

## الفصل الثالث

### الدراسات الحديثة للفيرويدات

### تصنيف - نطاقات - تنوع المتابع وتشخيص الفيرويدات

### classification - Domains - Sequence Variants and Diagnosis of Viroids

أولاً: - تصنيف الفيرويدات Classification of Viroids :

ظهرت آراء كثيرة فيما يتعلق بتصنيف الفيرويدات وسواء صنفتم الفيرويدات تحت الفيروسات أم لا فإن ذلك يعتمد على التعريف الدقيق والمقبول لكلمة فيروس Virus. وبالتالي فإن التعريف الذي ذكر في الطبعة الثالثة من كتاب General Virology الصادر سنة ١٩٧٨ لمؤلفه Luria et al والذي يرى فيه أن التركيب الذي أقل من الخلية والذي يمتلك طور حيوى معدى يتمثل بشكل خاص فى الفيروسات وهذه الفيروسات تنتج تحت نظام وراثى لا يختلف عنه فى الفيروس، والنظام الوراثى فى الفيروس يختلف عنه فى الفيرويد، اعتماداً على ذلك فإن الفيرويدات لا تقع فى هذا المجال من التعريف وبالتالي لا تدرج فى التصنيف تحت الفيروسات.

ومن ناحية أخرى فإن العالم Lwoff سنة ١٩٨١ يرى أن الفيروسات هى كائنات ذات قدرة حيوية على إحداث العدوى وذات قدرة على إحداث المرض وهى طفيليات مطلقة بكل ما فى الكلمة من معنى. وقد أكد فى تعريفه للطفيليات المطلقة على أنها تلك الطفيليات التى تستخدم النظم الأنزيمية لخلايا

عوائلها فى إنتاج الطاقة (نظام Lipmann) وبناء البروتين وتستخدم رايبوسومات خلايا العائل وكذلك tRNAs للعائل. حسب هذا التعريف فإن الفيروسات تكون فيروسات بشكل واضح.

بغض النظر عن أى من هذين التعريفين هو الأصح، إلا أن هناك إختلافات واضحة بين الفيروسات التقليدية والفيروسات. مع أن العالم Lwoff ذكر فى تعريفه للفيروسات بأنها أنواع من الفيروسات، إلا أنه إقترح تقسيم مملكة الفيروسات إلى مجموعتين، الأولى الفيروسات الحقيقية The True Viruses أو Euviruses والثانية الفيروسات Viroids.

إن العالم Lwoff إعتد فى تقسيمه على درجة وطبيعة التطفل ولم يضع فى إعتباره عمق الاختلافات بين الفيروسات والفيروسات. من الملاحظ أنه إذا كانت الفيروسات طفيليات مطلقة فى رأى العالم Lwoff، فمن الممكن اعتبار الفيروسات فوق التطفل المطلق Ultra - absolute parasites (يعنى أكثر من تطفل مطلق)، وذلك لأنها تعتمد إلى حد بعيد وكبير (زيادة عن الفيروسات) على آلية البناء الحيوى لخلايا عوائلها. مع أن الفيروسات تحتوى بشكل ثابت معلومات وراثية والتي بمساعدة النظام البنائى لبروتين العائل فإنها يمكن أن تترجم (فى طور واحد أو أكثر من دورة تضاعف الفيروس) إلى واحد أو أكثر من البروتينات الخاصة بالفيروس، إلا أن الفيروسات يبدو أنها لا تمتلك هذه الكفاءة. وبالتالي فإن الفيروسات حتى يحدث لها تضاعف فإنها يجب أن تعتمد كلية على أنزيمات موجودة بشكل طبيعى فى خلايا عوائلها. وبالتالي يمكن القول بأن الفيروسات هى الكائنات الممرضة الوحيدة المعروفة التى لا تعمل شفرة لأى بروتينات.

بعد تلك المناقشة مع العالم Lwoff تبين له ضعف وعدم دقة إقتراحه بتصنيف الفيروسات كأنها فيروسات وزاد هذا الاقتراح ضعفاً عند معرفة التركيب الجزيئى الفريد والغريب للفيروسات والذي ليس له نظير بين الفيروسات، هذا التركيب الذى جعل أى علاقة تطورية بين هذين الكائنين الممرضين الفيروسات والفيروسات فى قفص الاتهام.

يعتبر التتابع القاعدة الأساسية لمقارنة الفيروسات (تتابع النيوكليوتيدات في خيط الـ RNA) مع بعضها البعض. إن تتابع المنطقة المركزية المحفوظة يسمح لجميع الفيروسات الموصوفة (التي درست) بأن تصنف إلى أربعة مجموعات. الإختلاف الذى يقع ضمن كل فيروس ينسب إليه الأنواع وإن الأساس الذى يعتمد عليه فى التفريق بين التنوع Variants والنوع Species، هو أنه فى التنوع يكون هناك تشابه فى التتابع بحدود ٩٠٪، أما فى النوع Species فإن تشابه التتابع يكون أقل من هذا المستوى.

إعتماداً على هذا الأساس من التقسيم صنف الفيروسات إلى مجموعتين رئيسيتين وثلاثة تحت مجموعة.

لقد وضع Koltunow & Rezaian سنة ١٩٨٩ أساس تصنيف الفيروسات اعتماداً على مقارنة تحليل التتابعات فى الفيروسات ويوصى باستعمال جدول رقم ٧. حيث تقسم الفيروسات إلى مجموعتين رئيسيتين A و B وإن فيروس ASBVd هو الذى يمثل فى مجموعة A، لأن هذا الفيروس لا يظهر بشكل أساسى أية علاقات تتابع مع أى من الفيروسات الأخرى، مع أنه من المعقول جداً أن هناك أفراداً أخرى من هذه المجموعة (وقد وضع فيروس الموزايك الكامن للخوخ فى هذه المجموعة) وسوف تكتشف أفراداً أخرى مستقبلاً.

تقع الفيروسات الأخرى كلها ضمن المجموعة B والتي تسمى مجموعة Pospivroids. هذه المجموعة يمكن أن تقسم إلى ثلاثة تحت مجموعات هي  $B_1$ ،  $B_2$ ،  $B_3$ . إن تحت المجموعة  $B_1$  يمثلها الفيروس PSTVd وتحتوى ١٥ فيروس بدأت معرفة أولها منذ عشرين عاماً، مع أن بعضاً منها مثل CTiVd، CLVd قد عرف تتابعها حديثاً سنة ١٩٨٨ - ١٩٨٩. كل هذه الفيروسات تمتلك تتابع محفوظ وصفات تركيبية فى القمة المركزية للخيط فى جزئ الفيروس. أما تحت المجموعة  $B_2$  الذى يمثلها ASSVd وتسمى مجموعة Apscaviroids فهى تحتوى ثمانية فيروسات والتي قد وصفت حديثاً. هذه الفيروسات تتشارك فى مسافة (قطعة) كبيرة من تماثل التتابع خاصة ضمن المنطقة المركزية لجزئ الفيروس والذى هو الأساس فى وضعها فى مجموعات.

إن أحدث الفيرويدات وصفاً هو فيرويد (Columnnea blumei Viroid) CbVd وهو أيضاً واحداً من أصغر الفيرويدات به ٢٤٨ نيوكليتيده إكتشف سنة ١٩٩٠ يصيب الكوليس. إن تتابعه غير متعلق بشكل أساسي مع أى من الفيرويدات، ولكن صفات منطقتها المركزية تشابه لتلك الصفات الموجودة في عدد من أفراد تحت المجموعة B<sub>1</sub>، B<sub>2</sub> وبالتالي فإنه وضع في تحت مجموعة جديدة هي B<sub>3</sub>.

