة لانزيـم Ribonuclease وغير حساسة لانزيم De + oxyribonuclease. إن الملاحظات التى استنتجت من أن العامل المرضى يمكن تركيزه وسهولة ترسيبه بالايثانول واعادل تعليقه Resuspension فى حجم صغير من منظم يكون متوافقاً مع فكرة أن هذا العامل الممرض هو حمض نووى حر.

وكذلك وجد أن تحضين 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 الازالة من أعمدة Methylated serum albumin تؤدى إلى الاقتراح بإن هذا العامل الممرض المستخلص قد يكون خيط مزدوج من الحمض RNA.

لقد إستخلص كل من Singh & Bagnall حمض نووى معدى من نسيج مصاب بفيروید الدرنة 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 التحضين 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 اكسوكورتز 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 ـ S١٥. بسبب هذه النتائج وبسبب عدم إمكانية ملاحظة أجزاء فيروسية نموذجية كاملة بواسطة التصوير بالميكروسكوب الالكترونى، فقد إقترح الباحثان أن الفيرس يمكن أن يمثل شكل من أشكال الحمض النووى المعدى، قد تكون هذه الأشكال مشابهة إما لشكل غير

ثابت من فيرس خشخشة الدخان، طفرات غير متجمعة لفيرس موزايك الدخان أو كجزئ حمض نووى RNA مزدوج السلسلة.

أما الكائن الممرض الثالث الذى درس فى 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 التى يتصف بها مسبب مرض الدرنة المغزلية فى البطاطس ومسبب اكسوكورتز الحمضيات. وقد تميز مسبب تقزم الاقحوان بزيادة طول المادة المعدية والمسببة للمرض والتى تكورت أثناء عملية الطرد المركزى 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 يؤدى إلى ظهور عينات ذات حيوية مشابهة لتلك العينات غير المعاملة.

٢ ـ غياب الفيرونات Absence of Virions :

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

ملاحظة أن التحضيرات النقية جداً من RNA المأخوذة من نسيج مصاب بمرض الدرنة المغزلية تحتوى أيضاً مواد معدية والتى تترسب بمعدلات أسرع من تلك المتوقع الحصول عليها من RNA حر . وإذا كانت هذه المواد المعدية سريعة الترسيب مكونة من أجزاء من بروتين نووى فيروسى فإن هذه الأجزاء يمكن أن تكون بالتالى ذات صفات غير عادية. من هذه الصفات أن غلافها البروتينى 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 فى هذه الجزيئات فإن العالم Diener سنة ١٩٧١ إستنتج أن هذه المواد المعدية ذات سرعة الترسيب العالية لا يوجد فيها بروتين نووى فيروسى وبالتالى ليست أجزاء فيروسية. لقد تأكدت هذه الاستنتاجات السابقة تأكيداً جديداً بملاحظة (تجارب فى الموضع In situe) أن مسبب مرض الدرنة المغزلية فى البطاطس يكون حساساً للمعاملة بأنزيم Ribonuclease. وجد أن الترشيح بالتفريغ Vacuum in filtration لعصارة الأوراق المصابة بمسبب مرض الدرنة المغزلية فى البطاطس والموجود فيها أنزيم Ribonuclease يؤدى إلى الفقد الكلى إلى حد ما فى نشاط وحيوية هذا المسبب، فى حين أنه تحت هذه الظروف لا تتأثر حيوية ونشاط جزيئات الفيرس العادى.

قام العالم Zaitlin سنة ١٩٧٢ بتجربة حلل فيها بروتينات معزولة من أوراق مصابة بمسبب مرض الدرنة المغزلية فى البطاطس وأوراق مصابة بفيرس موزايك الدخان، وقارن ذلك مع بروتينات معزولة من أوراق غير مصابة فوجد أنه لا دليل على وجود بروتينات فى الأوراق المصابة بمرض الدرنة المغزلية تعتبر كغطاء بروتينى لمسبب المرض فى حين أنه تحت هذه الظروف يتكون الغطاء البروتينى لسلالات فيرس موزايك الدخان ويكون واضحاً تماماً.

تساءَل الباحث إذا كان الحمض النووى RNA فى المواد المعدية والتى هى سريعة الترسيب لا يقع تحت مجموعة الفيرونات 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 والتى لا تتحطم بالفينول، أو أنها تتواجد فى مجموعات ذات أحجام مختلفة. وبالتالى يجب التقدم خطوة أخرى فى التعرف على هذا المسبب وذلك بتحديد موقع المسبب المرضى بالنسبة للخلايا المصابة.

