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 (١,١ × ١٠^٥) دالتون وذات تركيب فريد، يمكن عزلها من أنواع معينة من النباتات الراقية التى تعانى من أمراض معينة مميزة. الفيرويدات لم تكتشف ولم تعرَّف 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. وبالتالى فإن الفيرويدات هى عوامل مسببة للأمراض.

إن الفيرويدات غير مشابهة للأحماض النووية الفيروسية حيث أنها أحماض نووية غير مغلفة، وكذلك فهى غير مشابهة للفيرونات Virons حيث أنه لم يعزل أى فايرون من النسيج المصاب (الفايرون هو جزئ واحد من الفيرس)، وتختلف فى جميع صفاتها عن الفايرونات. 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 فى مفهوم الفيرويدات منذ تسميتها سنة ١٩٧١ بواسطة العالم Diener وذلك عندما وضع أسس جديدة لهذا العلم مبنية على صفات العامل المعدى المسئول عن مرض الدرنة المغزلية فى البطاطس. لقد وجد أن هذه الصفات تختلف أساسياً عن تلك الصفات التقليدية والمعروفة للفيروسات على الأقل فى خمسة إعتبارات هامة.

١ ـ يوجد الفيرويد فى الطبيعة على شكل حمض نووى RNA غير مغلف بكبسولة أو غطاء بروتينى .

٢ ـ لم يكتشف فايرون أو أجسام شبيهة بالفايرون فى النسيج المصاب بالفيرويدات.

٣ ـ الحمض النووى RNA فى الفيرويدات ذو وزن جزيئى منخفض.

٤ ـ بالرغم من صغر حجم الحمض النووى RNA المعدى إلا أنه ينسخ ويتضاعف تلقائياً بذاته فى الخلايا القابلة للاصابة، هذا يعنى أنه لا يتطلب فيرس مساعد (كان فى بداية الأبحاث يعتقد بضرورة وجود فيرس مساعد مع الفيرويد لكى يتكاثر).

٥ ـ يتكون الفيرويد من حمض نووى ذو تركيب أولى وثانوى وثالث وفى 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 التى تبحث فى الكيمياء الحيوية، البيولوجيا الجزيئية أو الكائنات الحية الدقيقة، فإنه يمكن أن يلاحظ فى هذه الكتب ما ملخصه أن الفيرويدات هى أصغر مسببات الأمراض تتكون من RNA وهى أصغر التركيبات ذات التضاعف (التناسخ) الذاتى وهى أقل المستويات فى التسلسل الهرمى فى الحياة.

تعتبر الفيرويدات من المسائل المثيرة والمريبة، ليس فقط من ناحية البيولوجيا الجزيئية ولكن أيضاً من ناحية علم الفيرس، علم أمراض النبات، الفيزياء الحيوية وفى علوم أخرى ذات صلة بها. إن الزيادة الواضحة فى معرفتنا عن الفيرويدات يمكن أن تلاحظ بزيادة الأبحاث التى تجرى عليها باستمرار.

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

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

تفاعلات خلية عائل الفيرويد Viriod - Host Cell Interactions

عندما تدخل الفيرويدات فى الخلايا القابلة للإصابة فإنها تتضاعف ذاتياً، هذا يعنى بدون الحاجة إلى فيرس مساعد. هذه القاعدة البيولوجية الحقيقية أثارت عدداً من الأسئلة مثيرة للاهتمام أهم هذه التساؤلات هى: ـ

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

٢ ـ باى ميكانيكية تحدث الفيرويدات 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 الفيرويدات فى الخلية Subcellular Location:

لقد أظهرت الإختبارات الحيوية للأجزاء تحت الخلوية من أوراق طماطم مصابة بفيرويد PSTVd أن أجزاء النواة فقط تحتوى على فيرويد يمكن تقديره. أما الكلوروبلاست، الميتوكندريا، الرايبوسومات والأجزاء الذائبة تحتوى على آثار فقط من الفيرويد. إن معظم كمية الفيرويد فى النبات تكون مرافقة للكروماتين ويمكن استخلاصها على شكل حمض نووى RNA حر بدون منظم فسفاتى. إن فيرويد اكسوكورتز الحمضيات CEVd يكون أيضاً بشكل أساسى فى مكونات النواة ملاصقاً تماماً للكروماتين أما بالنسبة لهذا الفيرويد عندما يصيب نبات **Gynura aurantiaca** فإن كمية لا بأس بها من الفيرويد 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، وبالتالى يبدو أن الفيرويد المعدى الداخل 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 الفيرويد تبقى فى النواة.

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

الحديثة التى بنيت على إختبارات الحيوية قد أثبتت أن الفيرويدات مرافقة بشكل أساسى مع الأنوية و / أو الأغشية النووية. وفى أبحاث أخرى فإن الأنوية عالية النقاوة والكلوروبلاست من نسيج ورقة طاطم قد استعمل فى الدراسة ومحتواها من PSTVd قد حدد كمياً بواسطة الاتجاه المزدوج من الهجرة الكهربائية فى الجيل، فقد وجد أن ٩٥٪ من RNA الفيرويدى فى الأنوية، لا يوجد تجانس فى التوزيع داخل النواة ولكنه مترافقاً مع أجزاء النوية. عند زيادة القوة الأيونية، هذا يؤدى إلى إنطلاق الفيرويدات. لقد استنتج من كل ما سبق أن الفيرويدات مترافقة مع النوية بواسطة بروتين حمض نووى. اعتماداً عى ما تقدم وجد أن متوسط عدد نسخ الفيروويد بين ٦٠٠ ـ ١٠٠٠٠ نسخة فى الخلية.

ترجمة الفيرويد Viriod Translation :

إن الفيرويدات ذات سلسلة طولها كاف لأن يشفر لعديد من الببتيدات حوالى ١٠٠٠٠ دالتون، مع أنه فى حالة PSTVd الدائرى فإن العدد الفردى للنيوكليتيدات والذى من ناحية نظرية يسمح بثلاثة دورات فى الترجمة بطريقة تتغير كل مرة.

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

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

وعرفت تتابعات النيوكليتيدات فى RNA المكمل للفيرويد فى النسيج المصلب وذلك بواسطة العالم Owens سنة ١٩٨٠. ولقد إقترح أن هذه السلسلة المكملة للفيرويد يمكن أن تعمل عمل RNA's. أما بالنسبة لفيرويد PSTVd فإن السلسلة المكملة له (cPSTVd) كما أنشأت حسب تتابع نيوكليتيدات الفيرويد 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 والتى نظرياً تؤدى إلى أربعة عديدات الببتين تحتوى ١٠٨، ٧٩، ٤٣ أو ٢٨ حمض أمينى. وسواء كان أم لم يكن RNA's المكمل للفيرويد يعمل عمل mRNA's (لا يعرف حتى الآن) إلا أنها إذا كانت تعمل فإن بروتينات خاصة فيرويدية غريبة يمكن أن تكتشف فى تحضيرات البروتين من نسيج العائل المصاب.

إن المقارنة بين أنواع البروتين فى الطماطم السليمة والمصابة بفيرويد PSTVd وفى نباتات **Gynura aurantiaca** سليمة ومصابة بفيرويد 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 بالفيرويد. كذلك فإن التحليل بالهجرة الكهربائية فى الجيل ذات الاتجاهين للبروتينات المصنعة فى كل من خلايا الطماطم المصابة أو غير المصابة بفيرويد PSTVd والمأخوذ من المزارع المعلقة أظهرت أنه لا يوجد تغيرات كمية ولا كيفية تنتج عن بقاء الفيرويد داخل الخلية.

علاوة على ذلك برغم أن طرقاً أكثر حساسية فى التحليل يمكن أن تكشف عن وجود عديد من بروتينات خاصة بالفيرويد فى الخلايا المصابة، إلا أنه فى ضوء المعلومات الحالية يجب أن نخرج بنتيجة أن الفيرويدات لا تعمل عمل mRNA's. وإذا كان كذلك فإن ترتيب نيوكليتيدات 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 الجزئ Molecular Structure

مقدمة :-

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

لقد تحدد ترتيب النيوكليتيدات كاملاً فى فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس وذلك بواسطة العالم Gross سنة ١٩٧٨ . واعتماداً على أساسيات هذا الترتيب بالإضافة إلى دراسات الدنميكا الحرارية Thermodynamic والنشاط الانتقالى لدرجات الحرارة المدنترة لهذا الفرويد، إقترح نموذجاً للتركيب الثانوى لفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس. واعتماداً على هذا النموذج فإن الفيرويدات توجد فى شكلها الطبيعى على هيئة تركيب يشبه العصوى ممتد يتميز بسلسلة من قطع ذات شكل حلزونى مع وجود عروات داخلية. وبالتالى فإن التركيب شبه العصوى الذى كان يفترض للفيرويدات الطبيعية يعتبر الآن غير صحيح ومبنياً على النقص ويفضل عليه التركيب شبه العصوى ذو العروات الداخلية وأطراف شبه دائرية مع تركيب دبوس الشعر.

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

بين هذه النيوكليتيدات المتتابعة هناك ٦٩ ٪ منها موجود فى فيرويد PSTVd وبالتالى فإن كلا الفيرويدين يمكن أن يشكلا 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 نيوكليتيدات تتواجد فى مواقع مختلفة من الجزئ وهى AA إلى U فى الموقع ١٢٠ ـ 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 والتى ذكرت أن الفيرويدات تتكون من أنظمة ورائية صفاتها مشفرة فى ترتيب النيوكليتيدات فىRNAs. وبالتالى فإن ترتيب النيوكليتيدات فى النوع المفرد من الفيرويدات يختلف بشكل واضح عن بعضها البعض، بينما ترتيب سلالات النوع الواحد يختلف إختلافاً بسيطاً فقـط. ومن المهم أن نذكـر أن الاختلافـات البسيطة فى ترتيـب السلالاتين المعتدلة والشديدة فى فيرويد PSTVd لم يكن يتوقع أن يكون لها مثل هـذه النتيجة البيولوجية العميقة.

١ ـ التركيب الأولى والثانوى Primary and Secondary Sturcture

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

هناك طريقة واحدة يبدو أنها تبشر بنجاح الحصول على تفصيل متقن للترتيب الكامل للنيوكليتيدات فى الفيرويد:

فى المعمل فإن تعليم `5 لأجزاء الفيرويد التى حصل عليها بواسطة الهضم الكلى أو الجزئى باستعمال أنزيم رايبونيوكلييز النوعى مع-5`- polynucleotide Ki nase و $(\gamma - p)^{32}$ATP . 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 والتى أصبحت نموذجية لجميع الفيرويدات. أما النيوكليتيدات المتحورة نوعا 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.