جدول رقم ٧ : تصنيف الفيرويدات

عدد النيوكليوتيدات في الفيرويد	اسم الفيرويد مختصر	اسم الفيرويد بالتفصيل	تحت مجموعة الفيرويد	مجموعة الفيرويد
٢٤٧ (٢٥٠ - ٢٥١)	ASBVd	Avocado Sunblotch Viroid	تحت مجموعة ASBVd	مجموعة A أو Avsunviroids
٢٣٧	PLMVd	Peach Latent Mosaic Viroid		
٣٥٩	PSTVd	Potato Spindle tuber Viroid	تحت مجموعة B1	مجموعة B أو Pospiviroids
٣٧٥ - ٣٧٠	CEVd	Citrus Exocortis Viroid	تحت مجموعة أو PSTVd	
٢٤٠ - ٢٧٥	CVd	Citrus Viroids		
٢٤٧ - ٢٤٦	CCCVd	Coconut Cadang - Cadang Viroid		
٢٥٤	CTiVd	Coconut Tinangaja Viroid		
٣٥٦ - ٣٥٤	CSVd	Chrysanthemum Stunt Viroid		
—	ChCMVd	Chrysanthemum Chlorotic Mottle V.		
٣٠٣ - ٢٩٧	HSVd	Hop Stunt Viroid		
٢٥٦	HLVd	Hop Latent Viroid		
٣٦٠	TPMVd	Tomato Planta Macho Viroid		
٣٦٠	TASVd	Tomato Apical Stunt Viroid		
٣٧٢	ITBTVd	Tomato Bunchy Top Viroid (Indian)		
٢٩٧	CPFVd	Cucumber Pale Fruit Viroid		
٣٧٢	CLVd	Nematanthus Viroid		
٣٧٠	CLVd	Cloumnea Latent Viroid		
٣٣٠	ASSVd	Apple Scar Skin Viroid	تحت مجموعة B2 أو تحت مجموعة ASSVd	مجموعة Apscaviroids
٣٣٨	DAVd	Dapple Apple Viroid		
٣٤٠	AFCVd	Apple Fruit Crinkle Viroid		
٣١٥	PBCVd	Pear Blister Canker Viroid		
—	CBLVd	Citrus Bent Leaf Viroid		
٣٦٩	AGVd	Australian Grapevine Viroid		
٣٦٧	GYSVd-1	Grapevine Yellow Speckle Viroid - 1		
٣٦٣	GYSVd-2	Grapevine Yellow Speckle Viroid - 2		
٢٤٨	CYVd	Coleus Yellow Viroid	تحت مجموعة B3	
٢٤٨	CbVd-1	Coleus Blumei Viroid		

ملاحظات:

- ١ - فيرويدات الحمضيات لها تصنيف لوحدة في الجزء الثاني من الكتاب.
- ٢ - الفيرويد المسبب الشجرة الباهتة في الخيار، تقر الشجرة في الخوخ والبرقوق يعزل من الحمضيات والعنب.
- ٣ - يعتبر فيرويد الشجرة الباهتة في الخيار تنوع تابع لفيرويد حشيشة الدبنار.

بالإضافة إلى الفيروسات المذكورة في جدول رقم ٧ هناك عدة فيروسات تحت الدراسة وهذه الفيروسات هي:

- |                                       |   |
|---------------------------------------|---|
| 1 - Burdock stunt Viroid.             | 7 - Privet Viroid.                          |
| 2 - Pear Rusty Skin Viroid.           | 8 - Oil Palm Fatal Viroid.                  |
| 3 - Apple Scar Skin latent Viroid.    | 9 - Pigeon Pea Mosaic Mottle Viroid.        |
| 4 - Nicotiana glutinosa Strnt Viroid. | 10 - Dapple Fruit Viroid of Plum and Peach. |
| 5 - Carnation stunt Viroid.           |   |
| 6 - Wheat Leaf Blight Viroid.         | 11 - Nematanthys Viroid.                    |

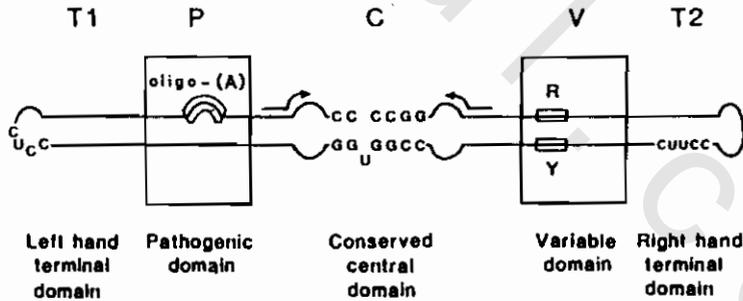
إن تحليل مقارنة التابع في النيوكليوتيدات لتسعة عشر فيروساً قد تم تحديد تتابعاتها وهذا يسمح بتصنيفها إلى مجموعتين كبيرتين. مجموعة A تحتوي فرد واحد لغاية سنة ١٩٩٢ وهو فيروس ضربة الشمس في الافوكادو ASBVd وهو ثاني أصغر الفيروسات المعروفة وهو الوحيد لغاية ١٩٩٢ الذي يحدث له إنشطار في المعمل ثم أضيف إليه فيروس آخر. الفيروسات الباقية في مجموعة B وتسمى مجموعة PSTVd - group B وهذه تقسم إلى تحت مجموعات ثلاثة هي PSTVd sub group B<sub>1</sub> - والثانية B<sub>2</sub> - sub - group B<sub>2</sub> والثالثة B<sub>3</sub> - sub - group B<sub>3</sub> .

الأسس التي بنى عليها تصنيف مجموعة B هي وجود تتابعات محفوظة في الجزء المركزي لجزئ الفيروس. في نموذج النطاق للفيروسات شكل ٧، فإن جميع جزيئات الفيروس في PSTVd مجموعة B يكن أن تقسم إلى خمسة نطاقات هي T<sub>1</sub>، V، C، P، T<sub>2</sub>. وإن حدود هذه النطاقات قد حددت بواسطة مقارنة التابع للفيروسات في أزواج. إن التغيرات الشديدة في تماثل التابع من الأعلى إلى الأقل أو العكس يبين مواقع الحدود والتي كانت دائماً ثابتة مع مقارنة الأزواج المختلفة. إن نموذج النطاق كان قد تكشف باستعمال تتابعات الفيروس فقط من تحت مجموعة B<sub>1</sub> لـ PSTVd بسبب أن أفراد هذه المجموعة كانت

متوفرة في ذلك الوقت. وعلى أية حال فإن فيروسات تحت المجموعة B<sub>2</sub> التابعة لـ ASSVd أيضاً تمتلك نفس النطاقات كما حدثت بواسطة نفس البحث وهو المقارنة الزوجية لتمائل التابع.

إن تحت مجموعة B<sub>2</sub> من ASSVd قد فصلت عن تحت مجموعة B<sub>1</sub> على أساس التابع في نطاق C. إن المنطقة المحفوظة المركزية ضمن نطاق C لكل تحت مجموعة فيها تتابعات بحوالى ٣٠ نيوكليتيدها وهي محافظ عليها بشكل كبير بين جميع أفراد تحت المجموعة والتي تمثل حوالى ثلث مجموع النيوكليتيديات في نطاق C. بشكل أساسى لا يوجد هناك تماثل بين هذه الثلاثين أو ما يقاربها في تحت المجموعتين وهذا يشكل الأساس فى تحت التقسيم. أما تحت مجموعة B<sub>3</sub> فهي لا تزال تحت الدراسة وتشمل فيروسين.

يؤدى نموذج النطاقات إلى الاقتراح بأن نشوء الفيروسات يشمل إعادة ترتيب النطاقات بين الفيروسات المهاجمة لنفس الخلية. سوف نتكلم عن النطاقات بالتفصيل فى صفحات لاحقة إن شاء الله.



شكل رقم ٧ :

نموذج لخمسة نطاقات فى مجموعة PSTVd. حدود نطاقات T<sub>1</sub>، P، C، V، T<sub>2</sub> محددة بتغير ملحوظ فى تماثل التابع فى ازواج القواعد بين الفيروسات. الاسهم تدل على التابع المتكرر المقلوب والذي يمكن أن يشكل ساق دبوس شعر مكون من تسعة قواعد زوجية. هذا دبوس الشعر رقم واحد.

## فيروسات مجموعة PSTVd :

هناك ١٥ فيروساً معروفاً وحددت تنابعاتها بالتفصيل في هذه المجموعة، تقسم هذه الفيروسات إلى ثلاثة تحت مجموعات (جدول ٧) وذلك مبنياً على تحليل التابع المقارن للمنطقة المركزية لكل جزئ. إنه من المحتمل أن يكون هناك أكثر من تحت قسم Subdivision ضمن كل تحت مجموعة، يمكن أن يكون هذا أكثر احتمالاً كلما زاد عدد الأفراد ضمن كل تحت مجموعة ووصفت جيداً. فمثلاً CCCVd وCTiVd مع أنها تشترك فقط في ٦٤٪ من عموم تماثل التابع، إلا أنها متقاربة جداً إلى حد ما على أساس كل من التابع وتنظيم التابع، صغر حجم جزيئات الفيروس، المدى العائلي المحدود في عائلة النخيل ومستوى منخفض من تماثل التابع الكلي مع الفيروسات الأخرى من تحت المجموعة الخاصة بها. هناك أمثلة أخرى في تحت مجموعة B<sub>1</sub> ليس محددة جيداً أيضاً.

كما سبق وقلنا فإن تقسيم أفراد هذه المجموعة إلى ثلاثة تحت مجموعات قد أعتمد على النطاق الفيرويدي Domain.