٣ ـ موقع مسبب المرض فى الخلية Subcellular Location :

أجريت إختبارات حيوية على مكونات الخلية من النسيج المصاب بمرض الدرنة المغزلية فى البطاطس أظهرت أن هناك حيوية يمكن تقديرها موجودة فقط فى أجزاء من حطام الخلايا وفى الأجزاء المحتوية على الأنوية. أما البلاستيدات، الميتوكندريا، 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 الدرنة 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 الدرنة المغزلية فى البطاطس يكون مترافقاً مع الكروماتين، هذا يمكن أن يوضح صفاته الترسيبية المتغايرة فى المستخلص الخام.

بالاضافة 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 هى المسبب الرئيسى لصفات الترسيب السريعة للمواد المعدية المرضية.

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

٤ ـ تقدير الوزن الجزيئى للفيرويدات المعروفة:

Molecular Weight Estimates of Native Viroids

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

مع أنه قد عرف لبعض الوقت أن فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس يترسب بمعدل منخفض أقل من جزيئات الحمض النووى الفيروسى RNA وحيد الخيط، إلا أن هذه الملاحظة لم يمكن الاستفادة منها فى تحديد الوزن الجزيئى للفيرويد وذلك نظراً لأن التكوين البنائى لهذا الحمض لم يكن معروفاً.

لقد إستعمل العالم Loening سنة ١٩٦٧ طريقة متطورة واعتمد عليها فى امكانية تقدير الوزن الجزيئى، هذه الطريقة مبنية على النشاط الحيوى فقط. لقد إقتنع هذا العالم بأن تأثيرات التركيب الثانوى لهذا الحمض RNA على صفاته الترسيبية تكون متعاكسة مع تأثيراتها على حركتها فى الهجـرة الكهربائية فى

مركب Polyacrylamide gels وبالتالى فإن دمج هاتين الطريقتين (الهجرة الكهربائية وسرعة الترسيب) سيكون ذو فائدة فى تمييز الاختلافات فى التركيب نتيجة للاختلافات فى 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 فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس أدى إلى استنتاجات غير متوقعة حيث تبين أن الحمض RNA المسبب للمرض له وزن جزيئى منخفض جداً وكان هذا التقدير حوالى ٥ × ٤١٠ دالتون فى نتائج معظم التجارب. هناك تأكيدات أخرى ظهرت بشكل أوضح تؤيد الوزن الجزيئى المنخفض لهذا الفيرويد، 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) والتى لا تستطيع أن تمر منها الأحماض النووية ذات الوزن الجزيئى المرتفع. فى مثل هذا الجيل فإن فيرويد الدرنة 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 ذكرا بعض النتائج التى أظهرت أيضاً أن فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس هو عبارة عن RNA ذو وزن جزيئى منخفض واستنتجا من تحديد حركة الفيرويد فى الهجرة الكهربائية فى Polyacrylamide gel ٧,٥٪ أن قمة الحيوية والنشاط للفيرويد تكون متوافقة مع حجم الجزيئات ذات ٤ ـ ٥ وحدة من وحدات Svedberg.

لقد ذكر العالم Diener سنة ١٩٧٣ أن الفيرويد 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 فيرويـد الدرنة المغزلية فى البطاطس، وكانت هذه التنقيـة متبوعة بالترسيب والتحليل بالهجرة الكهـربائية. وجد أن RNA المعدى يترسب بمعدلات تتوافق مع القيم S 7.5 - 5، وأن عمود الهجرة الكهربائية لفيرويد تقزم الاقحوان وفيرويد الدرنة

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 لفيرويد اكسوكورتز الحمضيات فإن الهجرة الكهربائية للتحضيرات المعدية فى ال polyacrylamide gels تدل على أن الوزن الجزيئى للحمض النووى RNA لمسبب هذا المرض هو ١,٢٥ × ٥١٠ دالتون وإقترح 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 فيرويد اكسوكورتز الحمضيات باستعمال polyacrylamide gels أن الوزن الجزيئى للحمض النووى RNA لمسبب هذا المرض هو ٥ ـ ٦ × ٤١٠ دالتون.

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

١ ـ 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. وبالتالى فإنه كلما كان الحمض النووى الفيرويدى قريب الشبه فى التركيب مع الحمض النووى القياسى كلما كانت النتائج أكثر دقة والعكس صحيح.

