

الفصل الرابع

دراسات تطبيقية على الفيرويدات

أولاً:- بناء فيرويد معدى فى المعمل:

In Vitro Synthesis of an Infectious Viroid

مقدمة:-

الفيرويدات هي ممرضات للنبات تتميز عن الفيروسات بغياب الغطاء البروتيني وبأحجامها الصغيرة وهي جزيئات من RNA أحادي الخيط دائرية تتكون من بضع مئات من النيوكليوتيدات. أصغر فيرويد فيه ٢٤٠ نيوكليوتيدة وأكبر فيرويد فيه ٣٧٥ نيوكليوتيدة (ذكر Steger et al سنة ١٩٩٢ أن هناك فيرويد بطول ٦٠٠ نيوكليوتيدة، إلا أنه لم يذكر اسم هذا الفيرويد ولا وصفه وسيأتى ذكر الخطأ الذى وقع فيه الباحث). لا يوجد أى تجارب أثبتت بأن الفيرويد يستطيع أن يشفر لأى بروتين ولا لأى نواتج ترجمة. وبالتالي فإن الباحث يجب أن يفترض أن تناسخ الفيرويد ومرضىته تعتمد كلية على نظم أنزيمية فى العائل. إن المعلومات الوراثية فى الفيرويدات تكون فى تركيب RNA. كذلك فإن للفيرويدات المقدرة لأن تخضع لتركيبات خاصة إنتقالية وتستطيع أن تتفاعل مع بعض عوامل خلية العائل.

ملاحظة: قام بهذا البحث مجموعة من العلماء فى استراليا ومجموعة أخرى فى ألمانيا والذى أمدنى بالبحوث مشكوراً الدكتور M.A. Rezaian والدكتور D. Riesner.

إن النموذج الحديث لتناسخ الفيرويد يفترض ميكانيكية الدائرة الملتفة. يمكن ذكر هذه الميكانيكية باختصار ونقول بأن الفيرويد الدائري (خيط موجب) ينسخ إلى Oligomeric خيط سالب من RNA. الخيط السالب هذا يعمل كقالب لبناء Oligomeric خيط موجب من RNA. كلتا خطوتى النسخ يحفزان بواسطة أنزيم العائل RNA Polymerase II المعتمد على DNA. أما الخيط الموجب Oligomeric RNA ينشط أنزيمياً إلى جزيئات ذات وحدة طول والذي بعد ذلك يلتحم ليكون دوائر فيرويد تامة mature. إن الانشطار الذاتى والالتحام الذاتى لا نستطيع تأكيد صحتها بالرغم من التجارب العديدة. هناك استثناء لهذه العملية موجود فى فيرويد ضربة الشمس فى الأفوكادو حيث أن جزيئات وحدة الطول تتكون بواسطة الانشطار الذاتى فى ال Oligomers، لا يوجد أنزيم يشارك خلال خطوة البناء هذه. يجب على الباحث أن يفترض بأن الدقة فى قطع ولحم وسيطات التناسخ من ال Oligomeric يكون نتيجة للتحديد الجيد للتركيب الثانوى للموقع. ويجب التأكد من أن الفيرويدات كجزيئات متطفلة لا تزود العوامل الخاصة بها فى خلية العائل بأى إجراء وأن عوامل التجهيز تلك الخاصة بخلية العائل لا تتكيف مع الفيرويد. وبالتالي فإنه على نقيض واضح مع بناء RNA العائل فإن التركيب الثانوى للفيرويدات ووسيطاتها فى التناسخ يكون لها الدور السيادةى فى الخلية.

دبابيس الشعر:

إن التركيب والتركيب الانتقالي للفيرويدات معروف بشئ من التفصيل. تحت الظروف الطبيعية فإن الفيرويدات تشكل تركيب شبه عصوى والذي يمكن وصفه بأنه تركيب متسلسل من حلزونات قصيرة مع عروات داخلية صغيرة. أثناء الدنترة بالحرارة فإن الفيرويدات تمر بعدة تركيبات إنتقالية من التركيب شبيه العصوى إلى دائرة أحادية الخيط بدون أية أزواج قواعد بين الجزئ. فى الاتحادات العالية الانتقالية الرئيسية فإن جميع ازواج القواعد للتركيب الطبيعى تتعطل وتنفصل ويتكون تركيب واضح جديد ثابت يسمى دبوس الشعر، وهى ثلاثة دبابيس،

دبوس الشعر I، II، III. هذا التحول يمكن رؤيته كسوط ذو تركيب ممتد إلى متفرع مع فقد واضح في تزاوج القواعد. أما على درجات الحرارة الأعلى فإن دبايس العشر الثابتة تنفصل باستقلالية عن بعضها البعض حسب درجة ثباتها في الحرارة. إن دبوس الشعر I و II تكون أكثر ثباتاً وحفظاً بين الفيرويدات المختلفة أكثر من بقية الجزئ مع الأخذ بعين الاعتبار موقع، طول ومحتوى القواعد G + C. أما دبوس الشعر رقم III فإنه يوجد فقط في الفيرويد PSTVd وبالتالي فإن أهميته جانبية.

لقد درس حديثاً العلاقة الوظيفية لدبوس الشعر II عن طريق الموقع المباشر للطافرات وطرق ال Thermodynamic واختبارات الحيوية بواسطة Loss et al سنة ١٩٩١. ولقد تبين أن دبوس الشعر II يتكون ليس فقط خلال الدنترة بالحرارة للفيرويدات الدائرية ولكن يمكن أن يتكون خلال بناء وسيطات تناسخ الفيرويد، ومن المحتمل أن تكون هذه الخطوة أكثر أهمية من ناحية بيولوجية حيث أنه يكون جزء من التركيب شبه المستقر. أظهرت الدراسة المستفيضة أن الطفرات التي تحدث في القطع التي تشكل دبوس الشعر II واختبارات الحيوية مع cDNA للفيرويد المتحول أن المنطقة المركزية لساق دبوس الشعر II هي المنطقة الحرجة في تناسخ الفيرويد. ولدى الأخذ بعين الاعتبار المعلومات الواردة في كثير من المراجع على مواقع الارتباط لكثير من عوامل النسخ، هذه الأبحاث تشير إلى الفرضية بأن دبوس الشعر II يعمل كموقع ارتباط لعوامل النسخ في خلية العائل.

هناك كثير من التقارير في المراجع تدل على أن المنطقة المحتوية دبوس الشعر I يمكن أن تكون موجودة في بناء ال Oligomeric وسيطات للتناسخ. يتكون دبوس الشعر I في منطقة من الجزئ التي تظهر تماثل تتابع قوى بين كل الفيرويدات من مجموعة PSTVd هذه القطعة تسمى -Upper central con- (UCCR) served Region. في حالة PSTVd لقد ذكر حديثاً أن RNase T₁ يكون قادراً ليحفز في لمعمل كلاً من تفاعل القطع واللحم بدون الحاجة إلى أى بروتين

آخر Tsagris et al سنة ١٩٩١. وعمليات فرضية لتفاعل التجهيز، فإن دخول أنزيمات مشابهة يمكن تخيلها ضمن خلية النبات. زيادة على ذلك نظراً لأن PSTVd يمثل في كثير من الاعتبارات على أنه صف Class كبير من الفيروسات، فإن المقدرة على التجهيز بواسطة RNase T₁ يمكن أيضاً أن يلزم للفيروسات الأخرى. لمثل هذه الدراسة فإن العالم السابق ذكره استعمل نسخة مستقيمة أطول من وحدة الطول (٨٥ نيوكليتيده إلى ٣٥٩ لكل واحد إلى ١٠٦ بإضافة ١٢ نيوكليتيده على النهاية 5' وإضافة ١٣ نيوكليتيده على النهاية 3')، وبالتالي فإن النسخة تحتوي على الجزء المركزي من UCCR بمقدار الضعف، على النهاية 5' ونهاية 3'. إن أربعة من 5'-vector النيوكليتيدهات المجاورة للتتابع النوعي لـ PSTVd تكون متماثلة لتتابع G80 PSTVd إلى U 83، وبالتالي فقط فإن الـ C84 تكون غائبة من خمسة نيوكليتيدهات أطول في PSTVd المتخصص الممتد على النهاية 5' للنسخة. إن الموقع G80 قد تحدد كموقع للقطع وإعادة اللحام في نسخة RNA ذو الخيط الموجب بواسطة RNase T₁. نظراً لأن هذه النسخة غنية بالكثير من مواقع G التي عليها apriori قطع ولحام يمكن أن يؤدي إلى دوائر مضبوطة من PSTVd، ولكن التفاعل الكامل كان ملاحظاً فقط على G80. من هذا يمكن الاستنتاج بأن التفاعل يكون موجهاً بواسطة تركيب ثانوي خاص للنسخ.

بناء فيروس CEVd في المعمل:

لقد استعملت كلونات cDNA الفيرونية المعدية على نطاق واسع لدراسة التتابع المطلوب لتضاعف ومرضية الفيروس بواسطة طريقة Site Directed mutagenesis. كما وأن حيوية كلونات DNA ونسخها الخاصة تعتمد على وجود تتابع في فيروس أطول من وحدة الطول في تركيبات الـ DNA. بعض كلونات الـ Monomeric أيضاً تكون معدية كنتيجة لتزامن وجود تتابعات الفيروس في

الجزئيات الناقلة والتي تؤدي إلى تكوين أطول من وحدة الطول لـ cDNAs. تحتوي تخضيرات الفيرويد من النباتات على نسبة من الجزئيات فى شكل مستقيم والذي يكون عالى الحيوية (معدى) ويبدو أنه يحتوى على نهايات 2', 3'- cy- clic phosphate والتي ذكر بأنها ضرورية للحوية (العدوى).

فى هذا البحث نذكر طريقة بناء فيرويد اكسوكورتز الحمضيات المعدى بنفس الطول فى المعمل، لنسخ ال Monomer وفيرويد دائرى CEVd موثوق به دون اللجوء إلى إجراءات الكلونة. تحتوى النسخ المعدية نهايات triphosphate 5'- و 3'- OH وفى هذا البحث أمكن إثبات أن 2, 3 - cyclic phosphate ليست خطوة أولية Prerequisite فى الحوية.

١ - إكثار وتنقية فيرويد CEVd :

تجهز نباتات طماطم *Lycopersicon esculentum* Mill cv. Rutgers فى طور النمو الفلقى وتحقن ميكانيكياً بسلالة شديدة من فيرويد CEVd وتحفظ على درجة حرارة ٢٧ - ٣٠م كما فى الطريقة التى ذكرها Rezaian et al سنة ١٩٨٩. بعد ظهور الأعراض يؤخذ مستخلص الفيرويد من النباتات (حسب طريقة Rezaian سنة ١٩٩٠) وينقى ويتم ذلك بواسطة الكروماتوغرافى السليلوزية ثم يتبع ذلك طريقة الهجرة الكهربائية فى الجيل ثنائية الاتجاه كما ذكرها Rezaian سنة ١٩٨٩.

٢ - بناء cDNA :

يتم بناء cDNAs ثنائية الخيط بواسطة عملية النسخ العكسى الموحد Combined reverse transcription ويجرى عملية إكثار amplification باستعمال CEVd نقى كقالب وإن واحداً من الزوجين المختلفين من Oligonucleotide المصنعة تستعمل كقالب شكل ٢٩. تبنى مجموعة النيوكليوتيدات القصيرة Oligonucleotides باستعمال طريقة Applied Biosystems 391 DNA Synthesizer وتنقى على لفائف OPC حيث أنها تصمم بطريقة معينة.

يلزم فى هذه العملية ستة بوادئ primers ويرمز لها P_1, P_2, P_3 وتركيبها كالآتى:-



وهناك P_5, P_6 سنذكرها فيما بعد.

يتكامل P_1 مع P_3 حيث أن مركز 38 مع 69 فى (P_1) و 300 مع 330 (P_3)

شكل (٢٩) من CEVd - A. أما P_2 و P_4 تشتمل T_7 RNA polymerase محفز residues¹⁻¹⁸ وتتابعات CEVd ذات المعنى Sense متوافقة مع residues 70 (P₂) و 86 و P_4 331 - 346 من هذا الفيرويد (شكل ٢٩). إن ذات الموقع ١٨ المكتوبة بخط أسود غامق فى الشكل هى فى هذه البوادئ مشتركة للقطعتين ومتوافقة مع الموقع ٧٠ فى P_2 أو ٣٣١ فى P_4 فى جزئ CEVd.

يؤخذ ٥٠ نانوغرام من CEVd - A وتمزج مع ١٠٠ ضعف مولر زيادة لكل من هذه البوادئ المنتقاة وتسخن على ٨٥ م لمدة ٢ دقيقة. بعد ذلك يجرى عملية نسخ عكسى مرتبط وإكثار عددي فى ٥٠ ميكولتر تشتمل القالب والبوادئ، ١٠ مللى مول Tris - Hcl (على درجة حرارة الغرفة العادية ٢٥ م ورقم حموضة ٨,٣)، ٥٠ مللى مول KCl، ٢ مللى مول $MgCl_2$ ، ١٠ ميكو غرام / مللتر جلاتين، ٢٠٠ ميكرومول لكل dNTP، وحدتين AMV من أنزيم النسخ العكسى Promega، ووحدة واحدة من أنزيم Taq DNA Ploymerase (Promega) يحضن المخلوط على ٤٢ م لمدة ١٥ دقيقة يتبع ذلك ٣٠ دورة PCR على جدول مقسم حسب الآتى: ١ دقيقة على ٩٤ م، ٢ دقيقة على ٥٥ م، ٣ دقيقة على ٧٢ م. إن

ال DNA الذى ازداد عدده وعمل بأنزيم RNase (١٠ ميكوغرام / مل على ٣٧م لمدة ٣٠ دقيقة) وتنقى بواسطة الهجرة الكهربائية فى أجروس منخفض نقطة الذوبان.

٣ - النسخ فى المعمل *In Vitro* transcription :

يحضر قالب DNA (١٠٠ نانوغرام) وينسخ بأنزيم T₇ RNA Polymerase بشكل أساسى كما هو مذكور فى طريقة Melton et al سنة ١٩٨٤. بالإضافة إلى القالب فإن التفاعلات تشتمل ٠,٥ مللى مول لكل rNTP و ٤٠ مللى مول - Tris HCl, pH 7.6 و ٦ مللى مول كلوريد مغنيسيوم و ٠,١ ميكوغرام لكل ميكولتر أسيتيلتيد BSA (Promega)، ٥ مللى مول DTT و ٠,٢ وحدة ميكوغرام لكل ميكولتر أنزيم T₇ RNA Polymerase فى حجم كلى من ١٠٠ ميكولتر. يتبع ذلك التحضين على درجة ٣٧م لمدة ٣٠ دقيقة. المخاليط المنسوخة تستعمل إما مباشرة للحقن أو تعامل بـ ٠,١ وحدة لكل ميكولتر RNase - Free DNase أو مائة ميكوغرام لكل ملتر RNase - Free DNase على درجة حرارة ٣٧م لمدة عشرة دقائق قبل الحقن. تختبر مهضومات النيوكلييز بواسطة عينات Electrophoresing لكل مخلوط تفاعل على Polyacrylamide gel مدتر ٦.٦ محتويًا ٨ مول يوريا يتبع ذلك الصبغ بالفضة. تكون النسخ المعدة للاستعمال فى نهاية تفاعلات التكيف (التعديل) قد استخلصت بالفينول وأجرى لها ترسيب بالايثانول قبل المعاملات الأخرى.

٤ - تحويل خمسة فتحة الطرفية وتحليق نسخ RNA :

Modification of 5⁻ termini and Circularization of RNA transcripts.

إن جزيئات RNA المنتجة بواسطة النسخ فى المعمل تحتوى نهايات 5⁻ triphos- phate و 3⁻ OH. إن النهايات 5⁻ triphosphate يجرى لها تحويل لتصبح 5⁻ OH وذلك عن طريق تحضين حوالى ١٠٠ نانوغرام من RNA مع وحدة واحدة من

أنزيم RNase Calf intestinal phosphatase يتبع ذلك الاستخلاص بالفينول ثم الترسيب بالايثانول. لقد أنتجت نهايات 5'- Monophosphate باستعمال نسخ مستقيمة مزالة عنها الفسفرة و ATP غير مشبعة وأنزيم Polynucleotide Kinase. يستعمل تفاعل متوازي مع ATP - $[^{32}P]$ لدمج Monitor phosphate. أما بالنسبة للتحليق فإن RNA المعامل بالكينيز يسخن على درجة 65 م لمدة 10 دقائق لتثبيط الكاينيز ثم بعد ذلك يحضن مع T₄ RNA ligase.

5 - تحديد التتابع في نقط إتصال الربط في الطبيعة:

Determination of The Sequence of The In Vivo Ligation Junction.

تعزل الفيروسيدات الذرية (Progeny) من نسيج مصاب بنسخة مستقيمة من CEVd أنتجت باستعمال البوادئ P₁ و P₂ (CEVd - T₁) كما ذكر سابقاً وأجرى لها إكثار بواسطة النسخ العكسي / PCR باستعمال P₅ و P₆ وتركيبهما كالآتي.



$[dCTGCTGGCTCCACATCCGA] = P_6$ تكون مرتبطة مع نيوكليوتيدات 175 إلى 198، ونيوكليوتيدات 199 إلى 217 من CEVd بالترتيب شكل 29. إن ال DNA الذي حصل له إكثار أجرى له عملية تنقية بالهجرة الكهربائية في أجروس ذو نقطة ذوبان منخفضة وحصل له تسلسل مباشرة بواسطة DNA T₇ polymerase (Bachmann et al سنة 1990).

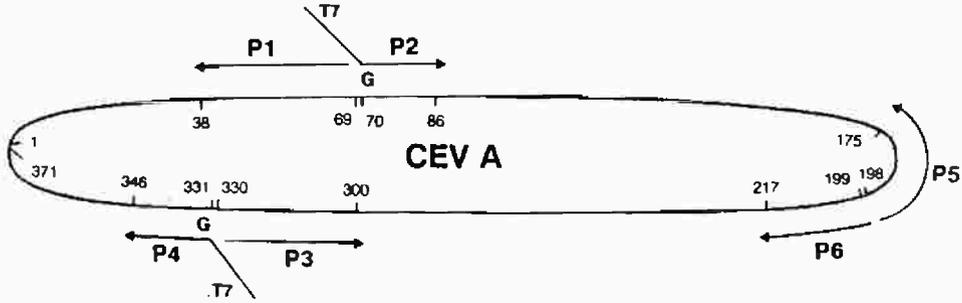
النتائج Results :

1 - توضيح لبناء الفيروسيدات في المعمل :

Scheme For The In Vitro Synthesis of Viroids

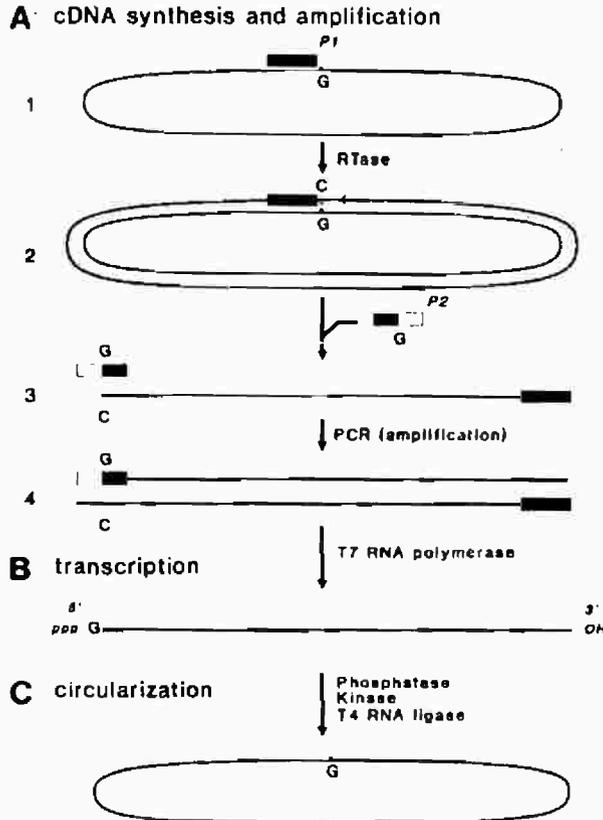
الخيط الأول البادئ Oligo deoxy ribonucleotide (شكل 30 P₁) يختار من أى منطقة من الفيروسيد 5' إلى آخر قاعدة G ويعاد إتحاده إلى RNA الفيرويدي. يؤدي النسخ العكسي إلى طول كامل من cDNA يحتوي نهايات 3' فى C. الخيط

البادئ الثاني (شكل ٣٠، P₂) يحتوى على ال ١٨ نيوكليتيده من T₇ يحفز البناء فى مواقع بدء العمل وترتبط مع تتابع حوالى ١٥ نيوكليتيده مكتملة لنهاية 3' من ال cDNA. النهاية G فى موقع ١٨ فى P₂ تشبك أو تربط القطعتين وتكون مكتملة إلى C-3' من الخيط الأول من DNA. بناء الخيط الثانى وإكثار ال DNA يتحصل عليه بواسطة طريقة PCR. إن ds DNA المتحصل عليه يحتوى على محفز كامل من T₇ RNA polymerase وتشفر لتتابع الفيرويد بالطول المضبوط. يتم نسخ ال DNA بواسطة T₇ RNA polymerase وينتج فيرويد مستقيم كامل الطول. إن RNA المستقيم يمكن أن يتحلق بواسطة أنزيم الربط RNA ligase بعد أن يحدث تحورات فى 5'-triphosphate إلى Monophosphate.