## مميزات مجموعة ASBVd . فيروس ضربة الشمس في الافوكادو:

بالإضافة إلى عدم وجود تشابه من حيث التابع والصفات التركيبية مع الفيروسات الأخرى، إلا أن هناك صفات أخرى مميزة، هي مقدرة كلتا الخيطين الموجب والسالب للحمض RNA للفيروس ASBVd لأن يخضع إلى تفاعل كامل من التقطيع الذاتي والذي يعتبر بأنه يلعب دوراً أساسياً في تناسخ الدائرة الملتفة لهذا الفيروس. يحدث تفاعل التقطيع الذاتي هذا في المعمل على مواقع معينة (لكنها مختلفة) في الحمض النووي RNA السالب والموجب في الغياب الكامل للبروتين، ولكن في وجود  $Mg^{++}$  يعطى RNA مقطع بنهايات من  $2'$ ,  $3'$ - Cyclic phosphate و  $5'$ - hydroxyl شكل (٥). أما في المعمل فإن تفاعل التقطيع يعتبر هو المسئول عن تقطيع ال monomers السالب والموجب من التكرار الترادفي لـ monomeric الخيوط السالبة والموجبة والتي تنتج باستمرار خلال تناسخ الدائرة الملتفة.

إن الميزة الهامة للتقطيع الذاتى للفيروس ASBVd السالب والموجب والذى يشارك بواسطة أربعة فايروسايدات معروفة (الدائرية، شبه الفيرويد، RNAs التوايح) و RNA الموجب للحمض RNA التابع لفيروس البقعة الحلقية فى الدخان، هى وجود ١٣ نيوكليتيده محفوظة والتي يمكن أن ترتب فى تركيب يشبه رأس المطرقة (شكل ٦) حول منطقة التقطيع الذاتى.

التركيب المجمع لشكل ٦ يحتوى ١٣ نيوكليتيده محفوظة (شكل صندوق) مع سيقان مكونة من ثلاثة أزواج من القواعد كما هو فى الشكل تأخذ I ، II ، III، حول منطقة مفتوحة مركزية تحتوى على شريط واحد من RNA. هذا التركيب نشأ من تسعة RNAs ذاتية القطع والتي وصفت لغاية الآن والذى يكون التقطيع الذاتى خلال تركيب رأس المطرقة هذا.

إن التركيب ثنائى الأبعاد لا يفسر بوضوح تفاعل القطع الذاتى الخاص العال. يمكن الاعتقاد بأنه فى وجود  $Mg^{++}$  يتكون تركيب ثلاثى نشيط والذى يسمح بالخفض فى الطاقة التنشيطية فى نقطة التقطيع الذاتى، وبالتالي فإن تفاعل نقل الفسفرة شكل ٥ يمكن أن يحدث. مع أن تفاعل القطع الذاتى من ناحية نظرية منعكس إلا أنه لم يلاحظ إطلاقاً مع الفيرويد ASBVd. الممكن إفتراضه أنه طالما تحدث عملية الانشقاق الذاتى فإن التركيب الثالثى المنشط يسترسل (يرتخى) وبالتالي فإن نهايات 3'، 5' لا تكون أطول من مجاوراتها ولا يحدث التفاعل العكسى.

من الممكن التنبؤ بأن أفراداً جديدة لمجموعة ASBVd (كما هى قد أكتشفت) سوف تحتوى تتابعات عامة وصفات تركيبية واحداً منها سيكون كلا الشريطين السالب والموجب فى RNAs لينقطع ذاتياً خلال تركيب رأس المطرقة. لا يوجد أى فرد من فايرويدات مجموعة PSTVd يمتلك بشكل مقنع صفة الانشطار

الذاتي، ولكن هناك فقط محاولات محدودة أجريت لغاية الآن للبحث عن مثل هذا التفاعل. يبدو من المحتمل تماماً أن هذ الفيروسات سوف تكون أيضاً ذاتية الانشطار ولكن سوف يكون عن طريق ميكائزم مختلف نظراً لأن تركيب رأس المطرقة يحتوى ١٣ نيوكليتيده محفوظة لا يمكن أن تتشكل من تتابع هذه الفيروسات.

### ثانياً: - النطاقات Domains :

المقصود بالنطاقات هو تقسيم جسم الفيروس المستقيم إلى عدة مناطق كل منطقة مميزة عن الأخرى فى تتابع نيوكليتيدياتها وفى وظيفتها وفى صفاتها، ودراسة هذه النطاقات لها فوائد كثيرة من حيث التصنيف ومن حيث نشوء الفيروسات. من حيث التصنيف ذكرنا جزءاً منه سابقاً وسنكمل بعد ذلك. أما من حيث أهميتها فى نشوء الفيروس، فإن نموذج النطاق يؤدي إلى الاقتراح بأن نشوء الفيروسات يشمل إعادة ترتيب النطاقات بين الفيروسات المهاجمة لنفس الخلية. إنه من الصعوبة بمكان إيجاد دليل محدد لدعم هذا الاقتراح. إن الميكانيكية المحتملة لمثل إعادة الترتيب هذه يكون بعدم استمرارية النسخ حيث RNA polymerase ينسخ قالب فيروس واحد ينقلب لينسخ قالب ثانى يضعه بجانبه فى بعض النقاط الأكثر احتمالاً ليتحدد بواسطته التركيب الثالثى للفيروس. مثل هذا النموذج يدعم المضاعفة الجزئية التى تحدث فى نطاق T<sub>2</sub> للفيروس CCCVd وإعادة الترتيب للحمض RNA والذى يحدث لانتاج فيروس حيوانى من RNAs ناقص التداخل.

إن زيادة تفهمنا عن تتابع النطاقات فى الفيروسات يسمح بزيادة قربنا المنطقى إلى علاقة وظائف التركيب ضمن واحد أو أكثر من النطاقات.

## نموذج النطاق لمجموعة PSTVd من الفيرويدات

### The Domain Model For The PSTVd Group of Viroids

نتيجة فحص تماثل التابع مع أكثر من ٤٠ تنوع تتابع، وهي توضع الآن تحت مجموعة PSTVd للفيرويدات. إن كلا من Keese & Symons سنة ١٩٨٥ قد وضحا بالتفصيل نموذج النطاق للفيرويدات والذي يكون أيضاً ملائماً للفيرويدات من تحت مجموعة  $B_2$  و  $B_3$  ويزود الأساس المبنى عليه تقسيم الثلاثة تحت قسم Subdivisions ضمن مجموعة PSTVd الكلية. وبالتالي فإن طراز النطاق مناسباً لجميع الفيرويدات لغاية الآن (المعروف تتابعها) باستثناء ASBVd.

عند دراسة المعلومات الموجودة في جدول رقم ٨ فإنه من المهم أن نتذكر أن مقارنة التابع في PSTVd مع ٢٥ تتابع عشوائي من حيث الحجم وتركيب القاعدة بنفس الطريقة يعطى تماثل تابع بنسبة  $29.5 \pm 4.2\%$ . وبالتالي فإن أى تماثل فى التابع الكلى يصل لـ ٢٥ - ٣٥% بين فيرويدين يمكن أن يؤخذ بعين الاعتبار ليدل على عدم العلاقة بينهما، فمثلاً بالنسبة لـ ASBVd بمقارنته مع جميع الفيرويدات الأخرى كما فى جدول ٨ يظهر عدم العلاقة بينه وبينها.

حتى بالنسبة للفيرويدات ضمن نفس تحت المجموعة Subgroup، فإن المقارنة يمكن أن تظهر إنخفاضاً فى تماثل التابع الكلى. فى تحت مجموعة PSTVd هناك مقارنة ثمانية حالات فى حالة زوجية أظهرت التماثل والذي يتراوح ما بين ٤٢ - ٣٣%. يجب أن نعرف أن تماثل التابع الكلى يكون له قيمة محدودة فى تصنيف الفيرويدات ولا يعتمد عليه بشكل كامل، حيث أن كلاً من Koltunow & Rezaian سنة ١٩٨٩ ذكرا بعض الانتقادات للذين يعتمدون اعتماداً كلياً فى التصنيف على تماثل التابع الكلى بين الفيرويدات.

جدول ٨: نماذج التتابع بين أزواج من الفيرويدات كما حددت باستعمال طريقة Wilbur & Lipman سنة ١٩٨٣.