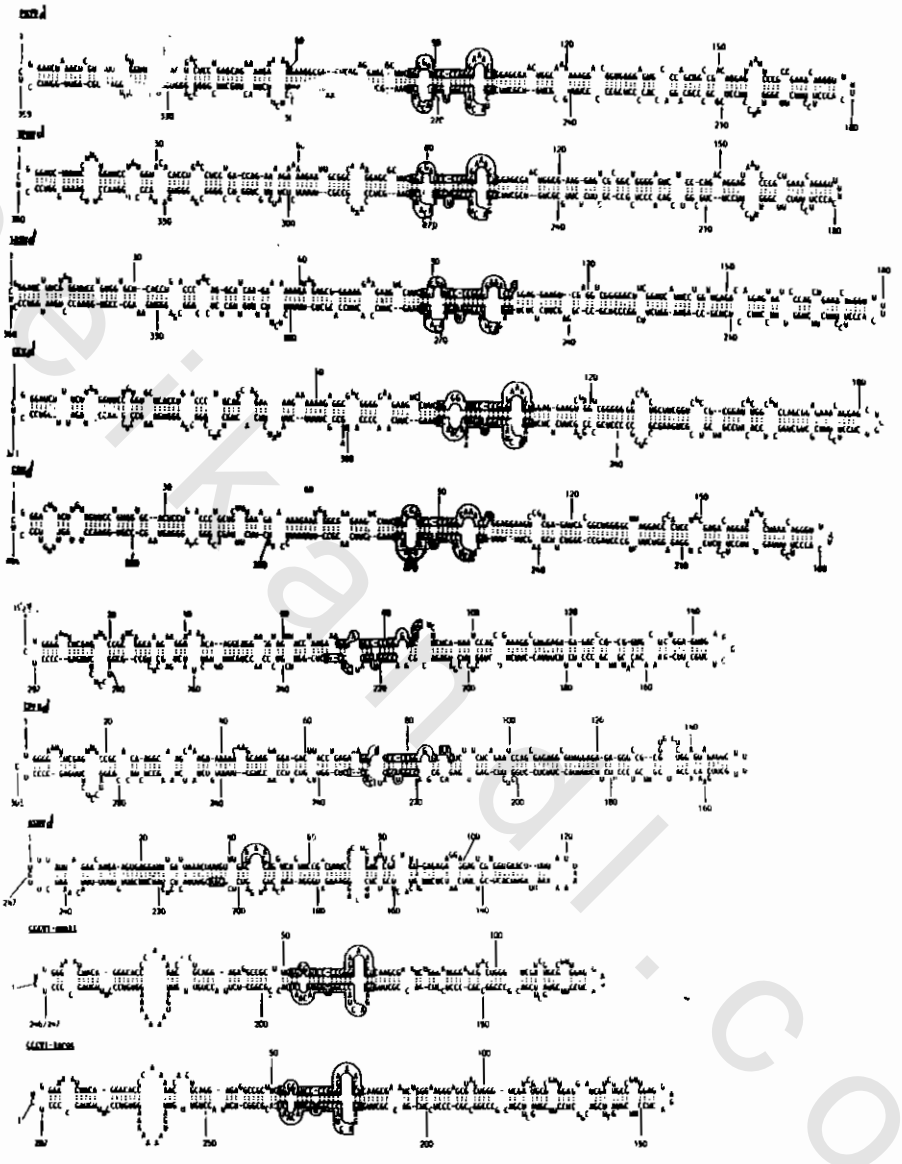
وأخيراً فإن نظام التتابع الثانوى قد استعمل بنجاح فى كل من:ـ

١ ـ نسخ الفيرويد المستقيم إلى cDNA.

٢ ـ الكلونة Cloning.

٣ ـ 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 المكلـون للفيرويد

obeikandl.com

شكل رقم ٢ :

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

الواحد يسمح بتوطيد وتثبيت التتابع الفردى للمتنوعات حتى فى تلك الحالات حيث أن عدم التجانس لا يعرف بواسطة التتابع المباشر للحمض RNA.

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

١ ـ مجموعة PSTVd والتى تضم PSTVd، TPMVd، TASVd، CEVd، CSVd، وإلى حد ما تضم HSVd و CPFVd.

٢ ـ مجموعة ASBVd.

٣ ـ مجموعة CCCVd. إلا أن هذا سيوضح بالتفصيل فى دراسة التصنيف فيما بعد.

فى جدول رقم ٢ هناك بعض المعلومات الكمية عن التتابع والتركيب الثانوى للفيرويد. إن أفراد مجموعة PSTVd تتميز بالتتابع المتماثل (المتناظر) لحوالى ٦٠ ـ ٧٠ ٪ أو أكثر من حيث نيوكليتيداتها A:U, G:C، وبالتالى فإن نسبة البيورين إلى البيرميدين تكون واحدة تقريباً وهناك حوالى الضعف من ازواج القواعد G:C بالنسبة إلى A:U. إن بين ٤ ـ ١٦ ٪ من ازواج القواعد تكون ازواج G:U. بالقرب من منتصف التركيب الثانوى هناك يوجد منطقة تتابعها متناظر جداً تظهر كمنطقة معلبة فى شكل٢. هناك خيط ممتد طويل من ال polypurine موجود بالقرب من هذه المنطقة المركزية المحفوظة وإن تماثل التتابل 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 الفيرويدات يمكن تقسيمه إلى جزء يسارى والذى يحتاج تتابعات محفوظة مع بعضها البعض إلى حد ما بتركيب لولبى بسبب إنخفاض الثبات الديناميكى، والنصف اليمينى، والذى يكون فيه الثبات أكثر أهمية من تتابع النيوكليتيدات.

بالنسبة لإثنين من الفيرويدات فى مجموعة PSTVd، فإن الفيرويد PSTVd نفسه والفيرويد CEVd هما عزلات مختلفة (طفرات) معروفة بأنها تختلف بواسطة تتابعها وجزئياً بشدة الإصابة مثل التعبير بالأعراض. أما ASBVd، CCCVd فهى تختلف عن بعضها البعض بمقدار ما تختلف عن فيرويدات مجموعة PSTVd. فمثلاً ASBVd، CCCVd لا تحتوى على تتابع polypurin. فى CCCVd يوجد منطقة محفوظة مركزية، بينما فى ASBVd يوجد فقط تعاقب مشترك من GAAAC. كذلك فإن هذه ال GAAAC موجودة فى الفيروسايدات فى المنطقة المركزية فى التركيب الثانوى. كذلك فإن ASBVd يظهر أقل تناظراً مع الفيرويدات الأخرى.

بالإضافة إلى أن CCCVd يختلف عن جميع الفيرويدات بسبب أن هناك أربعة تنوعات من CCCVd ذات أطوال مختلفة تكون مترافقة مع مرض كادانج ـ كادانج فى جوز الهند فهى تسمى:

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

٢ ـ CCCVd 1 - Large فيه ٢٨٧ نيوكليتيدة.

٣ ـ CCCVd 2 - Large فيه ٥٧٤ نيوكليتيدة.

يختلف CCCVd نوع 1 - Large عن نوع 1 - Small عن نوع فى تضاعف ٤١ نيوكليتيدة فى النهاية اليمنى فى التركيب الثانوى وهذا سبب ظهور العزلةBaao 54. إن حجم المنطقة المضاعفة يختلف بين ٤١ ـ ٥٥ بين العزلات المختلفة من CCCV.

جدول ٢ : التركيب الأولى والثانوى للفيرويدات.

الفيرويد	النيوكليوتيدات					التتابع المتماثل χ		أعداد النيوكليوتيدات المتغيرة بين الحلزات			ازواج القواعد				
	المجموع	A	U	G	C	مع PSTVd	بين الحلزات	مستبدلة	مقحمة	مزالة	درجة %	العدد الكلى	G:U %	G:C %	A:U %
PSTVd	٣٥٩	٧٣	٧٧	١٠١	١٠٨	١٠٠	١٠٠	-.	–	–	٧٠	١٢٦	١٣	٥٨	٢٩
PSTVd عزلةمعتدلة	٣٥٩	٧٠	٨٠	١٠١	١٠٨	–	٩٩	٢	١	١	٧١	١٢٨	١٣	٥٧	٣٠
PSTVd عزلة شديده	٣٥٩	٧٤	٧٧	١٠٠	١٠٨	–	–	٤	٠	٠	٦٩	١٢٤	١٢	٥٨	٣٠
TPMVd	٣٦٠	٧٢	٨١	٩٩	١٠٨	٨٣	٩٩	–	–	–	٦٨	١٢٢	٩	٦٠	٣١
TASVd	٣٦٠	٧٠	٩٠	١٠١	٩٩	٧٣	–	–	–	–	٧٣	١٣١	١١	٥٧	٣٢
A-CEVd	٣٧١	٧٢	٧٥	١١٢	١١٢	٧٣	١٠٠	–	–	–	٦٩	١٢٨	١٦	٥٦	٢٨
C-CEVd	٣٧١	٧٣	٧٦	١١٠	١١٢	–	٩٩	٤	٠	٠	٦٩	١٢٨	١٦	٥٦	٢٨
AM-CEVd	٣٧١	٧٢	٧٦	١١٠	١١٣	–	٩٩	٤	٠	٠	٦٧	١٢٥	١٦	٥٦	٢٨
DE 25-CEVd	٣٧١	٧١	٧٦	١١٢	١١٢	–	٩٩	٤	٠	٠	٦٩	١٢٨	١٦	٥٦	٢٨
DE 26-CEVd	٣٧١	٦٩	٨٠	١١٢	١١٠	–	٩٣	١٥	٦	٦	٦٨	١٢٦	١٤	٥٨	٢٨
E-CSVd	٣٥٤	٧٤	٩٣	٩٠	٩٧	٧٣	١٠٠	–	–	–	٦٩	١٢٢	١٠	٥٦	٣٤
A-CSvd	٣٥٦	٧٥	٩٣	٨٩	٩٩	٦٩	٩٧	٦	٤	٢	٧٠	١٢٤	١٣	٥٢	٣٥
HSVd	٢٩٧	٦١	٦٩	٧٩	٨٨	٥٥	١٠٠	–	–	–	٦٧	١٠٠	٧	٦٤	٢٩
CPFVd	٣٠٣	٦٤	٧٠	٨١	٨٨	٥٥	٩٧	٨	٧	١	٦٩	١٠٥	٤	٦٥	٣١
ASBVd	٢٤٧	٦٨	٨٥	٥١	٤٣	١٨	–	–	–	–	٦٧	٨٣	١٤	٣٤	٥١
صغير CCCVd - 1	٢٤٦ ٢٤٧	٥٣	٤٧	٧٣	٧٣ ٧٤	١١	١٠٠	–	–	–	٦٥	٨٠	٨	٦٩	٢٤
كبير Baao 54	٢٨٧	٥٩	٥٨	٨٦	٨٤	–	١٠٠	٠	٤١	٠	٦٤	٩٢	٨	٦٧	٢٥
Ligao 14 B	٢٩٦	٥٩	٥٩	٩١	٨٧	–	١٠٠	٠	٥٠	٠	٦٥	٩٦	٨	٦٨	٢٤
Ligao T1	٣٠١	٦٠	٥٩	٩٣	٨٩	–	١٠٠	٠	٥٥	٠	٦٤	٩٧	٨	٦٨	٢٤
San Nascisco	٢٩٧	٥٩	٥٩	٩١	٨٨	–	١٠٠	٠	٥١	٠	٦٥	٩٦	٨	٦٨	٢٤

ملاحظات:

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

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

٣ ـ جميع عزلات CCCVd1 الكبير تختلف عن عزلة الصغير وذلك بتضاعف التتابع على النهاية اليمنى فى التركيـب الثانوى وبالتالـى يكون تناظر التتابع ١٠٠٪. إن المنطقـة المتضاعفة قد ذكرت تحت بند المقحمة. أما عـزلة Baao 54، Ligoa 14B، Ligao T1 قد إشتقـت من CCCVd1 الصغير مع ٢٤٦ نيوكليتيدة. أما Aan Nascisco هو مشتـق من CCCVd1 الصغـير ٢٤٧ نيوكليتيدة.