٢ ـ إن نتائج الدراسات التى أجريت على فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس أدت إلى الاقتراح بأن RNA الفيرويدى قد يتواجد فى تجمعات بحالات عديدة وبالتالى فإن الوزن الجزيئى المقاس بهذه الطرقة قد يكون مبنياً على هذه التجمعات وليس على الخيط المفرد الوحيد من RNA.

٣ ـ 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 ـ ١٠٪ فإن RNA موضوع الدراسة يكون ذو وزن جزيئى ١ × ١٠^٥ دالتون، بينما إذا كان التركيز للجيل أكبر من ٨ ـ ١٠٪ فإن الوزن الجزيئى لنفس الحمض موضوع الدراسة يكون ٥ × ١٠^٤ دالتون.

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

٥ ـ التنقية Purification :

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

إن الخطوة الأولى التى تستعمل فى تنقية فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس كما ذكرها Diener سنة ١٩٧٢، عبارة عن الحصول على الأحماض النووية من كميات كبيرة نسبياً من الأوراق المصابة والسليمـة. 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 الفيرويد متوافقة مع هذا المكون الموجود فى الشريحة. هذا التوافق (المستوى العال من الحيوية) بالاضافة 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 لفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس.

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

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

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

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

الصفات الفيزيائية والكيميائية للفيرويد

Physical and Chemical Properties of Viroeids

١ ـ الوزن الجزيئى لفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس:

Molecular Weight of PSTVd

عند توفر التحضيرات النقية من فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس، فإن تحديد الوزن الجزيئى لهذا الفيرويد يكون مبنياً على، ليس على نشاطه البيولوجى، بل على

إمتصاصه للأشعة فوق البنفسجية وأصبحت هذه الطريقة ممكنة. ولتحديد الوزن الجزيئى للفيرويد، 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 دنترة 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 فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس باستعمال RNA المدنتر فى كل من الفيرس المرافق للتبقع الحلقى فى الدخان، المخول، الرابيوسوم، 5S، وفيرس تبرقش القرنفل كأوزان جزيئية قياسية، كانت النتيجة أن الوزن الجزيئى لفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس يقع فى مجال (٧,٥ ـ ٨,٥) × ٤١٠ دالتون وهذا ما ذكره Diener سنة ١٩٧٣.

إن هذا التعارض الواضح بين هذه القيمة للوزن الجزيئى والقيمة السابقة التى ذكرت بأنها ٥ × ٤١٠ دالتون يكون أكثر احتمالاً إلى التركيب المندمج (منضغط) للحمض النووى RNA ويوضـح الخطأ الحقيقـى الملازم للمحـاولات التى أجريت لتقدير الوزن الجزيئى للفيرويدات بالهجرة الكهربائية فى الجيل بالمقارنة للجزيئات المعروفة.

٢ ـ الدنترة الحرارية لفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس:

Thermal Denaturation of PSTVd

لتحديد فيما إذا كان فيرويد الدرنة المغزلية احادى أو ثنائى الخيط، درست الدنترة الحرارية للحمض النووى RNA وكان منحنى الدنترة يدل على أن تركيب الفيرويد ليس مزدوج القواعد بانتظام مثل RNA مزدوج الخيط، وبالتالى فإنه فى هذه الحالة

فمن المتوقع أن تحدث الدنترة على معدل درجات حرارة أكثر تقارباً وذات قيمة عالية. وعلى أيه حال فإن منحنى الدنترة لا يقرر بأن جزئ 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 لفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس المذاب فى منظم قوى عالى الايونية (0.1 x 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 ٥٤°م.

٣ ـ الحساسية للاشعاع Radiation Sensitivity :

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

إن تعريض الحمض النووى RNA الموجود فى كل من فيرويد الدرنة المغزلية، فيرس البقعة الحلقية فى الدخان والفيروسات المرافقة، للأشعة فوق البنفسجية ٢٥٤ نانوميتر أظهر أن التثبيط حصل بنسبة ٧٠ ـ ٩٠ ضعف فى فيرويد الدرنة المغزلية والفيروسات المرافقة بالمقارنة مع فيرس البقعة الحلقية فى الدخان، هذا ما وجده Diener سنة ١٩٧٤. هذه النتائج ذات الاختلاف الواضح فى الحساسية للاشعاع بالاشعة فوق البنفسجية يكون تفسيرها بسبب الحجم الصغير للحمض RNA فى

فيرويد الدرنة المغزلية والفيروسات المرافقة إذا ما قورنت بحجم RNA فى فيرس البقعة الحلقية فى الدخان.