شكل رقم ٢٩:

مواقع برايمرز متخصصة تستعمل فى تفاعل cDNA / PCR وتتابع ذرية CEVd. برايمر P₁ ، P₃ ، P₅ متكاملة ذات معنى أما برايمر P₂ ، P₄ و P₆ كانت ذات معنى مع الفيرويد. برايمر P₂ و P₄ تحتوى بروموتربولى ميريز T₇ RNA. أما برايمر P₅ و P₆ كانت تستعمل للإكثار وتتابع ذرية RNA الفيرويدى. رؤوس الأسهم تشير إلى اتجاه البناء.



شكل رقم ٣٠ :

شكل تخطيطي لبناء الفيروسات في المعمل. (A) بناء cDNA يجرى عن طريق إعادة الاتحاد مع برايمر P₁ بقالب الفيرويد الدائري (خطوة ١) يتبع ذلك نسخ عكسي مؤدياً إلى جزئ منتهياً بنهاية C (خطوة ٢). أما البرايمر P₂، خطوة (٣) يحوى مشجع T₇ ويستعمل للإكثار في تفاعل PCR (خطوة ٤). النسخ B والتخليق C مشروحة في الكتاب.

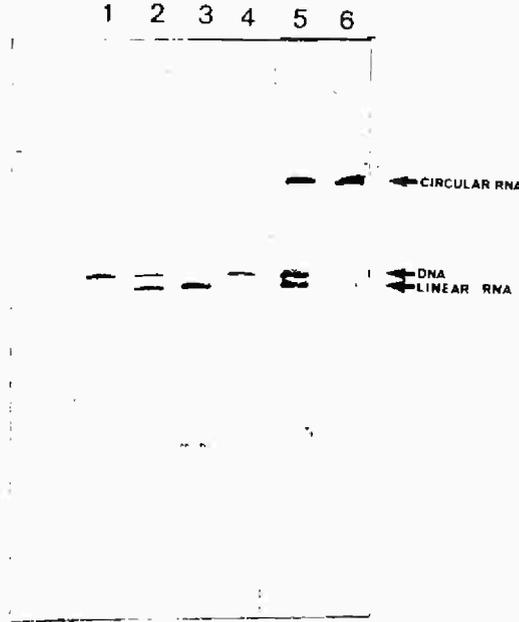
٢ - بناء الأشكال المستقيمة والدائرية من فيرويد اكسوكورتز الحمضيات:

Synthesis of Linear and Circular Forms of CEVd

لقد تم بناء فيرويد اكسوكورتز الحمضيات في المعمل وظهرت بوضوح نشاطاته الحيوية في تجارب على النبات العائل. إن الفيرويد CEVd - A هو خيط مزدوج من cDNA مندمج مع المحفز T_7 قد أنتج (شكل ٣١ شريحة ١) بواسطة عملية النسخ العكسي / PCR وإجراءات استعمل فيها البودئ P_1 و P_2 شكل ٢٩. إن ds DNA قد عومل بأنزيم Ribonuclease لاستبعاد أى بقايا. يستعمل CEVd بشكل أساسى كقالب وبعد التنقية ينسخ بواسطة T_7 RNA Polymerase لانتاج منتج من RNA وحيد الخيط مساوياً لجزئ مستقيم من CEVd - A بنهايات تصل حتى رقم ٦٩ و ٧٠ (شكل ٣١ شريحة ٢، $CEVd - T_1$). إن هوية نسخة من- CEVd T_1 قد تأكدت بواسطة الهضم بأنزيمات DNase و RNase (شكل ٣١ شريحة ٣ و٤). يتبع ذلك الهجرة الكهربائية تحت ظروف الدنترة، إن نسخة من $CEVd - T_1$ لها نفس القابلية للتحرك والانتقال كما فى $CEVd - A$ المستقيم ذو العدد ٣٧١ نيوكليتيده (شكل ٣١ شريحة ٣، ٦) موجود فى تخضير منقى من الفيرويد من نباتات مصابة.

النسخ الدائرية المقفولة التكافؤية قد أنتجت من $CEVd T_1$ RNA المستقيم المتحصل عليه ثم يتبع بعد ذلك إنقلاب للنهية triphosphate 5^- إلى مونوفوسفيت عن طريق المعاملة أولاً بأنزيم الفسفاتيز ثم بعد ذلك بأنزيم Polynucleotide Kinase بعد التحضين مع T_4 RNA ligase فإن نسبة من النسخ المستقيمة كانت قد تحلقت وكانت متساوية فى الحركة مع $CEVd - A$ (شكل ٣١ شريحة ٥، ٦).

إن البودئ P_3 و P_4 شكل ٢٩ كانت قد استعملت فى تفاعل موازى لانتاج أنواع أخرى من CEVd المستقيم بنهايات على ٣٣٠ و ٣٣١. هذه النسخة الثانية كانت قد استعملت لإختبار إمكانية الانتاج لهذا التكنيك ولفحص النسخ المبتدأة من مواضع مختلفة على جزئ CEVd الدائرى فيما إذا كانت معدية (حيوية).



شكل رقم ٣١ :

بناء أشكال الفيروس CEVd المستقيمة والدائرية. الشريحة ١ = ناتجة عن طريقة التكبير بواسطة PCR للحمض cDNA الفيروسي CEVd يحتوي مشجع T_7 ، أما شريحة ٢ = ناتجة عن إكثار DNA و RNA المستقيم بعد النسخ. شريحة ٣ = ناتجات النسخ معاملة بـ DNase. أما شريحة ٤ = ناتجات نسخ معاملة بأنزيم RNase. شريحة ٥ = ناتجات إزالة الفسفات. نسخ Kinased الناتجات معاملة T_4 ، RNA ligase، شريحة ٦ = CEVd - A مأخوذ ثانية من النباتات المصابة. النسخ الصغيرة تكون غالباً نتيجة نهايات غير ناضجة.

٣ - حيوية فيروس اكسوكورتز الحمضيات المصنع في المعمل:

Infectivity of In Vitro Synthesized CEND

بعد حقن نباتات الطماطم بحوالي ٣٠ نانوغرام / ميكولتر من كلا النوعين (نسخة مستقيمة) CEVd - T_1 و CEVd - T_2 ، فقد أظهرت تشوه كبير في ساق النبات وتقرم يدل على الإصابة بالفيروس CEVd - A خلال ثلاثة أسابيع من الحقن (جدول ١٦). لم تتأثر الحيوية بمعاملة مخلوط النسخ بأنزيم DNase ولكن تبطل الحيوية بالمعاملة بأنزيم RNase. إن نباتات الطماطم التي حقنت بكمية أكبر

من ميكوغرام / ميكولتر من قالب CEVd DNAs لم يظهر عليها أية أعراض ، هذا يدل على أن الحيوية كانت بسبب النسخة الكاملة لـ RNA .

أعيد اكتشاف ذرية الفيرويد من نباتات الطماطم المحقونة بنسخة CEVd - T₁ وأثبت أنها دائرية بواسطة الهجرة الكهربائية في الجيل ثنائي الاتجاه. إن تحليل التتابع لذرية الفيرويد أثبت أنها كانت مماثلة للفيرويد الأصلي في منطقة إتصال الربط في تجارب المعمل .

جدول رقم ١٦ : حيوية فيرويد اكسوكورنيز الحمضيات المبنى في المعمل :

الحيوية						الحمض النووي الأولي والتركيز		اللقاح
5-10	4-10	3-10	2-10	1-10	0/10	RNA	DNA	
					0/6	—	1000	CEVd - T ₁ PCR DNA
					0/6	—	1000	CEVd - T ₂ PCR DNA
					6/6	30	1	Untreated - CEVd - T ₁
					6/6	30	0	DNase + Transcription
					0/6	0	1	RNase + Mixture
					6/6	30	1	Untreated - CEVd - T ₂
					6/6	30	0	DNase + Transcription
					0/6	0	1	RNase + Mixture
0/6	0/6	0/6	0/6	3/6	6/6	30	0	5'- Endmodified Triphosphate
0/6	0/6	0/6	1/6	4/6	6/6	30	0	CEVd - T ₁ RNA Monophosphate
0/6	0/6	0/6	0/6	4/6	5/6	30	0	Transcript Hydroxyl
0/6	2/6	5/6	6/6	6/6	N.T	30	—	CEVd - A
					0/6	—	—	T _E buffer

ملاحظات : .

التركيز نانوغرام / ميكولتر. N.T= لم تختبر. الحيوية = عدد النباتات التي تظهر أعراض / عدد النباتات المحقونة.

٤ - تأثير تحويل النهاية الطرفية خمسة فتحة على حيوية النسخة المستقيمة :

Effect of 5' - terminal modification on Linear Transcript Infectivity

أن تأثير التحور فى النهاية الطرفية 5' على حيوية نسخة CEVd - T₁ إختبرت بواسطة إنتاج نسخ تحتوى نهايات 3'-OH مرتبطة مع 5'- triphosphate أو monophosphate أو مجموعة OH - وأنجزت إختبارات الحيوية بواسطة سلسلة تخفيفات .

التركيز الأولى للنسخ والفيرويد ١٠^{-٥} استعملت لدراسة الحيوية كانت ٣٠ نانوغرام لكل ميكولتر وتخفيفات حضرت لغاية ١٠^{-٥} . حقنت النباتات بتركيز ١ ميكولتر من اللقاح لكل فلقة وتركت لتنمو ثم أخذت عنها الملاحظات .

وجد أن CEVd - A الدائرى النوع الأصلى له نقطة تخفيف قصوى للاحتفاظ بحيويته وكفاءته هي ١٠^{-٥} . وعلى أية حال فإن النسخ المستقيمة كانت فعلاً أقل حيوية حيث تبدى نقطة تخفيف ١٠^{-٣} لـ RNA المستقيم المحتوى 5'- monophosphate و ١٠^{-٢} لـ RNAs المستقيمة التى تحتوى 5'- triphosphate أو OH - 5' (جدول ١٦) .

مناقشة النتائج

فى البحوث المذكورة سابقاً ذكر أنه تم بناء نسخاً معدية مستقيمة مختلفة لها الطول الكامل ومتوافقة مع CEVd (الحمض RNA) ، كل من هذه النسخ تسبب أعراض مرضية فى نباتات الطماطم نموذجية للعزلة الشديدة من CEVd وتؤدى إلى إنتاج ذرية CEVd دائرية تشبه الطراز الأصلى . إن الدراسات السابقة للأشكال المستقيمة من الفيرويدات قد استعملت الفيرويدات المستقيمة التى نتجت إما بالحدوث الطبيعى لجزئ مستقيم عزل من نسيج مصاب أو RNA فيرويدى دائرى حدث له استقامة بواسطة فعل أنزيمات Nucleases أو أيونات Mg²⁺ . إن التحضير لهذا النوع يمكن أن يحصل له تلوث بواسطة RNA الدائرى ويصبح محتويًا على

خليط غير متجانس من جزيئات غير مستقيمة أنتجت بواسطة أحداث الثغرة أو Nicking (إحداث فتحة صغيرة فى خيط الحمض النووى) على مواقع مختلفة فى الجزيء الدائرى وبالتالى يصعب تفسير نتائج الإختبارات الحيوية.

إن الطريقة المذكورة فى هذا البحث تتغلب على هذه المشاكل وتؤدى إلى إنتاج تخضيرات متجانسة من جزيئات فيرويد مستقيمة مساوية لتلك المنتجة بواسطة طريقة الثغرة المفردة على مواضع متخصصة خالية من التلوث بـ RNA الدائرى. هذه الجزيئات تكون مناسبة جداً (مثالية) لدراسة حيوية الفيرويدات المستقيمة وتأثيرات تحورات النهايات الطرفية على حيوية الفيرويد المستقيم.

إن الأشكال المستقيمة الحادثة طبيعياً للفيرويدات تتجمع فى النسيج المصاب، من المحتمل أن تكون كوسيطات تظهر فى نموذج التكاثر (النسخ) بطريقة الدائرة المتلفة. بغض النظر عن الأبحاث السابقة، فإن جميع الدراسات قد أظهرت أن هذه الجزيئات المستقيمة الحادثة طبيعياً أنها معدية. إن الأشكال المستقيمة التى تحدث طبيعياً لفيرويد تقزم الأقحوان وفيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس هى معدية مثلها مثل الأشكال الدائرية الخاصة. بينما الشكل المستقيم لفيرويد تقزم الأقحوان قد ذكر بأنه ناتجاً عن الانشطار العشوائى، وأن فيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس يبدو بأنه ناتج بواسطة الانشطار الذى يحدث فى بضع مواقع خاصة. إن هذه الجزيئات المستقيمة لفيرويد PSTVd قد وصفت وذكر لها مميزات أكثر وتبين بأنها تحتوى نهايات طرفية 5'-OH و 3'-cyclic phosphate. إن التجمعات غير المتجانسة من جزيئات فيرويد PSTVd التى أحدثت فيها ثغرة صناعية (nicked) المنتجة باستعمال Nucleases و Cl₂ و U₂ التى أيضاً تحتوى نهايات طرفية 5'-OH و 2'-cyclic phosphate، قد تبين أيضاً أنها تظهر حيوية كاملة، بينما الجزيئات المشابهة التى تحتوى نهاية 3'-OH و 5'-phosphate المنتجة بواسطة الثغرة مع S1 nuclease فإنها تعتبر غير معدية. هذه البيانات تقترح بأن حلقة 2', 3'-cyclic phosphate هى خطوة أولية أساسية للحوية (العدوى). وعلى أية حال فإن نتائج

هذا البحث على فيرويد اكسوكورتز الحمضيات لم تدعم هذه الفكرة (النظرية) بسبب أن النسخ المستعملة في هذه الدراسة كلها تحتوي OH⁻³ وكانت معدية ولو على كميات صغيرة بالمقارنة مع الفيرويد الدائري.

جزيئات فيرويد PSTVd والتي أجرى لها عملية الثفرة صناعياً nicked باستعمال Mg²⁺ لاتاج أشكال مستقيمة مع مخلوط من نهايات 2⁻ و 3⁻ phosphate مقترنة مع OH⁻⁵ أظهرت بأنها ذات حيوية خاصة منخفضة بأضعاف ٣١٠ - ٤١٠ أو أقل منه في الفيرويد الدائري مشابهة بذلك لحيوية الجزيئات المستقيمة المذكورة هنا. يبدو من المحتمل أن أطراف 2⁻ 3⁻ Cyclic Phosphate يجب أن تكون موجودة في ال RNA المستقيم ليظهر حيوية كاملة، ولأن الجزيئات تحتوي مجموعات أخرى على terminus 3⁻ دائماً يبدو بأنها تظهر مستوى منخفض من الحيوية. إن التحوير أو التعديل في ال End⁻⁵ يظهر بأن له قليلاً أو بدون تأثير على حيوية النسخ المستقيمة عند مقارنته بالفيرويد الدائري.

هناك نوع جديد ذو حيوية من RNA ligase في مستخلصات جنين القمح والذي يتطلب أطراف 2⁻, 3⁻ cyclic phosphate وإيضاً إما 5⁻ phosphate أو OH⁻⁵ قد تم وصفه ولقد استخدم في المعمل مثل Viroid ligase. ولقد تبين أن نسخ CEVd المستقيمة والتي لا تحتوي النهاية الطرفية 2⁻, 3⁻ cyclic phosphate كانت معدية وهذا يؤدي إلى الاعتقاد بأنه إما النوع الثاني من ال ligase يكون موجوداً في العائل النباتي أو أن terminus 3⁻ تخضع لعملية الفسفرة في الطبيعة In Vivo Phosphorylation لاتاج 2⁻, 3⁻ cyclic phosphate والتي يمكن فيما بعد أن تعمل كمادة تفاعل لأنزيم ال Ligase الموصوف سابقاً.

المخطط الثاني يبدو أنه أكثر احتمالاً، ولأن مستخلصات جنين القمح لم تظهر نشاطاً يمكن اكتشافه لأنزيم ال Ligase عندما يحضن مع جزيئات فيرويد مستقيم

أنتجت بواسطة S1 nuclease والذي يمتلك نهاية طرفية OH⁻³ و phosphate⁻⁵ مشابهة لواحدة من النسخ التي أظهرت أنها معدية في هذه الدراسة.

إن الفيروسات لم تظهر أى تشفير للبروتينات وتبقى عملية إحداث الطفرات Mutagenesis أكبر طريقة لتحليل وظائف تركيبها. وعلى أية حال فإن دراسة إحداث الطفرات قد تبين بأنها محدودة بسبب الحاجة إلى بناء كلونات DNA معدية فى الشكل head - to - tail dimers وأيضاً بسبب الحاجة لبناء أعداداً كبيرة من الطافرات mutants من التى معظمها يكون غير قابل للحياة. إن نظام بناء ال RNA المذكور فى البحث السابق يتجنب الحاجة إلى كلونة وهو مناسب بشكل خاص لسرعة إحداث الطفرات الموجهة لمواقع معينة - di - Rapid site reected mutagenesis فى ال RNA الدائرى بسبب بادئ Oligonucleotide محتوياً طفرات يمكن أن تختار من أى منطقة فى جزئ⁵ إلى نهاية موقع G. فمثلاً بالإضافة إلى الفيروسات فإن الفيروسات و Hepatitis delta virus RNA وخمائر 20 S RNA replicon يمكن أن تبنى بواسطة هذا النظام. إن أنظمة بناء RNA داخلاً فى بوايد Oligonucleotide محتوية أنزيم RNA polymerase المعتمد على DNA محفزاً للتتابع قد استعمل قبل ذلك لتكاثر RNA من قالب DNA مكلون أو لإنتاج RNA فيروسى معدى محتوياً إضافة لذلك نيوكليوتيدات 3⁻ termind من PCR DNA مكلون. كذلك فإن النظام المذكور هنا فإنه لا يتدخل فى إجراءات كلونة ويؤهل البناء فى المعمل للحجم المضبوط ل RNAs ليس فقط من قوالب RNA الدائرى ولكن أيضاً من RNAs المستقيم المحتوى 5⁻ terminal G residue. كذلك فإن mRNAs ويمكن أيضاً RNAs الفيروسى أن تصنف فى هذا المخطط، وهذا التكنيك يرتبط مع إجراء غطاء RNA لإنتاج RNAs فيروسى نشيط بيولوجياً، بدون شك سوف يستخدم فى الدراسات على مثل هذه الجزيئات.

ثانياً: - المعالجة بالحرارة المنخفضة ومزرعة القمة المرستيمية لاستبعاد أربعة فيرويدات من النباتات المصابة:

A Low Temperature Therapy and Meristem - Tip Culture For Eliminating Four Viroids From Infected Plants

مقدمة:

إن الجمع بين المعالجة الحرارية ومزارع القمة المرستيمية قد استعمل منذ مدة طويلة كطريقة للتخلص من الفيروسات من النباتات المصابة، ولكن ثبت بأنها غير فعالة إلى حد ما في التخلص من فيرويد الدرنة المغزلية في البطاطس والتخلص من فيرويد تقزم الأقحوان من النباتات المصابة بالفيرويد في البطاطس والأقحوان. هذا لا يثير الدهشة إذا علمنا جيداً أن الفيرويدات تخترق الخلايا المرستيمية بسهولة أكثر من الفيروسات وأن درجات الحرارة العالية تناسب تناسخ الفيرويد. عندئذ فإن المحاولات لاستبعاد الفيرويدات من النباتات المصابة عن طريق المعالجة بالحرارة المنخفضة مرتبطة مع مزارع القمة المرستيمية يبدو أنها ممكنة. وفي الحقيقة أمكن الحصول على نباتات بطاطس خالية من فيرويد الدرنة المغزلية وكذلك نباتات حشيشة الدينار (HOP) خالية من فيرويد تقزم حشيشة الدينار قد تم بناء على استعمال هذه الطريقة:

تؤخذ نباتات بطاطس الصنف المزروع Prosna من عقل ساق أو درنات ثم تحقن بسلاطات شديدة من فيرويد الدرنة المغزلية في البطاطس (s - PSTVd)، بالإضافة إلى نباتات الأقحوان الصنف المزروع Bonnie Jean المصابة بفيرويد تقزم الأقحوان CSVd والصنف المزروع Deep Ridge المصاب بفيرويد التبرقش الشاحب في الأقحوان ChCMVd والصنف المزروع Mistletoe المصاب بفيرويد الثمرة الباهتة

ملاحظة: قام بهذا البحث إثنان من العلماء في وارسو (بولندا) والذي أمدني بالبحث الدكتور - E. Paduch

.Cichal

في الخيار CPFD و تنمى فى مرآقد نمو على درجة حرارة ٥م وإضاءة ١٦ ساعة يومياً مع كثافة ضوئية 5.0001X. أما نباتات الكنترول من نفس الأنواع والأصناف المزروعة والتي أصيبت بنفس الفيرويد نمت فى صوباً زجاجية تحت ظروف نمو قياسية.