٢ ـ التركيب الثانوى Secondary Structure :

كما ذكر سابقاً فإن التركيب الثانوى للفيرويدات قد استنتج من نتائج التجارب بالإضافة إلى الحسابات النظرية. إن التجـارب باستعمـال المواد الكيماوية المحورة مثل: ـ

١ ـ Dye binding.

٢ ـ Oligonucleotide binding.

٣ ـ 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 الجزئ 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 للفيرويدات.

إن الأصل النظرى للتركيب الثانوى قام وفقاً لثلاثة مستويات:

الأول: ـ الشكل العصوى المتطاول للجزئ وهذا كان قد أخذ من نتائج التجارب وبواسطة النظام التجريبى والخطأ، فإن مخططات القاعدة المزدوجة جعلته أقرب مايكون إلى أعلى رقم من القواعد المزدوجة، ٦٩ مثلاً.

الثانى: ـ المستوى العال من التنقية. إن الأبحاث الثيرموديناميكية أثبتت وجود التركيب الثانوى للفيرويد.

الثالث: ـ إن نظام العد العشرى 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 وتحوراً لحساب الخيوط الدائرية والقيم الأحدث لازواج القواعد الثابتة والعروات.

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 وبالتالى حتى التقديرات التقريبية تؤدى إلى التركيب الصحيح. جدول رقم ٣.

جدول رقم ٣ : القياسات الثيرموديناميكية للتركيب المقطعى للفيرويدات، الفيروسايدات وتتابعات عشوائية

	Δ G/N (KJ/mel)	Tm [c]	$\Delta T1_{/2}$ [c]	Mechanism
Viroids				
PSTVd	1.67	51	0.9	Formation of stable
CEVd	1.62	51	1.0	hairpins
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	___
VTMoV2	1.32	38	2.0	___
Randum sequences	1.27 ∓ 0.1	36 ± 5	> 5	___

ملاحظات:

فى التتابع العشوائى عدد النيوكليتيدات ومحتويات من A، U، C، G مأخوذة من PSTVd. التتابع العشوائى متوسط لخمسة مكررات. Tm و ΔT12 قيمها تشير إلى قوة أيونية ٠,٠١١ Na^+، رقم حموضة ٦,٨.

٣ ـ التركيب المقطعى Structural Transitions :

إن التراكيب المقطعية للفيرويدات قد درست بعدة طرق منها: ـ

أ ـ منحنيات الدنترة بالحرارة.

ب ـ طرق قياس الحرارة الدقيقة.

جـ ـ الطرق الديناميكية.

د ـ طرق الارتفاعات المفاجأة لدرجات الحرارة.

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

إن طريقة اعادة الترتيب لشكل الفيرويد من التركيب المتطاول 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 يترواح ما بين الشكل المتطاول 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 الفيرويدات PSTVd، CEVd، CSVd.

Viroids	-Hairpins- I	II	III
PSTVd	79 87 CGCUUCAGG 14 GCGAGGUCC 110 102	227 236 CCCUCGCCCC 82 GGGAGCGGGG 328 319	127 135 CGGUGGGGA 28 GCCGCCCUU 168 160
CEVd	(possible but not studied)	239 251 CCCUCGCCCGGAG 79 GGGAGCGGGCCUC 339 327	not possible
CSVd	(possible but not studied)	223 233 CCCUAGCCCGG 76 GGGAUCGGGCC 322 312	not possible
CCCVd-large	46 54 CGCUUGAGG 14 GCGAACUCC 77 69	not possible	not possible

شكل رقم ٣ :

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

الوزن الجزيئى والشكل Molecular Weight and shape :

إن الأوزان الجزيئية قد حددت أصلاً من ١ ـ الهجرة الكهربائية فى الجيل. ٢ ـ Sucrose gradient ٣ ـ Electron micrographs. إن اولى الأوزان الجزيئية الدقيقة (الصحيحة) قد حصل عليها باستعمال الة الطرد عن المركز فائقة السرعة ثم بعد ذلك يتم إجراء توازن على الترسيبات 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 جزيئى ٣٣٣ لكل نيوكليتيدة تشمل Bound cations.

أما بالنسبة للشكل، فتظهر الفيرويدات فى الصور المأخوذة بواسطة Elctron micrographs على شكل تركيب عصوى إذا ما حضرت تحت ظروف طبيعية (١,. مول كلوريد صوديوم و pH 7). هذه النتيجة معروفة بالنسبة لكثير من الفيرويدات مثل PSTVd، CPFVd، CCCVd، CSVdو HCVd. كذلك أيضاً من دراسات سرعة الترسيب على فيرويد PSTVd والاشكال الأربعة لفيرويد CCCVd، أمكن الاستنتاج بأن الفيرويدات تمتلك تركيب شبه عصوى فى المحلول، زيادة على ذلك فإنها تأخذ فى المحلول بعض المرونة التى تجعل شكلها شبه دائرى والتى يمكن تمييزها أيضاً بوجود مسافة قصيرة تتكرر فى الفيرويد، هذا الطول المتكرر يكون تقريباً نصف قطر الدائرة التى يمكن أن ينحنى إليه البوليمر، هذا الطول يساوى ٣٠٠ أنجستروم. وعند اجراء مقارنة بين هذا الطول والطول المتكرر فى حمض DNA ثنائى 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 فى الأشكال المضاعفة من CCCVd والتى تسمى RNA2 فإنها تتخذ فى المحلول الشكل المتطاول. العالم Haseloff et al سنة ١٩٨٢ استنتج بدراسته على أساس

التتابع فى النيوكليتيدات أن الفيرويدات تأخذ الشكل المتطاول بالإضافة إلى الشكل الصليبى.

يمكن القول بأن الفيرويد يأخذ الشكل المتطاول 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 جزيئات 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 جزيئات الفيرويد غير المدنترة كثير من أزواج القواعد الداخلية بحيث تكون هذه الأزواج مرتبطة لتعطى تركيب شبه عصوى بطول ٥٠ نانوميتر، أما عند دنترة هذه الجزيئات فإنها تعطى دوائر احادية الشريط يكون طول ميحطها ١٠٠ نانوميتر. أما الوزن الجزيئى يساوى (٨٠ ـ ١٢٢) × ١٠^{٣} أما S_2ow = ٨ ـ ١٠ أما Tm فى ١٠ ملى مول أيون صوديوم = ٥٠°م. أما الكثافة فى كبريتات السيزيوم تساوى تقريباً ١,٦ غم / سم^{٣}.

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

obeikandl.com

(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 مكملة للحمض DNA للفيرويد الكامل. هذه التتابعات للحمض DNA يمكن أن تكون موجودة مسبقاً ـ بشكل مثبط ـ 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 الداخل 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) وبالتالى لا يثبط تضاعف الفيرويد CPFVd. وعلى النقيـض من الدراسات التى أجريت باستعمال Actinomycin - D والتى 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 لفيرس 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 الداخل فى

تضاعف الفيرويد وهذا يكون أكثر وضوحاً بالتجارب التى يستعمل فيها ∝- aman-itine، هذه النتائج التى لم توافق تلك المتحصل عليها باستعمال Actinomycin - D فقط ولكن بالإضافة إلى استعمال أنزيم نوعى والذى 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 Mn^{2+}، Mg^{2+}، $(NH_4)_2SO_4$ مستوى خط بناء CEVd حتى على تركيز عال من ∝ - amanitine ١٠-٨ ـ ١٠-٦ 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+} والتى 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 10^{7} 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

obeikandl.com

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

إن الحقيقة التى تقول بأن الفيرويدات 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 الفيرويدات تكون أخطاء فى الخلية لقطع من ال DNA. هذا يمكن أن يعكس التركيب الاستثنائى والصفات الديناميكية للفيرويدات والتى قد وصفت سابقاً بأنها شبيهة بـ DNA.

فى المعمل فإن النسخ للحمض RNA للفيرويد 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 الفيروسى للنبات. لايكون تناسخ الفيرويد فى المعمل مثبطاً بواسطة amanitine - ∝. وبالتالى فإن هذه النتائج سوف لا تشرح الحساسية فى الطبيعة لمادة amanitine - ∝ لنباء الفيرويد الملاحظة فى البروتوبلاست.

الانزيمات الداخلة فى تضاعف الفيرويد 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 طبيعيا 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 الفيرويدات تنسخ بكفاءة عالية بواسطة أى أنزيم. إن التحليل بواسطة الهجرة الكهربائية فى الجيل تحت ظروف الدنترة فى منتجات النسخ فى المعمل مع فيرويدات منقاة تستعمل كقوالب كشفت بالإضافة إلى عديد من الجزيئات المكملة للفيرويدات الصغيرة.

باعتبار كل النتائج السابقة نستنتج أن الفيرويدات تتضاعف بطريقة غريبة والتى فيها تكون جزيئات RNA المعدى منسوخة كلية بواسطة أنزيم العائل الموجود سابقاً، وبالتالى 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 حائاً على التأمل بأن التركيب الطبيعى للفيرويدات يكون عبارة عن تركيب يشبه DNA ثنائى الشريط والذى يسمح للأنزيمات أن تقوم بعملها بشكل جيد نسبياً بهذه الكفاءة. لقد تبين أن الفيرويدات يمكنها بسهولة أن تشكل معقدات ثنائية مع RNA polymerase II والتى تشترك (تتنافس) مع DNA لعمل قالب لمواقع الربط على الأنزيم، وبالتالى فإنها تثبط وبشدة بناء RNA من DNA الموجه. من هذه الناحية فإن جزيئات الفيرويد المعدية تجند وتجبر RNA polymerase II الموجود فى النواة لتكاثرها الخاص. بالتالى 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 رقمI أو III المعتمد على DNA النقى، وبالتالى لا يمكن اعتبارها داخلة فى تضاعف الفيرويد. إن موقع الفيرويدات الناضجة فى النوية سوف تظهر لصالح polymerase I الذى عادة يجرى تناسخ RNA الرايبوسومى فى النوية. إن تماثل التتابع بين تتابع محفز DNA من كائن حى آخر مع التتابعات على النهاية اليمنى فى التركيب الثانوى للفيرويد PSTVd، CSVd أو CEVd قد وجد بواسطة كثير من الباحثين. ومن ناحية أخرى فإن موقع الفيرويدات الناضجة فى النوية لا يستثنى بناؤها بواسطة الأنزيم polymerase II والذى يعرف بأنه موجود فى البلازما النووية أو مترافقاً مع الكروماتين. هذا يمكن أن يكون متوقعاً من المقارنة مع الحمض النووى الصغير U_3 والذى على الأقل فى الخلايا الحيوانية ينسخ بواسطة polymerase II من الكروماتين وبعد ذلك يصبح مترافقاً مع النوية.

المنقبات Probes :

هناك طريقة أخرى لدراسة تناسخ الفيرويد تكمن فى تطوير المنقبات أو جزيئات من المنقبات الخاصة بالفيرويد وتعريف تتابع القواعد فى DNA أو RNA المتعلق بالفيرويد قياساً على الحمض النووى المستخلص من النباتات وذلك بواسطة التهجين الجزيئى.

لقد استعملت ثلاثة أنواع من المنقبات هى:ـ

١ ـ فيرويدات نقية معلمة فى المعمل باليود المشع ١٢٥.

٢ ـ خيط مفرد (محضر فى المعمل) من DNA تكميلى للفيرويد (cDNA).

٣ ـ خيط مزدوج من الفيرويد ومكمله من ال DNA يحصل عليه بطرق فنية معينة.