TPMVd	77																		
TASVd	96	73																	
CEVd	60	65	77																
CSVd	66	68	72	63															
CCCVd	47	48	44	44	44														
CTVd	43	45	43	46	37	64													
HSH	44	41	36	47	33	44	40												
HLVd	44	45	47	40	37	50	49	42											
GVd IB	42	49	42	40	37	34	34	34	38										
GYSVd	37	44	40	40	40	30	31	38	42	73									
ASSVd	42	36	40	40	44	31	38	36	30	46	42								
ASBVd	32	30	32	29	33	26	32	35	31	29	31	28							
	PSTVd	TPMVd	TASVd	CEVd	CSVd	CCCVd	CTVd	HSH	HLVd	GVd IB	GYSVd	ASSVd							

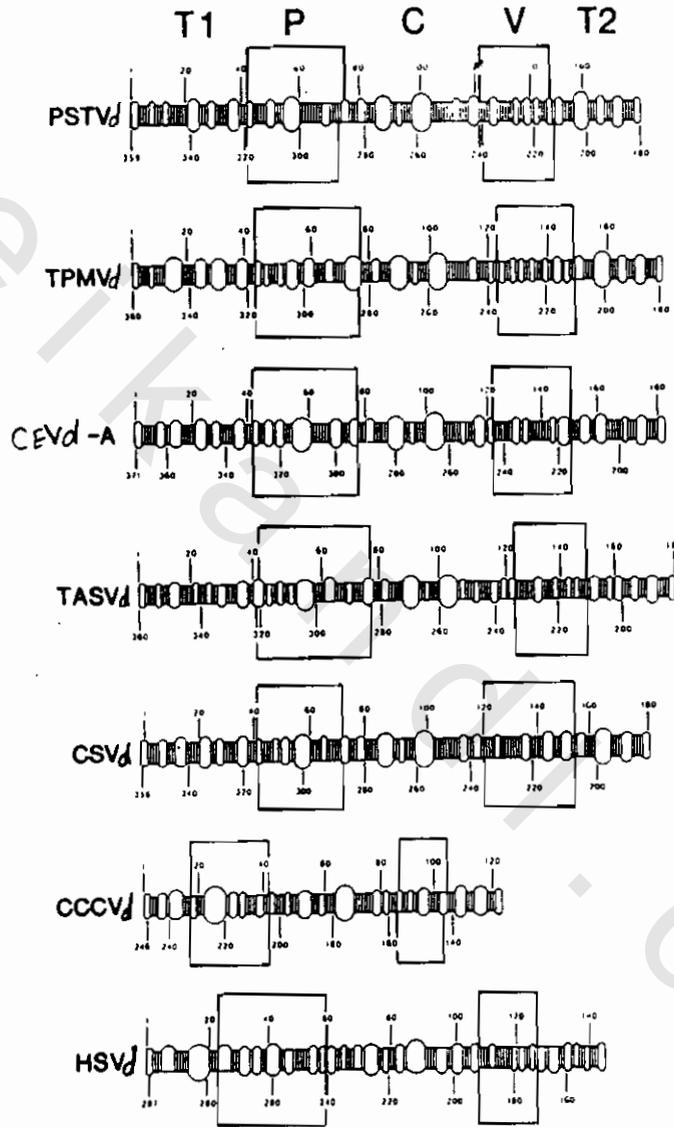
المقاسات التي استخدمت في هذا الجدول:  $g=4$ ,  $W=100$ ,  $K=4$ .

## نموذج النطاق لتحت مجموعة $B_1$ من PSTVd

### The Domain Model For The PSTVd Subgroup $B_1$

إن مقارنة تحليل تتابع الحالة المزدوجة لأفراد من تحت مجموعة  $B_1$  من PSTVd أظهرت وجود خمسة نطاقات (شكل ٧) وقد عرفت حدودها بواسطة ملاحظة تغييرات حادة في تماثل التتابع من المرتفع إلى المنخفض والعكس بالعكس. هناك مقارنات لحالات ازدواجية مختلفة كانت دائماً ثابتة في تحديد الموقع الدقيق (الصحيح) لحدود النطاقات. هناك شكل توضيحي يشرح هذه الحدود في سبعة فيرويدات في شكل ٨. وبالتالي فإن هذه النطاقات كانت قد اكتشفت بواسطة مقارنة تماثل التتابع بين قطاعات من كل جزئ للفيرويد مفضلاً ذلك على طريقة تماثل التتابع الكلى في جزئ الفيرويد.

هناك صفات أخرى لهذه النطاقات مكتوبة باختصار في جدول ٩، ١٠. بالرغم من التنوع في طول أفراد من فيرويدات تحت مجموعة PSTVd، إلا أن عدد النيوكليوتيدات في نطاق C ثابت بشكل واضح والاختلاف فقط في مواقع ٩٥ - ٩٧ في أفراد هذه المجموعة. بالنسبة لاصغر الفيرويدات فإن أكثر النقص في الحجم يحدث في النطاقين  $(V, T_1)$ . إن تماثل التتابع بين النطاقات في مختلف الفيرويدات (جدول ١٠) ذو درجة عالية من الأهمية، بسبب الاختلافات الملحوظة والتي يمكن أن تحدث بين النطاقات المتجاورة. كانت مثل هذه المقارنة هي التي أدت إلى الاقتراح بأن الفيرويدات نشأت (تطورت) عن طريقة إعادة ترتيب النطاقات بين مختلف أفراد الفيرويدات المهاجمة لنفس الخلية وما يتبع ذلك من طفرات ضمن كل نطاق.



شكل رقم ٨ :

رسم يوضح النطاقات لسبعة فيروسات في تحت مجموعة PSTVd.

جدول ٩ : بين حجم نطاقات الفيرويد

المجموع	نطاق $T_2$	نطاق V	نطاق C	نطاق P	نطاق $T_1$	اسم الفيرويد
٣٥٩	٦٤	٥٤	٩٥	٦٣	٨٣	PSTVd
٣٦٠	٦٢	٥٢	٩٥	٦٣	٨٨	TMPVd
٣٦٠	٦٢	٤٩	٩٧	٧٠	٨٢	TASVd
٣٧١	٦٤	٥٧	٩٧	٦٩	٨٤	CEVd
٣٥٦	٥٢	٦٦	٩٥	٦٠	٨٣	CSVd
٢٤٦	٤١	٢٨	٩٥	٤٩	٣٣	CCCVd
٢٥٤	٤١	٣٩	٩٥	٤٧	٣٢	CTiVd
٢٩٧	٤٧	٣٧	٩٧	٧١	٤٥	HSVd
٣٣٠	٦١	٢٩	٩٢	٥٦	٩٢	ASSVd
٣٦٩	٧٢	٣٦	١١٠	٥٠	١٠١	AGVd
٣٦٧	٨١	٣١	٩٧	٤٥	١١٣	GySVd
٣٦٣	٧٥	٢٩	٩٧	٥٠	١١٢	GVd 1B

ملاحظة:

إن الحدود بين نطاقى  $T_1$ ، P قد تغير قليلاً كما ذكر Keese & Symons سنة

١٩٨٥.

جدول ١٠ : تماثل التتابع بين النطاقات في الفيرويدات المختلفة .

% تماثل التتابع في النطاقات						الفيرويدات المستعملة في المقارنة المزدوجة	
الكلية	T <sub>2</sub>	V	C	P	T <sub>1</sub>	2	1
٦٠	٤٨	٤٩	٧٢	٦٤	٧١	CEVd - A	PSTVd
٧٧	٩٤	٣٨	٩٨	٧٦	٧٠	TPMVd	
٦٩	٩٠	٤١	٧٢	٦٠	٧٢	TASVd	
٦٦	٨٣	٤٥	٧٩	٤٧	٧٨	CSVd	
٤٧	٣٥	٣٧	٧٥	٢٧	٢٦	CCCvd	
٤٣	٣٦	٢٨	٦٣	٣٦	٢٨	CTiVd	
٤٤	٢٩	٣٥	٤٤	٦٤	٣٤	HSVd	
٦٥	٤٨	٤٦	٧٢	٦٤	٧٤	TPMVd ←	CEVd - A
٧٧	٥١	٤٥	٩٩	٧٢	٩٣	TASVd	
٦٣	٣٨	٣٩	٨٤	٤٨	٧١	CSVd	
٤٤	٤٦	٣٥	٦١	٣٢	٣١	CCCvd	
٤٦	٣٨	٤٠	٦٧	٣٨	٣٨	CTiVd	
٤٧	٣٤	٣٢	٤٥	٦٧	٤٢	HSVd	
٧٣	٩٨	٣٨	٧٤	٥٧	٧٤	TASVd ←	TPMVd
٦٨	٨٨	٥٩	٧٤	٥٢	٦٩	CSVd	
٧٢	٨٩	٥٢	٨٢	٥٦	٧٢	CSVd ←	TASVd
٦٤	٥٩	٧٥	٦٦	٥٠	٦٨	CTiVd ←	CCCvd (246)
٤٤	٤٣	٣٤	٤٣	٤٥	٦٤	HSVd	
٤٠	٤١	٣٢	٤٧	٣٩	٦٠	HSVd ←	CTiVd

استعملت المقاسات 4 ، W = 4 ، g = 4

## ١ - نطاق C = C Domain :

هذا النطاق من أكثر النطاقات حفظاً Conserved ، في المقارنة الازدواجية بين الفيرويدات فإن تماثل التتابع يختلف بين ٤٤٪ و ٩٩٪، هذه القيم تكون مساوية لـ أو أكثر من تماثل التتابع الكلى (جدول ١٠). إن المميزات الأساسية لهذا النطاق هو وجود إنتفاخ لولبي (حلزوني) على نحو تام يسمى U - bulged كما في شكل ٧ وتتابع متكرر مقلوب (الاسهم في شكل ٧) والتي معاً تحدد ما يسمى بالمنطقة المركزية المحفوظة Central conserved region (CCR) ضمن مجال C. إن هذه المنطقة CCR هي التي تحدد تحت قسم subdivision لمجموعة PSTVd إلى ثلاثة تحت مجموعات.