درنات بطاطس من الصنف Azalia والصنف Irys المصابة بالسلالة الشديدة من فيروس الدرنة المغزلية فى البطاطس s - PSTVd أو السلالة المعتدلة m - PSTVd تحتفظ فى ثلاجة على درجة حرارة ٦ - ٧م. أما الدرناات الكنترول من نفس الأصناف والتي أصيبت بنفس الفيرويدات حفظت على درجة حرارة الغرفة العادية.

بعد ٣ و ٦ شهور تقطع القمم المرستيمية من السيقان أو نموات الدرنة من النباتات المعاملة والكنترول. تظهر سطوح المواد النباتية عن طريق غمرها فى ٩٦٪ إيثانول لمدة ٣٠ ثانية ثم تشطف بماء معقم. قطعت القمم المستيمية (قبة المرستيم مع واحدة أو إثنين لفة إبتدائية) فى ظروف معقمة بنصل حاد معقم. نقلت القمم المقطوعة على ورق ترشيح يعمل كموصل إلى أنابيب إختبار بايركس (١ سم قطر و ٧ سم طول) وضع فيها ٤ مللتر محلول بيئة يسمى بيئة Murashinge & Skoog (هذه البيئة ذكرها كل من Mellor & Smith سنة ١٩٧٧) والتي كانت قد عقت مسبقاً لمدة ٣٠ دقيقة فى الاوتوغليف على ضغط جوى واحد. تغلق أنابيب الإختبار بغطاءات قطنية من نوع صوفى ويقطع من Parafilm وحفظت على دجة حرارة ١٦ - ٢٠م و ١٤ ساعة إضاءة يومياً وكثافة ضوئية 2.0001X.

عندما أصبح طول النباتات النامية من الدرناات بطول ٣ سم وعندما تكون لها نظام جذرى جيد نقلت إلى أوعية بلاستيكية صغيرة مملوءة بمخلوط (٢:١) - Peat moss ورمل. بعد ١٠ - ١٤ يوم أخرى نقلت إلى أوعية بلاستيكية مملوءة بمواد مناسبة للنمو ثم تركت لتنمو تحت ظروف الصوباء الزجاجية المثالية.

إختبر وجود الفيروس في النبات بعد ٢، ٤ و٦ شهور من النمو في الصويا الرجاجية. النباتات المفردة إختبرت بواسطة الهجرة الكهربائية في Polyacrylamide gel وبواسطة الإختبارات الحيوية. نباتات الطماطم صنف Rutgers استعملت ككاشف لكل من PSTVd السلالة الشديدة والمعتدلة، نباتات الأقحوان الصنف المزروع Deep Ridge كاشف لـ ChCMVd ونباتات الأقحوان الصنف المزروع Bonnie Jean كاشف لكل من CSVd و CPFVd. هذه الأصناف ثبت وأنها نباتات كاشفة جيدة للفيروسات في تجارب سابقة.

النتائج :-

نباتات الأقحوان تحملت ظروف درجات الحرارة المنخفضة والكثافة الضوئية المنخفضة بصفة أحسن من نباتات البطاطس جدول ١٧. كانت أقل درجة تحمل لنباتات البطاطس هي النامية من الدرناات. فقط نبات مفرد واحد من ٢٠ نبات بقيت حية لمدة ٣ شهور تحت هذه الظروف وحتى هذا النبات المفرد مات قبل نهاية الستة شهور مدة المعالجة. أما نباتات البطاطس النامية من عقل ساق بقيت حية لمدة أطول نوعا ما وأربعة نباتات منها بقيت حية حتى نهاية الستة شهور مدة المعالجة. ومن ناحية أخرى فإن درناات البطاطس بقيت حية بصورة جيدة في ظروف المعالجة والتي كانت غالباً مثل الظروف المثالية لتخزين البطاطس جدول ١٧.

أما بالنسبة للقمم المرستيمية، تقريباً فإن نصفها قد نمت إلى نباتات ولا يوجد مشكلة فيما إذا كانت قد قطعت من نباتات الأقحوان أو البطاطس (جدول ١٧). لم يلاحظ أى تأثير لظروف المعالجة على بقاء المرستيمات حية. إن العدد الحقيقي للقمم المرستيمية التي بقيت حية يختلف من ٢٥ - ٩٠٪ للنباتات المختلفة ولكن يبدو أنها لم تتأثر بنوع النبات ولا بظروف المعالجة جدول ١٧.

إن الأعراض النموذجية للإصابة بالفيروسات ChMVd، CSVd و CPFVd كانت ملاحظة على نباتات الأقحوان النامية من قمم مرستيمية أخذت من نباتات

الكنترول الجاهزة فى الشهر الأول من نموها فى الصوبا الزجاجية. نباتات البطاطس النامية من قمم مرستيمية المأخوذة من مثل هذه النباتات أظهرت أعراض PSTVd بعد ٢ أو ٣ شهور من نموها فى الصوبا الزجاجية. جميع الفيرويدات الأربعة اكتشفت فى هذه النباتات بواسطة الاختبارات الحيوية أو بواسطة إختبار الهجرة الكهربائية فى Polyacrylamide gel .

ولسوء الحظ فإن الأربعة فيرويدات كلها اكتشفت أيضاً فى جميع النباتات النامية من القمم المرستيمية المأخوذة من النباتات التى قد نمت لمدة ٣ شهور فى ظروف المعالجة. الفيرويدات اكتشفت فى هذه النباتات بعد شهرين من النمو فى الصوبا الزجاجية (جدول ١٨) وبعد شهر أو شهرين جميع هذه النباتات أظهرت أعراض.

ومن ناحية أخرى ولا أى نبات من النباتات النامية من قمم مرستيمية المأخوذة من النباتات التى قد نمت لمدة ٦ شهور فى ظروف درجات حرارة منخفضة لم تظهر أعراض إطلاقاً للإصابة الفيرويدية خلال ستة شهور من النمو فى الصوبا الزجاجية. إن الإختبارات الحيوية وإختبارات الهجرة الكهربائية فى Polyacrylamide gel قد أثبتت أنه بعد شهرين من النمو فى الصوبا الزجاجية فإن أعداداً كبيرة من هذه النباتات كانت خالية من الفيرويدات. إعادة الإختبار لهذه النباتات بعد ٤ و ٦ شهور من النمو فى الصوبا الزجاجية أظهرت الوجود للفيرويدات فى بعضها ولكن لا تزال ١٨,٥ - ٨٠٪ من هذه النباتات خالية من الفيرويد جدول ١٨ .

الدرنات من نباتات البطاطس والعقل من نباتات الأقحوان التى ظهرت بأنها خالية من الفيرويد بعد ٦ شهور نمو فى الصوبا الزجاجية قد نمت إلى نباتات وهذه النباتات أختبرت ثانية لمعرفة وجود الفيرويدات فأعطت نتائج سالبة.

جدول ١٧: حصر لنباتات البطاطس والدرنات ونباتات الأقحوان في درجات الحرارة المنخفضة ثم وحصر للنباتات الناتجة من القمم المرستيمية لهذه النباتات.

عدد النباتات النامية من المرستيمات المقطوعة بعد المعالجة	عدد المرستيمات المقطوعة من النباتات (درنات) بعد المعالجة		عدد النباتات (درنات) معاملة قاومت المعالجة لمدة		المعاملة	الأجزاء النباتية والفرويد
	٣ شهور	٦ شهور	٣ شهور	٦ شهور		
—	٢	—	٣	١	٢٠	أ- بطاطس نوع Proсна - نباتات نامية من درنات
—	١٠	—	٤٠	—	٢٠	١- معالجة ٢- s - PSTVd
١١	٥	١٢	١٢	٤	٢٠	ب- بطاطس نوع Proсна نباتات نامية من عقل
١٠	١٥	٣٠	٣٠	—	٢٠	١- معالجة ٢- s - PSTVd
٤	٥	٨	١٠	٤	٤	ج- بطاطس نوع أزاليا - درنات
٧	٨	١٢	١٠	—	٥	١- معالجة ٢- s PSTVd
٧	١٠	١٨	٢٤	١٢	١٢	د- بطاطس نوع أيرس درنات
١٠	١٢	٢٤	٢٤	—	١٢	١- معالجة ٢- s PSTVd
١٠	١٢	٢٠	٢٤	١٢	١٢	١- معالجة ٢- m PSTVd
١٦	١٠	٢٤	٢٤	—	١٢	١- معالجة ٢- m PSTVd
٨	١٠	٢٠	٢٠	١٢	١٢	١- معالجة ٢- m PSTVd
١٠	١١	٢٤	٢٤	—	١٢	١- معالجة ٢- m PSTVd
٣٧	٢٨	٥٧	٥٧	١٩	١٩	ز- أقحوان نوع ديب راج
٣٥	١٩	٥٠	٤٥	—	١٩	١- معالجة ٢- ChCMVd
٢٧	٣٢	٧٥	٧٥	٢٥	٢٥	ح- أقحوان نوع بول جين
٣٠	٢٠	٦٥	٦٠	—	٢٥	١- معالجة ٢- CSVd
١٠	١٠	٣٠	٣٠	١٠	١٠	ط- أقحوان صنف مستيبينو
٢٥	١٥	٣٠	٢٥	—	١٠	١- معالجة ٢- CPFVd

جدول ١٨: كفاءة استبعاد أربعة فيرويدات من نباتات البطاطس والأقحوان باستعمال مزرعة القمة المرستيمية بعد المعالجة بالحرارة المنخفضة.

عدد النباتات الخالية من الفيرويد اعتماداً على الاختبار بعد فترة نمو في الصوباء الزجاجية	عدد النباتات النامية من المرستيم المقطوع			مدة المعالجة بالأشهر	المادة النباتية والفيرويد
	٢ شهر	٤ شهر	٦ شهر		
—	صفر	—	—	٢٥	كترول - بطاطس - نباتات الصنف بروستا
—	صفر	—	—	٥	٣ نباتات بطاطس نامية من الساق
٦	٩	٨	—	١١	٦ نباتات بطاطس نامية من عقل المعاملة بالفيرويد s - PSTVd
—	صفر	—	—	١٥	كترول - بطاطس - صنف بروستا نباتات
—	صفر	—	—	٥	٣ بطاطس صنف ازالا - درنات
١	٢	٢	—	٤	٦ s - PSTVd
—	صفر	—	—	٢٢	كترول بطاطس مزروعة صنف أيرس
—	صفر	—	—	١٠	٣ بطاطس درنات
٢	٥	٣	—	٧	٦ s PSTVd
—	صفر	—	—	٢٦	كترول بطاطس مزروعة صنف بروستا
—	صفر	—	—	١٢	٣ درنات صنف ازالا
٥	٧	٦	—	١٠	٦ m PSTVd
—	صفر	—	—	٢١	كترول بطاطس مزروعة صنف أيرس
—	صفر	—	—	١٠	٣ بطاطس درنات
٤	٦	٥	—	٨	٦ m PSTVd
—	صفر	—	—	٥٤	كترول الأقحوان
—	صفر	—	—	٢٨	٣ أقحوان صنف ديب راجد
٢٦	٣١	٢٩	—	٢٧	٦ فيرويد ChCMVd
—	صفر	—	—	٥٠	كترول أقحوان
—	صفر	—	—	٣٢	٣ أقحوان صنف بون جين
٥	١٥	٥	—	٢٧	٦ CSVd
—	صفر	—	—	٤٠	كترول أقحوان
—	صفر	—	—	١٠	٣ أقحوان صنف مستلوت
٨	٩	٩	—	١٠	٦ CPFVd

ثالثاً: - تثبيط إصابة الفيرويد بواسطة تعبيرات RNA مضاد المعنى فى النباتات المحولة وراثياً:

Inhibition of Viroid Infection by Antisense RNA Expression in Transgenic Plants

مقدمة :-

تعتمد هذه الطريقة على بناء جزيئات من RNA متكاملة مع mRNA الناتج من نسخ جين معين، ويطلق على هذا الأخير اسم Sense RNA (ذو معنى) نظراً لأنه يحمل الكودونات التى تتم قراءتها أثناء عملية الترجمة لانتاج بروتين فعال يحتوى على تتابع نوعى من الأحماض الأمينية. ومن جهة أخرى يطلق على النسخة المكاملة من RNA اسم مضاد المعنى "Anti Sense" نظراً لأن تتابع النيوكليوتيدات بها يكون معكوساً بالنسبة للتتابع على النسخة الأصلية مما يترتب عليه عدم إمكان قراءة كودونات شفرية صحيحة وذات معنى بل تقرأ على أنها كودونات إنهاء الترجمة فى أى إطار قراءة من الإطارات الثلاثة.

يؤدى توافر RNA مضاد المعنى مع mRNA المرسل الطبيعى لنفس الجين فى سيتوسول الخلية إلى حدوث تجاذب نوعى بينهما بحيث ينتج جزئ مزدوج هجين من RNA، وبديهي أنه لا يمكن ترجمة مثل هذا الجزئ المزدوج مما يعنى عدم الحصول على الناتج النهائى لتعبير هذا الجين (البروتين) وبالتالي يكون بمقدورنا تحديد وظيفة هذا الجين.

وتتلخص طريقة إنتاج RNA مضاد المعنى لجين ما فى الخلية فى الآتى :-

ملاحظة: قام بهذا البحث أحد عشر عالماً فى مركز أبحاث البيولوجيا الجزيئية فى ألمانيا والذى أمدنى بهذه المعلومات مشكوراً هو الدكتور Detldv Riesner وأنا أعرضه بشكل مختصر.

- ١ - كلونة الجين المطلوب دراسته.
 - ٢ - فصل التابع الشفري للجين عن منطقة البروموتور الخاص به باستخدام أنزيمات القطع المحددة المناسبة.
 - ٣ - إعادة إتحاد التابع الشفري للجين مع نفس البروموتور ولكن فى اتجاه معكوس التابع.
 - ٤ - إعادة إدخال هذا التابع المعكوس المتحد بالبروموتور. أى الجين المضاد المعنى إلى الخلية المضيفة بإحدى طرق التحول الوراثى.
- تكون المحصلة النهائية لهذه العملية هى أن الجين المعكوس التابع سيتم نسخه إلى نسخ RNA مضاد المعنى، وهذه بدورها عند اصطدامها بالنسخ الطبيعية لـ m RNA لنفس الجين (ذو المعنى) تتزوج معها مكونة جزئ RNA مزدوج لا يمكن ترجمته مما يؤدي إلى توقف إنتاج البروتين الذى يشفر له هذا الجين.
- لقد تم استخدام RNA مضاد المعنى فى إيقاف تعبير عدد كبير من الجينات فى كل من غير مميزة النواة ومميزة النواة. بالإضافة إلى استخدامه فى إيقاف تعبير الجينات معروفة الوظيفة فإنه يمكن استخدامه أيضاً فى التعرف على وظيفة الجينات المجهولة الوظيفة. إذ يمكن استخدام RNA مضاد المعنى فى إنتاج طفرات وظيفية بحيث يعطى الشكل المظهري الطافر للكائن الذى حدثت به هذه العملية ومعلومات هامة عن وظيفة الجين فى الخلية المتأثرة.
- ولكى نضمن الحصول على إيقاف تام للتعبير الجينى فإنه إما أن يستخدم بروموتور قوى جداً لدفع عملية نسخ التابع الشفري المعكوس أو أن يتم ادخال عدد كبير من نسخ RNA مضاد المعنى إلى الخلية المضيفة.
- (هذه المقدمة أخذت من كتاب البيولوجيا الجزيئية للدكتور محمد فتحى عبد الوهاب سنة ١٩٩٣).

استعمال RNA مضاد المعنى مع الفيروسيدات:

معظم التطبيقات التي أجريت باستعمال RNA مضاد المعنى والموجهة مباشرة ضد الجينوم الفيروسي أظهرت نجاحاً محدوداً. هناك تعبيرات أكثر فعالية للإصابة الفيروسية حصل عليها في حالة الفيروس ذو أَل DNA، الفيروسات المتجمعة (فيروسات الجوزاء Geminivirus). هذا من المحتمل أن يكون بسبب موقع التناسخ والتجمع للفيروس، فإن الفيروسات المتجمعة تكون في الأنوية بينما مع الفيروسات ذات RNA النباتية تكون موجودة في السيتوبلازم، وبالتالي فإن تضاعف الفيروسات المتجمعة وتناسخ RNA مضاد المعنى Antisense تحدث في نفس الموضع والذي يكون أكثر ملائمة لتكوين معقدات من مضاد المعنى وتتابعات الهدف، عند مقارنتها مع مواقع الفيروسات ذات RNA ومتطلباتها لنقل نسخ مضاد المعنى من النواة إلى السيتوبلازم وما يتبع ذلك من وقف للتناسخ.

هذه الحقائق تدعم فكرة أن الإصابة الفيروسية أيضاً يمكن تثبيطها بكفاءة بواسطة RNA مضاد المعنى antisense بسبب موقعها في النواة. إن عدم وجود دليل لأي ناخب مترجم للفيروسيدات وعدم وجود غطاء بروتيني، فإن جميع النشاطات الأنزيمية والوقاية ضد التحطيم وتجهيز وتخزين الفيرويد يجب أن تتم بواسطة العائل وأن المعلومات الوراثية لـ RNA الفيرويدي لا يمكن أن تكون التابع للبروتين ولكن يجب أن تكون لتركيبه الخاص.

من المفترض أن معظم الفيروسيدات تناسخ بسلوك غير متماثل شاملة ميكانيكية الدائرة الملتفة لانتاج أشكال minus - Sense RNA Oligomeric والتي تعمل كقوالب لـ Oligomers of plus - sense polarity والأخيرة تجهز فيروسيدات جديدة (خلفه) ذات وحدة طول وبالتحديد plus - polarity. وبالتالي فإن RNA مضاد المعنى يستطيع، في الأصل أن يتوجه إما ضد ذرية الفيرويد monomeric أو الوسيطات الموجبة ذات المعنى Plus - Sense intermediates بالإضافة إلى أنه يوجه ضد تناسخ الوسيطات Minus - Sense Oligomeric. إنه من غير

الممكن استعمال نسخاً Complete monomeric Copies من cDNA الفيرويدي لـ RNA مضاد المعنى الهدف في الطبيعة بسبب الطول الكامل لمكملات RNAs التي توجد كوسيطات تناسخ في النواة بأية طريقة كانت ولا تشكل بسهولة ds RNA في المعمل. زيادة على ذلك فإن التحول مع مثل cDNA الفيرويدي يمكن أن تحفز الإصابة في النباتات المحولة.

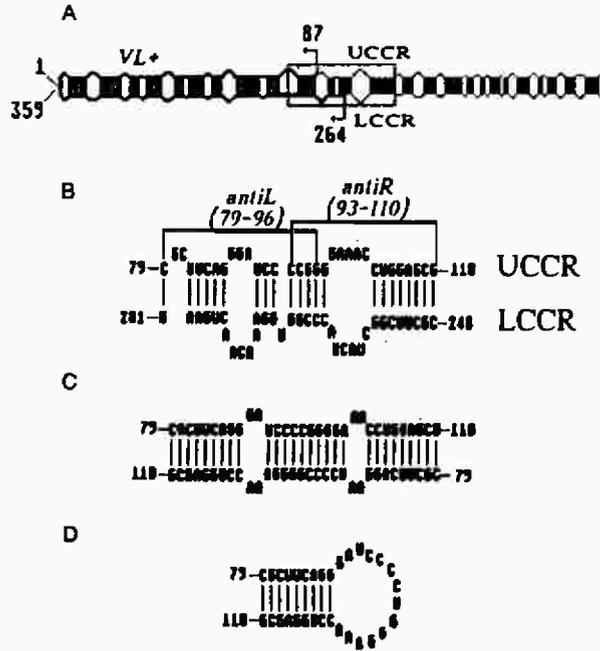
نظراً لأن التركيب والمقاطع التركيبية لـ RNA الفيرويدي كلها معروفة جيداً وهناك نماذج مفصلة موجودة وتوضح شمولها على حوافز تركيبية Structural motifs وخطوات وظيفية مثل التناسخ، التجهيز وغيرها.