فى البداية يمكن القول بأن استعمال الفيرويدات المعملة باليود المشع ١٢٥ كمنقبات فى تجارب التهجين أدى إلى نتائج متضاربة. على أساس مثل هذه التجارب فإن مجموعتين من الأبحاث قد ذكرتا وجود تعاقب مكمل للفيرويد فى DNA الفيرويد المعدى وحتى فى نباتات العائل غير المصابة، لكن الأبحاث اللاحقة أثبتت بوضوح خطأ النتائج السابقة. وبالمثل فإنه فى تجارب التهجين الجزيئى بين cDNA المعلم بالفسفور المشع ٣٢ وفيرويد تقزم الاقحوان CSVd فإن أل Genomes سواء فى العوائل السليمة أو المصابة بفيرويد CSVd لم يلاحظ فيها تطابق فى ترتيب وتعاقب النيوكليتيدات.

وعلى أية حال فإن أى من هذه التجارب لم تستبعد إمكانية أن التتابعات المتعلقة بالفيرويد قد تكون موجودة عشوائياً على كروموزومات العائل أو أن ال DNA للعائل يحتوى على مجموعة صغيرة فقط من جينوم PSTVd. وفى هذه الحالة الأخيرة فإنه من الممكن تصور أن هناك ترتيب قصير من قواعد ال DNA المكملة للفيرويد قد تقوم بعملها كمواقع تمييز وقد تتدخل فى 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 الداخل هو الذى يعمل كقالب لبناء ذرية جديدة من الفيرويد وليس DNA الخاص بالعائل.

المركبات الوسيطية 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 المكملة 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 وسيطية 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 بمنقب فيرويد معلم بيود مشع ١٢٥. كما أن بعض الأحماض النووية RNAs المكملة 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 المكملة للفيرويد، إلا أن الباحث Grill سنة ١٩٨٠ لم يوافق على مثل هذه التصنيفات.

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

إن الدليل المقنع لوجود جزيئات كاملة الطول من RNA مكملة للفيرويد 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 للفيرويد. إن هذا المنقب قد تم بناؤه عن طريق تخضين polyadenylated PSTVd مع أنزيم النسخ العكسى ويتبع ذلك ازالة قالب الفيرويد بالتسخين. كانت النتائج بأن الشريط المفرد من DNA (الذى هو cDNA تكميلى لفيرويد PSTVd) قد إنقلب إلى cDNA ثنائى الخيط مقاوم لأنزيم S1 nuclease فى تفاعل استعمل فيه أنزيم DNA polymerase 1 للبكتيريا E. coli. إن cDNA الثنائى الشريط المكمل للفيرويد PSTVd بعدئذ قد غرس فى pst I فى مواقع أنزيمات القطع الداخلية للبلازمد PBR 322 عن طريق استعمال اجراءات تعاقبات Oligo (dc) وOligo (dG). إن المقاومة للتتراسيكلين، تحول الحساسية للبنسلين، تحتوى على تتابعات مكملة لـ cDNA الفيرويدى PSTVd المعلم بالفسفور المشع ٣٢ وكلون واحد أعيد تركيبه (pDc - 29) يحتوى ٤٦٠ زوج من القواعد المغروسة فيه. إن هذا الحمض ثنائى الخيط PSTVd cDNA يحتوى مواقع للتقسيم لستة مواقع محددة لانزيمات القطع الداخلى مؤكدة بالتتابع المذكور سابقاً للفيرويد PSTVd. إن نتائج هذه التجارب وغيرها تدل على أن كل التعاقب الكامل للفيرويد PSTVd قد حصل لها كلونة.

إن تجارب التهجين بواسطة بعض المنقبات أثبتت وجود جزيئات RNA فى مستخلصات من خلايا مصابة لها نفس قابلية التحرك (ووزن جزيئى محتمل) كما فى فيرويد PSTVd المستقيم ولكن ذو قطبيه عكسية. إن جزيئات RNA المكملة للفيرويد PSTVd التى لها نفس هذا الحجم قد وجدت بعد معاملة مستخلصات الحمض النووى بأنزيم RNase، دنترة الأحماض النووية RNAs باستعمال الحرارة لمدة دقيقتين على درجة حرارة ١٠٠م فى ٥٠٪ Formamide ثم تبرد وبعد ذلك تحلل بالهجرة الكهربائية بالجيل على درجة ٥٥°م فى وجود ٨ مول يوريا. إلا أن العالم Branch ومرافقوه سنة ١٩٨١ قد ذكروا نتائج تخالف هذه النتائج حيث استعملا أحماض نووية RNAs مدنترة قبل التحليل وإن التحليل بواسطة الجيل كان يفضل تحت ظروف يعرف أنها تمنع اعادة التقوية الكبيرة للحمض RNA.

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

ولقد أورد بعض الباحثين عدة براهين تثبت أن الخلايا المصابة بالفيرويد تحتوى بالإضافة إلى خيط مكمل للفيرويد كامل الطول تحتوى على جزيئات خاصة بالفيرويد أطول من وحدة الفيرويد الواحدة. إن أول إقتراح يدل على أن مثل هذه الأحماض النووية RNAs القريبة من الفيرويد يمكن أن توجد فى الخلية حصل عليه بواسطة إختبارات Blot hybridization مع مستخلصات حمض نووى من النباتات المصابة بالفيرويد PSTVd، والتى فيها نوعين من RNA يحتويان على

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

إن جزيئات RNA الخاصة بالفيرويد PSTVd تكون ذات حركة أثناء الهجرة الكهربائية أكثر بطئاً من جزيئات الفيرويد PSTVd الدائرية والمستقيمة، هذا ما لوحظ فى بعض الدراسات والتى فيها استعمل مستخلص حمض نووى من نباتات مصابة بالفيرويد PSTVd والتى استعمل فيها الهجرة الكهربائية على الجيل والتى فيها كانت الجزيئات الخاصة بالفيرويد قد عرفت بواسطة طريقة التهجين Northern bolt التى 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 فى الهجرة الكهربائية أكثر بطئاً من الفيرويد PSTVd الدائرى والآخر تحرك تقريباً بنفس سرعة PSTVd الخيطى، إلا أن هذه التجارب قد إنتقدها Hadidi سنة ١٩٨١ وأثبت عدم دقتها.

إن البرهان المقنع على وجود جزيئات من cPSTVd ذات طول أطول من وحدة الطول قد حصل عليه فى دراسة مشابهة لطريقة Blot hybridization والتى فيها إستعمل نظامين من الدنترة الكاملة فى الجيل. لقد ظهرت وعرفت أربعة حزم متميزة من جزيئات cPSTVd . وباستعمال حسابات معينة تبين أن هذه الحزم تحتوى أطوال ٧٠٠، ١٠٥٠، ١٥٠٠ و١٨٠٠ نيوكليتيدة وهذا أدى إلى القول بأنها تمثل مرادفات للفيرويد PSTVd والتى تحتوى ٧١٨ قاعدة (ثنائى)، ١٠٧٧ قاعدة (ثلاثى)، ١٤٣٦ قاعدة رباعى، ١٧٩٥ قاعدة خماسى. لم يمكن التعرف على حزم لوحدة الطول من cPSTVd، قد يكون هذا بسبب التداخل فى التهجين بكميات كبيرة من PSTVd غير المعلمة الموجودة فى RNA من النباتات المصابة متحركة إلى نفس الموقع فى الجيل كما فى cPSTVd الاحادى. إن الدراسات الأنزيمية دلت على أن حزم cPSTVd تتكون على وجه الحصر من RNA موجود فى معقدات محتوية على مناطق ذات خيط مضاعف. وبسبب التعريف الجيد للحزمة من cPSTVd فقد تبين أن حوالى ٤٠ نيوكليتيدة تكون زيادة فى طول

الوحدة الواحدة من PSTVd أمكن ملاحظتها بعد المعاملة بأنزيم RNase T_1، كذلك فلقد إقترح الباحث أن هناك كمية قليلة من RNA الداخلة فى 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 T_1.

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

هناك أبحاثاً أخرى وهى أيضاً مبنية على الفصل بالتفريد الكهربائى فى الجيل للأحماض النووية RNAs تكون متبوعة بعملية Blot hybridization أثبتت أن التركيب الجزيئى للجزيئات الخاصة بالفيرويد كانت أكثر وضوحاً وإن بعض الأدلة قد أثبتت أن هذه التركيبات هى فعلاً قد تمثل مركبات وسيطية فى تناسخ الفيرويد.

بالاتفاق مع الأبحاث السابقة فإن تجارب Blot hybridization المستعملة منقبات DNA أعيد تركيبها أظهرت أن معظم مكونات الفيرويد هى RNA ثنائى الخيط (وذلك باستعمال مستخلصات RNA من نسيج مصاب) والتى تهاجر فى الجيل أكثر بطئاً من الوحدة الكاملة من PSTVd. إن أكثر الأحماض النوويةRNAs شهرة والتى هى أكثر بطئاً فى الهجرة هما حمضان قد فصل كل منهما عن الآخر بواسطة الكروماتوغرافى السليلوزية والهجرة الكهربائية فى الجيل، وإن

التركيب والحجم والشكل ومكونات PSTVd و cPSTVd لكل منهما قد تحللت فى 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 وخيطية 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:ـ

١ ـ تنسخ الفيرويدات عن RNA تكميلى complementary وليس عن قوالب DNA.

٢ ـ هذه القوالب (RNA تكميلى) 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 ـ ينسخ الحمض النووى RNA المكمل للفيرويد من جزئ فيرويد دائرى بواسطة ميكانيكية اللف الدائرى والتى تؤدى إلى تكوين قوالبMultimeric 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 تحتوى كميات يمكن التعرف عليها من DNA خاص بالفيرويد. عندما إختبر RNA الموجود فى الخلية للتتابع الخاص بالفيرويد فإن RNA المكمل للفيرويد وجد للفيرويدات CEVd، PSTVd وفى ASBVd. إن الأنسجة المصابة بالفيرويد PSTVd تحتوى RNA تكميلى للفيرويد الكامل. ولقد ثبت نهائياً أن RNA فقط هو الوسيط الداخل فى تناسخ الفيرويد، ولزيادة الوصف للحمض RNA الخاص بالفيرويد فإن التهجين بالمنقبات الخاصة بتتابع الشريط (−) أو الشريط (+) قد إستعمل. إن المنقبات الخاصة بالأشرطة السالبة كانت فيرويدات معلمة باليود المشع ١٢٥، أما الشريط الموجب دى اوكسى نيوكليوتايدز، M13 mp 93 ملونة تحتوى تتابع الشريط الموجب. لقد إختبر تتابع الشريط الموجب بشريط دى اوكسى نيوكليوتايد سالب cDNA، معلم بفسفور مشع ٣٢ أو كلونات M13 mp 99 تحتوى تتابع شريط سالب.

إن التحليل بطريقة Northern Blotting للشريط السالب ذو التتابع الفيرويدى أظهر أن الشرائط السالبة من نوع كثير الوحدات (multimers) باثنين إلى خمسة أضعاف طول وحدة الفيرويد، ولقد أمكن التعرف على تتابع أطول من طول وحدة الطول فى فيرويد 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 للفيرويدات. فى النسيج المصاب بالفيرويد PSTVd هناك مستوى قليل من ال dimers و trimers وفى النسيج المصاب بالفيرويد 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 فىRNA2 فى الكادانج ـ كادانج.