لقد قام العالم Semancik سنة ١٩٧٣ بتعريض تحضيرات من فيرويد اكسوكورتز الحمضيات وفيرس موزايك الدخان إلى أشعة مؤينة، وحدد بالمعدلات المقارنة للتثبيط البيولوجى، الوزن الجزيئى فوجد أنه ١,١ × ٥١٠ دالتون للحجم المحدد من فيرويد اكسوكورتز الحمضيات.

٤ ـ الفحص بالميكروسكوب الالكترونى لفيرويد الدرنة المغزلية:

Electron Microscopy of PSTVd

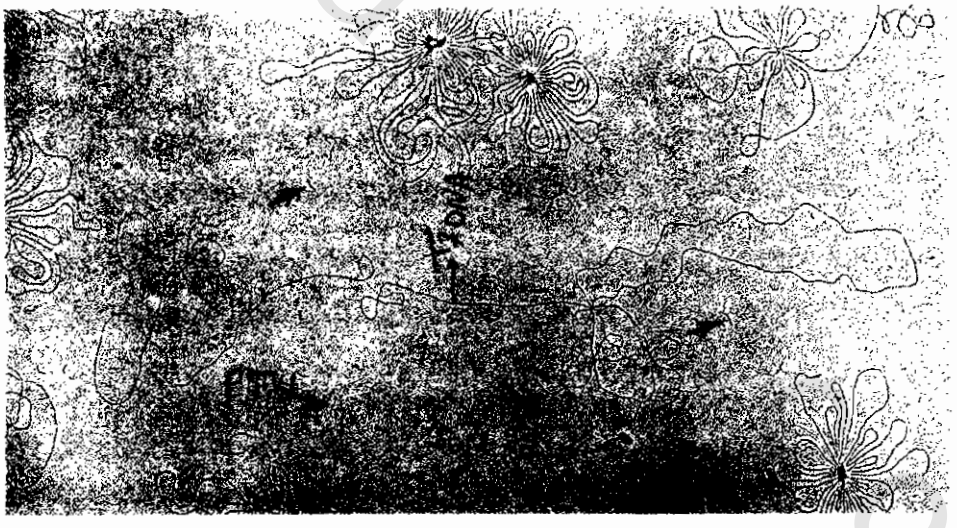
إستعمل العالم Sogo ومرافقوه سنة ١٩٧٣ طريقة لدراسة فيرويد الدرنة المغزلية بالميكروسكوب الالكترونى، فقد عامل تحضيرات نقية من فيرويد الدرنة المغزلية بطبقة احادية من البروتين واستعمل الطريقة التى ذكرها Zahn و Kleinschmidt سنة ١٩٥٩.

عند رش تحضيرات من فيرويد الدرنة المغزلية الموجودة فى ٤ مول من محلول أسيتات الصوديوم على الصورة تحت المائية للماء المقطر، تكشفت تركيبات قصيرة جداً غالباً فى تجمعات منضغطة ولكن احياناً على شكل أجزاء منفصلة، هذه الأجزاء لم يمكن اكتشافها فى حالة الكنترول لأحماض نووية حرة وكانت غير موجودة فى التحضيرات المعاملة بأنزيم Ribonuclease.

بسبب إتحاد جزيئات فيرويد الدرنة المغزلية 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 امكانية رؤية جزيئات فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس بمفرده قد وضعت تحت الإختبار. وبالفعل كان هناك اعداداً كثيرة من السلاسل القصيرة ذات طول متناسق نسبياً لوحظت عندما نشرت تحضيرات من فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس فى محلول يوريا ٨ مول، هذا ماوجده Sogo ومرافقوه سنة ١٩٧٣. لم يمكن تمييز وملاحظة مثل تلك

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

نظراً لأن الكتلة لكل وحدة طول غير معروفة، فإن أطوال جزيئات فيرويد الدرنة المغزلية للبطاطس كانت تقارن مع تلك الجزيئات من الأحماض النووية معروفة الوزن الجزيئى التى كانت تضاف إلى تحضيرات الفيرويد وكانت عندئذ تعامل بالتطابق بين المعلوم والمجهول.



شكل رقم ١ :

صورة الكترونية ليفرويد PSTVd مختلطاً مع DNAثنائى الخيط و DNA للفاج T_7 بالمقارنة النسبية يلاحظ الحجم الصغير جداً للفيرويد بالمقارنة مع DNA للفاج.