في الجزء الأول من هذه الدراسة كان هناك محاولة لتوجيه RNA مضاد المعنى ضد حافز تركيبى خاص Special Structural motif. إن المنطقة المركزية المحفوظة (CCR) Central conserved Region الذى حددت تنابعها أولاً في فيرويد الدرنة المغزلية في البطاطس PSTVd تكون ذات اهتمام خاص بسبب أن تنابعها يكون مميزاً لجميع صف Class الفيرويدات. إن ما يسمى صف PSTVd من المفروض أن يكون هو الأساس في نشوء الفيرويدات. إن CCR تتكون من منطقة عليا UCCR ومنطقة سفلى LCCR (شكل ٣٢) واللذان معاً تشكلان قطعة من التركيب شبه العصى الأصيل للفيرويد. وحسب معلوماتنا الحالية (١٩٩٤) عن تجهيز الفيرويد، هذا يعنى الانشطار للخيوط الموجب- strand in Plus - Oligomeric intermediate من وحدة الطول واللحام لتكوين الدائرة كل ذلك يحدث في الـ UCCR. إن وسيط التناسخ يجب أن يخضع لتحويلات تركيبية معينة ليعمل كقالب لتجهيز أنزيمات العائل وإن منع مثل هذا التحول بسبب تداخل RNA مضاد المعنى يمكن أن يثبط تجهيز الفيرويد وبالتالي تناسخ الفيرويد في الطبيعة.

في الجزء الثانى من هذه الدراسة فقد أختير cDNA ليغطي النصف الأيسر فقط من التركيب الثانوى شبه العصى للفيرويد كتركيب RNA مضاد المعنى ضد تناسخ الخيوط السالب الوسيط. هناك مستوى منخفض جداً من الخيوط السالبة

الوسيط في خلايا النبات المصابة بالمقارنة مع ذرية الفيرويد الدائرية. إن تركيز الخيوط السالبة يصل إلى مستوى أكثر تبكيراً خلال الإصابة منه في Plus mono-mers مبيناً أن الوسيطات السالبة تكون إما قد بنيت على معدل منخفض أو تحلل بسرعة أكثر عند مقارنتها مع Plus monomers. وبالتالي فإن توجيه RNA مضاد المعنى ضد minus - sense oligomers يمكن أن يكون ذو استراتيجية أكثر كفاءة من التوجيه ضد ذرية الفيرويد Plus - Sense Viroid Progeny.

ولقد تبين قبل ذلك أن القطع القصيرة من ال DNA وال RNA المكاملة تستطيع أن تثبط الإصابة بالفيرويد، هذا ما وجدته Matousek سنة ١٩٩٤. هذه القطع كانت تحضن في المعمل مع PSTVd والمعقد المتكون سابقاً كان يحقن في النبات كان التثبيط أكثر فعالية عندما كان التحضين يجري على درجات حرارة عالية حيث التركيب الثانوي للفيرويد كان يندثر. وكنتيجة لهذه المعطيات فإن مركبات RNA مضاد المعنى الفيرويدي من الممكن أن لا يتكون تحت الظروف الفسيولوجية، التجهيز الخلوي لكل من بناء الفيرويد وال RNA مضاد المعنى ذو الفائدة وتكوين المركب يجب أن يقلد ويدرس في المعمل تحت الظروف الفسيولوجية. بناء وسيطات تناسخ الفيرويد وال RNA مضاد المعنى يمكن أن تجرى في المعمل عن طريق النسخ من قوالب DNA باستعمال أنزيم-T7 RNA Polyme-ase وتكوين مركبات بين RNA الهدف ومضاد المعنى، يمكن أن يتبع ذلك تقدير كمي بواسطة المدرج الحراري للهجرة الكهربية في الجيل - Temperature gradient gel electrophoresis والذي يرمز له TGGE وبواسطة الأجسام المضادة anti dsRNA antibodies. لقد ظهر أن ال RNAs مضادات المعنى المختارة ضد الخيط الموجب وأيضاً ضد وسيطات تناسخ الخيط السالب تشكل مركبات ثنائية الخيط متخصصة مع أهدافها تحت الظروف الفسيولوجية، وهذا وسيط ل RNA مضاد المعنى ذو أهمية في تأثيرات التثبيط على إصابة الفيرويد قد لوحظت في الطبيعة باستعمال نباتات بطاطس تجهز RNA مضاد المعنى.



شكل رقم ٣٢ :

A = تركيب ثانوي للفيروس PSTVd مع المنطقة المحفوظة المركزية (UCCR / LCCR) وموقع VL₊ RNA مضاد المعنى (الخط السميك) والذي يوجه ضد نسخ سالبة الخيط. B = توضح UCCR و Anti L.L CCR تمثل RNA مضاد المعنى مع التابع التكميلي لتتابع الفيروس (79 - 96) و anti R تمثل RNA التكميلي مضاد المعنى لتتابع الفيروس (93 - 110). أما C = التركيب الثلاثي الحلزوني المتكون بواسطة وحدتين من UCCR. أما D = تركيب دبوس الشعرا المتكون ضمن الجزئ في القواعد الزوجية للتركيب UCCR.

النتائج Results

١ - تحليل المركب المتكون من RNA مضاد المعنى و RNA الهدف في المعمل:

إن RNA مضاد المعنى أختير ضد المنطقة المركزية العليا المحفوظة (UCCR) شكل ٣٢ في نسخ الشريط الموجب بسبب دوره الأساسي في تجهيز الفيروس. هناك في وسيطات تناسخ ال Oligomeric إثنان من UCCR من الممكن أن تشكل منطقة حلزونية (لولبية) ثلاثية ثابتة مكونة من ٢٨ زوج قواعد معترضة بواسطة إثنين فقط

من العروات الصغيرة الداخلية (شكل ٣٢، C). هذا التركيب يكون نتيجة نوع التتابع المتعكس Palindromic لمنطقة UCCR. كذلك أيضاً فإن RNA مضاد المعنى إذا تكامل مع الطول الكامل لمنطقة UCCR يستطيع أن يشكل تركيبات لجزئ داخلي ثابت حلزوني ثلاثي أو تركيب دبوس الشعر I (شكل ٣٢، D). هذه التركيبات بإمكانها أن تتنافس مع المركبات المتكونة من RNA الفيرويدي ومضاد المعنى. من أجل ذلك الغرض أيضاً فإن إنئين من RNAs مضاد المعنى أقصر اختيراً مكملان للجزء اليسار anti L أو للجزء اليمين من UCCR anti R (شكل ٣٢، B). الذي يمكن ملاحظته في الهجرة الكهربائية في أل-Polyacrylamide gel أن ال RNA مضاد المعنى ذو الطول الكامل فإنه فعلاً يشكل أساساً (إلى حد بعيد) Dimers أو جزئ بيني لدبابيس الشعر. هذا أدى إلى الاستعمال الكبير لتتابعات مضاد المعنى الأقصر anti R و anti L بالنسبة للإختبارات المعملية بالإضافة إلى تحولات النبات. إن نسخ الخيط الموجب Dimeric من الفيرويد PSTVd تعمل كالنموذج الأصغر لوسيطات نسخ أكبر. إنها تمتلك موضعين للانشطار وموضع واحد للالتحام رغم أن التجهيز ممكن أن يحدث على موضع واحد في الفيرويد.

إن تحليل المركب المتكون بواسطة الطريقة TGGE لها من الفوائد أكثر من الطرق الأخرى حيث أنها تسمح للباحث ليس فقط بفصل RNA المعقد من غير المعقد ولكن أيضاً للتفريق بين أشكال ال RNA المختلفة. لقد طبقت أول مرة سنة ١٩٨٨ بواسطة Hecker et al لتحليل المركب المتكون من خيوط سالبة وموجبة مع تتابع PSTVd. في هذه التجربة إقتصرت التحليل على ما يسمى تجربة ما قبل النسخ Pre-transcription والتي فيها كان RNA مضاد المعنى موجوداً مسبقاً في المخلوط عندما بدأ نسخ نسخة من ال Dimeric.

إن التحليل بطريقة TGGE أجرى مباشرة بعد توقف النسخ بواسطة إضافة ٥ مللى مول EDTA. يظهر على الجيل في شكل ٣٢، A الذي فيه المركب المتكون مع anti L كان قد تحلل، عديداً من المنحنيات للتحويل واضحة، هذه يشار إليها

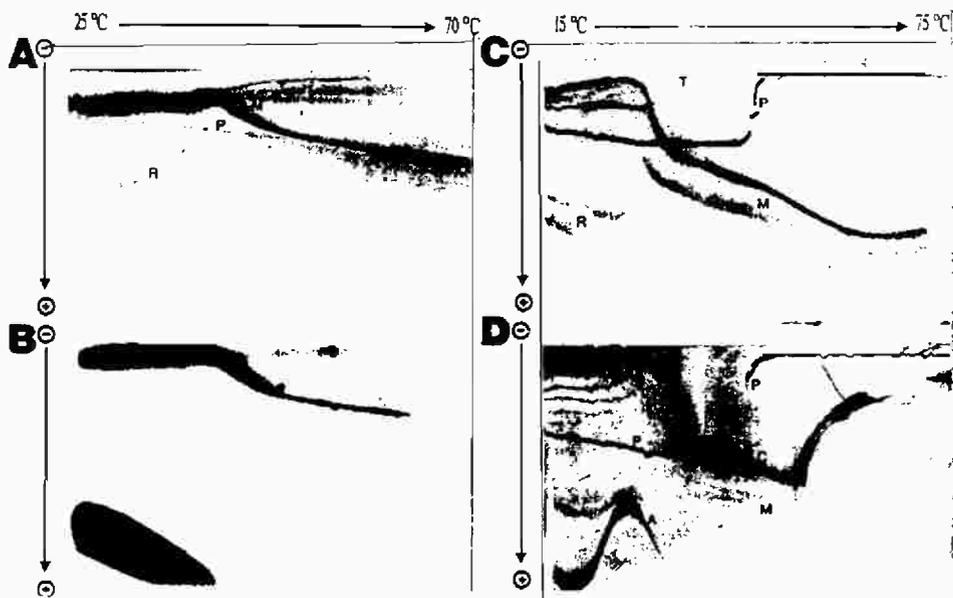
بواسطة R، M، T حيث حصل عليها مشابهة جداً لما ظهر عندما حللت نسخة من ال Dimeric فقط. يجب أن نذكر هنا بأن منحني التحول M (عديد دبابيس الشعر) يكون مميز لموقع اليمين بعد النسخ، هذا التركيب لا يكون في توازن ثيرمو ديناميكي ولكن يخضع لتغيرات بطيئة في تركيبات مثلث بواسطة منحنيات T (حلزون ثلاثي، شكل ٣٢) و R (شبه عصوي في شكل ٣٢) بالإضافة إلى الثلاثة منحنيات R، M، T فإن الشرائح بين T و M تظهر بوضوح والتي يمكن أن تكون نشأت من مركبات نسخة RNA مضاد المعنى. أما الشريحة P تتبع إلى ناقلات نسخ البلازمد التي لم تزال من المحلول. يمكن أن يعرف المركب تعريفاً لا لبس فيه من الصورة الإشعاعية الذاتية (شكل ٣٣، B) من التجربة المثالية. ويبدو واضحاً أن RNA مضاد المعنى المعلم إشعاعياً يهاجر ضمن منحني التحول لتركيب M وضمن الشرائح الإضافية الأضعف. في دراسات أخرى معملية متضمنة المعاملة بالحرارة للمركبات لنقل التركيب M إلى تركيب T أظهر أن حوالي ١٠٠٪ من تركيب M كانت متراكبة بواسطة RNA مضاد المعنى. من التحليل في شكل ٣٣، B، يبدو واضحاً أن معقدات نسخة RNA مضاد المعنى تكون ثابتة لدرجة حرارة ٦٥ م. أما التحليل لـ anti R RNA أعطى نتائج مشابهة جداً.

المعقد المتكون من RNA VL₊ (شكل ٣٣، A) ونسخاً سالبة الخيط Oligomeric درست باستعمال TGGE وطرق dot-ELISA. إن الخيط السالب دايمرك قد نسخ من pRH718 بدون وجود RNA مضاد المعنى وحلل بالطريقة TGGE (شكل ٣٣، C) وبالمثل كما في النتائج على نسخ الخيط الموجب، هناك ثلاثة تركيبات مختلفة يمكن اكتشافها. إن التركيب السائد الذي يميز للموقع المباشر بعد النسخ يمثل بالمنحني M والتركيبات الثابتة R و T تكون موجودة بتركيزات منخفضة فقط. إن الشريحة ذات الكثافة الأكثر إنخفاضاً ولكنها في موضع موازي لـ M من الممكن أن تمثل نهاية مبكرة. بعد النسخ المبكر للحمض RNA مضاد المعنى فإن

تأثير ربط RNA مضاد المعنى يكون واضحاً في شكل (D، ٣٣). إن التركيب غير المعقد لـ M قد تلاشى، بينما معظم الجزيئات (أكثر من ٩٥٪) هاجرت كمعقد C مع مضاد المعنى. إن RNA مضاد المعنى غير الداخِل في المعقد يشار إليه بـ A. هذا الاتجاه يكون واضحاً من الهجرة الأكثر إنخفاضاً بالمقارنة مع الحالة غير المعقدة، من نفس موقع الجزئ الأحادي في المدى من ٣٠ - ٣٥ م ومن المواقع النموذجية للخيوط المزدوجة المتجانسة بين ٥٥ - ٦٥ م. إن الأخيرة هذه تتكون من مناطق ثنائية الخيط مدنته جزيئاً مظهرة بوضوح كتأخير عنيف ومواقع غير مستمرة إلى حالة أسرع حركة على نفس الدرجة المرتفعة التي تكون مرئية فقط كشرائح مختلطة من RNA مضاد المعنى المفكك ونسخة دايمرك. الارتباط مع التركيبات الأخرى يمكن أن يحدث أيضاً ولكن لا يشارك بصفة معنوية. نظراً لأن التركيب المعقد يغير المنحنى معنوياً فإن التعليم الإشعاعي كما في حالة الشكل ٣٣ B ليس ضرورياً، كما في النتيجة الهامة من التحليل بطريقة TGGE. يمكن القول بأن التركيب المعقد من RNA VL₊ مضاد المعنى والوسيطات من الخيط السالب دايمرك تحدث مع إنتاج يقارب ١٠٠٪ تحت الظروف التي تشبه الظروف الطبيعية (في الطبيعة). بعد تحضين RNA مضاد المعنى الذي نسخ كلية ونسخة خيط سالبة دايمرك على ٣٧ م وجد أن هناك ٣٠٪ من النسخ فقط من المعقد.

إن النتائج المتحصل عليها بواسطة TGGE قد تأكدت بواسطة طريقة-Dot ELISA وذلك باستعمال جسم مضاد monoclonal متخصص لـ ds RNA. في الخطوة الأولى من التجربة فإن خمسة أضعاف مولر زيادة من RNA مضاد المعنى فوق RNA الهدف كانت حضنت على حرارة مرتفعة ثم بردت إلى درجة حرارة التحليل. كما في جدول ١٩ فإن ds RNA قد تشكل بإنتاج أعلى عندما حضن على درجات حرارة مرتفعة ولكن ١٠ - ٢٠٪ فقط من VL₊ قد لوحظت وكأنها في المعقد مع RNA الهدف على درجات حرارة مقاربة للحرارة الفسيولوجية. وعلى أية حال إذا كان النسخ للخيوط السالبة ترايمرك قد حدث في المعمل في وجود RNA ثنائي الخيط مضاد المعنى موجب قبل النسخ، فإن التكوين يتجه تقريباً لتكملة المكونات التي يبدو وأنها في تركيز مولر منخفض. لم يكتشف معقدات

ds RNA وعلى أية حال بالنسبة لنسخ المائة وتسعون نيوكليتيدها لها نفس القطبية كما في RNA الهدف. حتى بعد النسخ فإن الهضم بأنزيم DNase والاستخلاص بالفينول فقط في الكمية الكلية من الحمض الأميني، هذا يعني أنه يمكن تحديد كمية الخيوط السالبة Trimeric والنسخ مضادة المعنى والنسبة المثوية للخيوط الثنائية لأي من الجزئيات يمكن تقديرها بصعوبة. يلاحظ أن إجراءات الهضم بأنزيم DNase، الاستخلاص بالفينول والترسيب التي تتبع النسخ لا تغير المدى لتكوين الخيط الثنائي.



شكل رقم ٣٣ :

TGGE لمقد متكون بين RNA مضاد المعنى و RNA الهدف. الشريحة A و B تظهر تحليل معقدات من RNA قصير مضاد المعنى (anti L) ونسخ دايمرك موجبة الخيط من الفيروس PSTVd بعد Pre-transcription للحمض RNA مضاد المعنى. شريحة A تمثل جيل مصبوغ بالفضة، شريحة B تمثل autoradiogram من RNA مضاد المعنى معلم إشعاعياً. إن أسرع شريحة في الهجرة في ال autoradiogram تكون أكثر احتمالاً من معقدات RNA مضاد المعنى مع النسخ المنتهية مبكراً. أما شريحة C فتمثل نسخة دايمرك سالبة الخيط. أما شريحة D فتمثل نسخة دايمرك سالبة الخيط بعد Pre-transcription مع VL+ ل RNA مضاد المعنى. إن الشرائح معلمة لثلاثة تركيبات مختلفة (R, T, M) = التركيب الثلاثي الحلزوني، M = تركيب متعدد دبابيس الشعر، R = التركيب المتطاوّل شبه المعصوي مشابه للفيروس الموجود في الطبيعة. أما P فهي ناقل النسخ.

جدول ١٩ : اكتشاف ds RNA بواسطة dot ELISA .

٣٠	٤٠	٥٠	٦٠	٧٠	٨٠	٩٠	درجة الحرارة الأولية للتهجين م°
١٥	٣٠	٥٠	٦٥	٦٥	٦٥	٦٥	كمية المواقع المستهدفة %

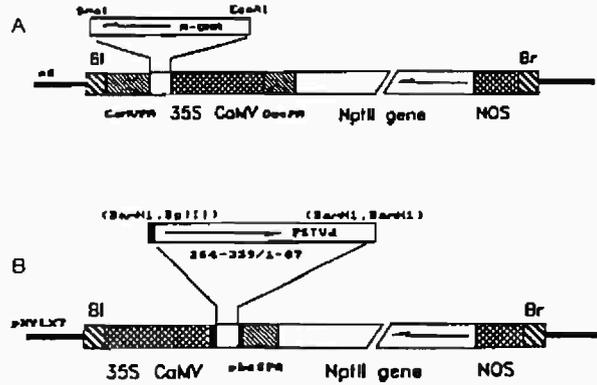
٢ - تعبيرات RNA مضاد المعنى فى نباتات البطاطس المحولة وراثياً:

إن ناقلات التعبير تحمل تتابعات مضاد المعنى بعد بدء النسخ، إن 35S CaMV المحفز ملاحظة فى شكل ٣٤. أما فى شكل ٣٤، A، فإن التركيبات من anti R و anti L مع مواقع CaMV Polyadenylation تكون موصوفة. هناك تركيبان آخران مشار إليهما anti Lvt و anti Rvt ، موقع ال Polyadenylation قد شطبت. إن ناقل التعبير لتتابع مضاد المعنى VL₊ يحمل إشارة rbsC ل Polyadenylation (شكل ٣٤، B). علييات التعبير نقلت إلى جينوم البطاطس بواسطة الناقل A. tumefaciens والدورة الأولى من الاختبار أجريت على أساس مقاومة التجذير فى الخلفية ل Kanamycin. إختبرت نباتات البطاطس المحولة وراثياً واختبرت لتعبير RNA بواسطة طريقة تحليل Northern .