إنشطار بوادئ الغيرويد قليلة الازواج والتحليق فى الفيرويدات

Splitting of Oligomer Viroid Precursors and Circularization of Viroids

إن التركيب الدائرى للفيرويدات يمنحها فائدة القدرة الهائلة على الانتقاء أو الاختيار، نظراً لأن أنزيم ال polymerase حالما يترافق مع RNA يكون عنده القدرة لانتاج نسخاً عديدة الازواج طويلة والتى عندئذ يمكن أن تنشطر إلى نسخ وحيدة (هذا يعنى إلى جزيئات تكون ذات طول يساوى طول وحدة واحدة). إن الوحدات المستقيمة، على الأقل الشرائط الموجبة يجب أن تتحلق لتشكل فيرويدات ناضجة.

ليس من الواضح تماماً بأى 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، وبالتالى فإن أنزيم Ribonuclease يمكن أن يحرر هذه الوحدات. أما فى مجال الدراسات التى أجريت على تحكيم الفيرويدات، فإن هناك نوعان من الجزيئات المستقيمة قد عرفت فى تحضيرات الفيرويد PSTVd الدائرى والتى تختلف بوجود فتحة بين C_{181} و C_{182} وبين C_{348} و A_{349} 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 المتطاول. فى هذا التسلسل فإن الفتحة موجودة بين C_{181} و C_{182} يمكن أن تكون الواصلة بين التركيبات المتطاولة. إن تجاور كل من C - A قد عرف أيضاً فى RNAs كنقط ضعيفة بشكل خاص، وذكر أيضاً فى بادئ RNA من البكتروفاج T_4 إنشطار ذاتى على هذه المنطقة. بجانب أنزيم Ribonuclease فإن

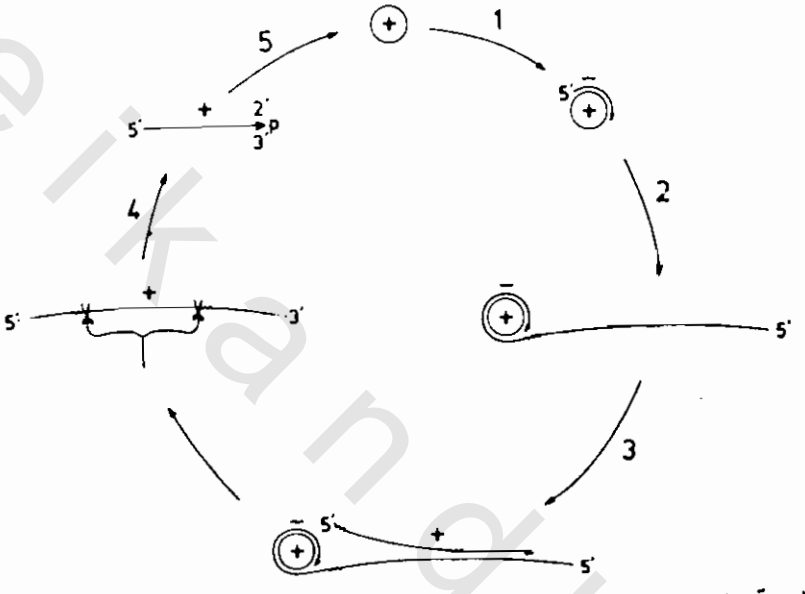
الهضم والتقطيع (الانشطار) الذاتى يتم حتى إتحاد القطع الذاتية وتوصيلها (هذا يعنى وصل ذاتى للقطعة ليشكل وحدات دائرية مباشرة كما هو واضح فى- Pre) rRNA Tetrahymena). ومن ناحية أخرى فإذا كان الانشطار والوصل هى تفاعلات منفصلة فيجب أن يتعرف على أنزيم فى النبات والذى يربط-2`, 3`- cyclophos phate - terminated to 5 - phosphorylated RNA ليشكل روابط-2`- phos phomonoester - 3`,5`- phosphodiester. هذا الأنزيم قد تبين أنه يحلق بكفاءة ما يسمى جزيئات الفيرويد المستقيمة فى وضعها الطبيعى بالإضافة إلى جزيئات 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 Oligomric 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 كالآتى: ـ 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 جزيئات 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 بالفيرويد 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 الفيرويد فى الطبيعة كما إقترح فى شكل ٤.



شكل رقم ٤ :

رسم إفتراضى لتناسخ فيرويد 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 التتابع السالب، وهذا أدى إلى الاستنتاج بوجود ميكانيكية لف دائرى مختلفة. إن الفيرويد ASBVd المخترق للنبات والذى هو monomeric يمكن أن ينقلب بواسطة أنزيمـات العائـل إلى جزئ دائرى سالب والذى عندئذ يعمل كقالب لبنـاء الدائرة الملتفـة من تتابـع ASBVd موجب مستمر والذى يعامل ليعطـى ASBVd monomeric مستقيم كامل الطول بعد ربط ASBVd الدائرى ال monomer السائد.

هناك ميكانيكية ثالثة تشمل التفاف دائرتين. تبنى الشرائط السالبية Multimeric كما فى شكل (٤) ولكنها تعامل لتعطى دائرة monomeric من شريط سالب والذى يعمل كقالب لالتفاف دائرة ثانية لينتج شريط موجب multimers. يؤدى القطع والتوصيل إلى إنتاج ذرارى من الفيرويد.

تناسخ الدائرة الملتفة Rolling circle Replication :

هناك إتفاق عام على أن RNAs فى الفيرويدات تتناسخ بواسطة ميكانيكية الدائرة الملتفة. هناك طريقتين أمكن تعريفهما فى هذا المجال كما فى شكل ٤ ب. فى 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 فى مناطق معينة إنشطار لهذا الخيط خطوة ٢ تعطى مونومير monomer والذى عندئذ يتحلق بواسطة أنزيم اللحام فى العائل RNA ligase خطوة ٣. يتكون RNA دائرى سالب هذا ينسخ بواسطة أنزيم RNA polymerase خطوة ٤. RNA الموجب المستقيم الطويل ينشطر فى أماكن مخصصة ويكون Monomers خطوة ٥، هذه تتحلق لتعطى الذرية الجديدة RNA دائرى والذى يكون عادة الشكل السائد فى الطبيعة. إن فيرويد واحد هو ASBVd وفيروسايد واحد هو vLTSV ومرافق واحد sTRSV و HDV RNA أكثر احتمالاً لأن تتبع هذا الطريق فى تناسخها.

أما الميكانيكية الثانية فهى فى شكل ٤ب القسم الأيمن. وهى تشبه شكل القسم الأيسر باستثناء أن الخيط السالب الملتف فى الخطوة الأولى لا يحدث فيه إنشطار ولكنه ينسخ مباشرة ليعطى خيط مستقيم موجب (خطوة ٣) والذى ينشطر ليعطى Monomers ثم تتحلق الذرية الناتجة. إن مجموعة PSTVd من الفيرويدات والثلاثة أنواع الأخرى من الفيروسايدات تتكاثر كما فى هذه الطريقة.

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

النباتات الذى يمكن أن يُحلِّق RNAs الفيرويدى 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.

الإنشطار المتخصص لـ RNA أثناء تناسخ الدائرة الملتفة

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 الفيرويدات، الفيروسايدات وجميع مرافقات RNAs الصغيرة لا يمكن أن تشفر لأى بروتينات من الحجم المطلوب لأنزيم Ribonuclease وبالتالى فإن مثل 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 الفيروسايدات vLTSV، vSNMN، vSCMoV، vVTMov بالإضافة إلى الفيرويد ASBVd كلها تخضع لتفاعل الانشطار الذاتى فى المعمل فى الغياب الكامل للبروتين. يكون التفاعل عبارة عن إنشطار غير مائى بسيط حيث أن الرابطة داخل النيوكليتيدة تخضع لتفاعل نقـل فسفرة فى وجود Mg^{2+} تهاجـم بواسطة 2`- hydroxyl على الفسفور تقود إلى 2`, 3`- cyclic phosphate 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 بوادئ الرايبوسومال 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 التى تعترض هنا هى الميكانيكية التى بواسطتها جميع الفيرويدات التابعة لمجموعة PSTVd تكون قد نشأت من أطول من وحدة طول نواتج تناسخ الدائرة الملتفة. لا يبدو أنها محتوية النيوكليتيدات 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 لبوادئ من PSTVd وإنتاج monomers دائرية عندما استعمل بوادئ أطول من وحدة طول وحضنها مع مستخلصات أنوية النبات. أخذت هذه النتائج لتدل على أن عمليات الانشاء فى الطبيعة لبوادئ 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 وتركيب غير معروف فى RNA السالب من sTRSV وتركيب 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) البوادئ فى جميع أفراد مجموعة PSTVd.

تظهر نتيجة الأبحاث المنشورة أن كلونات cDNA المونوميرك PSTVd أو CEVd معتمدة على وجود التتابع فى النهادية`5 للفيرويد المقحم والتى تتكرر بعد النهاية`3 فى هذه القطعة المنغرزة. دراسات أخرى على الطفرات إقترحت بأن مواقع البناء فى بوادئ 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

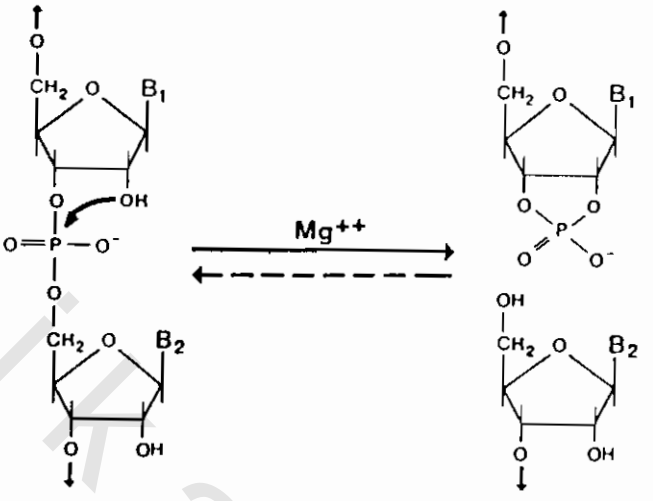
لقد درس هذا الموضوع من قبل كثير من الباحثين منذ سنة ١٩٨٩ وحتى سنة ١٩٩١ وفيما يلى نذكر ملخصاً لهذا الموضوع:ـ

تحضر نسخاً من RNA سالب وموجب من كلونات cDNA من ASBVd و vLTSV ذات إنشطار ذاتى بصفة تخصصية عالية أثناء النسخ وبعد العزل فى الغياب الكامل للبروتين. يشمل التفاعل Mg^{2+} عامل مساعد لتفاعل نقل الفسفرة الذى يشطر ال RNA ليعطى نهايات ذات 2`, 3`- cyclic phosphate و-5`- hy droxyl شكل (٥). على أساس مواقع متخصصة فى الانشطار يتكشف تركيب رأس المطرقة ثنائى الابعاد محفوظ (شكل ٦) هذا يمكن أن يضاف إلى RNAs ذاتى الانشطار من ASBVd سالب وموجب.

إن تركيب رأس المطرقة لشكل ٦ يتركب من ثلاثة سيقـان زوجيـة القاعدة (III, II, I)حول منطقة احادية الخيط مفتوحة ذات ١٣ نيوكليتيدة (شكل صندوق) والتى تكون محفوظة فى تسعة RNAs ذات إنشطار ذاتى معروفة (لغاية ١٩٩١) والتى تنشطر خلال هذا التركيب. مع أن الدليل الواضح لم يحصل عليه، إلا أنه يبدو من المحتمل أن تفاعل الانشطار الذاتى الموصوف فى المعمل يكون أيضاً مسئولاً عن بناء بوادئ من ال Oligomeric فى الطبيعة.