يظهر شكل ١ صورة ميكروسكوبيه لمخلوط من حمض DNA ثنائى الخيط، Coliphage T_7 و RNA لفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس. تدل القياسات أن DNA للفاج T - 7 حوالى ٢٨٠ ضعف طول فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس، يظهر كذلك أن سمك فيرويد الدرنة المغزلية مشابهاً لسمك DNA للفاج T - 7. واعتماداً على أن الوزن الجزيئى للحمض DNA - T_7 يساوى ٢٥ × ٦١٠ دالتون كما ذكر العالم Lang سنة ١٩٧٠ فإن الوزن الجزيئى لفيرويد الدرنة المغزلية هو ٨,٩ × ٤١٠ دالتون.

إن الفحص الميكروسكوبى لخليط من فيرويد الدرنة المغزلية وحمض RNA لفيرس تبرقش القرنفل مدنتر بالفورمالدهيد أظهر أن RNA الفيرويدى أسمك من الخيط المفرد من RNA الفيروسى، إلا أن طول RNA الفيروسى حوالى ١٧ ضعف طول RNA الفيرويدى المدنتر. هذه المقارنة ادت إلى تقدير الوزن الجزيئى للفيرويد بحوالى ٧,٩ × ٤١٠ دالتون.

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

٥ ـ تركيب جزئ الفيرويد Molecular Srtucture of Viroid

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

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

طرق الازالة من أعمدة CF - ll 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 تؤدى إلى الاعتقاد بأنه يتكون من حمض RNA ثنائى السلسلة فقط. بالاحتكام إلى هذا المعيار فإن فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس له تركيبات ثانوية عديدة.

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

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

أما فيما يتعلق بفيرويد اكسوكورتز الحمضيات فإن العالمان Semancik & Weathers سنة ١٩٧٠ ذكرا بأن الحمض النووى RNA المعدى يتواجد على شكلين. الشكل الأول يترسب فى مجال (15S - 10) أما الشكل الثانى يترسب فوق S25. وجد أن ازالة فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس وفيرويد اكسوكورتز الحمضيات من أعمدة Methylated serum albumin يكون فى مجال إزالة 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 ثنائى السلسلة، إلا أن هناك محاولات أجريت لتفكيك هذا الحمض RNA المتوقع أنه ثنائى السلسلة أو ملاحظة أية مقاومة يبديها 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 لفيرويد الدرنة المغزلية والتى ذكرها Sing & Clark سنة ١٩٧١ وإقترحا بأن تركيب RNA الفيرويدى هو على الأقل ثنائى السلسلة جزئياً. أما بالنسبة لفيرويد اكسوكورتز الحمضيات تثبط كلية بمادة الفورمالدهيد.

عند مقارنة RNA الفيرويدى مع RNA الفيروسى وحيد السلسلة، تبين أن فيرويد اكسوكورتز الحمضيات مقاوم للتثبيط بالحرارة وبأنزيمات القطع الخارجى Exonucleases وفى هذه الصفة الأخيرة يشارك RNA الفيرويدى للحمضيات فيرويد الدرنة المغزلية، إلا أن المقاومة للتثبيط بأنزيمات اكسوكورتز أنزيمات القطع الخارجى Exonucleases قد تؤدى إلى القول بأن تركيب RNA الفيرويدى 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 والتى تجعل الحمض النووى RNA الفيرويدى عائماً فى محلول متدرج الكثافة من محلول كبريتات السيزيوم القياسى، فإن بعض العلماء إقترحوا أن فيرويد 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 اما:ـ

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

٢ ـ أن يكون الفيرويد حمض نووى RNA ثنائى السلسلة ولكن بجزيئات غير كاملة ازدواج القواعد.

الصفات الحيوية

BIOLOGICAL PROPERTIES

١ ـ التضاعف (التناسخ) Replication

إن إنخفاض الوزن الجزيئى للفيرويدات أثار تساؤلاً، وهو إلى أى مدى تستطيع هذه الأحماض النووية RNAs أن تمتلك معلومات وراثية كافية لتحث على تضاعفها فى العوائل القابلة للإصابة. إن الوزن الجزيئى لفيرويد الدرنة المغزلية يكون كافياً فقط لعمل شفرة لـ ٧٠ ـ ٨٠ حمض أمينى، هذا يعنى 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 فى التضاعف.