فى النباتات التى حولت لتعبيرات RNA مضاد المعنى ضد UCCR، فقط فى المتحولات فقدت جزء من مواقع ال Polyadenylation (anti Lvt, anti Rvt) تعبير RNA مضاد المعنى أمكن اكتشافه. فى ١١ من ١٢ من المتحولات فإن RNA مضاد المعنى قد اكتشفت. كما هو ملاحظ فى شكل ٣٥، A، فإن الحجم كانت حوالى ٥٠٠ - ٦٠٠ نيوكليتيده بدلاً من الحجم المتوقع ٢٥٠ نيوكليتيده. من الممكن أن يكون ذلك فى الشطب فى مواقع ال Polyadenylation النهائية الصحيحة ل RNA مضاد المعنى يكون مشوهاً ومنتجات أطول قد بنيت. التعبير لمنتجات مختلفة (٥٠٠ - ٦٠٠ نيوكليتيده) يمكن أن تكون نتيجة مراحل غير ناضجة مختلفة من النسخ. ومن المحتمل أيضاً أن تركيبات ال anti Rvt و anti Lvt فقط مع مواقع النهايات الطرفية disorted تنتج RNAs مضاد المعنى ذو ثبات كاف والتي يمكن اكتشافها بطريقة Northern analysis. لكى نتأكد من أن الإشارات المكتشفة فى شكل ٣٥، A الجزء العلوى ليست النتائج للإصابة الفيرويدية ولكن

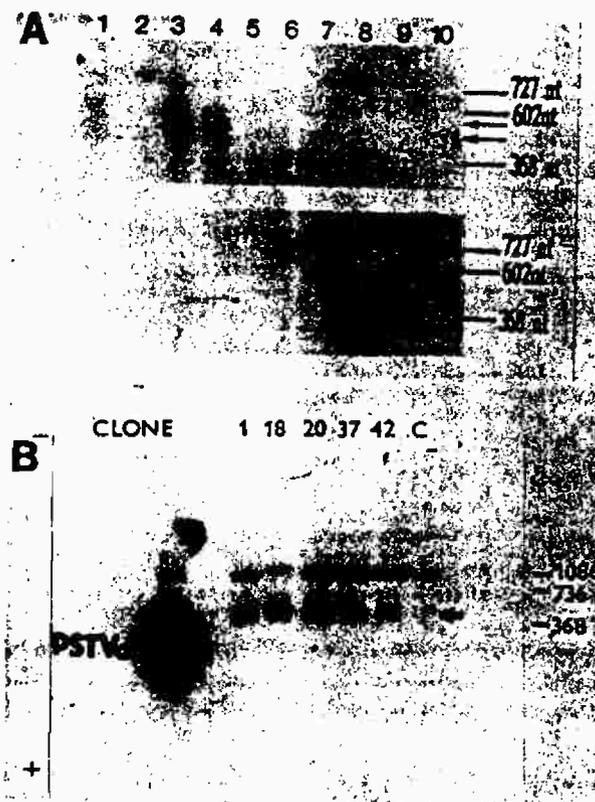
من تعبيرات RNA مضاد المعنى، إن التهجين المنظم مع نسخ خيط سالبة معلمة إشعاعياً من PSTVd كانت منجزة. إن الشكل ٣٥، A الجزء السفلى يبين عدم وجود إشارات من PSTVd الدائري يمكن اكتشافه في النباتات المحولة وراثياً.

هناك ٦ كلونات محولة مع التركيبات VL₊ أظهرت تعبيرات لـ RNA خاص والتي لم تكن ملاحظة في نباتات الكنترول (الشكل ٣٥، B). إن طول ال RNA كان حوالي ٦٠٠ قاعدة. وعلى هذا الأساس فإن القطعة مضادة المعنى الخاصة بـ PSTVd (١٨٣ قاعدة) مساوية ٣٠٪ من مجموع ما عبر عنه RNA. لم تستعمل ظروف غسيل شديدة بعد التهجين وبالتالي فإن بعض الشرائح غير المتخصصة في ال autoradiogram لم يمكن استبعادها. وحسب التقدير الأولي فإن كمية RNA مضاد المعنى الكاملة تختلف من ٠,٥ - ٢,٥ ميكوغرام لكل ٣٠ ميكوغرام من مجموع RNA معتمداً على Clone analysed. إن الإشارة الملاحظة لكلون ٦ قورنت مع الإشارة التي تلاحظ عادة لكلون ١.



شكل رقم ٣٤ :

عوامل تحول النبات للتعبير عن RNA مضاد المعنى. شكل A: ناقل مكوّن للتعبير عن RNA مضاد المعنى ضد ال UCCR. إن DNA - A يحتوي ١٨ قاعدة زوجية من النيوكليوتيدات القصيرة المهجنة (Anti L / Anti L') أو (Anti R / Anti R') مع أربعة نيوكليوتيدات إضافية كبولي لنكروز لإنتاج موقع محدود EcoRI و Smal. أما شكل B فهو ناقل مكوّن للتعبير عن RNA - VL₊ مضاد المعنى ضد نسخ سالبة الخيط. توجيه تناوبات RNA الفيرويدي مشار إليه بأرقام. المواقع المحدودة المستعملة للمكثفة موضوعة في أقواس. أما العلب السوداء فهي مواقع التتابع المنسوخ الموجه من الناقل 35 SCaMV هو فيروس موزايك القرينط أما 35S فهو البروموتور و CaMVPA و rbcSPA فهي التتابع للبولى ادينيليشن. NOS، NptII جين و OcsPA هي مشجع nopaline synthase، النيومايسن فسفوترانسفيريز II جين وتتابع البولى ادينيليشن لـ OCS. وكذلك فإن B₁، B₂ الحافة اليسرى والحافة اليمنى.



شكل رقم ٣٥ :

تعبير RNA مضاد المعنى في نباتات البطاطس المحولة وراثياً. شكل A. تحليل RNA مضاد المعنى قصير ضد UCCR. أما الشكل (A) العلوي فهو تحليل بالنورثيرن بلوت لنسيج ورقة (RNA) محول وراثياً. (١، ٢، ٣، ٤، ٥، ٩) و ١٠ كمنترول بعد دنتره الاجاروز والهجرة الكهربائية في الجيل. شريحة ٦ = ١٠ نانوغرام خيط دايمرك موجب من نسخ PSTVd (٧٢٧) نيوكليتيده و ١٠ نانوغرام من نسخ PSTVd خيط مونوميرك سالب (٣٦٨) نيوكليتيده. شريحة ٧ = ١٠ نانوغرام من نسخ PSTVd خيط موجب (٦٠٢) نيوكليتيده. شريحة ٨ = ١٠ نانوغرام مستخلص خام من PSTVd. الجزء السفلي A نفس بقعة RNA كما في الجزء العلوي ولكنها غسلت وأعيد نهجيتها مع نسخ PSTVd سالبة الخيط معلمه للكشف عن PSTVd تباعات موجبة. أما شريحة B تحليل لـ RNA VL₊ مضاد المعنى ضد نسخ سالبة الخيط. حوالي ٥٠ بيكوغرام من الفيروس PSTVd الطبيعي أضيفت إلى الموقع المعلم في اليسار. C = RNA من نباتات بطاطس غير محولة وراثياً. تدل الأسهم على RNAs مضاد المعنى معبراً في النباتات المحولة وراثياً.

٣ . تثبيط الإصابة الفيرويدية فى النباتات المحولة وراثياً:

للدراستات الحيوية فإن النباتات المحولة وراثياً تكون قد تكاثرت خضرياً وتضاعفت . بالنسبة للـ anti R و anti L فإن مجموعات محولة من ١٢ نبات من نفس النبات الواحد المتحول حققت بمستخلص خام من PSTVd . بعد ٤ و ٨ أسابيع حللت كمية أُل PSTVd وقورنت مع تلك الموجودة فى نباتات الكنترول . بسبب المهاجمة الفطرية فإن جميع النباتات من أنواع الـ anti RvT و anti LvT ماتت قبل الكشف عن محتوياتها من الفيرويد . هذا كان من سوء الحظ نظراً لأن تعبيرات RNA مضاد المعنى قد اكتشفت فقط فى هذه النباتات .

مع أنه لم يكن من المحتمل اكتشاف RNA مضاد المعنى فى النباتات المحولة ذات النوع anti L و anti R ، فإن هناك ثلاثة متحولات أظهرت خفضاً فى القابلية للإصابة بالفيرويد PSTVd بعد أربعة أسابيع شكل ٣٦؛ الجزء العلوى . فمثلاً فى الحالة ذات ١٢ متحول فقط ٢ من ١٠ عقل أظهرت محتويات من PSTVd يمكن اكتشافها وحتى فى هذين الإثنين فإن كمية أُل PSTVd كانت أقل منها فى نباتات الكنترول A . وعلى أية حال فإنه بعد ٨ أسابيع من الحقن فإن محتوى جميع النباتات المحولة من الفيرويد كان متقارباً مع الكنترول (شكل ٣٦ الجزء السفلى) . وبالتالي فإن الإصابة الفيرويدية لم تكبح بثبات فى النباتات المحولة وراثياً ولكنها تأخرت بشكل معنوى . عندما إختبرت هذه النباتات بعد التكاثر الخضرى المتتابع لمعرفة حيوية الفيرويد فإن تأخر تضاعف الفيرويد لم يمكن تأكيده كتأثير معنوى .

إن الستة VI₊ المختارة من كلونات البطاطس إختبرت عن طريق التقدير بمقياسين ، فهرس الحيوية بالإضافة إلى كمية الفيرويد فى النباتات المصابة . بالنسبة للطريقة الأخيرة فإن الإصابة صنفت إلى أربعة درجات . نتائج إختبارات مثل هذه الإصابة موجودة فى جدول ٢٠ . إن إحدى وعشرون يوماً بعد الحقن (P.i) فإننا عادة ما نلاحظ إصابة ضعيفة جداً للفيرويد PSTVd ومعظم النباتات المصابة تقع

فى رتبة ثلاثة وأربعة، نموذجياً مع ٠,٠٣ - ٣ بيكوغرام من الفيرويد لكل ملغرام من المادة الطازجة. مقارنة فهارس الحيوية لكلونات مختلفة ومجموعة الكنترول فى هذا الوقت تدل على خفض معنى احصائياً للإصابة فى كلونات ١، ٦، ٢٠ و ٣٧ عند مقارنتها مع الكنترول غير المحول. فمثلاً فإن قيمة G كانت ٢٣، ٢٦، ٢٤ و ١٨ لكلونات ١، ٦، ٢٠ و ٣٧ بالترتيب. إن التساوى فى النسبة المثوية للنباتات المصابة يجب أن يطرح على مستوى ٠,٠٠١ من المعنوية الإحصائية. بالنسبة لكلون ١٨ فإن الاختلافات كانت معنوية على مستوى ٠,٠١ ولم يكن هناك إختلافات معنوية ملاحظة بين كلون ٤٢ ومجموعة الكنترول. كذلك فإن النتيجة قد أوضحت فرق كبير بين مختلف الكلونات المتحولة. فى بداية الإصابة (٢١ يوم بعد الحقن) فإن جميع النباتات المحولة وراثياً والمحقونة كانت (باستثناء واحد من كلون ٢٠) هذه فقط ضعيفة الإصابة (مرتبة ٣ و ٤)، بينما أكثر من ٤٠٪ من نباتات الكنترول المحقونة تقع فى مرتبة ٢، هذا يعنى نباتات متوسطة الإصابة. أخيراً فإن ٣٥ يوم بعد الحقن فإن جميع فهارس الحيوية قد إزداد لكن لا يزال معظم الكلونات تختلف معنوياً عن الكنترول. مع أن مستوى PSTVd قد إزداد بشكل مثير، فإن متوسط كمية آل PSTVd فى الكلونات المصابة كان بشكل واضح أقل منه فى نباتات الكنترول. وعلى أية حال فإن كلون ٤٢ لم يختلف عن مستوى الكنترول (جدول ٢٠) هذه تؤكد بشكل عام الملاحظات التى شوهدت من قبل. هناك إصابات أقوى شاملة إلى حد ما قد حصل عليها بعد ٣٥ يوم من الحقن بالمقارنة فى التجربة فى جدول (٢٠، b) ومعظم النباتات المحقونة كانت مصنفة فى مراتب الإصابة ١ - ٣. فى سلسلة إختبارات الحيوية الثانية لقد تم إختيار تجمعات الفيرويد فى أنابيب. بالنسبة لكلونات ١، ٢٠ و ٣٧ فإن نسبة الأنابيب المصابة قدرت بعد ٩٠ يوم من الحقن (جدول ٢١)، هذه النتائج أوضحت فى الأنابيب نفس النزعة كما فى نسيج الورقة الأخضر.

جدول ٢٠: إختبار الإصابة في نباتات البطاطس المحولة وراثياً.

فهرس الإصابة عدد النباتات المصابة على عدد النباتات المحقونة	عدد النباتات المصابة رتب الإصابة				عدد النباتات المحقونة	
	١	٢	٣	٤	كلونات محولة	غير محولة
A: إختبارات الإصابة، ٢١ يوم بعد الحقن.						
٠,١٢	١	١	صفر	صفر	١٧	١
٠,٠٤	١	صفر	صفر	صفر	٢٤	٦
٠,٣٣	٢	٤	صفر	صفر	١٥	١٨
٠,١١	صفر	١	١	صفر	١٨	٢٠
٠,١٩	٣	١	صفر	صفر	١٦	٣٧
٠,٥٧	٣	٤	صفر	صفر	٢١	٤٢
٠,٨٦	٢	٨	٨	صفر	٢١	غير محولة
B: إختبارات الإصابة، ٣٦ يوم بعد الحقن.						
٠,٤٧	٦	١	صفر	١	١٧	١
٠,٥٠	٣	٤	١	٤	٢٤	٦
٠,٤٧	٣	٤	١	٤	١٥	١٨
٠,٤٧	١	صفر	٢	١	١٨	٢٠
٠,٤٤	٢	صفر	٥	صفر	١٦	٣٧
٠,٧٥	٢	صفر	١	٦	٢١	٤٢
٠,٩٥	صفر	٢	٣	١٥	٢١	غير محولة
C: إختبارات الإصابة بعد نصف سنة من التكاثر الخضرى، ٣٥ يوم بعد الحقن.						
٠,٤٩	صفر	٣	٥	٣	٢٣	١
٠,٦٢	صفر	٢	٤	٤	١٦	١٨
٠,٢٨	١	٢	١	١	١٨	٢٠
٠,٥٩	صفر	٦	١٠	٣	٣٢	٣٧
٠,٦٧	صفر	٢	٢	٨	١٨	٤٢
٠,٩٦	صفر	١٠	٤	١٤	٢٩	غير محولة

١ - رتب الإصابة حسب كمية الفيرويد PSTVd فى الأوراق المصابة: ١ = قوى: ٣٥ - ١٠ بيكوغرام

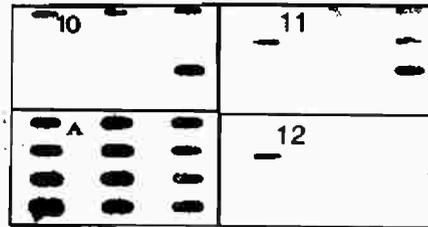
/ ملغ مادة طازجة. ٢ = متوسطة: ١٠ - ٣ بيكوغرام / ملغ. ٣ = ضعيفة = ٣ - ٠,٣

بيكوغرام / ملغ، ٤ = آثار = ٠,٣ - ٠,٠٣ بيكوغرام / ملغ

جدول ٢١: تحليل الإصابة بفيروس PSTVd في درنات البطاطس. لحقن النباتات المتكاثرة خضرياً يكون مشابهاً لتلك التي في الجدول السابق رقم C.

الكلون المحول	عدد الدرنات المختبرة على عدد النباتات التي هي حاملة الدرنات	% الدرنات المصابة
١	٢٧/١٠	٤٤
٢٠	٢٦/١٠	١٩
٣٧	٣١/١٠	٧٧
٩٥	٣٨/١٥	٩٥

4 weeks after PSTVd inoculation



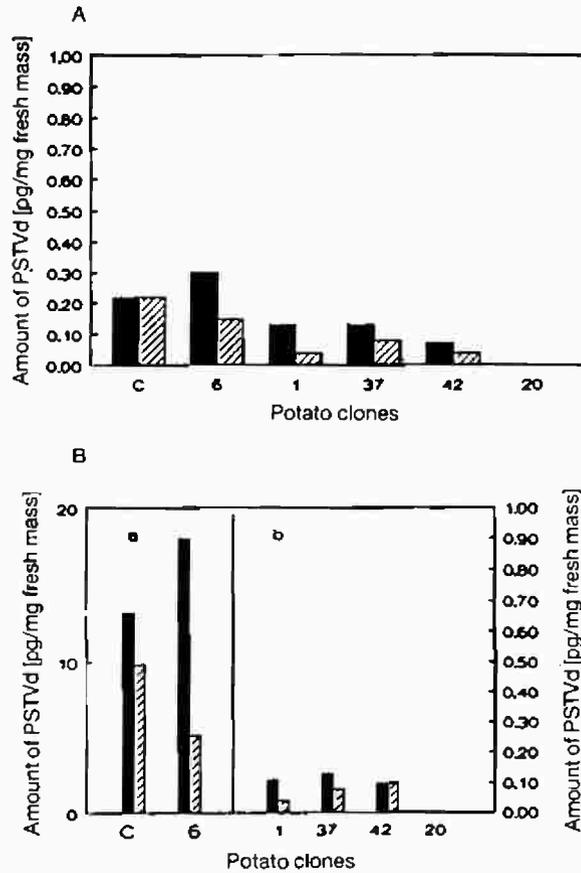
8 weeks after PSTVd inoculation



شكل رقم ٣٦:

تنشيط الإصابة الفيروسية في نباتات البطاطس المحولة وراثياً. تحليل حقن PSTVd في الطرز المحولة وراثياً (١٠، ١١، ١٢) وفي الطراز غير المحول وراثياً الكنترول. A الطرز المحولة وراثياً ١٠ و ١١ تحولت مع RNA anti R مضاد المعنى، الطراز ١٢ مع RNA anti L مضاد المعنى. عقل البطاطس حققت بمستخلص خام من النباتات المحقونة، وعزل الحمض النووي بعد ٤، ٨ أسابيع. نقلت مضاعفات من المستخلص على غشاء نايلون وهجنت مع نسخة PSTVd سالبة الخيط. إختبرت عشرة أفراد من كل طراز محول وراثياً أما في الشريحة السفلى فإن تسعة نباتات من طراز ١٠ و ١١ وعشرة نباتات من طراز ١٢ بالترتيب.

يمكن تلخيص النتائج المتحصل عليها سابقاً بأن هناك إختلافات كبيرة ليس فقط بين الجينوتايب المختلفة ولكن أيضاً بين مختلف النباتات من نفس الكلون ضمن التجربة الواحدة. عند مقارنة التجارب المختلفة بعد التكاثر الخضرى لـ VL₊ المتحول جدول ٢٠ أدى إلى وجود على الأقل جينوتايب واحد كلون ٢٠، أظهرت مستوى ثابت منخفض من الإصابة بالفيروس PSTVd وبالتالي أظهرت أعلى الدرجات من التثييط للإصابة بالفيروس. من ناحية أخرى حتى ضمن هذا الكلون فإن النباتات المصابة بشدة (مرتبة ١) قد لوحظت، هذا أدى إلى الاقتراح بأن المقاومة المحتملة يمكن أن تتحقق عن طريق التوسط بواسطة RNA مضاد المعنى لم تعمل، إذا كان من الممكن أن بعض المستوى البسيط من الفيروس وصل في نسيج النبات. إن الاختلافات العالية في تجمع الفيروس حتى ضمن الجينوتايب الواحد يمكن أن تنتج من إختلاف تعبير RNA مضاد المعنى في النسيج المختلف من الممكن أن يتسبب عن DNA methylation وخفض التعبير في علب DNA - T. لكي نجعل التجربة في ظروف مثالية يؤخذ عديد من ال Subclonings من الجينوتايب VL₊ المحول وتوضع على بيئة محتوية 5'azacytidine وأجرى إختبار The leaf disc agroinoculation تحت ظروف إضاءة وحرارة قياسية في Clima - boxes (شكل ٣٧). إن فحص معدل تجمع الفيروس أظهر مستوى منخفض جداً من التجمع بعد عشرة أيام من ال agroinoculation. بعد ٢٠ يوم ظهرت تجمعات قوية للفيروس في أقراص الورقة الكنترول وفي أقراص ورقة كلون رقم ٦. كان هناك إنخفاضاً شديداً في مستوى التجمع لوحظ في كلونات ١، ٣٧ و ٤٢ ولم يمكن اكتشاف فيروس لكلون ٢٠. يجب أن نذكر هنا أنه لم يكن هناك إختلافات معنوية في مستوى PSTVd في الحلقة الخارجية ومركز القرص في تنوع الكنترول بينما المستوى من PSTVd قد إنخفض معنوياً في أنسجة مركز القرص من الجينوتايبات المحولة. هذا الميل أو النزعة لوحظت حتى في أقراص من الجينوتايب المصابة بشدة رقم ٦ شكل ٣٧، A.



شكل رقم ٣٧ :

مستويات من PSTVd في Agroinfected أقراص ورقة. A = التحليل بعد عشرة أيام من الحقن. B = التحليل بعد عشرين يوم من الحقن. الأرقام تدل على الكتلونات المحولة وراثياً. إن حرف C يدل على النباتات غير المحولة وراثياً. في شكل B الأعمدة في (a) تدل على التوجيه اليسارى، في (b) التوجيه اليمنى.