## ٢ - نطاق P = P Domain :

تكون هذه المنطقة مترافقة مع التعبير بالأعراض المرضية، هذا ما قرره كثير من الباحثين. إن الميزة الأساسية لهذا النطاق هي قطعة من-Adenine dominated Oli gopurine بحوالى ١٥ - ٢٠ نيوكليتيده على الشريط العلوى لجميع الفيرويدات باستثناء CCCVd حيث يوجد تتابع (As) Oligo. أما على قاعدة نطاق P فإن Oli- (U<sub>4</sub>-7) go غالباً ما تكون موجودة باستثناء مما هو فى CCCVd و CTiVd والتي تحتوى على قطعة غنية من (A) Oligo بسبعة نيوكليتيدهات.

## نطاق P فى فيرويد CEVd يلعب دوراً فى المرضية :

إن العزلات التى تحدث طبيعياً فى الفيرويد وتؤخذ من نبات مفرد، غالباً ما تحتوى أكثر من تنوع تتابع من الفيرويد، وهذا التنوع يمكن أن يفصل ويحدد تتابعه عن طريق تحضير كلونات cDNA الكامل الطول من مخلوط فيرويد. نظراً لأن كلونات cDNA للفيرويدات ونسخها من RNA والتي هى معدية عندما تحقن على نباتات قابلة للإصابة يمكن أن تحضر، هذا يقدم فرصة فريدة لعلاقة تتابع ومن ثم تركيب ذو مرضية.

إن تحليل تتابع تنوعات كل من HSVd، CEVd، PSTVd، أظهر أن جميع إختلافات التتابع (تقريباً) لكل فيروس تقع ضمن نطاقى P و V. هذا يدل على أن التنوع فى شدة التعبير عن الأعراض المرضية فى تنوعات التتابع، يكون أكثر احتمالاً لأن يحدد عن طريق اختلاف التتابع فى واحد أو كلا هذين النطاقين. معظم المعلومات المتوفرة عن CEVd والنتائج تظهر أنه فى ١٧ من تنوعات التتابع، فإن جميع إختلافات التتابع تحدث ضمن نطاقى P و V فى مناطق تسمى PL و PR شكل ٩.

لتحديد أى من النطاقين P أو V كليهما كان مسؤولاً عن تغيير التعبير المرضى. حضرت إصابة تجريبية بـ cDNA بـ كلوناته cDNA والتي فيها احدى نصفي تنوع تتابع كان قد إرتبط خلال نطاق C مع النصف الثانى من تنوع ثانى (شكل ١٠). استعمل إثنان من تنوعات التتابع احدهما من الذين يحثون على إحداث أعراض شديدة على بادرات الطماطم والآخر من الذين يحثون على إحداث أعراض شديدة البساطة (معتدلة جداً). كانت تركيبات cDNA ملائمة حضرت باستعمال مناطق ال Bam HI و Hind III فى نطاق C. أظهرت النتائج الحيوية بوضوح أن نطاق P يحدد تعبيرات العرض المرضى، بينما نطاق V يمكن أن يكون له تأثير على مستوى الفيروس الذى يتكشف فى النباتات المصابة. ولقد تأكد أن تتابع الفيروسات الجديدة (الذرية) كانت دائماً نفسها كما فى تلك المكلونة المستعملة فى الحقن.

نطاق V = V Domain :

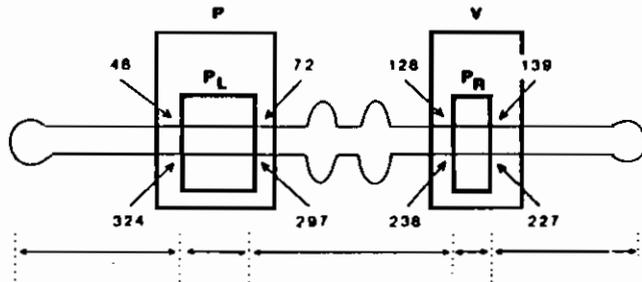
هذا النطاق يظهر الاختلافات الكبيرة فى التتابع بين الفيروسات قريبة الصلة. يظهر هذا النطاق أقل من ٦٠٪ تماثل فى التتابع بين أى زوج من الفيروسات باستثناء بين CCCVd و CTIVd (جدول ١٠) وهو أيضاً الأصغر حجماً يختلف من ٢٨ - ٦٦ نيوكليتيده (جدول ٩).

إن العلاقة الوحيدة المعنوية في التتابع في هذا النطاق بين فيروسات تحت المجموعة B<sub>1</sub>. تكون منطقة Oligo - purine: Oligopyrimidine عادة في أقل الحالات ثلاثة أزواج قواعد C: G. في حالة الفيروس CEVd فإن نطاق V قد يكون له دوراً في تحديد المستوى من CEVd في نباتات الطماطم المصابة. هناك أيضاً تنوع كبير في التتابع في هذا النطاق بين تنوعات التتابع للفيروس CEVd.

### نطاقات T : T Domains

إن النطاقين الطرفين لهما أهمية كبيرة وذلك بسبب الأدوار التي يمكن أن تقوم بها في تناسخ الفيروس وفي التكشف التطوري لجميع الفيروسات في مجموعة PSTVd. فمثلاً فإن هذه النطاقات يعتقد بأنها واقعة في جزئ ال RNA المتبادل بين إثنين أو أكثر من الفيروسات المهاجمة لنفس الخلية لتكون باعثة على فيروسات جديدة متوقعة. مع أن الأدوار الوظيفية لهذه النطاقات غير واضحة تماماً، إلا أن المحافظة العالية للتتابع في تنوعات نفس الفيروس يدل على الدور الهام في التضاعف (التناسخ). إن نطاق T<sub>2</sub> في الفيروس CCCVd يكون غير مألوف في ذلك الاختلاف في التتابع الجزئي الناشئ خلال تكشف مرض كادانج - كادانج في نخيل جوز الهند.

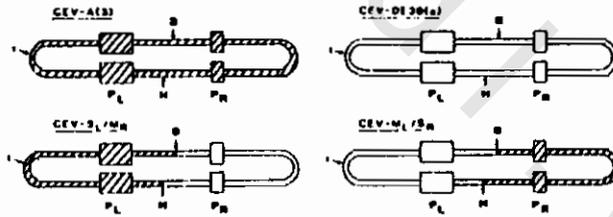
إن تماثل التتابع في نطاقات T في تحت مجموعة B<sub>1</sub> للفيروس PSTVd يظهر تتابع محفوظ بشكل تام لـ C - C - U - C في نهاية العروة لنطاق T<sub>1</sub> ولتتابع مجموعات C - C - U - U - C في نطاق T<sub>2</sub> شكل V. هذه الحوافز تكون أيضاً موجودة في التتابعات الحديثة لكل من CLVd و HLVd. وعلى أية حال فإن هذه الحوافز لا تكون محفوظة في فيروسات ASSVd وتحت مجموعة B<sub>2</sub> أو فيروسات CbVd تحت مجموعة B<sub>3</sub> مع استثناء المواقع الصحيحة لـ C - C - U - C في النهاية اليسارية للنطاق T<sub>1</sub> في GVd 1B.



Total number of nucleotides in each domain	96	49	116-117	20-24	89
Maximum number of nucleotide differences between any two variants in each domain	0	12	4	17	0
Maximum variation (%) between any two variants	0%	25%	3%	77%	0%

شكل رقم ٩ :

ملخص لتحليل التتابع لسبعة عشر تنوع تتابع من فيروسات اكسوكورتز الحمضيات. يحدث معظم تغيرات النيوكليوتيدات في نطاقى P<sub>L</sub> و P<sub>R</sub> ضمن نطاق المرضية العادى P ونطاقات V المتغيرة.



شكل رقم ١٠ :

رسم توضيحي لأبوين من فيروسات اكسوكورتز الحمضيات وفيروسين من وحى الخيال. الاب CEVd - A (2) يسبب أعراض شديدة على بادرات الطماطم، بينما الاب الثانى - CEVd - DE 30 (a) يسبب أعراض معتدلة. P<sub>R</sub>، P<sub>L</sub> تندل على النطاقات المعروفة. B تندل على موقع Bam أما HI H تندل على موقع Hind III فى كلونات cDNA. هذه المعلومات استعملت فى بناء الفيروسين الآخرين.