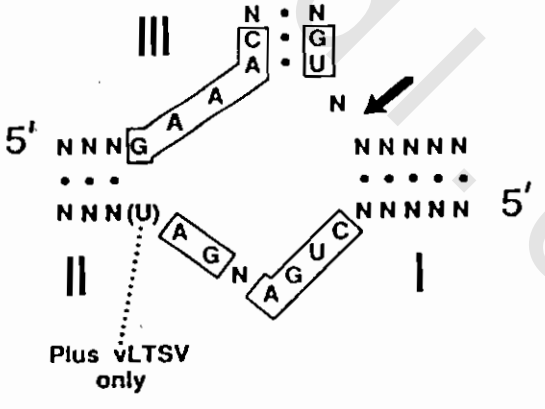
تركيب رأس المطرقة ثنائى الأبعاد كما فى شكل ٦ لا يستطيع أن يشرح بوضوح لماذا يكون هناك إنشطار غير أنزيمى لـ RNAعلى مواقع معينة. من المعتبر أنه فى وجود Mg^{2+}، فإن تركيب رأس المطرقة يتخد تركيب ثلاثى نشيط والذى يخفض كفاءة الطاقة التنشيطية ويختص بعمله على رابطة النيوكليتيدة الداخلية من مواقع الانشطار الذاتى ليسمح بنقل الفسفرة فى تفاعل الانشطار الذاتى. عند الإنشطار فإن التركيب يتراخى وبالتالى يمنع التفاعل العكسى من الحدوث مع العلم أنه من ناحية نظرية جميع التفاعل يكون منعكس.

أما فى حالة ASBVd فإن التتابعات الداخلة فى تفاعل رأس المطرقة تزودنا بمعلومات عن الخطوة التى تعتبر مفتاحاً فى دورة التناسخ، وهو أيضاً التتابع الوحيد فى هذه الممرضات RNAs. وبالتالى ففى حالة ASBVd فإن مواقع الانشطار الذاتى الموجب والسالب تكون ١٤ نيوكليتيدة منفصلة وأن التتابع فى تركيبات رأسى المطرقة تشمل تقريباً الثلث المركزى لجميع الجزئ.



شكل رقم ٥ :

تفاعل الانشطار الذاتى الذى 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 الذاتى لفيرويد ضربة الشمس فى الافوكادو ولأربعة فيروسايدات ومرافقات. هناك ١٣ نيوكليتيدة محفوظة فى عليه والنيوكليتيدات غير المحفوظة يشار إليها N.

غياب منتجات الترجمة Absence of Translation Products :

تعتبر الفيرويدات هى الكائنات الوحيدة ذات نظام التناسخ الذاتى والذى لا يعمل شفرة لتناسخه ولا وحدات صغيرة subunit لأنزيم التناسخ الخاص به. مع أنه لايوجد برهان تجريبى نهائى يدل على أن المعلومات الوراثية للفيرويدات لا تعبر عن نفسها فى بروتين صغير، هناك عدة نقاط ذات توضيح سلبى فى مناقشة ذلك.

إن كفاءة الفيرويدات على التشفير يمكن أن تؤدى إلى بروتين ليس أكثر من ١٢٠ حمض أمينى، فمثلاً بالنسبة للفيرويد PSTVd فإن أطول بروتين، يمكن أن ينتج من أكثر من دورتين من الترجمة، شريطة أنه فى هذه الحالة أن مثبطات كودون UGA يجب أن تكبح. إن الافتقار إلى مواقع ربط الرايبوسومات وغياب التركيب القلنسوى، التتابع المجاور مباشرة، ثبات التركيب الثانوى والدائرية كلها لاتناسب نشاط mRNA. أما فى المعمل فإن أنظمة الترجمة لا يمكن التعرف على منتجات خاصة بها إذا كان الفيرويد PSTVd أو CEVd يمكن أن يظهر عمل مثل mRNA. إن المقارنة الدقيقة لنماذج بروتين من نبات **Gynura aurantiaca** المصابة بالفيرويد CEVd ونباتات الطماطم المصابة بالفيرويد PSTVd مع نباتات كنترول متماثلة من نباتات سليمة أظهر بأنه لا يوجد شفرة فيرويدة مختلفة. وباختصار يمكن القول بأن تناسخ الفيرويد يعتمد على أنزيمات polymerase العائل ولا يشفر لنفسه.

دراسة المرض الفيرويدى

١ ـ المصادر The Sources :

تمتلك بعض الفيرويدات مدى عائلى واسع بشكل واضح، وهذا يعنى أن RNA الفيرويدى يمكن تحضيره ليس فقط من العائل الذى فيه اكتشف الفيرويد اصلاً، ولكن أيضاً من النباتات الأخرى والتى يمكن أن تكون أكثر ملائمة لتحضير الفيرويد. فى كثير من الحالات فإن نقل الفيرويدات إلى عوائل نباتية أخرى لا يؤدى إلى ظهور أعراض معبرة عن الإصابة وبالتالى يجب أن

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

إن نقل الإصابة الفيرويدية 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 الفيرويد. 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 ـ ١٤ يوم من الحقن عندما تنمو النباتات تحت كثافة ضوئية عالية ودرجة حرارة مرتفعة ٣٠ ـ ٣٥°م خلال النهار وحوالى ٢٠°م خلال الليل. هذه المدة يمكن أن تطول إلى ٢ ـ ٣ شهور إذا نمت النباتات تحت درجة حرارة ٢٠°م. ولقد تبين أن تناسخ الفيرويد وتعبيره بالأعراض يأخذ مجراة تقريباً فى نفس الوقت وأن أفضل إنتاج من RNA الفيرويدى يحصل عليه بعد ٣ ـ ٦ أسابيع من الحقن.

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

وزن الجزء النباتى	كمية الفيرويد
$\frac{1}{2}$ كيلو غرام ارواق	٥٠٠ ميكوغرام
$\frac{1}{2}$ كيلو غرام سيقان	٣٠٠ ميكوغرام
$\frac{1}{2}$ كيلو غرام جذور	١٨٠ ميكوغرام

تتم 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 ـ التشخيص Diagnosis :

يكون هناك نوعاً من الالتباس عند تمييز الاصابة الفيرويدية إعتماداً 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 الفيرويدى بالرغم من المحاولات العديدة التى أجريت بهذا الشأن.

إن التشخيص السليم يتم الحصول عليه بواسطة التعرف على الحزم الفيرويدية فى الهجرة الكهربائية فى الجيل Gel electrophoretic أو بواسطة التهجين الجزيئى. إن طرق الهجرة الكهربائية فى الجيل Gel elecrtophoretic تتضمن الحصول على محلول متجانس من غرام أو بضعة غرامات من النسيج النباتى، مستخلص حمض نووى. فى بعض الحالات تستبعد الأحماض النووية ذات الوزن الجزيئى العال وذلك بواسطة الترسيب فى كلوريد الليثيوم، ثم الترسيب بالايثانول للأحماض النووية الباقية. يحلل المستخلص الخام من الحمض النووى الناتج على مادة polyacryla-mide slab gels. أيضاً يستعمل ٥ ٪ polyacrylamide gels بالنسبة للفيرويدات ذات الوزن الجزيئى لغاية ١٢٠٠٠٠ دالتون (PSTVd) أو ٢,٥ ـ ٣ ٪ للفيرويدات الكبيرة مثل كاداغ ـ كاداغ. عند إضافة ٨ مول يوريا يحصل على حزم ضيقة. هناك زيادة يمكن ادراكها فى الحساسية وخفض فى الزمن مطلوبة للتشخيص بالهجرة الكهربائية حصل عليها عندما كان السير فى ظروف طبيعية مشتركاً مع سير متعاقب تحت ظروف دنترة فى الهجرة الكهربائية ذات الاتجاهين. هذه الطريقة ادت إلى فصل نقى لجزيئات الفيرويد 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 الفيرويدى لكل غرام من نسيج ورقة الطماطم وأعطت ٦٠٠ بيكوغرام فى حزمة مفردة، وفى أبحاث أخرى أعطت ٢ نانوغرام فيرويد لكل غرام من نسيج الطماطم و ٨٠ بيكوغرام فى حزمة مفردة. إن استعمال الهجرة ذات الاتجاهين فى العزل الكهربائى سهلت العمل فى تطبيقات روتينية لكثير من عينات الأنسجة فى وقت واحد.

إن إختبارات التشخيص للفيرويدات المبنية على تهجين DNA تكميلى ذو قوة إشعاعية عالية قد استعملت مع كثير من الفيرويدات وكانت الاختبارات تجرى بواسطة Dot - spot hybridization مع cDNA مكلون cloned للفيرويد

PSTVd، CSVd، HSVd أو عن طريق Liquid hybridization مع منقبات cDNA وذلك بالنسبة لكل من RNA فى فيرويد كادانج ـ كادانج وفيرويد ASBVd . أما هذا الفيرويد الأخير ASBVd فقد أمكن تعريفه بالتهجين الذاتى self - hybridization مع RNA للفيرويد نفسه المعلم بالفسفور المشع ٣٢. إن حساسية إختبارات التهجين قد ذكرت بأنها تصل ما بين ٢٠ ـ ٨٠ نانوغرام فيرويد لكل غرام من النسيج المصاب. وبتقدم 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 فى الجيل حساسة لتركيب فيرويد معينة (الدائرى) كما أنها لا تستطيع التفريق بين تتابعات مختلفة، بينما طريقة التهجين تعرف فقط تعاقبات معينة بغض النظر عن التركيب، وبالتالى فإن كلتا الطريقتين تكمل كل منها الأخرى فى صفاتها.

٣ ـ كلونة الجزئ Molecular Cloning :

فى الوقت الحالى فإن تتابعات الفيرويد المكلون وجدت لها مجالاً كبيراً فى التطبيق فى أبحاث الفيرويد مثل: ـ

أ: ـ التتابع Sequencing.

ب: التهجين لتشخيص الفيرويد، الدراسات التى تجرى لمعرفة المركبات الوسيطية فى تناسخ الفيرويد وإنتشار الفيرويد فى الخلية.

جـ: حيوية cDNA المكلون والمواقع الموجهة للمطفرات.

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

جدول ٤ : كلونات cDNA لبعض الفيرويدات.

الفيرويد	البلازمو	المحفز	موقع الادخال	الحجم والاتجاه
PSTVd	pGl 101 H	Iac	Hae III 146	monomerid (+) and (-)
PSTVd	pBR 322	tet	Bam H 1 87	monomeric (+) and (-) dimeric (+) and (-)
PSTVd	pBR 322	_	Bam H 1 87	monomeric +
HSVd	pGL 101	lac UV5	Eco R 1 296	monomeric (+) and (-) dimeric (+) and (-) tetrameric (+) and (-)
CEVd	pBR 322	_	Bam H1 87	monomeric (+)
ASBVd	pBR 322	_	_	_

٤ ـ التنقية Purification :

تكمن تنقية الفيرويد فى خطوتين أساسيتين هما:ـ

١ ـ تحضير مستخلص من RNA ذو وزن جزيئى منخفض.

٢ ـ التنقية النهائية للحمض الفيرويدى RNA من هذا المستخلص.