مناقشة النتائج :-

لقد سبق وبيننا أن RNA المتخصص لـ PSTVd متمائل الازدواجيات وأن ازدواج من نسخ مضادة المعنى طويلة غير كاملة مع PSTVd كانت فعلاً غير معدية في نباتات الطماطم. هذه النتيجة أدت إلى الاقتراح بأن تداخل RNA - RNA يمكن أن يشكل حقيقة أساس وسيط لـ RNA مضاد المعنى يثبط إصابة الفيرويد. في هذه الدراسة ثم إختيار RNA مضاد المعنى غير كامل ضد ال UCCR من الخيط الموجب وضد النصف اليسارى من وسيط التكاثر السالب لـ PSTVd لتحليل التأثير المثبط على إصابة الفيرويد في النباتات المحولة وراثياً. كما ذكر سابقاً فإن التأثير المثبطة تصبح متوسطة بواسطة تعبيرات RNA مضاد المعنى الخلوى وقد ذكرت لبعض RNA الفيروسى للنبات و DNA الفيروسى، ولكن النتائج لا يمكن أن تنطبق على الفيرويدات خاصة بسبب الصفات التركيبية الخاصة للفيرويدات والتي تشكل ازواج مضاعفة. هذه الصفة يجب إعتبارها خاصة بالنسبة لوسيطات التكاثر الأطول، والتي بطريقة أخرى يمكن أن تكون هدفاً مناسباً بسبب تركيزها المنخفض في الخلايا المصابة. مجرد التحضين لـ RNA مضاد المعنى أو الهدف قد أظهر أن التحضين يجب أن يجرى على درجات حرارة عالية غير فسيولوجية لكي نحصل على إنتاج عال من المركب المعقد. لكي نوجه هذه المشكلة فى مصطلحات ثيرموديناميكية إختبر التداخل بين RNA مضاد المعنى و RNA الهدف عندما بنى RNA الهدف تحت ظروف فسيولوجية بواسطة أنزيم T₇ Polymerase فى وجود RNA مضاد المعنى قبل النسخ والمعقد المتكون أجرى له تحليل بواسطة TGGE والاكتشاف بواسطة Immunochemical لـ ds RNA. هناك طرق مشابهة يكون من المحتمل أن تحدث فى الخلايا المحولة وراثياً بعد دخول الكائن الممرض النواة وتكون طريقة التناسخ قد ابتدأت. من التحليل بواسطة TGGE يمكن القول بأن إنتاج المعقد المتكون كان تقريباً ١٠٠٪. هذه النتيجة كان من السهل الحصول عليها من المعقدات مع النصف اليسارى من RNA مضاد المعنى، بسبب الانتقال الواضح فى الشرائح. المعقد المتكون من RNA مضاد المعنى القصير ضد

ال UCCR لم يقود إلى إنتقال معنوى ولكن يمنع التغير التركيبى فى RNA الهدف وعلى أساس هذا التأثير فإن ١٠٠٪ معقد متكون يمكن أن يستنتج. زيادة على ذلك فإن التحليل المعملى للمعقد المتكون بعد Pre - transcription ل RNA مضاد المعنى أظهر بشكل جلى واضح أن التركيب لوسيطات تناسخ الفيرويد التى توجد فى اليمين بعد عملية النسخ تكون أساسية لتكوين المعقد بينما الانتظار للتركيب المتوازن يمكن أن يمنع تكوين المعقد.

النباتات المحولة وراثياً حضرت معبرة عن RNA مضاد المعنى ضد الجزء اليمين واليسار من ال UCCR (مع تتابع كامل وشطب ال Polyadenylation) و VL₊ حمض RNA مضاد المعنى (الجزء اليسار من الفيرويد شبه العصى) ضد الخيط السالب. وجد أن تعبيرات RNA مضاد المعنى اكتشفت فى تحولات anti LvT و anti RvT (مع تأخير إشارة ال Polyadenylation) ولكن ليس فى متغيرات anti P و anti L هذا يمكن أن يوضح بعدم الثبات الكاف لهذه ال RNAs فى الطبيعة وعلى هذا الأساس يكون هناك تركيز منخفض جداً للكشف بواسطة Northern analysis. هناك سبب واحد لهذا الافتراض يكون بأنه يمكن اكتشاف T - DNA مضاد المعنى موحد لمتحولات anti LvT و anti RvT بالإضافة إلى متحولات anti R و anti L بواسطة التحليل بطريقة Southern. من الممكن اكتشاف تعبير RNA مضاد المعنى المنخفض فى متحولات anti LvT و anti RvT فقط بسبب RNA مضاد المعنى المعبر كان حوالى ٢٥٠ - ٣٥٠ نيوكليتيده أكبر من المتوقع وبالتالي ثبت أعلى منه فى ذلك الذى من متحولات anti R و anti L. إن RNA VL₊ المضاد المعنى المعبر فى الطبيعة أظهر تقريباً ٦٠٠ قاعدة فى الطول بحوالى ٣٠٪ من التتابع الخاص بمضاد المعنى، لا يمكن أن يحصل عليه بدون شك فى التجارب المعملية سواء RNA المعبر قد كون معقدات مع ال RNA الهدف بكفاءة مثل التى لوحظت فى النسخ المعملية. ولكن يبدو محتمل جداً نظراً لأن المعقد المتكون ذو معنى أو مضاد المعنى يفسد بواسطة تركيب الفيرويد

الجزء البيني وليس بواسطة ازواج قواعد متطابقة من تتابعات خاصة للفيرويد مع تتابعات الناقل المتصلة أو ال Poly A tail .

درس تأثير RNA مضاد المعنى على كلونات بطاطس وحللت النتائج لمعرفة مدى التثبيط للإصابة بالفيرويد PSTVd . أظهرت النتائج أن ظاهرة التثبيط وجدت فعلاً بسبب: أولاً، بعض الطرز المحولة وراثياً تظهر ثبات وخفض معنوي في الإصابة الفيرويدية في النباتات والدرنات بالمقارنة مع الكنترول، ثانياً، إنخفاض التركيز للفيرويد اكتشف في بعض النباتات المحولة وراثياً إذا قورنت مع النباتات غير المحولة وراثياً وأجريت المقارنة خلال ثلاثة أسابيع بعد الحقن (جدول ٢٠، A) وحتى ٨ أسابيع بعد الحقن (شكل ٣٦). إن تثبيط الإصابة أو على الأقل التأخير في تضاعف الفيرويد لوحظ في النباتات المحقونة بالإضافة إلى بعد Agroinfection .

مع أن تأثيرات التثبيط كانت معنوية، إلا أن إختلافات وراثية عالية قد لوحظت بين الطرز المختلفة، والأكثر أهمية الإختلاف العال الذي لوحظ ضمن كلون واحد متكاثر خضرياً. حتى من بين أكثر الكلونات مقاومة فإن بعض النباتات المصابة بشدة قد لوحظت. إن مظهر النسيج المصاب بشدة دل أيضاً في هذه الحالة على أن التثبيط بمضاد المعنى يمكن أن يتغلب عليه كلية إذا حصل على مستويات بداية من ال PSTVd في خلايا النبات عالية وإن سرعة تناسخ الفيرويد لا تثبط لمدة طويلة. إن الاختلافات غير العادية الملاحظة هنا تختلف بوضوح عن DNA مضاد المعنى و RNA الوسيط في التثبيط الذي لوحظ في الدراسة السابقة، بينما المعقد RNA الفيرويدي مضاد المعنى كان قد تشكل في المعمل قبل الحقن. في تلك الحالة فإن التأثير المثبط كان أكثر قوة، أقل إختلافاً ومعمد أساساً على زيادة المولر لـ RNA مضاد المعنى زيادة عن PSTVd. إن التأثيرات الموصوفة هنا تختلف أيضاً عن معظم النتائج المتحصل عليها باستعمال RNA مضاد المعنى ضد Endogenous genes. في هذه التجارب كان هناك متغيرات كبيرة بين الكلونات المختلفة، أيضاً، لوحظت ولكن الكلونات الفردية عادة تسلك معدل منخفض ثابت من m RNA وبالتالي فإن ال فينوتايب الطافرة يمكن إختبارها.

لقد تبين من الدراسات الحديثة Wassenegger et al سنة ١٩٩٤ أن-Genome integrated viroid cDNA يصبح متخصص methylated فوق تجمعات الفيرويد في نباتات الدخان المتحولة وراثياً. إن الباحث فسر هذه الظاهرة بواسطة إمكانية أن RNA الموجه ينتج من جديد ميثيليشن لتتابعات الجينوم. إن التغيرات العالية في وسيطات RNA مضاد المعنى في تثبيط الإصابة الفيرويدية في هذه التجارب (تجارب البحث الحالي) يمكن أن تفسر غالباً بهذه الظاهرة. إذا ما حدث وأن بعض حدود مستوى RNA الفيرويدي قد إمتد فإن عملية الميثيليشن ل-Viroid - specific anti-sense gene يشجع (يرتفع). إن التناسخ غير المثبط من PSTVd يكون النتيجة المنطقية. إن ما وجد بأن تأثير مضاد المعنى كان أقوى عندما عوملت أقراص ورقة البطاطس خلال الحقن أيضاً بمادة azacytidine (مشطة للميثيليشن) والتفسير بأن الاختلافات المعنوية بين كلونات البطاطس المختلفة يمكن أن تتسبب عن أو بواسطة تأثير الموقع على DNA methylation وتكون متفقة مع الافتراضات المذكورة سابقاً.

إن ال Physiological mosaic المعروف جيداً في خلايا النبات من الممكن أن يقود أيضاً إلى تركيز RNA مضاد المعنى باختلاف من خلية إلى خلية حتى إذا نظم بواسطة محفز تأسيسي. إن المستوى الحدى الأولى من RNA الفيرويدي يمكن أن يصل إليه بسهولة أكثر في هذه الخلايا بدون تعبيرات RNA مضاد المعنى أو بكمية بسيطة جداً منه، هذه الفيروسيدات يمكن أن تنتشر في الأنسجة المحيطة. من المعروف أن الفيروسيدات تتراكم بسرعة أكثر في النسيج المرستيمي ومن هناك يمكن أن تنتقل ضمن النبات خلال خلايا اللحاء هذا ما وجده Palukaitis سنة ١٩٨٧.

في هذا النسيج فإن التناسخ يمكن أن يحدث بمعدل أعلى، بينما مستوى RNA مضاد المعنى يمكن أن يكون غير كاف تماماً لأن يتداخل مع مسار التناسخ وبالتالي يقود إلى تنافس مختلف تماماً. من هذا الاتجاه فإن نتائج البحث تكون أكثر تشابهاً للتأثيرات الملاحظة ل-RNA الفيروسي للنبات. بالنسبة للفيروسات المتجمعة

(فيروسات الجوزاء) مثل فيروس الموزايك الذهبى فى الطماطم TGMV والذى فيه ال DNA والفيروس يتكاثر داخل النواة، فإن تأثير مضاد المعنى كان أقوى جداً إذا كان إختبار التناسخ فى قرص الورقة قد تم (أنجز) ولكن غير كامل فى بعض الطرز عند حقن النباتات المحولة السليمة. يمكن القول بأنه إذا كانت جينات RNA مضاد المعنى ناشئة مع محفزات غير حساسة لـ DNA methylation فإنها تكون أكثر فعالية.

رابعاً: الوقاية بالتضاد بين أربعة فيرويدات:

Cross Protection Among Four Viroids

تعرف الوقاية بالتضاد على أنها التداخل فى التعبير العرضى عن طريق حقن متحدى (فيروس أو فيرويد) فى النبات المصاب سابقاً. هذه الظاهرة قد أثارت اهتمام أخصائى الفيروس من علماء أمراض النبات وذلك منذ اكتشافها بواسطة Mckinney سنة ١٩٢٩. إن ميكانيكية الوقاية بالتضاد لا تزال محل دراسة وأجرى عليها أبحاث كثيرة خاصة فيما يتعلق بالأمراض الفيروسية خاصة فيروس موزايك الدخان وترستيزا الحمضيات فى البرازيل.

أما عن الوقاية بالتضاد بالنسبة للفيرويدات كان أول وصف لها سنة ١٩٦٧ بواسطة العالم Fernow. لقد وجد أن نباتات الطماطم *Lycopersicon esculentum* الصنف المزروع Rutgers يمكن أن يحفظ من الأعراض التى ستتكشف نتيجة الإصابة بالسلالة الشديدة لفيرويد الدرنه المغزلية فى البطاطس PSTVd وذلك عن طريق الحقن المبكر بالسلالة المعتدلة لنفس الفيرويد. زيادة على ذلك فإن العالم Fernow قد أظهر بأن السلالة الشديدة يمكن إعادة اكتشافها من نباتات الطماطم التى لم تظهر عليها الأعراض نتيجة الوقاية بالتضاد.

ملاحظة: هذا البحث قام به مجموعتين من العلماء. الأولى فى جامعة روكفلر فى أمريكا وعلى رأسهم C.L. Niblett، والمجموعة الثانية فى وارسو بولندا وعلى رأسهم العالمة E. Paduch. Cichal وهى التى أمدتنى بشكورة بهذه البحوث.

إن الدراسة التي أجريت على RNA بطريقة بصمة الأصبع Finger printing في كل من السلالة الشديدة والمعتدلة قد أظهرت أن هاتين السلالتين للفيروس PSTVd فيهما اختلافات بسيطة فقط في تتابع نيوكليوتيداتها. لقد أجرى عدة أبحاث لتحديد فيما إذا كانت الوقاية بالتضاد التي بين الفيروسيدات هي مقصورة فقط على تلك الفيروسيدات التي تظهر درجة عالية من تماثل التتابع في أحماضها RNAs.

لكي نجري إختبارات الوقاية بالتضاد بين أى فيروسين فمن الضروري أن نلاحظ :-

- ١ - توفر العائل المشترك بين الفيروسين موضوع الداسة.
 - ٢ - دراسة سابقة لهذين الفيروسين تثبت بأنهما يتناسخان في العائل المشترك.
- أجريت دراسة الوقاية بالتضاد على نباتات الطماطم و / أو نباتات الأقحوان وذلك باستعمال الفيروسيدات الآتية :-

- ١ - السلالة الشديدة من فيروس الدرنه المغزلية في البطاطس PSTVd - s.
- ٢ - السلالة المعتدلة من فيروس الدرنه المغزلية في البطاطس PSTVd - m.
- ٣ - فيروس اكسوكورنز الحمضيات CEVd.
- ٤ - فيروس تقزم الأقحوان CSVd.
- ٥ - فيروس الشحوب المتبرقش في الأقحوان ChMVd.

أظهرت الدراسات السابقة أن السلالة الشديدة والسلالة المعتدلة وفيروس اكسوكورنز الحمضيات تناسخ في نباتات الطماطم، بينما الدراسات التي ذكرت عن بصمة الاصبع المذكورة سابقاً قررت أن السلالة الشديدة والمعتدلة لفيروس الدرنه المغزلية في البطاطس ذات علاقة متقاربة جداً. أما عند المقارنة بين PSTVd وفيروس CEVd لم يظهر مناطق واسعة ذات تماثل متقارب في RNAs التابعة لها.

نبات الأقحوان:

إن نبات الأقحوان *Chrysanthemum morifolium* عائل هام ومفيد فى دراسة الفيروسيد. إن فيروسد تقزم الأقحوان CSVd وفيروسد الشحوب المتبرقش فى الأقحوان ChCMVd قد اكتشفت اصلاً فى هذا العائل وازدادت بشكل واسع فى الأصناف المزروعة مثل Bonnie Jean بالنسبة للفيروسد الأول، والصنف Velvet Ridge للفيروسد الثانى. إن دراسات التهجين التى أجريت بين CSVd و PSTVd أدت إلى القول بأن حوالى ٢٠% من RNA فى الفيروسد CSVd يكون متماثل مع ذلك الذى فى RNA لفيروسد PSTVd. وبوضوح فإن إختلافات التتابع بين PSTVd و CSVd تكون كافية لانتاج RNA مختلف كلية فى بصمة الأصبع، ولكن يوجد تشابهات كافية تسمح بعملية Cross - hybridization محدودة. إن التطبيقات البيولوجية لهذا التماثل يمكن أن تختبر إذا أصابت هذه الفيروسات عائل مشترك.

لإجراء التجارب، فى البداية يجب تحديد فيما إذا كان CSVd و ChCMVd يحدث لهما تناسخ فى الطماطم وفيما إذا كنت السلالة الشديدة والسلالة المعتدلة لفيروسد PSTVd وفيروسد CEVd تتناسخ فى نبات الأقحوان ثم بعد ذلك يختبر كل فيروسد لوحده لمعرفة قدرته على الوقاية ضد الفيروسات الأخرى.

تحضير اللقاح:

إن كلا السلالتين من PSTVd وفيروسد CEVd حصل لهما اكثار وزيادة فى نباتات الطماطم صنف Rutgers. إن اللقاحات من هذه الفيروسات حضرت عن طريق طحن الأوراق المصابة بالفيروسد والمتجمدة (١ : ١، W / V) فى هاون ومدقة مع ٠,٠٤ مول فوسفات البوتاسيوم منظم، pH8 محتوياً ٠,٣% من-mercaptoe- 2 - thanol. أما الفيروسدان CSVd و ChCMVd قد حفظا فى نبات الأقحوان. اللقاحات تتكون من مستخلصات كاملة من الحمض النووى من نسيج مصاب

مركزاً بعشرة وعشرين ضعف بالترتيب على أساس وزن النسيج عن طريق الترسيب بالايثانول.

الإختبارات على نباتات الطماطم:

تُحقن نباتات الطماطم عن طريق تعفير فلقات البادرات (٢ - ٤ مراحل ورقية) بالكرابوراندنم ثم تحك الفلقات بماسحة قطنية مغمورة باللقاح (بالمحلول المنظم في حالة الكنترول). تلاحظ التعبيرات المرضية وتكتب بعد ٦٠ - ٧٥ يوم من الحقن. تنقى الفيروسات من النباتات المصابة وتعلم في المعمل باليود المشع ١٢٥. يجرى التحليل بواسطة طريقة بصمة الأصبع ذات الاتجاهين لـ RNA قبل وبعد التكاثر في نباتات الطماطم. إن كلاً من السلالة الشديدة والمعتدلة في فيروس الدرنه المغزلية في البطاطس وكل من CEVd و CSVd كل منهما أظهر صفات ال RNA المميزة في بصمة الأصبع، هذا يدل على عدم وجود أى تداخل أو تلوث بين هذه الفيروسات وأن هذه الفيروسات تكاثرت بشكل نقى في النبات، إلا أن الاختبارات الحيوية فشلت في إثبات تناسخ ال ChCMVd في نباتات الطماطم.

أما إختبارات الوقاية بالتضاد على الطماطم فقد أجريت كما ذكر Fernow سنة ١٩٦٧. كانت الحقنة الأولى في طور الفلقة، أما الحقنة بالفيروس المتحدى فقد أجريت بعد ١٤ يوم، عندما كانت النباتات تحمل ٣ - ٤ مراحل ورقية وإن جميع الأوراق باستثناء أصغرها قد حقنت.

الإختبارات على نباتات الأقحوان:

في الإختبارات على نبات الأقحوان فإن ٦ - ١٠ عقل مجذرة (لها جذور) ذات طول ١٠ - ١٥ سم قد حقنت عن طريق وضع قطرة من اللقاح متوسطة الحجم على الساق ويعمل ٢٥ ثقب عميق خلال القطرة في الساق باستعمال نصل مشروط نمرة ١١، تحفظ النباتات في الصوبا الزجاجية على درجة ٢٢ - ٢٨ م أو في إطارات التنضد على درجة ٢٨ م وإضاءة ٢١٦٠٠ شمعة مع ١٦ ساعة إضاءة يومياً. كانت تحقن النباتات بالفيروسات الخمسة المذكورة سابقاً.

الأعراض التي تظهر تدل على أن كل من الفيروسات الخمسة قد تكاثرت. إن طريقة بصمة الأصبع لـ RNA لكل من العزلة الشديدة والعزلة المعتدلة و CEVd و CSVd أثبتت أنها قد عزلت من نباتات الأقحوان وقد أثبتت تطابق كل من هذه الفيروسات. لم يكن باستطاعة بصمة الأصبع اكتشاف ChCMVd نظراً لانخفاض الناتج منها.