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

ربما يكون بناء الفيرويدات بطاقة عادية من جينوم العائل والتى تبدأ نشاطها بوجود الفيرويد فى العائل، إلا أنها تكون مكبوتة كلية فى النباتات غير المصابة. إذا كان ذلك صحيحاً فإن الفيرويدات تعمل كمانعات كبت لهذه الطاقة الكامنة، إما مباشرة أو عن طريق ببتيدات عديدة مترجمة من الحمض النووى RNA. إن مثل هذا التصور يجلب سؤالاً هو لماذا قطع حمض ال DNA المكبوتة كلية والتى 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 معقولية من الوهلة الأولى هو إفتراض أن فيرويد الدرنة المغزلية مشابهاً للحمض RNA فى الفيروسات المرافقة والتى تتطلب فيرس مساعد لها لتضاعف نفسها. إن الجهود التى بذلت لاثبات وجود مثل هذا الفيرس المساعد فى نباتات الطماطم غير المحقونة أعطى نتائج سلبية. ولقد أظهر العلماء أنه إذا كان مثل هذا الفيرس 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 فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس عنده القدرة على التناسخ فى عدد من أنواع نباتات العائلة الباذنجانية بالإضافة إلى البطاطس والطماطم، فبالتالى يجب أن يتكاثر الفيرس المرافق والمفترض وجوده مع الفيرويد فى هذه الأنواع النباتية أيضاً. لقد أظهر Diener سنة ١٩٧٢ أن أنواع نباتات العائلة الباذنجانية والتى يمكن أن تصاب عن طريق مستخلص خام يحتوى على فيرويد الدرنة المغزلية يمكن أن تصلب أيضاً بحمض RNA ذو وزن جزيئى منخفض مفصولاً من polyacrylamide gels. وبالتالى إذا كانت الفيروسات المساعدة داخلة فى تضاعف فيرويد الدرنة المغزلية فإن مثل هذه الفيروسات يجب أن تكون موجودة بشكل عام فى النباتات التى تبدو سليمة من أنواع نباتات العائلة الباذنجانية.

من تلك النتائج ومن غيرها يبدو من غير المحتمل وجود فيروسات مساعدة مع الفيرويد، وبالتالى فإن فيرويد الدرنة المغزلية بالرغم من حجمه الصغير يبدو أنه ذو مقدرة على التضاعف تلقائياً بذاته فى النباتات العائل.

٢ ـ نشوء المرض Pathogenesis

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

تحدث أمراضاً خطيرة بأعراض متنوعة مشابهة لتلك الأعراض النموذجية المتسببة عن الاصابة الفيروسية. نظراً لأن هناك كمية صغيرة جداً من الفيرويدات المعروفة تكون موجودة فى الأنسجة المصابة، فإنه من غير المحتمل أن يكون هناك نقصاً فى النيوكليتيدات المتوفرة لبناء الحمض النووى للعائل وتكون مسئولة عن هذه الاضطرابات فى العائل. لقد تأكد هذا الرأى بحقيقة أنه فى كثير من العوائل فإن الفيرويدات تتضاعف بكفاءة عالية بدون حدوث اضراراً ظاهرة للعائل، هذا ما ذكره Sanger سنة ١٩٧٢.

هناك عدة اراء تفسر دور الفيرويدات فى نشوء المرض منها:ـ

١ ـ هناك تدخلاً نوعياً من قبل الفيرويدات يحدث فى وظائف ميتابولزم العائل مما يؤدى إلى حدوث الأمراض.

٢ ـ يمكن أن تعمل الفيرويدات، مثلا، كأحماض نووية RNAs ناقلة غير عادية وهذا يؤدى إلى تكوين أو بناء بروتينات ذات عيوب تركيبية.

٣ ـ يمكن أن تتدخل الفيرويدات مع جينوم العائل من ناحية نسخ الجينوم إما بالكبح العادى للسسترونات Cistrons المعبرة أو عن طريق وقف الكبح للسسترونات المثبطة عادياً.

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

٣ ـ الإنتقال Transmission

إن الفيرويدات المعروفة لغاية سنة ١٩٧٣ تنتقل بالطرق الميكانيكية، إما بسهولة مثل فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس وفيرويد تقزم الاقحوان، وإما بصعوبة إلى حد

ما مثل فيرويد اكسوكورتز الحمضيات. بالنسبة لفيرويد الدرنة المغزلية 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 فيرويد الدرنة المغزلية وفيرويد اكسوكورتز 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 أجزاءً من الأنوية المحتوية على فيرويد الدرنة المغزلية أو قطعاً من الكروماتين المحتوية على فيرويد الدرنة المغزلية تنتقل من الخلايا المصابة إلى الخلايا العادية بطريقة أفضل من إنتقال ال RNA الحر. إن فيرويد الدرنة المغزلية ينتقل عمودياً إما خلال حبة اللقاح أو المبايض 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 وإقترح بأنه إما أن يكون شكل بدائى جداً للفيرس 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 اراء عن أصل الفيرويدات قد لخصها العالم Diener سنة ١٩٧٩ . ثم

ناقشها واوضح كثير منها واضاف عليها العالم Sanger سنة ١٩٨٤. من هذه الأراء.