فى معظم الاجراءات فإن الحمض النووى الكلى يستخلص من مزيج النسيج المتجانس بواسطة نظام Buffer / phenol المحتوى على بديل الصوابين SDS وعلى benfonite مثبط 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 الخصبة من الفيرويد فى 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 فيرويدات 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 ٠,٥ 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 الفيرويدات تنقى من مستخلص RNA الخام إلى الحالة المتجانسة ثم تستعمل طريقة Polyacrylamide gel electrophoresis. ويفضل استعمال هذه الطريقة ذات الاتجاهين (سنذكر 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 هى الميكانيكية التى بها تحدث الفيرويدات أمراضاً فى عوائل معينة، علاوة على ذلك فإنها تتضاعف (تتناسخ) فى 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 هى:ـ

١ ـ إن وجود الفيرويد فى نواة العائل وعدم مقدرته الظاهرة ليعمل عمل mRNA يؤدى إلى القول بأن أعراض المرض المتسببة عنه قد تكون ناتجة عن التداخل أو التفاعل المباشر للفيرويد مع جينوم Genome العائل، هذا يعنى عن طريق تداخله فى التنظيم الجينى فى الخلايا المصابة.

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

٣ ـ هناك إقتراحاً ثالثاً لنشوء المرضية بالفيرويد، هذا الإقتراح يفترض بأن الفيرويد يقوم بتجنيد RNA polymerase II للحمض DNA التابع النووى بواسطة جزيئات الفيرويد المعدى وذلك لاستكمال أو إنجاز تناسخه (الانانية فى التناسخ)، ويثبط أو يكبح بناء mRNA's جينومى فى خلية العائل وبالتالى يعوق أو يفسد عمليات التمييز أو التخليق فى الخلية.

obeikandi.com

يجب أن نؤكد على أن جميع هذه التفسيرات هى عبارة عن إقتراحات إلى حد بعيد ولكى يكون أى من هذه التفسيرات الثلاثة المذكورة سابقاً معقولاً يجب أن لاينظر إلى نتيجة الإصابة الفيرويدية الملاحظة وهى الأعراض، ولكن أيضاً يجب النظر إلى الحقيقة المذكورة سابقاً وهى أنه فى بعض الأنواع النباتية فإن الفيرويدات تتناسخ بشكل كاف دون احداث ضرر واضح مميز على العائل، وفيما يلى بعض المعلومات قد تلقى بعض الأضواء على هذا الموضوع.

١ ـ علاقة المرض مع البروتينات والمركبات الأخرى:

كما ذكر سابقاً فإنه لم يوجد فيرويد يعمل شفرة لبناء البروتين. وعلى أية حال فإنه فى نسيج مصاب بالفيرويد CEVd من نبات **Gynura aurantiaca**، طماطم والبطاطس، فإن هناك نوعان من البروتينات ذات أوزان جزيئية تتراوح ما بين ١٢ ـ ١٨ ألف دالتون، تتراكم فى النسيج. وفى نسيج نبات الطماطم المصاب بالفيرويد PSTVd وجد بروتين ذو وزن جزيئى ١٤ ألف دالتون، وهذا كان وجوده بتركيز أعلى فى النباتات المصابة عنه فى النباتات السليمة، إلا أن هذه البروتينات ليست متخصصة بالاصابات الفيرويدية، ولكنها تظهر أيضاً بعد الإصابة الفيروسية وفى النباتات الطبيعية التى وصلت طور الشيخوخة. قد ينظر إلى هذه البروتينات على أنها إستجابة فسيومرضية Pathophsiological للنبات العائل. كذلك ذكر حدوث بعض التغيرات بعد حدوث الإصابة بالفيرويد، فى التركيز الكلى للأحماضDNA ، RNA والبروتينات وفى المحتوى والتركيز للعناصر المعدنية وفى تركيز حمض الكلورجنك. هذا يدعم التفسير الأول الذى ذكر سابقاً.

٢ ـ تماثل التتابع مع الأحماض النووية RNAs الصغيرة:

عنـد إجـراء دراسـات حـول الفيرويـدات والأحمـاض النوويـة الصغيـرة RNAs (U1 - U6) فى الكائنات الحية الدقيقة مميزة النواة، أمكن التعرف على بعـض التماثل فـى تتابع النيوكليتيـدات هذا التتابع كان واضحاً بشكل جيد.

إن الأكثر وضوحاً فى هذا المجال هو تماثل التتابع بين النهاية`5 فى U1 RNA والمنطقة الأكثر حفظاً فى الخيط السفلى فى التركيب الثانوى (سيذكر ذلك بالتفصيل إن شاء الله فى الفصل الثالث) فى الفيرويدات من مجموعة PSTVd. وبالاعتماد على الأبحاث اللاحقة فإن U1 RNA يتدخل فى عملية التراكب splicing (سبق ذكرها) والتى فيها تقطع الانترونات من الحمض النووى RNA غير المتجانس ويتكون mRNA المطلوب. فى هذه الأشكال فإن النهاية`5 من U1 RNA تشكل أزواج قواعد بنهايتين من الانترون. ويعتقد أن الفيرويد يمكن أن يحل محل U1 RNA ويتدخل فى عملية التراكب، وأيضاً يعتقد أن خيط الفيرويد السالب يتفاعل مع ويوقف عمل U1 RNA. إن تكوين دبابيس الشعر (فى تركيب الفيرويد) يمكن أن تكون ناتجة عن مثل هذا التفاعل أو أن دبابيس الشعر الثابتة يمكن أن تناسب هذا التفاعل. وفى أشكال مختلفة من PSTVd يمكن أن يحدث تفاعل بواسطة منطقتين غير متجاورتين مع مواقع التراكب فى mRNA للعائل. هناك مناطق مشابهة ولكن غير متماثلة تماماً وتكون أيضاً موجودة فى العزلات المعتدلة من الفيرويدات PSTVd و CSVd. إن الأعراض غير الشديدة فى الاقحوان والتى تظهر بعد الإصابة بثلاثة فيرويدات تكون فى حالة توازى مع التفاعل المتوقع للفيرويدات مع مواقع التراكب على الأحماض mRNAs.

وعلى أية حال فإن تواجد الفيرويدات الناضجة فى النوية ووجود U1 RNA فى أجزاء الرايبونيوكليوبروتين تبطل الشكل المذكور سابقاً فى نشوء المرض. فقط فإن الحمض النووى الصغير RNA U_3B المعروف بأنه موجود فى النوية. وكذلك وجد أن تتابع متماثل بين PSTVd و snRNA U_3B من خلايا No-vik off hepatoma قد وجد فعلاً فى النوية. لم يمكن التوصل إلى أشكال (من هذه المذكورة) تساهم فى نشوء المرضية تشبه هذا التماثل.

٣ ـ إختلاف التتابع Sequence Variation :

إن تتابع النيوكليتيدات 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 النيوكليتيدات ٤٠ ـ ٥٥، ٣٠٥ ـ ٣٢٠ وإلى مقدار بسيط حول النيوكليتيدات ١١٥ ـ ١٢٥. إن العالم Sanger وتلاميذه قد إقتنعا بأن الاختلاف الكبير يؤثر فى الشدة وذلك عن طريق تغيير الثبات الثيرموديناميكى لتلك المنطقة، وأن الاختلاف القليل يعدل بحيث يحدث توازناً مع العدد الكلى من النيوكليتيدات والتى 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 والذى 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 ـ cDNA المكلون للفيرويد المعدى Infectious Viroid cDNA Clones :

لقد ذكر العالم Owens سنة ١٩٨١ أن DNA للبلازمد 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 المكلون 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 مكلون للفيرويد HSVd. لقد ذكر Meshi et al سنة ١٩٨٤ حتى الخيوط المزدوجة من cDNAs تحتوى من ١ ـ ٣ وحدات من تتابع الفيرويد HSVd بدون محفزات promoters كانت معدية. كانت حيوية تتابع الوحدة الواحدة منخفضة، لكنها وجدت فى cDNA الذى أُخذ من قطع فى دائرة الفيرويد 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 المكلون الفيرويدى المعدى على أن تتابع الفيرويد يمكن أن يحدث فيه تغير بواسطة مطفرات تعمل مباشرة على المواقع المخصصة لذلك، وهذا يمكن أن يستعمل كأداة مؤكدة لدراسة ميكانيكية نشوء المرضية وتناسخ الفيرويد.

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

بالرغم من معرفتنا الكبيرة عن تتابع الفيرويدات وتركيبها وتفهمنا الزائد لتناسخها، إلا أننا بشكل أساسى لا نمتلك الادراك الحقيقى لكيفية حدوث الأعراض من قبل الفيرويدات. ونظراً لأن الفيرويدات لا يبدو بأنها تشفر لأى بروتين أو عديد ببتايد، 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 الفيرويدات لتتداخل مع بعض الأحماض النووية RNAs فى الخلية له أهمية ونتائج كبيرة.

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

مقارنة بين الفيرويدات وبعض الكائنات الأخرى

١ ـ مقارنة بين الفيرويدات والفيروسات: ـ

كما سبق وذكرنا فإن الفيرريدات هى كائنات صغيرة ذات وزن جزيئى منخفض من الحمض النووى RNA والتى تستطيع أن تهاجم خلايا النبات وتكاثر أنفسها اعتماداً على نفسها وتسبب أمراضاً للنبات. تختلف الفيرويدات عن الفيروسات فى بعض الصفات هى: ـ

أ ـ حجم الحمض النووى RNA. إن حجم هذا الحمض فى الفيرويدات له وزن جزيئى صغير يتراوح ما بين (١١٠٠٠٠ ـ ١٣٠٠٠٠) دالتون. أما فى الفيروسات فيكون وزنه الجزيئى من مليون إلى عشرة ملايين دالتون.

ب ـ الصفة الثانية وهى حقيقة أن الحمض النووى RNA الفيروسى أو أل DNA يكون مغلفاً بغطاء بروتينى، بينما الفيرويدات لا يوجد عليها غطاء بروتينى، وتوجد بوضوح بدون غطاء بروتينى يعنى أنها حمض نووى حر ليس عليه غطاء.

جـ ـ تتابع النيوكليتيدات ووجود النطاقات فى الفيرويدات تختلف عنه فى الفيروسات.

د ـ الفيروسات تستطيع أن تشفر للبروتين أما الفيرويدات فلا تستطيع.

هـ ـ تتناسخ الفيرويدات ويزداد عددها بطرق مختلفة عن التى تتبعها الفيروسات.

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

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

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

جدول رقم ٥: بعض الفروق بين مسببات مرضية

الصفـة	الكائنات الحية الدقيقة	الفيروسات	الفيرويدات
النمو	يحدث فيها نمو	لا يحدث نمو	لا يحدث نمو
الانقسام	تنقسم	لا تنقسم	لا تنقسم
التطفل المطلق	غير مطلقة التطفل	مطلقة التطفل	مطلقة التطفل
نوع الحمض النووى	RNA و DNA	RNA أو DNA	RNA
الوزن الجزيئى للحمض النووى	أكبر من ٣ × $١٠^{٨}$	٣ × ($١٠^{٦}$ _ $١٠^{٨}$)	(١,١ – ١,٣) × $١٠^{٥}$
التغليف	غير قابل للاستعمال	مغلف مع بعض الاستثناء	غير مغلف
تشفير للبروتين	تشفر	تشفر	لا تشفر

٢ ـ مقارنة بين الفيرويدات والفيروسايدات:

Comperison of Viroids and Virusoids

تعتبر الفيروسايدات Virusiods من مرافقات RNAs النباتية. حيث أن هذه المرافقات تقسم إلى مجموعتين:

المجموعة الأولى: مجموعة مغلفة توجد بشكل دائرى مثل الفيرويد ويوجد ضمن هذا الغلاف فيروس مساعد. ويوجد من هذه المجموعة أربعة أفراد معروفة وتسمى Virusiods (يعنى فيها RNA شبيه بالفيرويد Viroid - like RNAs) واعطيت هذا الاسم لتمييزها عن المجموعة الأخرى.

obeikandl.com

المجموعة الثانية: مجموعة مغلفة 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. فى حالة sTRSV الأشكال الدائرية تكون موجودة فى النباتات المصابة ولكن فقط الشكل المستقيم هو الذى يختار ويكون مغلفاً مع جزيئات الفيرس.