عند إجراء إختبارات الوقاية بالتضاد على الأقحوان فقد أجريت باستعمال ضعف التركيز من الحمض النووي من السلالة الشديدة والمعتدلة و CEVd و CSVd وعشرين ضعفاً من تركيز ChCMVd. أجريت الحقنات بالفيروس المتحدى بعد ٤٠ - ٥٠ يوم على ساق غير محقون مظهراً أعراض واضحة للفيروس الأول. النباتات المختبرة قدرت على أساس نوع الأعراض المنتجة، شدة الأعراض و / أو تاريخ ظهور العرض (جدول ٢٢). الأوزان والأطوال لنباتات الطماطم أيضاً سجلت في الملاحظات في نهاية التجربة.

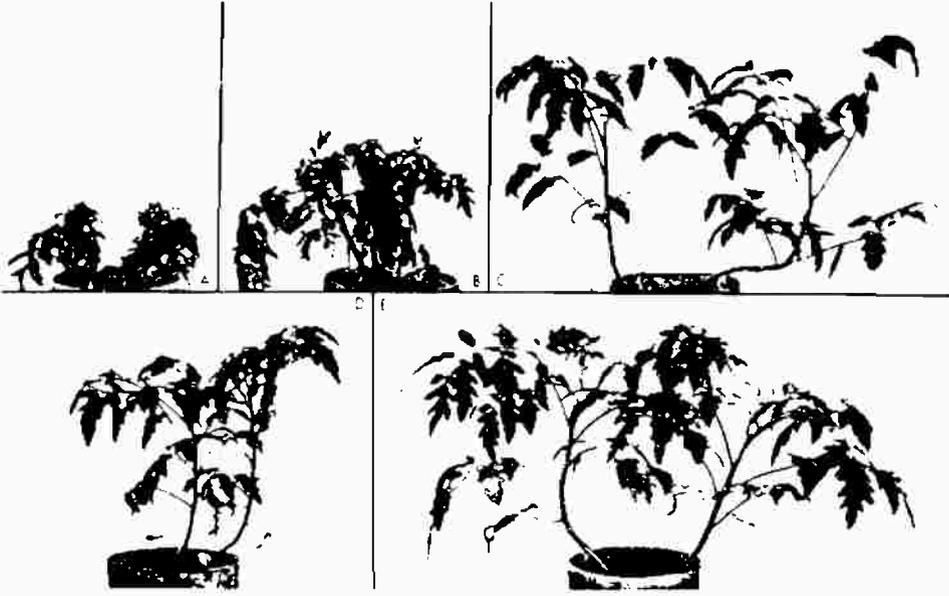
نتائج الإختبارات:

يمكن دراسة كل فيروس بمفرده لمعرفة مقدرته على أن يبقى محافظاً على نفسه ضد الفيروس الثاني إذا كانت الأعراض التي ينتجها تختلف بوضوح من و / أو أقل شدة من الأعراض المتسببة في ذلك النبات بواسطة الفيروس المختار (جدول ٢٢). يذكر وصف الأعراض لكل فيروس على نباتات الطماطم والأقحوان مجتمعة مع ذكر الوقت المطلوب لظهور التعبير العرضي بواسطة إختبار نصف الورقة في نباتات الطماطم.

١ - نتائج الإختبارات على الطماطم:

إن حقن نباتات الطماطم بالسلالة المعتدلة لوحدها سبب أعراضاً بسيطة جداً ولكنها خفضت الوزن وطول النبات بنسبة ٣٠٪ (شكل ٣٨، جدول ٢٣). أما نباتات الطماطم المحقونة بالسلالة الشديدة أو CEVd لوحدها تكشف عليها أعراض

شديدة مثل تقزم القمة الشديد، الالتفاف والتدلى والنكروزر، هذه الأعراض نموذجية للسلاسل الشديدة من PSTVd والفيروس CEVd وقد خفضت في الوزن بنسبة ٧٠ - ٨٠٪ وخفضت الطول بنسبة ٥٠٪ (شكل ٣٨ وجدول ٢٣).



شكل رقم ٣٨ :

الوقاية بالتضاد في نباتات الطماطم صنف Rutgers عن طريق الحقن بالتتابع بالسلالة المعتدلة من فيروس PSTVd وفيروس CEVd. الحقن الأول كان في طور الفلقات والحقن الثاني بعد ١٤ يوم من الحقن الأول. المعاملة A = حقنت CEVd مع منظم، B = حقنت بالمنظم أولاً ثم بالفيروس CEVd، المعاملة C = سلالة معتدلة ثم منظم. D = سلالة معتدلة ثم CEVd أما E = حقنت أولاً وثانياً بالمنظم. النباتات صورت بعد ٥٢ يوم من الحقن الأول.

جدول ٢٢: وصف الأعراض الفيرويدية والوقاية بالتضاد الناتجة في نباتات الطماطم والأقحوان.

اختبارات الوقاية بالتضاد				الأعراض		الفيروسات
ChCMVd	CSVd	CEVd	PS	الأيام	الوصف	
—	—	غير مؤكد	غير مؤكد		لا شيء	الطماطم CSVd
—	غير مؤكد	+	+	٥٢	تحت المعدل في الطول والوزن	PM
—	—	—	—	١٨	تقرم شديد، ندى أوراق، تككل في القمة	PS
—	—	—	—	١٨	تقرم شديد، ندى أوراق، تككل في القمة	CEVd
—	—	+	—		بقع شاحبة متوسطة	PM الأقحوان
—	لا يوجد وقاية	لا يوجد وقاية	لا يوجد وقاية		نظام التبرقش والشحوب	ChCMVd
لا يوجد وقاية	—	+	—		بقع شاحبة، تقرم متوسط	PS
غير مؤكد	—	+	+		تقرم، بقع شاحبة، ندى الورقة	CSVd
—	—	—	—		تقرم شديد وتشوه الورقة وشحوب	CEVd

ملاحظات على الجدول: -

١ - رتب الفيروسات تصاعدياً حسب ازدياد شدة الأعراض. PM = السلالة المعتدلة من فيروس الدرة المغزلية في البطاطس، PS السلالة الشديدة من فيروس الدرة المغزلية في البطاطس.

٢ - اليوم = يدل متى (على الأقل) نصف النباتات المختبرة أعطت تعبيرات أعراض.

٣ - الوقاية بالتضاد أجريت كما هو مشرح في الموضوع. حُفنت النباتات أولاً بالفيروس المذكور في الجهة اليمنى من الجدول ثم بعد ذلك حُفنت بالمتحدى (١٤ يوم في الطماطم، ٤٠ - ٥٠ يوم في الأقحوان) بالفيروسات المذكورة في أعلى الجدول.
+ تعنى حصلت وقاية. أما (-) تعنى لم تسجل النتائج.

جدول ٢٣: تأثير الحقن بالفيريويد على تكشف الأعراض وشدتها وعلى الوزن والطول في نباتات الطماطم صنف Rutgers.

المعاملات		الأعراض		التأثير على	
الحقن الأول	الحقن الثاني	الشدّة	الأيام اللازمة للظهور % متوسط الوزن بالنسبة للكتنترول	متوسط الطول بالنسبة للكتنترول %	
منظم	منظم	—	—	١٠٠	١٠٠
PS	منظم	+++	١٨	٢٨	٤٨
PS	CEVd	+++	١٨	٢٦	٥٣
PS	PM	+++	١٨	٢٨	٥٥
PS	CSVd	+++	١٨	٢٨	٥٦
CEVd	منظم	+++	١٨	٢٠	٤٧
CEVd	PM	+++	١٨	٢١	٤٤
CEVd	PS	+++	١٨	٢٠	٤٦
CEVd	CSVd	+++	١٨	٢٢	٤٧
PM	منظم	+	٥٢	٦٧	٧١
PM	CEVd	+	٥٢	٥٢	٦٨
PM	PS	+	٥٢	٥٤	٦٥
PM	CSVd	+	٥٢	٦٥	٧٠
CSVd	منظم	—	—	٨٩	٩٨
CSVd	CEVd	++	٥٢	٥٧	٦٧
CSVd	PM	+	٥٢	٦٨	٨٥
CSVd	PS	++	٥٢	٥٢	٦٨
منظم	PM	+	٥٢	٧٨	٨٢
منظم	CEVd	++	٣٦	٥٨	٦٠
منظم	PS	++	٣٦	٤٣	٦٠
منظم	CSVd	—	—	٩٣	٩٠

ملاحظات على الجدول: -

- ١ - الحقن الأول كان في طور الغلقات. الحقن الثاني كان بعد الحقن الأول بمدة ١٤ يوم وفي طور أربعة أو ثلاثة رقات. كان هناك ١٤ نبات لكل معاملة. متوسط الوزن للنباتات الكنتول ٥٥ غرام أما متوسط الطول كان ٤٨ سم.
- ٢ - فهرس الشدة كان (-) لا يوجد أعراض، (+) = أعراض معتدلة، (++) أعراض متوسطة، (+++) أعراض شديدة يمكن ملاحظة ذلك في شكل ٣٨.
- ٣ - استمرت التجربة ٦٥ يوم. بحسب اليوم عندما يظهر نصف أو أكثر من نباتات التجربة الأعراض المذكورة.

حقنت نباتات الطماطم أولاً بمنظم ثم بعد ذلك بالمتحدى مثل السلالة الشديدة أو CEVd، فكانت النتيجة أن تكشفت أعراض فيرويدية واضحة وخفضت حوالى ٥٠٪ من الوزن و ٤٠٪ من الطول (شكل ٣٨، B جدول ٢٣). مع أن الأعراض المميزة للفيرويد قد أنتجت فى هذه النباتات، إلا أن الأعراض كانت أقل شدة من تلك الواضحة فى شكل ٣٨، A، نظراً لأن النباتات كانت أكبر بمدة ٢ أسبوع عندما حقنت. على كل حال فإن تعبيرات الأعراض فى هذه المجموعة من النباتات معنوياً وأكثر شدة من تلك الملاحظة فى النباتات المحقونة فى اليوم الأول بالسلالة المعتدلة. النباتات التى حقنت فى اليوم الأول بالسلالة المعتدلة وبالمتحدى ثم بعد ١٤ يوم من ذلك بالسلالة الشديدة أو CEVd كانت غير متميزة عن تلك المحقونة بالسلالة المعتدلة لوحدها (شكل ٣٨، D و جدول ٢٣). وبالتالى فإن الحقن السابق بالسلالة المعتدلة حفظ هذه النباتات من تكشف أعراض فيرويدية شديدة تتسبب عن السلالة الشديدة أو عن CEVd. النباتات الموجودة فى شكل (D، ٣٨) كانت قد اختبرت لإظهار القوة القليلة من الأربعة عشر نبات فى تلك المعاملة، علاوة على ذلك فإنها لم تظهر أعراض فيرويدية. التجارب الأخرى المستعمل فيها خمسة عزلات إضافية أظهرت نفس الوقاية.

نباتات الطماطم المحقونة بالفيرويد CSVd لوحده لم يتكشف عليها أعراض مرئية ولم تكن مختلفة معنوياً عن النباتات غير المحقونة فى الطول أو الوزن (جدول ٢٢، ٢٣). وبنفس الطريقة فإن تلك النباتات المحقونة بالفيرويد CSVd والمتحدى مع سلالة معتدلة من PSTVd لم تختلف معنوياً فى الوزن والطول عن نباتات الكنترول المحقونة بعد ١٤ يوم بالسلالة المعتدلة. من ناحية أخرى بينما النباتات المحقونة بالفيرويد CSVd ثم حقنت بالمتحدى السلالة الشديدة أو الفيرويد CEVd، لحسن الحظ تكشفت أعراض فيرويدية وكان الخفض فى الوزن والطول مشابهاً للنباتات فى الكنترول (النباتات التى حقنت فى اليوم الأول بالمنظم وفى اليوم الرابع عشر حقنت بالسلالة الشديدة أو CEVd). إن إبتداء هذه الأعراض كان قد تأخر حوالى ١٦ يوم (جدول ٢٣). هذه النتائج تؤدى إلى القول بأن CSVd يتدخل مع نشوء

المرضية في نباتات الطماطم بواسطة السلالة الشديدة والفيروس CEVd. لقد حصل على مثل هذه النتائج المقنعة باختبارات مماثلة على نباتات الأقحوان.

٢ - نتائج الإختبارات على الأقحوان:

إن الأعراض الناتجة من السلالة الشديدة والسلالة المعتدلة والفيروس CEVd والفيروس CSVd والفيروس ChCMVd يمكن تمييزها بسهولة في نباتات الأقحوان صنف Bonnie Jean (جدول ٢٢). إن الحقن بالسلالة المعتدلة، السلالة الشديدة أو الفيروس CSVd تحفظ نبات الأقحوان من إظهار تعبيرات عرضية للفيروس CEVd. وعلى أية حال فإن ChCMVd لم يكن حافظاً ضد الأعراض من السلالة الشديدة (شكل ٣٨). أما في التجارب التي فيها حقنت النباتات أولاً بالفيروس CSVd أو CEVd ثم بعد ذلك حقنت بالمتحدي ChCMVd كانت غير حاسمة بسبب أن الأعراض الناتجة عن ChCMVd لم يمكن تمييزها إيجابياً عن تلك المتوطدة مسبقاً والأعراض الأكثر شدة من الفيروس CSVd والفيروس CEVd. وبالتالي كما هو ملخص في جدول ٢٢ فإن أفراد المجموعة من الفيروسات التي تشمل السلالة الشديدة والسلالة المعتدلة من PSTVd والفيروس CEVd والفيروس CSVd، ولكن باستثناء ChCMVd تظهر وقاية بالتضاد في نوع من الأقحوان. هذا يدل على أن السلالة الشديدة والمعتدلة والفيروس CEVd والفيروس CSVd تؤثر على عمليات بيولوجية مشتركة، مع أنها تختلف معنوياً من واحد إلى الآخر في التركيب الأولى للأحماض RNAs.

أما الفيروس ChCMVd يبدو أنه لا يؤثر في نفس هذه العملية. ولتحديد فيما إذا كان المتحدي (الفيروس المحقون ثانياً) له تأثير في الوقاية بالتضاد أو يمكن أن يحمي النباتات عن طريق حقنة في النباتات أولاً، فقد تم إجراء إختبارات حيوية في تجربتين حفظت النباتات عن طريق الحقن المزدوج. في كل حالة فإن كلا الفيروسين حصل له تناسخ. فمثلاً الأعراض النموذجية لكل السلالة الشديدة والفيروس CEVd (أو السلالة المعتدلة والفيروس CEVd) لوحظت بعد الإختبار

الحيوى لمستخلصات الحمض النووى من النباتات المحفوظة والمحقونة مسبقاً بأى من إتحادات الفيرويدات. إن مستوى التناسخ بواسطة الفيرويدات المفردة فى النباتات المحفوظة بالتضاد والمحقونة مرتين تبقى لتحديدتها.

خلال التجارب التى استمرت ٦٥ يوم لم يلاحظ اطلاقاً أعراض للفيرويد المتحدى المحقون فى نباتات الطماطم المحفوظة. وعلى أية حال، فى الأقحوان، فإن أعراض CEVd المتحدى المحقون لم تكبح بشكل غير محدود عن طريق الحقن المسبق بالسلالة الشديدة أو المعتدلة أو الفيرويد CEVd، وإنما بدأت فى الظهور فى هذه النباتات المحفوظة حوالى ٥٠ - ٦٠ يوم بعد الحقن بالمتحدى. هذه النتائج تشبه تلك التى حصل عليها Herrick & Cassells سنة ١٩٧٧ الذى درس الوقاية بالتضاد لسلالات فيروس موزايك الدخان.

لقد تم تفسير ظاهرة الوقاية بالتضاد فى الفيرويدات عن طريق تثبيت الإصابة بواسطة المحقون الأول سواء كان فيروس أو فيرويد والذى إلى حد ما يؤخر أو يمنع تعبيرات الأعراض عن طريق المتحدى المحقون فيروس أو فيرويد، ولا يمكن أن نلغى إمكانية أن مقدار التركيز للفيرويد المتحدى مطلوب لتعبيرات الأعراض وأن هذا التركيز لا يصل إليه فى حالة وجود السلالة الواقية كنتيجة للتثبيط الجزئى للتناسخ.

إدخال فيرويد ثمرة الخيار الباهتة فى التجربة:

أجريت التجربة السابقة مع إضافة فيرويد ثمرة الخيار الباهتة CPFVd فى التجارب على الأقحوان. فتبين أن الأقحوان صنف Bonnie Jean تفاعل مع الإصابة بالفيرويد CPFVd بظهور بقع صفراء صغيرة عديدة على حواف الأوراق وقممها.

وقد أظهرت نتائج دراسات الوقاية بالتضاد أنه فقط ChCMV لم يحفظ نباتات الصنف Bonnie Jean ضد الإصابة بأى من الفيرويدات الثلاثة الأخرى، ولا أى من هذه الثلاثة فيرويدات حفظ هذه النباتات ضد الإصابة بالفيرويد ChCMV.

ومن ناحية أخرى فإن النتائج المذكورة في جدول ٢٥ تدل على أن العزلتين من PSTVd بالإضافة إلى الفيرويد CSVd و CPFVd حفظت النباتات كل ضد الآخر. الحقن الرجعي للنباتات السليمة Bonnie Jean أكدت النتائج كما هو واضح في الأعراض.

لم يكن بالإمكان رؤية RNA الخاص بالفيرويد ChCMVd على شكل حزمة على الـ Polyacrylamide gels المحمل بمستخلصات من نباتات مصابة بالفيرويد ChCMVd حضرت بواسطة أى من الإجراءات المتبعة فى الاستخلاص، مع أن RNAs الخاصة بالنبات اكتشفت فى هذه المستخلصات عن طريق الصبغ بمادة Toluidine الزرقاء. إن حزم RNA لثلاثة فيرويدات الأخرى كانت دائماً موجودة فى وسط الجيل بالضبط فوق حزمة RNA - 9S. مهما كان فإن إجراءات المستخلص كانت تستعمل، أما حزمة m - PSTVd - RNA كانت دائماً الأكثر وضوحاً وكانت حزمة RNA للفيرويد CSVd كانت الأضعف. أما المستخلصات من نبات الأقحوان الصنف المزروع Mistletoe المحقونة بالفيرويد CPFVd لم تكن نقية بدرجة كافية نظراً لأن الجيل المحمل بهذه المستخلصات كانت تصبغ بشكل شامل بالتولويدن الأزرق.

جميع حزم RNA للفيرويدات كانت واقعة على نفس المسافة من قمة الجيل، هذا يدل على أنها لا تختلف فى حركتها فى الهجرة الكهربائية-Electrophoreti-cal mobility فى ٠.٥ بولى اكريلاميد جيل. يظهر فى جدول ٢٤ أن الفيرويد ChCMVd أصاب نبات الأقحوان فقط من الثلاثة أصناف المزروعة واحداث أعراض تبرقش الورقة النموذجية على الصنف Deep Ridge وعلى الصنف Bonnie Jean. أما الفيرويدات الثلاثة الأخرى أصابت جميع أنواع النبات المحقونة والمزروعة باستثناء نباتات الخيار صنف Sporu والتي كانت أصيبت فقط بالفيرويد CPFVd. نباتات الخيار المصابة نمت أبطأ من الأفراد السليمة، أوراقها كانت أصغر وشاحبة بأطراف مجمدة لأسفل، ازهارها كانت صغيرة ذات بتلات خشنة مثلثة وكانت ثمارها صغيرة شكل الكمثرى وذات لون أصفر باهت.

جدول ٢٤: تفاعل عدة نباتات إختبار للحقن بأربعة فيروسات.

التفاعل مع الحقن بالفيروسات					النبات المختبر
ChCMV	CPFVd	CSVd	m-PSTVd	s-PSTVd	
					١ - نبات الأفيون
ss	ss	ss	ss	ss	صنف Bonnie Jean
ss	ss	ss	ss	ss	صنف Mistleto
ss	si	si	si	si	صنف Deep Ridge
o	si	ss	si	ss	٢ - <i>Gynura aurantiaca</i>
o	ss	o	o	o	٣ - نبات الخيار صنف Sporu
o	ss	ss	ss	ss	٤ - الطماطم صنف Najwczesniejszy
o	ss	ss	ss	ss	الطماطم صنف New York
o	ss	ss	ss	ss	الطماطم صنف Rutgers
o	ss	ss	ss	ss	٥ - البطاطس صنف Line PW 22 / 70
o	si	lsss	lsss	lsss	البطاطس صنف <i>Scopolia sinensis</i>

ملاحظات على الجدول: -

ls = أعراض موضعية

ss = أعراض جهازية

si = إصابة جهازية بدون أعراض

o = بدون إصابة

جدول ٢٥ : نتائج إختبارات الوقاية بالتضاد مع أربعة فيروسات على الأبقوان
صنف Bonnie Jean .