## النطاقات في ال ASSVd تحت مجموعة B<sub>2</sub> من الفيروسيدات:

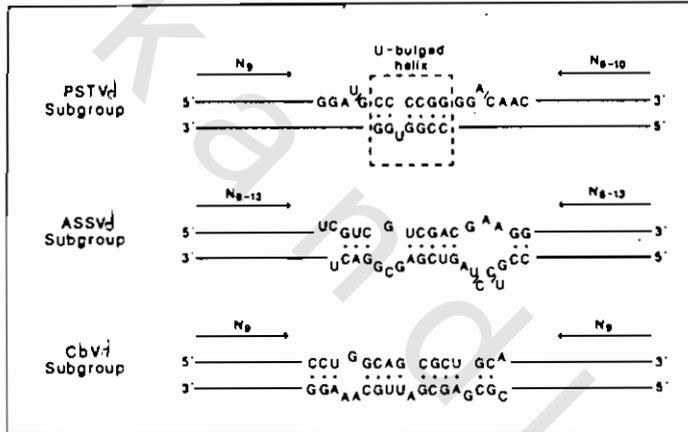
يمكن تقسيم كل فيروس من الثمانية فيروسات التابعة لتحت مجموعة ASSVd إلى خمسة نطاقات بواسطة المقارنة بالتتابع الزوجي بنفس الطريقة المتبعة في تحت مجموعة PSTVd. إن الصفة الأساسية المشتركة بينهم هي وجود منطقة محفوظة مركزية ضمن نطاق C والتي تكون محدودة على قمة الشريط بواسطة تكرار طرفي، ولكنها هي التي تظهر نيوكليوتيدات مختلفة على ال CCR من فيروسات تحت مجموعة PSTVd. أيضاً ففي وسط نطاق T<sub>1</sub> فإن هناك مجموعة (تكتل) من ٢٠ نيوكليوتيدة محفوظة بشدة موجودة في كلا الخيطين.

## نطاق C في مجموعة PSTVd من الفيروسيدات:

ضمن نطاق C في أفراد تحت مجموعة B<sub>1</sub> من فيروسات PSTVd وتحت مجموعة B<sub>2</sub> في فيروسات ASSVd، فإن هناك منطقة مركزية محفوظة محددة جيداً تسمى Central conserved region (CCR) والتي لها مميزات عامة مشتركة بين التحت مجموعتين حتى برغم عدم وجود تتابع مشترك. كذلك فإن الصفات المشتركة تكون موجودة في الفرد الوحيد من تحت مجموعة B<sub>3</sub> من فيروس CbVd. وبناءً على هذه القواعد فإن جميع تتابعات الفيروسات (لغاية سنة ١٩٩١) باستثناء ASBVd يمكن تصنيفها ضمن مجموعة PSTVd وتقسّم إلى ثلاثة تحت مجموعات. بالإضافة لذلك فإن علاقات ارتباط زيادة عن ذلك تكون موجودة بين أفراد من تحت مجموعة PSTVd و ASSVd قد تم اظهارها عن طريق وجود خمسة نطاقات متتابعة في هذه الفيروسات. يمكن التنبؤ بتركيب خمسة نطاقات مشابهة لتحت مجموعة CbVd كفيروسات جديدة مكتشفة تتابعاتها تحدد على تحت المجموعة هذه.

إن المميزات العامة لمنطقة CCR في التحت ثلاثة مجموعات موضحة في شكل ١١. إن حدود منطقة CCR تكون واضحة ومحددة بواسطة تتابع متكرر مقلوب

في قمة الشريط والتي يمكن أن تزود بساق دبوس الشعر والذي لا يكون دائماً ثنائي القاعدة تماماً. إن طول كل ساق يختلف من ٨ - ١٣ نيوكليتيده، مع أنه بشكل أكثر شيوعاً يكون بطول ٩ نيوكليتيده خاصة في تحت مجموعة PSTVd يكون طول الشريط العلوي عادة ٣٢ نيوكليتيده بالنسبة لتحت مجموعة PSTVd، إلا أنه يختلف من ٣٢ - ٤٢ نيوكليتيده لتحت مجموعة ASSVd، ويكون ٣٤ نيوكليتيده مقصوراً على أفراد تحت مجموعة CbVd. هناك نيوكليتيده مفردة أو استثنائية محفوظة على كلا الشريطين في منتصف كل من CCR وهذه واضحة في شكل ١١.

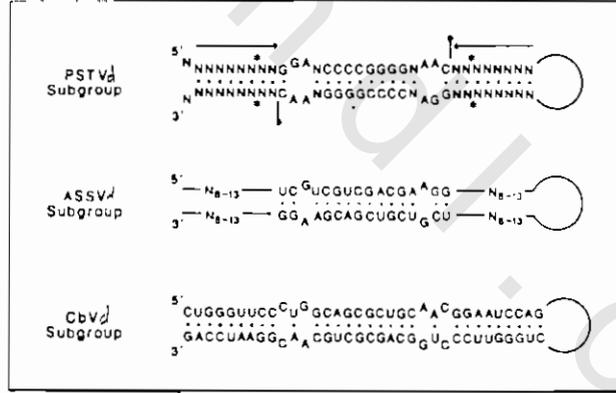


شكل رقم ١١ :

المنطقة المحفوظة المركزية CCR لثلاثة من تحت مجموعة PSTVd تحدد هذه المنطقة بنهايات التابع المتكرر المقلوب. ويظهر طول كل واحدة منها.

إن الانتفاخ اللولبي (الحلزوني) الذي على شكل حرف U يكون ذو أهمية خاصة في فيروسات تحت مجموعة PSTVd. إنه يظهر تركيب متجانس مع رايبوسومال L 18 على منطقة الارتباط في 5S RNA في البكتيريا *E. coli* ومع المنطقة اللولبية المنتفخة المركزية المحفوظة على 5S RNAs للنباتات الراقية. ومن المحتمل أن بروتينات العائل المرتبطة لهذه المنطقة يمكن أن تلعب دوراً في تناسخ هذه المجموعة من الفيروسات.

إن التتابع المتكرر المقلوب في الشريط العلوي لمنطقة CCR لفيرويدات مجموعة PSTVd يسمح بتكوين تركيبات غالباً ثنائية الخيط ذات رأسين (تركيبها من الامام يشبهه من الخلف) في أزواج Dimeric أو تكرارات أطول قليلة الأزواج Oligomeric من هذه الفيرويدات شكل ١٢. هناك اعتقاداً هاماً بأن هذه التركيبات يمكن أن تلعب دوراً في بناء البودائ قليلة الازدواج الناتجة خلال تناسخ الدائرة المتلفة ليعطي خيط آحادي الأزواج و / أو جزيئات دائرية في المعمل وبالتالي تجهز الخطوة الأخيرة في عملية التناسخ. وعلى كل حال فإن الدليل يكون عادة غير مباشر في التجارب العادية، بينما في التجارب المعملية لم تزود بدليل واضح لنتيجة العمليات الخاصة. أحياناً فإن البيانات الواضحة للخيط العلوي في منطقة CCR يبدو أنها داخلة في سلسلة العمليات في الظروف الطبيعية كانت قد زودت من دراسات الحيوية مستعملة نسخاً من CEVd محتوية طفرات آحادية القاعدة في الشريط العلوي في منطقة الحلزون المنتفخ على شكل حرف U في شكل ١١.



شكل رقم ١٢:

تركيب متعكس الذي من الممكن أن يكون في ترادفات monomeric متكررة من أفراد كل تحت مجموعة من مجموعة PSTVd. جميع التتابعات مأخوذة من الخيط العلوي من CCR. موقع التكرار المنقلب في الثلاثة تحت مجموعات يشار عليه بالأشهر. أما حرف N فهي نيوكليوتيدات غير محفوظة. في فيروسد HSVd فإن U مغروزة في موقع معلم بالدائرة المطموسة في تحت مجموعة PSTVd، علامة النجمة تدل لمواقع غرز لاثنين غير مزدوجين من النيوكليوتيدات في فيروسد HLVd.

## الدور المقترح في إعادة تنظيم النطاقات في نشوء الفيروسات

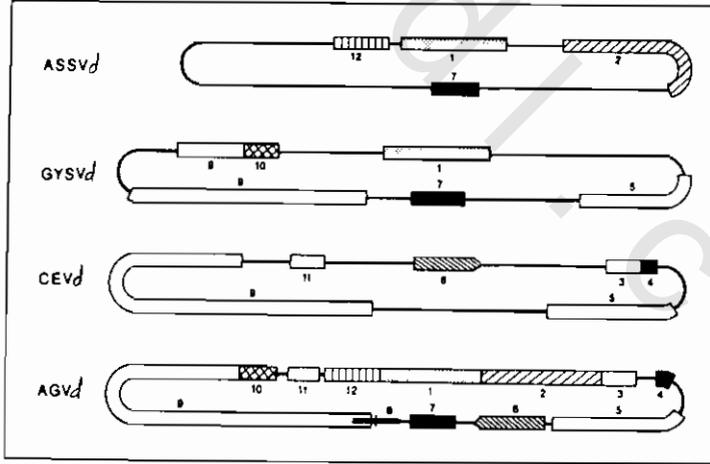
## Proposed Role of Rearrangement of Domains In The Evolution of Viroids

إن نموذج النطاق بمجرد وصفه يؤدي إلى الاقتراح بأن نشوء الفيروسات يتضمن إعادة ترتيب النطاقات بين إثنين أو أكثر من الفيروسات والتي تهاجم نفس الخلية متبوعاً بواسطة طفرات أخرى. يكون دائماً هناك شيء من الصعوبة للتزويد بأدلة مباشرة لمثل هذه الاقتراحات، ولكن بسبب ظهور تنابعات لفيروس جديد فإن أدلة قوية غير مباشرة تكون واضحة وتؤكد الاقتراح. والمثل الجيد على ذلك هو التنابع الحديث لفيروس CLVd والذي فيه نطاقات T<sub>1</sub> و T<sub>2</sub> تظهر تماثل عال في التنابع لنفس النطاقات في PSTVd و TASVd بالترتيب، وتكون الحدود محددة جيداً بواسطة المقارنة بالطريقة الزوجية بين أعداد من تحت مجموعة PSTVd (شكل ١٠). إن وجود أطوال تحت نطاقية Sub - domain lengths في تنابعات TPMVd في نطاق P، وفي تنابعات PSTVd و HSVd في نطاق C يدل على أن إعادة ترتيب RNA يمكن أن تحدث ضمن النطاق بالإضافة إلى منطقة الحدود (شكل ١٠).