إن مرافق RNA الحيوانى الوحيد والذى يشارك صفات الإنشطار الذاتى فى المعمل والمفترض تناسخه بالدائرة الملتفة والانشطار الذاتى فى الطبيعة مثل المرافقات النباتية هو فيرس دلتا الكبد hepatitis ويسمى Hepatitis delta virus (HDV) RNA. وإن هذا ال RNA الدائرى يتكون من ١٧٠٠ نيوكليتيدة وحجمه خمسة أضعاف RNA فى النبات ويكون مغلفاً على شكل أجزاء فيروسية منفصلة عن RNA الفيروسى.

ويبين جدول رقم ٦ مرافقات RNAs التى تخضع للانشطار الذاتى.

جدول رقم ٦ : مرافقات RNAs التى تخضع للانشطار الذاتى

	الفيرس المساعد	الاسم باختصار	طول النيوكليتيدات
النبات ١ ـ RNAs شبيه بالفيرويد مغلفة Virusoide	أ ـ فيرس التخطيط المتنقل فى البرسيم الحجازى Luceme transiend strak virus	vLTSV	324
	ب ـ فيرس التبرقش العقدى فى البطاطس Solanum nodiflomm mottle virus	vSNMV	377
	جـ ـ فيرس تبرقش البرسيم الأرضى Subterranean clover mottle virus	vScMov	332 & 388
	د ـ فيرس التبرقش القطيفى فى الدخان Velvet tobacco mottle virus	vVTMoV	365 - 360
٢ ـ RNA مستقيم مغلف	فيرس البقعة الحلقية فى الدخان Tobacco ringspot virus	STRSV - sTobTSV	359
٣ ـ الحيوان RNA دائرى مغلف لفيرس دلتا الكبد	Hepatitis B virus	HDV RNA	1,700

إن الصفات الخاصة للفيرويدات يمكن ملاحظتها جيداً عند إجراء مقارنة مع جزيئات RNA الشبيهة بالفيرويدات مثل الفيروسايدات virusoids، الأحماض النووية RNAs الدائرية ذات الحجم المشابه المحتوى المماثل من GC ولكن بشكل عشوائى مثل التتابع المخلق بالكومبيوتر. إن تتابع النيوكليتيدات والتركيب الثانوى لاثنين من الفيروسايدات تختلف عن فيروسايد vTMOV فيرس التبقع المخملى (القيطفى) فى الدخان، وفيرس تبقع نبات (SNMV) **Solanum nodiflorum**. إن درجة تزاوج القواعد يكون ٥٦ ٪ فى vTMoV و ٥٧ ٪ فى SNMV وقيمة متوسطة من ٥٧ ٪ حسبت من أقرب ما يمكن من التركيب الثانوى لخمسة تتابعات مختلفة عشوائية. هذا ويظهر أن درجة تزاوج القواعد فى بعض الفيرويدات ٦٤ ٪ فى CCCVd ليست أعلى بكثير من الفيروسايدات أو التتابعات العشوائية. إن غياب التشعبات صفة مميزة والتى هى من مميزات الفيرويدات. كذلك فإن هناك صفة مميزة أخرى هى الثبات الثيرموديناميك، وهى إما أن توضح بواسطة $\Delta G / N$ أو بواسطة قيمة Tm. إن التعاون الممثل بواسطة $\Delta T1/2$ يكون فقط عال فى التراكيب المقطعية للفيرويدات. وأن تكوين دبوس الشعر الثابت خلال تكون تركيب مقطعى مترافق يحدث فقط فى الفيرويدات.

ماذا عن الفيرويدات الحيوانية

Question of Animal Viroids

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

هناك أمراضاً كثيرة تصيب الإنسان والحيوان وتعزى إلى فيروسات ولكن العامل

المسبب الحقيقى 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 فيرويدات.

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

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 hydropobic protein فى العامل المسب 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 الفيرويدات من حيث صغر الحجم والمقدرة على إحداث أعراض واضحة فى العوائل القابلة للإصابة، والوقت الطويل الذى يحتاجه بالمقارنة مع الفيروسات، أصبح هناك إحتمالاً من أن يكون عامل المرض يحتوى على جينوم شبيه بالفيرويد.

إن الصعوبة فى اكتشاف حمض نووى فى تحضيرات سكرابيا المختلفة النقية يمكن أن يكون راجعاً إلى الوزن الجزيئى المنخفض جداً لجينوم سكرابيا. وإذا كان هذا المسبب المرضى يتكون من جزئ دائرى ٥٠ نيوكليتيدة، فإن تناسخ الدائرة الملتفة لهذا ال RNA سوف يولد جزيئات concatameric والتى يمكن أن تكون الشكل الوظيفى للمادة الوراثية. زيادة على ذلك فإن الانشطار الذاتى الجزيئى لهذه ال concatamers يمكن أن تولد جزيئات أصغر بأطوال مختلفة كل منها ينجز وظيفة مختلفة إلى حد ما بسبب إختلاف الطول.

بعد كل هذا من الممكن أن نتخيل جزئ RNA دائرى 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 التى تقوم بها الفيرويدات. 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 فى سنة ١٩٧٤ ولغاية ١٩٩٢ لم يتأكد الموضوع.

فرضية Diener: هل الفيرويدات مستحثات (بقايا) جزئ من عالم RNA

Are Viroids Molecular Fossils of the RNA World

لقد تقدم العالم Diener سنة ١٩٨٩ بفرضية يقول فيها إن الفيرويدات عبارة عن مستحثات أو بقايا جزئ من عالم RNA. وإن هذه الفرضية لاقت معارضات كثيرة من قبل كثير من الباحثين، إلا أن هناك من وافق عليها وقدم الأدلة والبراهين على صحتها. وفيما يلى نعرض التقرير الذى 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 والذى يقول فيها أنه يمكن تفسير ظهور الفيرويدات على أنها جزئ مستحاث من عالم RNA. نحن سلكنا 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 :ـ

١ ـ عالم RNA :

هناك بعض الافتراضات التى وضعها كثير من العلماء حول عالم RNAوكانت هذه الافتراضات ناجحة فى كثير من الحالات وقد قمنا بتلخيص هذه الافتراضات وهى كالآتى: ـ

أ ـ ازدواجية الفينوتايب والجينوتايب لـ RNA :

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

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

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

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

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

فى هذا المجال يمكن أن نقوم بتلخيص إقتراحات العالم Diener والتى 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 الفيرويدات قد درست جيداً خاصة تلك التى لها أهمية فى الزراعة منذ ظهور تأثيرها الأول على العائلة الباذنجانية خاصة **Solanum tuberosum** (البطاطس)، فمثلاً إن أول فيرويد عرف هو فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس PSTVd وفيه ٣٥٩ نيوكليتيدة (Diener 1971). وإن أول تتابع للنيوكليتيدات الكاملة فى الفيرويد قد حدد أيضاً فى PSTVd سنة ١٩٧٨ من قبل العالم Gross.

من هذا يتبين أن هناك ثقة واسعة لصالح تفسير الفيرويدات 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 التى تدعم البراهين التى تؤيد بأن الفيرويدات هى بقايا من عالم RNA هذه النقاط هى: ـ

أ ـ طول الفيرويدات القصير ٢٤٦ ـ ٣٧٥ نيوكليتيدة.

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

جـ ـ إن البناء الداخلى للفيرويـدات يعطيها ميكانيكية دفاعية، نظراً لأنها تتكون مـن دوائر أحادية الخيط مع وجود ازواج قواعد عديدة تسمح لهذا ال RNA ليشكل حلزون ثنائى كامل بأبعاد تجعل الفيرويد مقاوم للأشعة UV.

د ـ إن تتابع النيوكليتيدات فى الفيرويدات يبرز قليلاً من النشاط لـ RNA أو لا يظهـر أى شـئ من هذا النشـاط فى الفيرويد PSTVd، فمثلاً هناك stop codons متكررة فى كل القراءات للاطار العام للفيرويد.

الآراء المعارضة لنظرية Diener والرد عليها

١ ـ التناقض الظاهرى لهذه الفرضية:

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

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

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

للرد على هذه المعارضة يجب أن نطرح السؤال التالى.

أين كانت هذه الأجزاء المحافظة على حياتها منذ الدهر السحيق قبل أن تصبح متخصصة على النباتات فى العصر الجيولوجى المتوسط نسبياً؟؟.

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

٢ ـ البحث عن البكتيريا الزرقاء المميزة:

فى هذا الموضوع، بين الاختيارات المختلفة المتوفرة فى البحث عن البكتيريا الزرقاء المميزة يجب أن نذكر أن صفة الفيرويدات ذات التضاعف الموجب بسبب أنزيمات العائل تؤدى إلى الاقتراح بأن Cyanobacteria RNA replicase قد استكشف من وجهة النظر هذه (هذا يعنى أن RNA - polymerase المعتمد على RNA الذى يمكن أن يكون مسئولاً عن تضاعف الفيرويد، 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 لبروتينHU فى **E. cloi** .

لكى نرد على هذا الاعتراض يجب أن نستذكر تسلسل فرضيات التكافل الداخلى Endosymbiosis. يجب أن نفترض أن الاسترقاق Holobionts (متكافل Symbionts وعائل hosts) الأول يستفيد من العائل ولا يقدم للعائل أية فائدة، هى أهداف جديدة للانتخاب الطبيعى بسبب التداخل بين المشاركين فى التكافل، فى هذه الحالة فإن المشارك قوة رائدة مهمة جداً فى التطور، وهذا دعم بأسانيد قوية من كثير من الباحثين. مثل هذا التداخل بين العوائل والمتكافلين يمكن، مثلاً، أن يكون إنتقال وراثى أو متكافل مشارك مثل العضيات Organelles.

نرجع ثانية إلى العلاقة مع الفيرويدات فإن الاحتمالات المتوقعة والقائمة تكمن فى:

بعض الانزيمات المعروفة فى نسخ الفيرويدات مثل (QB replicase). بعض التكافل بين الخلايا البكتيرية التى تمتلك فعلاً جينومات مخفضة، فمثلاً الكائن **Cyanophora paradoxa** وحيد الخلية ذو أسواط، يوجلينا تأوى Cyanelles والتى 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 يهمنا 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. الفيرويدات يجب عليها أن تعتمد على جينوم العائل لبناء عامل X.

هذه إثباتات نظرية وبقى 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 الثانى

1 - Agrios, M. J. 1987. Plant Pathology. Acedemic 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. matn, 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., Domedy, 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.

obeikandl.com

16 - Muhlabach, 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.

obeikandl.com