الفيرويد الموجود في اللقاح المضاف إلى النبات خلال بعد ستة أسابيع من الحقن بالمتحدى	الحقن الثاني	الحقن الأول
m - PSTVd	—	m - PSTVd
m - PSTVd	s - PSTVd	m - PSTVd
m - PSTVd	CSVd	m - PSTVd
m - PSTVd	CPFVd	m - PSTVd
m - PSTVd + ChCMVd	ChCMVd	m - PSTVd
s - PSTVd	—	s - PSTVd
s - PSTVd	m - PSTVd	s - PSTVd
s - PSTVd	CSVd	s - PSTVd
s - PSTVd	CPFVd	s - PSTVd
s - PSTVd + ChCMVd	ChCMVd	s - PSTVd
CSVd	—	CSVd
CSVd	m - PSTVd	CSVd
CSVd	s - PSTVd	CSVd
CSVd	CPFVd	CSVd
CSVd + ChCMVd	ChCMVd	CSVd
CPFVd	—	CPFVd
CPFVd	m - PSTVd	CPFVd
CPFVd	s - PSTVd	CPFVd
CPFVd	CSVd	CPFVd
CPFVd + ChCMVd	ChCMVd	CPFVd
ChCMVd	—	ChCMVd
ChCMVd + m - PSTVd	m - PSTVd	ChCMVd
ChCMVd + s - PSTVd	s - PSTVd	ChCMVd
ChCMVd + CSVd	CSVd	ChCMVd
ChCMVd + CPFVd	CPFVd	ChCMVd
m - PSTVd	m - PSTVd	none
s - PSTVd	s - PSTVd	none
CSVd	CSVd	none
CPFVd	CPFVd	none
ChCMVd	ChCMVd	none

خامساً: التداخل بين الفيرويدات المحقونة معاً:

Interference Between Coinoculated Viroids

أظهرت الدراسات المتأخرة أن الوقاية بالتضاد Cross - Protection تحدث في الفيرويدات ليس فقط بين سلالتين لفيرويد معين (التي لا تختلف في تتبعها الأساسي بأكثر من ١٠٪) ولكنها تحدث أيضاً بين الفيرويدات المختلفة وهذا أدى إلى إجراء تجارب كثيرة في هذا المجال.

في إختبارات الوقاية بالتضاد الكلاسيكية يكون هناك مدة أسبوعين بين الحقن بالفيرويد الأول والحقن بالفيرويد المتحدى. وحيث أن ظاهرة الوقاية بالتضاد تقترح بأن وجود فيرويد واحد يمكن أن يتدخل مباشرة مع عملية تناسخ الفيرويد الثاني، وبالتالي فإن هذا يصعب تقديره بعد فترة طويلة لأن فترة أسبوعين بين الحقن بالفيرويد الأول والفيرويد الثاني تسمح بحدوث تأثيرات ثانوية أخرى. وبالتالي فإن هناك مجموعتين من التجارب لتحديد فيما إذا كان التداخل يمكن أن يلاحظ بين الفيرويدات الداخلة في النبات وكأنه لقاح واحد مخلوط من الفيرويديين.

عند البحث عن التداخل بين سلالة معتدلة من فيرويد الدرنة المغزلية في البطاطس m - PSTVd وسلالة شديدة s - PSTVd. حقنت بادرات طماطم ذات عمر ١٤ يوم بكل من السلالتين على حدة ومرة ثانية بالسلالتين معاً. بعد ١٠ أسابيع أخذت ملاحظات وصور عن هذه النباتات. خلال فترة العشرة أسابيع هذه استعملت طريقتان لتقدير تعبيرات الأعراض للفيرويد PSTVd. حدد طول كل نبات أسبوعياً بواسطة قياس طول الساق حتى القمة المرستيمية. بالإضافة إلى ذلك استعمل نظام تدرج عددي واستعمل ثلاثة مرات في الأسبوع ليسجل التغيرات غير العادية في الشكل الظاهري، مثل تشوه الأوراق، النموات الزائدة للسيقان

ملاحظة «هذه التجربة قام بها إثنى عشر باحثاً في جامعة روكفلر في أمريكا سنة ١٩٨٨ وكان على رأس هذا الفريق من الباحثين العالم ANDREA D.Branch. وهي تعرض هنا باختصار كبير».

المحورية، الشحوب، التبقع والموت والتقرم، هذا يعنى خفض المسافة بين السلاميات. التقديرات الممكنة على هذا المدرج تتراوح من صفر إلى خمسة. إن مقدار ٢ أو أكثر يدل على أعراض شديدة تدل على مرض فيرويدي شديد. هذه التجربة أجريت مرتين، باستعمال مجموعات معاملة تحتوى أربعة نباتات فى كل الأوقات. حصل على نتائج عالية التناسق ودرست المعلومات المتحصل عليها.

النباتات التى أعطيت لقاح مخلوط يحتوى ٠,٢ ميكوغرام لكل ملتر من السلالة المعتدلة من فيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس و ٠,٢ ميكوغرام لكل ملتر من السلالة الشديدة من نفس الفيروس كانت نتائجها من حيث منحى النمو والأعراض الجانبية مطابقة لتلك النباتات المحقونة بكمية ٠,٢ ميكوغرام لكل ملتر من السلالة الشديدة لنفس الفيروس لوحدها. هذا يدل على إخفاق للسلالة المعتدلة فى أن تقلل التعبيرات المرضية للأعراض المتسببة عن السلالة الشديدة أما النباتات المحقونة بكمية ٠,٢ ميكوغرام لكل ملتر من السلالة المعتدلة نمت بسرعة أكثر ووصلت إلى طور نهائى أكبر من النباتات المحقونة إما بمخلوط من السلالة المعتدلة والشديدة معاً أو السلالة الشديدة لوحدها. وعلى كل حال فإن النباتات المحقونة بالسلالة المعتدلة يمكن أن تميز عن النباتات المحقونة بالكنترول على أساس الارتفاع وعلامات الشكل الظاهرى. النباتات المحقونة بعشرة أضعاف زيادة من السلالة المعتدلة فوق السلالة الشديدة (٠,٢ ميكوغرام لكل ملتر من السلالة المعتدلة و ٠,٠٢ ميكوغرام لكل ملتر من السلالة الشديدة) كانت غير مميزة عن النباتات المحقونة بالسلالة الشديدة بتركيز ٠,٠٢ ميكوغرام لكل ملتر. وبالتالي حتى عندما يكون اللقاح محتوياً عشرة أضعاف زيادة من السلالة المعتدلة فإن العزلة الشديدة كانت سائدة سيادة كاملة على مستوى التعبير العرضى للمرض.

وعلى النقيض من ذلك فإن النباتات المحقونة بمائة ضعف زيادة من السلالة المعتدلة نمت إلى معدل ارتفاع أكثر قليلاً من المجموعة المشابهة المحقونة بالسلالة الشديدة لوحدها، هذه الزيادة لوحظت فقط فى فردين من المجموعة. نفس هذين

النباتين أظهرتا أعراض معتدلة فقط خلال العشرة أسابيع في فترة بعد الحقن. وعلى أية حال في ٧٥٪ من النباتات فإن أعراضاً غير مخفضة من المرض الشديد قد نتجت على الرغم من زيادة مائة ضعف من اللقاح من RNA من العزلة المعتدلة لا يوجد أى دليل على أن السلالة الشديدة والمعتدلة تسبب تأثيرات إضافية عند حقنهما معاً في النباتات.

الجرعة المطلوبة لتعبيرات الأعراض:

هل من الممكن أن تلك الأعراض سوف تختلف ليس فقط مع السلالة ولكن أيضاً مع جرعة اللقاح؟؟ للإجابة على هذا السؤال فإن مجموعات من النباتات الكنترول حقنت إما بالسلالة المعتدلة من فيروس الدرنه المغزلية في البطاطس لوحدها (بتركيز ٤،٠،٢،٠،٢،٠،٢ و ٢،٠٠٢ ميكوغرام / مللتر) أو بالسلالة الشديدة لوحدها (فوق نفس المستوى المستوى من التركيز) ثم وضعت تحت المراقبة لمدة عشرة أسابيع. وجد أن الوقت اللازم لبداية ظهور الأعراض الفيرويدية النموذجية يتناسب عكسياً مع تركيز اللقاح. وعلى أية حال فإن هذا التأثير الذى كان أكثر وضوحاً خلال أول أسبوعين بعد الحقن لم يستمر. بمضى عشرة أسابيع بعد الحقن فإن جميع المجموعات النباتية المحقونة بالسلالة المعتدلة مطابقة تماماً لبعضها البعض بغض النظر عن التركيزات التى استعمل فيها اللقاح، سواء حقنت بتركيز ٤،٠ ميكوغرام لكل مللتر أو ٢،٠٠٢ ميكوغرام لكل مللتر فهى تعبر عن نفس المستوى من أعراض السلالة المعتدلة وكانت كلها أقصر قليلاً من نباتات الكنترول المحقونة بالمنظم. وبالمثل فإن النباتات المحقونة بتركيز ٢،٠٠٢ ميكوغرام لكل مللتر من السلالة الشديدة أظهرت نفس الخفض العنيف فى الدرجة وحصلت على نفس الأعراض مقدره مثل تلك المحقونة بتركيز ٤،٠ ميكوغرام. فى كل حالة فإن الأعراض الخاصة المميزة للسلالة وجد أنها تتكشف فى النباتات المحقونة بمدى جرعات من الفيروس متفاوتة وإن إختلاف التركيز فى الحقن يظهر تأثير فى أول ٧٠ يوم ثم بعد ذلك لا يعود لاختلاف التركيز أى أثر على الأعراض.

تثبيط تناسخ فيروس تقزم حشيشة الدينار بعد الحقن المشترك بفيروس PSTVd:

نظراً لأن عزلات الفيروس تحدث طبيعياً، مثل العزلة المعتدلة والشديدة لفيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس، فإنها يمكن أن تحتوى خليطاً من تنوعات التابع. إن هذه الدراسة إمتداداً للدراسة السابقة وذلك لمقارنة كفاءة التناسخ فى النباتات المحقونة بنسخ من تابع فيروس مكلون. هذه النسخ ممكن أن تزود بلقاح يحتوى تتابعات نقيه مفردة.

لقد إختير فيروس تقزم حشيشة الدينار HSVd وفيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس PSTVd لهذه التجربة لعدة أسباب منها: -

- ١ - هذان الفيروسان يحدثان أعراضاً مختلفة جداً فى نباتات الطماطم.
- ٢ - الإصابة بفيروس تقزم حشيشة الدينار تسبب أعراضاً غير ظاهرة فى البطاطس بينما فيروس الدرنه الغزلية الهولندية يسبب أعراضاً شديدة جداً تحت ظروف النمو المستعملة فى التجربة.
- ٣ - نظراً لأن الفيروسين يمتلكين تماثل تتابع محدود فقط فمن الممكن تمييزهما بطريقة تهجين الحمض النووى.
- ٤ - إن نسخ ال Dimeric من HSVd و PSTVd قد تبين أنها معدية فى نباتات الخيار والطماطم بالترتيب.

لإختبار نسخ ال HSVd dimeric على نباتات الطماطم، فإن cDNA inserts كانت قد تحركت أولاً فى ناقلات التعبير pSP6. إثنان من البلازمم مختلفان كل من تكرار ترادفى رأس مع ذيل من HSVd cDNA ركبت فى pSP6 واحداً يستعمل موقع Eco R1 الموجود فى HSVd DNA والآخر مستعملاً مواقع Bam H1. النسخ من هذه البلازميدات يشار إليها HSD3 و BH2 بالترتيب

تحتوى HSVd dimers من القطبية الموجبة محاطة جانبياً بمناطق قصيرة من تتابعات الناقل.

إن تهجين الحمض النووي قد بين أن تناسخ HSVd يحدث في نباتات الطماطم المحقونة بكل من النسختين HSVd dimeric. وعلى أية حال كما هو متوقع فإن هذه النباتات لم يتكشف عليها أية أعراض يتعرف عليها. إن نسخة الـ PSTVd 8A قد أظهرت في تجارب سابقة أنها معدية لنباتات الطماطم، هذا يكون باعثاً على نضج الـ PSTVd RNA الدائري لتتابع الهولندي. إن الحقن بـ 8A أنتج أعراضاً مميزة لمرض فيروسى شديد. المقارنة بـ dot intensities بين أن نباتات الطماطم المصابة بفيروس PSTVd يتجمع فيها على الأقل ٥٠ ضعف من RNA الفيروسي أكثر منه في نباتات الطماطم المحقونة بفيروس HSVd.

هناك إجراءات مختلفان إستعملا للحقن المشترك للنباتات بفيروس HSVd وفيروس PSTVd. في تصميم مشابه لذلك المستعمل في دراسة السلالة المعتدلة والشديدة في فيروس الدرنه المغزلية في البطاطس فإن نسخاً من الـ Dimeric من HSVd و PSTVd خلطت مع بعضها بمعدلات مختلفة وحقنت في بادرات الطماطم. في التجربة الثانية، فإن نسخاً مزدوجة حضرت والتي تحتوى صورتين (نسختين) من الـ PSTVd إرتبطت مع صورتين من HSVd. هذه النسخة BPH 21 تضمنت إضافة التتابعات من HSVd و PSTVd بتركيزات متساوية. كانت النتائج من كلا التجريبتين متشابهة بغض النظر عن التصميم. إن وجود الـ PSTVd كان مقترناً بخفض ملحوظ في تناسخ الـ HSVd.

في تجارب أولية للتنافس بين HSVd و PSTVd فإن نسخاً من HSD₃ و 8A خلطت بمعدلات بنسبة تتراوح من ١ : ١ إلى ١ : ١٠٠. النباتات التي تحصل على نفس اللقاح كانت تعامل كمجموعة. بالمقارنة مع عينات من النباتات حقنت بنسخاً من HSVd لوحده، فإن التركيز من HSVd كان يخفض بالتدرج في الأحماض النووية من النباتات المحقونة بـ HSVd و PSTVd بنسبة ١ : ١. لوحظ بعض الخفض في HSVd في مستخلصات من النباتات حقنت بعشرة

أضعاف زيادة من نسخ HSVd، بينما نسخ الـ PSTVd لم يكن لها تأثير مكتشف على التجمع في النباتات المحقونة بمائة ضعف زيادة من نسخ HSVd.

لتحديد فيما إذا كان المستوى المنخفض من HSVd عاكساً عدم المقدة النسبية على نسخ الـ HSVd لتدخل خلايا الطماطم في الوقت الذي عنده يضاف اللقاح، النباتات كانت أيضاً محقونة بنسخة مزدوجة (BPH 21) محتوية صوراً مرتبطة من الـ Dimeric لكل من HSVd و PSTVd. وعلى أية حال فإن تناسخ HSVd لم يثبت في النباتات التي أخذت هذه النسخة. في الحقيقة، فإن سبعة أسابيع بعد الحقن خلالها لم يمكن اكتشاف HSVd في الساق ومستخلصات الورقة في هذه النباتات. في التجارب اللاحقة فإن محتويات الفيروس في النباتات المفردة كانت قد تحددت.

إن طريقة Dot hybridization أظهرت أن واحداً فقط من ثمانية نباتات يتجمع فيها مستويات ممكن التعرف عليها من HSVd RNA عندما حقنت بمخلوط محتويماً ٢٠ ميكوغرام لكل ملتر من HSD₃ و ٢,٠ ميكوغرام لكل ملتر من نسخ Dimeric PSTVd. ومن ناحية أخرى فإن ثلاثة من أربعة نباتات تنسخ HSVd عندما حقنت بـ HSD₃.

إن كفاءة الـ PSTVd في وقف تناسخ الـ HSVd كان أيضاً مؤكداً في النباتات المحقونة بمقدار ٤٠ ميكوغرام لكل ملتر من النسخة المزدوجة، BPH 21. هذه النباتات أظهرت أعراض مرض شديدة يتعذر تمييزها عن تلك الناتجة بواسطة الحقن بنسخة الـ PSTVd لوحدها. إن الفيروس PSTVd يتجمع في الخمسة نباتات كلها، بينما HSVd لم يمكن اكتشافه في أى منها. إن النسخة من HSVd dimer- أكثر تشابهاً للنسخة المزدوجة التي تسمى BH₂. هذه النسخة تصيب ثلاثة من خمسة نباتات عندما حقنت بمقدار ٢٠ ميكوغرام لكل ملتر. كذلك فإن BH₂ تصيب ثلاثة من خمسة نباتات عندما حقنت بمقدار ٥٠ ميكوغرام لكل ملتر. إن إصابة ٦ من ١٠ نباتات طماطم محقونة بمقدار ٢٠ - ٥٠ ميكوغرام لكل ملتر من BH₂ أدى إلى الاقتراح بشدة بأن HSVd فشل في التناسخ في النباتات المحقونة بنسخة مزدوجة من BPH 21 بسبب التداخل من PSTVd.

يمكن القول باختصار بأن هذه التجربة قد أظهرت أن نسخاً من PSTVd قد خفضت بشكل كبير جداً حيوية نسخ HSVd. إن طريقة Dot hybridization قد أظهرت أن الفيرويد PSTVd فقط هو الذى يتضاعف وينسخ إلى مستويات يمكن اكتشافها فى النباتات المحقونة بنسخ مزدوجة تحتوى نسختين من PSTVd متبوعة بنسختين من HSVd. بينما النسخ المزدوجة التى فيها HSVd تتابعه يسبق تلك التى فى PSTVd التى تحتاج إلى الإختبار. لقد تبين أن نسخ HSVd تكون معدية عندما تحاط بمدى واسع من التتابعات المختلفة. ويبدو أن HSVd يفضّل فى التضاعف عندما يحقن مشتركاً مع PSTVd فى النباتات بسبب التداخل الواضح من PSTVd.

هناك سؤالاً نحتاج إلى الإجابة عليه مستقبلاً وهو هل الفيروسات الشديدة المرضية تستطيع أن توقف تناسخ الفيروسات الأقل شدة مرضية؟؟

إن تجارب الحقن المشترك تختلف عن تجارب الوقاية بالتضاد Cross - Protec- tion والتى فيها إحدى الفيروسات يدخل النبات قبل الآخر بمدة معينة. إذا كان تناسخ الفيرويد يؤدي إلى تكوين تركيب معقد دائم فإن هذا التركيب يكون منافساً للفيرويد الثانى الذى يدخل متأخراً. أما فى تجارب الحقن المشترك فإن الفيرويدين يدخلان معاً مما يسمح لهما بفرصة متساوية، هذه الأوضاع تجعل الفيرويد الشديد يكون عنده فرصة كبيرة لتكوين معقد بغض النظر عن وجود الفيرويد الضعيف.

لقد وجد أن تناسخ PSTVd فى النباتات الحساسة جداً للبرد والتى تنمو على درجة أقل من ٢٤م يكون قليل جداً مما يؤدي إلى تثبيط واضح فى الأعراض المرضية وفى تراكم الفيرويد فى النبات. كذلك فإن مستويات HSVd فى نباتات الطماطم النامية فى نفس درجات الحرارة كان أقل منه فى PSTVd. وأن طرق التحاليل المختلفة أثبتت أن مستويات HSVd لا تزيد عن ٢٪ من مستوى PSTVd. إن الاختلاف فى هذا المستوى يؤدي إلى الاختلاف فى إظهار الأعراض المرضية على نباتات الطماطم.

مراجع خاصة بالفصل الرابع

- 1 - Bachmann, B., Luke, W. and Hunsmann, G. 1990. Nucleic Acid Res. 18 : 1309.
- 2 - Cassells, A. C. and Herrick, C.C. 1977. Virology 78 : 253 - 260.
- 3 - Fernow, K. H. 1967. Phytopathology 57 : 1347 - 1352.
- 4 - Heckcr, R. et al. 1988. Gene 72. 59 - 74.
- 5 - Loss, P., Schmitz, M., Steger, G. and Riesner, D. 1991. EMBO J. 10 : 719 - 727.
- 6 - Matousek, J, Trnena, L. Rakousky, S. ad Riesner, D. 1994. J. Phytopa., 140 : 10 - 24.
- 7 - Mellor, F. C. and R. Stace - Smith. 1977. Applied and Fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer Verlag, Berlin.
- 8 - Melton, D. A. et al 1984. Nucl. Acids. Res. 12 : 7045 - 7056.
- 9 - McKinney, H. H. 1929. I. Agric. Res. 39 : 557 - 578.
- 10 - Palukaitis, P. 1987. Virology, 158 : 239 - 241.
- 11 - Riesner, D. et al. 1989. Electrophoresis 10, 377 - 389.
- 12 - _____ , _____ , _____ .1990. New Series in biophysics. Nucleic Acids Vol IV PP. 194 - 243.
- 13 - Steger, G. et al. 1992. J. Mol. Biol. 227 : 719 - 737.
- 14 - Tsagris, M., Tabler, M. ad Sanger, H. L. 1991. Nucleic Acid Res. 19 : 1605 - 1612.
- 15 - Wassengger, W. J. et al. 1994. Cell. 76 : 267 - 276.