إن مقارنة تحليل التنابع لـ AGVd في تحت مجموعة ASSVd قد أظهر أيضاً خليط متزاخم من قطع والتي تبدو وكأنها مأخوذة من ASSVd، PSTVd، CEVd و GYSVd شكل ١٣. هذه القطع لها تماثل في التنابع والذي يختلف من ٥٢ - ١٠٠٪ من التنابع المتطابق في فيروسات الآباء المفترضة. لهذا فإن هذا الفيروس يكون مثلاً آخر والذي فيه يظهر إعادة الترتيب للحمض النووي RNA والتي يمكن أن تحدث ضمن النطاقات. إنه المثل الأول والذي يظهر فيه مثل إعادة الترتيب هذه والتي يجب أن تأخذ مجراها بين الفيروسات ضمن تحت مجموعتين من الفيروسات منفصلتين.

## الدليل المباشر على إعادة الاتحاد في RNA بين ال RNAs الفيروية:

إن إعادة الاتحاد المفترض في RNA في النطاقات وتحت النطاقات بين الفيروسات مشتركة الإصابة (كما قد بينا) مبنياً على مقارنة تحليل التتابع. مع أن جميع الأدلة تكون مؤيدة لإعادة الاتحاد في RNA، إلا أنه لا يوجد بيانات تدل على الفترة الزمنية التي تلزم لمثل إعادة الاتحاد هذه لكي تحدث بين الفيروسات مشتركة الإصابة، كذلك لا يوجد أية محاولات ذكرت عن إنتاج فيروسات خيالية (وهمية) بواسطة الحقن المشترك لفيروسين بينهما علاقة على عائل نباتي مشترك. إن مثل هذه التجارب أصبحت الآن معقولة بواسطة استعمال سلسلة تفاعل ال Polymerase والاختيار الدقيق المحكم للسودائ (سلسلة قصيرة من DNA) والتي يمكن أن تسمح بالتعرف على الجزيئات الناتجة المتوقعة. إن مثل هذا الاقتراح يمكن أن يكون أساسياً نظراً لأن أى من الذرية المتوقعة قد تكون ذات أضرار في التناسخ عندما تقارن مع الأبوين وبالتالي يمكن أن تتواجد فقد بتركيزات منخفضة.



شكل رقم ١٣:

علاقات التتابع بين فيروس AGVd وثلاثة فيروسات أخرى، القطع ذات تماثل التتابع العال بين فيروسين أو أكثر محفوظة في علب ومرقمة.

إن الأحماض النووية RNAs الفيروسية تكون وسيلة مزودة بأدلة أكثر ثباتاً عن إعادة الاتحاد في RNA. إن أكثر الأمثلة توضيحاً لذلك هو العمل الذي قام به Allison et al سنة ١٩٩٠ والذي إقترح بأن إعادة التكاثر لجينوم RNA الفعال بواسطة إعادة التكاثر بين نواتج الطفرات المقتضبة Deletion mutants. فى هذا البحث فإن فيروس التبرقش الشاحب فى اللوبيا Cowpea chlorotic mottle Virus (CCMV) كان يستعمل فى هذه الدراسة نظراً لأنه يحتوى على جينوم ثلاثى فى ثلاثة أحماض RNAs أحادية الشريط. إن الحقن المشترك لهؤلاء الثلاثة جميعاً يبدو أنه يكون مطلوباً لمقدرته (حيويته) على أوراق اللوبيا. إن الأحماض النووية الكبيرة من RNA<sub>1</sub> و RNA<sub>2</sub> تكون أحادية السسترونك monocistronic أما RNA<sub>3</sub> فإنه ثنائى السسترونك discistronic ويعمل شفرة لبروتينات 3a وللغلاف البروتينى. إن DNA المكون عن كل من هذه الأحماض الثلاثة حضرت بحيث زودت RNA transcripts لدراسة الحيوية. إن الالغاء الذى يتم ضمن أى من الجين 3a أو جين الغطاء البروتينى يبطل حيوية الفيروس. وعلى أية حال فإن الحقن المشترك للأحماض RNA<sub>1</sub>، RNA<sub>2</sub> كل منهما مع RNA<sub>3</sub> يبطل الطفرات التى تؤدى إلى إنتاج ذرارى فيروس تحتوى النوع الأصيل RNA<sub>3</sub> وهذا ثبت بطريقة تحليل التتابع. ونظراً لأن إعادة الاتحاد فى RNA قد حدثت بين الناتجات من طفرة RNAs<sub>3</sub> ومستويات عالية من الفيروس قد حصل عليها فى اليوم السابع أو بضع أيام بعد الحقن.

لقد ذكر العالم Robert H. Symons فى مقالة المنشور فى مجلة Molecular Plant - Microbe Interaction عدد ٤ صفحة ١١١ - ١٢١ الصادر فى سنة ١٩٩١ تحت عنوان دورية التتابع فى الفيرويدات تدل على أن النشوء يتم بواسطة التضاعف كما يلي:-

Periodicity of Sequences in Viroids indicates Origin by duplication.

تبدى معظم الفيروسات تركيبات دورية (تركيب معين يتكرر بالترتيب) يتميز بتكرار وحدات من ١١ أو ١٢ نيوكليتيده في تحت مجموعة PSTVd، و ٦٠ نيوكليتيده في ASSVd و ٨٠ نيوكليتيده في ASBVd. مع أن التابع المتكرر وجد فقط في حوالي  $\frac{1}{3}$  من مجموع التابع في أفراد تحت مجموعة PSTVd، فإن أطول المتكررات في ASSVd و ASBVd تشغل الطول الكامل في كل جزئ.

إن الدوريات في جدول ١١ يبدو أنها متخصصة في الفيروسات، نظراً لعدم وجودها في RNAs الصغيرة الأخرى أو الفيروسات. وعلى أية حال فإن الدورية الواضحة لم توجد في HSVd أو في تنوعات التابع الخاصة بها في فيروس الثمرة الباهتة في الخيار، ولا في أفراد كلتا تحت مجموعة PSTVd وهذا الشيء يبقى محيراً. ولقد إقترح بعض العلماء أن الدورية الملاحظة في الفيروسات يمكن أن تلعب دوراً في تفاعل RNA الفيرويدي الشبيه بال DNA مع البروتينات نظراً لأن واحدة من صفات DNA هي المقدرة على ربط البروتين لتكون دورية تركيبية.

هناك احتمالية أخرى هي ذلك التركيب الدورى لمعظم الفيروسات يعكس أصلها التطورى حيث تضاعف التابع يكون متبوعاً بطفرة تسمح بزيادة في حجم وتكشف جزيئات الإصابة. المثل الممتاز لهذا التضاعف الجزئى لجزئى الفيرويدي يظهر خلال الإصابة لنخيل جوز الهند بواسطة فيروس CCCVd. إن الفيرويدي المتكون من ٢٤٦ نيوكليتيده تظهر مبكرة في الإصابة، لكن كلما تكشفت الأعراض تنشأ أشكالاً ذات وزن جزئى أكبر جديدة، وفي آخر الأمر تسيطر على تجمعات الفيرويدي كلما تقدم المرض. يحدث تضاعف لجميع نطاق T<sub>2</sub> ويبدأ على ثلاثة مواقع منفصلة ضمن نطاق V يعطى تناوبات زيادة من ٤١، ٥٠، ٥٥ أو ٢ × ٥٠ نيوكليتيده.

المضمون الوظيفي لتكشف هذه الأشكال الأعلى من CCCVd خلال تقدم المرض لم تعرف بعد. هنا بعض الفوائد تؤخذ من التضاعف، فمثلاً زيادة التنافس لربط هذه التتابعات المتكررة لبعض مكونات العائل ضرورياً للتضاعف ولكن هذا يكون بصفة محدودة.