١ ـ إن أهم الملاحظات فيما يتعلق بأصل الفيرويدات يختض باكتشافها:

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

من كل ما سبق يتبين أن الفيرويدات حديثة الأصل، وقد إفترض أنها نشأت من نشاطات الانسان مثل ادخال الزراعات الاحادية Monocultures حيث أنها قد تكون ساهمت فى تكاثر وإنتشار الفيرويدات والأمراض الفيرويدية. ونظراً لأن الفيرويدات غالباً لا تسبب اعراضاً فى النباتات البرية، بالتالى إفترض بأنها نشأت من عائل نباتى 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 الفيرويد.

٢ ـ نشوء الفيرويد بالمصادفة من أحماض نووية RNAs عادية:

هذا الاقتراح الثانى لاصل الفيرويدات يذكر أن الفيرويد 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 Dicn-er قد تنبأ بأن أمراض فيرويدية جديدة على النباتات المزروعة سوف تستمر فى التكشف 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 يثبط بإضافة مثل هذا الحمض RNA.

إن فيرويد الدرنة 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 فيرويد الدرنة المغزلية، ومن المحتمل فيرويدات أخرى نشأت من RNAs من النواة والتى تكون مكونات عادية للكائن والتى 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 ـ حدوث تداخل فى تتابع النيوكليتيدات فى الحمض النووى RNA :

قد تكون الفيرويدات نشأت من حدوث تداخل فى تتابع النيوكليتيدات فى الحمض النووى RNA. هذا الافتراض يبدو أنه مدعماً بتماثل التتابع بين معظم تنوعات التتابع وتتابعات الفيرويدات (باستثناء فيرويد ضربة الشمس فى الافوكادو) والنهاية `5 للحمض U_1 RNA، 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 الفيرويدات 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 الجزيئات الوسيطة ذات القواعد المزدوجة (كما تفعل الفيرويدات)، وإذا ما أصبحت دائرية (كما هى الفيرويدات) وبالتالى فإن هذه الجزيئات تصبح ثابتة وتنجو من التحطيم. إن إتخاذ الانترونات للشكل الدائرى قد لوحظ فى دراسات Borst سنة ١٩٨١ وذكر أن بعضاً منها تأخذ حجم الفيرويدات 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 polymerase للحمض RNA الموجه وبالتالى تنجو من ميكانيكية التوجيه فى خلية العائل.

إن الأحماض النووية الصغيرة من RNA المترافقة مع أجزاء من رايبونيوكلو 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 ـ 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 U1RNA. وإذا كان هذا صحيحاً فإن نظرية الانترون لاصل الفيرويد تتنبأ أن تتابع نيوكليتيدى معين على الفيرويدات أن تسلكه كمكل للنهاية `5 لهذا الحمض النووى الصغير المزعوم SnRNA بالإضافة إلى U1RNA.

ومن ناحية هذه التشابهات كان من الأفضل تحديد فيما إذا كانت تتابعات النيوكليتيدات فى فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس تحتوى على مطاطية كافية لتكوين تكامل مع النهاية `5 للحمض U1RNA أو لا تحتوى، ولكن الأستقصاء عن مثل هذه التتابعات فشل فى الكشف عن امكانية تكوين معقدات ثابتة بين RNA لفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس وU1RNA. وعلى أية حال لأن RNA الفيرويدى فى البطاطس يبدو بأنه ينسخ عن قالب RNA، فإن الخيط الكامل وليس الفيرويد نفسه يمكن أن يمثل إنترون ثابت ويسلك سلوك تكميلى مع U1RNA.

٤ ـ 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 والفيروساید virusoid يبدو أنه فى كون الفيرويد يتناسخ بواسطة أنزيم العائل polymerase، بينما الفيروساید يعتمد على أنزيم Replicase الفيروسى لتناسخه. وتختلف الفيرويدات عن الفيروسايدات فى النقاط الآتية: ـ

أ ـ لا يوجد تماثل فى التتابع يمكن تقديره بين الفيرويدات والفيروسايدات.

ب ـ تختلف الفيروسايدات عن الفيرويدات فى الصفات الثيرموديناميكية والهيدروديناميكية وهى بهذه الصفات تتشابه جداً مع التتابع العشوائى ومع طول وتركيب القاعدة ودائرية الفيرويدات.

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

يمكن أن تكون الفيرويدات والحمض RNA الفيروسى 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 ميكانزم العائل فى الانتقال داخل الخلايا والتضاعف بسبب أن خلايا العائل (النبات) العادية تحتوى تركيبات لها صلة مع الأحماض RNAs والتى هى أيضاً قادرة على الانتقال والتضاعف لكى تسهل تكبيرها و-Extrachromosomal inheri tance ومن الواضح أن مثل هذا النظام إذا وجد يمكن أن يكون مصدراً لتطور الفيرويدات وحمض RNA الفيروسى.

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

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

٧ ـ يمكن أن تكون الفيرويدات إشتقت من عناصر وراثية مترجمة:

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

إن تماثل التتابع لأكثر من ٧٠٪ من فيرويدات مجموعة PSTVd (فيرويد 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 جدود مختلفة من RNA . ونظراً لأن تتابع الفيرويد لا يحدث فى DNA العائل يستبعد أن تكون الفيرويدات من أصل RNA ناتج من DNA . ونظراً لأن التتابع المتماثل مع U1 RNA والصفات التركيبية تشبه العناصر القابلة للانتقال وتشبه Retroviral proviruses الناشئة من الأحماض RNAs غير الممرضة من الأنواع غير المتقاربة من مميزة النواة.

تتابع اكتشاف الفيرويدات:

إن أول كائن ممرض امكن تمييزه وتعريفه على أنه فيرويد 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)، والذى 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 جزيئات 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 توالت اكتشافات الأمراض الفيرويدية ومسبباتها كما فى جدول رقم ١، وإن معظم هذه الأمراض ذات أهمية إقتصادية فى المحاصيل النباتية. فمثلاً فيرويد كاذانج ـ كادانج 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

اسم المرض الفيرويدى	المدى العائلى	الاختصار	سنه الاكتشاف	العالم المكتشف
١ ـ Potato spindle tuber Viroid الدرنة المغزلية فى البطاطس	معظم نباتات العائلة الباذنجانيه	PSTVd	١٩٧١	Diener Singh & Clark
٢ ـ Citrus exocortis Viroid اكسوكورتز الحمضيات	الحمضيات، العائلة المركبة العائله الباذنجانية	CEVd	١٩٧٢	Sanger Semancik & Weathers
٣ ـ Chrysanthemum Stunt Viroid تقزم الاقحوان	أنواع من العائلة المركبة	CSVd	١٩٧٣	Hollings & Stone Diener & Lowson
٤ ـ Chrysanthemum chlorotic mottle Viroid الشحوب المتبرقش فى الاقحوان	أنواع من العائلة المركبة	CCMVd	١٩٧٥	Remaine & Horst
٥ ـ Cucumber pale Fruit الثمرة الباهتة فى الخيار	العائلة القرعيه والطماطم	CPFVd	١٩٧٤ ١٩٧٦	Van Dorst & Peters Sanger et al
٦ ـ Coconut cadang - cadang كادانغ ـ كادانغ فى جوز الهند	نخيل جوز الهند	CCCVd	١٩٧٥ ١٩٧٦	Randles Randles et al
٧ ـ Hop Stunt تقزم حيشية الدينار	العائلة الباذنجانية العائلة القرعية	HSVd	١٩٧٧	Sasaki & Shikata
٨ ـ Columnea erythrophae كولمينا الكامن	———	——	١٩٧٨	Owens et al
٩ ـ Avocado sun blotch ضربة الشمس فى الافوكادو	الافوكادو القرفة	ASBVd	١٩٧٩ ١٩٨٠	Thomas & Mohamed Mohamed & Thomas
١٠ ـ Tomato apical Stunt تقزم قمة الطماطم	معظم نباتات العائلة الباذنجانية	TASVd	١٩٨١	Walter
١١ ـ Tomato planta macho النبات الذكر فى الطماطم	الطماطم وبعض نباتات العائلة الباذنجانية	TPMVd	١٩٨٢	Galindo et at
١٢ ـ Burdock Stunt	الباردوك	BSVd	١٩٨٣	Chen et al

ملاحظة هامة :

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

٢ ـ 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.

obeikandl.com

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.

obeikandl.com