لقد ذكر أن التضاعف لنطاق T<sub>2</sub> من CCCVd يحدث بواسطة إنقطاع النسخ بأنزيم RNA polymerase ملتفاً أو قافزاً من قالب إلى آخر. هناك نموذجاً مماثلاً لتلك المقترح في فيروس الانفلونزا. فرضاً فإن تضاعف التابع في الأفراد الأخرى من فيروسات مجموعة PSTVd يمكن أن تحدث بطريقة متماثلة للمرحلة الأخيرة لبناء جزئ كامل الطول.

جدول ١١: أمثلة على الدورية التركيبية في الفيروسات.

الاجماع	وحدات متكررة نيوكليتيديّة	الفيروس
CNGRRGRRAYCN نيوكليتيديّة ٦٩ - ١٧٢	١٢	PSTVd
CNGRRGRRAYCN نيوكليتيديّة من ٢٤٤ - ١٢٩	١٢	CCCVd
متكررة ٤,٥ - ٥,٥ مرة في ٣٣٠ نيوكليتيديّة	٦٠	ASSVd
متكررة ٣ مرات في ٢٤٧ نيوكليتيديّة	٨٠	ASBVd

ملاحظات:

N = a non conserved nucleotide A, C, G, or U, Y = Pyrimidene, R = Purine.

تتابع النطاقات فى الفيروسيدات والفيروسايدات يدل على النشوء بواسطة أعادت ترتيب RNA .

### Sequence Domain In Viroids and Virusoids indicate Evolution by RNA Rearrangement.

بمقارنة تحليل تتابع الأزواج لأفراد تحت مجموعة B<sub>1</sub> من PSTVd دلت على وجود خمسة نطاقات والتي تعينت حدودها عن طريق التغيرات الحادة فى تماثل التتابع من العالى إلى المنخفض والعكس بالعكس. المقارنات الزوجية المختلفة كانت دائماً متناسقة مع الموقع الصحيح مع الحدود لكل نطاق. لقد تبين نموذج النطاقات باستعمال التتابع فى الفيرويد فقط من تحت مجموعة B<sub>1</sub> لمجموعة PSTVd. وعلى أية حال فإن فيروسيدات مرض ندب الجلد فى التفاح ASSVd تحت مجموعة B<sub>2</sub> لها نفس النطاقات كما يظهر بواسطة مقارنة الأزواج فى التتابع.

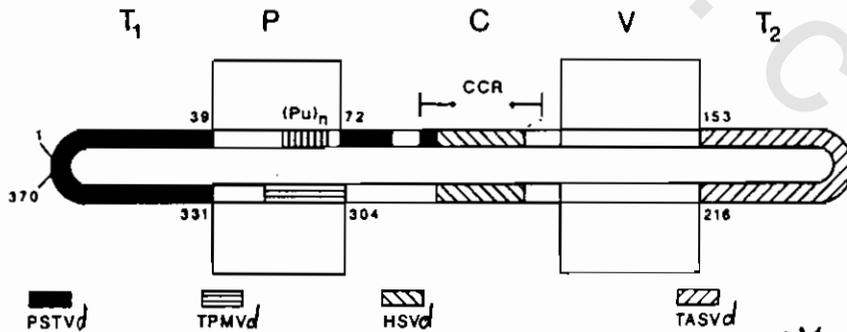
تقسم مجموعة PSTVd إلى تحت مجموعتين على أساس التتابع فى المنطقة المركزية المحفوظة لنطاق C. ضمن نطاق C فى كل تحت مجموعة هناك تتابعات حوالى ٣٠ نيوكليتيده والتي هى محفوظة تماماً highly conserved بين كل الأفراد لكل تحت مجموعة ولكنها تختلف تماماً عن تلك الموجودة فى تحت المجموعات الأخرى. تتابعات المنطقة المركزية المحفوظة هذه تشكل ثلث نطاق C فى كل حالة. وعلى أية حال فإن الميزة العامة لكلا تحت المجموعتين هو وجود تتابع متكرر مقلوب قصير Short inverted repeat sequence ضمن النيوكليتيديات المحفوظة والتي تظهر على شكل أسهم فى شكل ٧.

هذا النموذج للنطاق يؤدي إلى الافتراض بأن نشوء الفيروسيدات داخلاً فى إعادة الترتيب للنطاقات بين الفيروسيدات المهاجمة لنفس الخلية متبوعاً بنشوءات أخرى. إن الإنبات التجريبى لهذا الافتراض صعب تحقيقه ولكن التتابعات للفيرويد الجديد والتي تستمر فى الظهور أعطت إثبات قوى غير مباشر. فمثلاً فى تتابع Columnnea latent viroid، فإن نطاقات نهاية اليد اليسرى T<sub>1</sub> ونهاية اليد اليمنى T<sub>2</sub> تظهر بتجانس

تتابع مرتفع لنفس النطاقات في PSTVd في فيروس تدقزم قمة الطماطم مع حدود محددة جيداً ومتناسقة مع مقارنات الأزواج الأخرى شكل ١٤. إن وجود أطوال لتحت نطاق من تتابعات في فيروس النبات الذكر في الطماطم TPMVd في النطاق المرض P وفي PSTVd، HSVd، في نطاق C شكل ١٤، يدل على إعادة الترتيب التي يمكن أن تحدث ضمن النطاق بالإضافة إلى الحدود. أيضاً كذلك فإن الفيروس المتسلق Scrambled وهو فيروس العنب الاسترالي AGVd من ASSVd تحت مجموعة B<sub>2</sub> الذي فيه تقريباً جميع ال ٣٧٠ نيوكليوتيدة يبدو وأنها مأخوذة من أجزاء من فيروسات CEVd، PSTVd، ASSVd و GYSVd. إن تشابه التتابع في أجزاء من AGVd يختلف من ٥٢ - ١٠٠٪ من التتابعات المتشابهة في الفيروسات الآباء المفترضة.

إن الميكانيكية التي يتم بها إعادة الترتيب للحمض RNA غير معروفة. إحدى الميكانيكيات المحتملة هي عدم استمرارية النسخ حيث أن RNA polymerase الذي ينسخ قالباً من فيروس واحد أو فيروسايد يتحول إلى نسخ قالب ثانوي متجاور على بعض المواقع والأكثر احتمالية تحديدها بواسطة التركيب الثالث tertiary للقالبين.

من الأمثلة على إعادة الاتحاد بين الشريط الموجب لـ RNA للفيروسات هي التجمعات. في حالة فيروسات النبات فإنه في بعض الأحيان فإن المثال الأكثر تحديداً هو الذي ذكر بواسطة Allison et al سنة ١٩٩٠ عن فيرس التبرقش الشاحب الثلاثي في اللوبيا.



شكل رقم ١٤ :

رسم توضيحي للفيروس CLVd يظهر القطع عالية تماثل التتابع مع فيروسات أخرى. CCR منطقة مركزية عالية الحفظ.

ثالثاً: - إختلاف التتابع فى تنوعات التتابع فى الفيرويدات:

### Sequence Variability in Sequence Variants of Viroids

مقدمة:

قبل أن ندخل فى هذا الموضوع يجب أن يكون لدينا فهماً واضحاً للاصطلاحات المستعملة والتي نذكر تعريفها فيما يلى:-

١ - عزلة الفيرويد A Viroid Isolation: هى مجموع جزيئات الفيرويد الكاملة الموجودة فى نبات مصاب واحد. إن مثل هذه العزلة يمكن أن تحتوى نوعاً واحداً أو أكثر من الفيرويد وتحتوى واحداً أو أكثر من تنوعات التتابع لكل أنواع الفيرويد.

٢ - أنواع الفيرويد A Viroid Species: تتكون أنواع الفيرويد من واحد أو أكثر من تنوعات التتابع مستقلة التناسخ والتي تظهر أكثر من ٩٠٪ من تماثل التتابع بواسطة المقارنة المزدوجة. جميع أفراد النوع الواحد تمتلك أقل من ٨٠٪ من تماثل التتابع مع أفراد من أنواع فيرويد آخر.

٣ - تنوع التتابع A Sequence Variant: هو جزيء فيرويد مفرد ذو تتابع محدد. وبالتالي فإن أنواع الفيرويد تحتوى واحداً أو أكثر من تنوع التتابع تحدث طبيعياً والذي كل منها يختلف بوحدة أو أكثر من النيوكليوتيدات عن تنوعات التتابع الأخرى ولكن كلها تظهر أكثر من ٩٠٪ من تجانس التتابع بواسطة المقارنة الزوجية.

٤ - النسبة المئوية لتماثل التتابع Percent Sequence homology: يستعمل هذا الاصطلاح للمقارنة بين فيرويدين وهذا يحدد بواسطة طرق معتمدة على الكومبيوتر التي ذكرها Wilbur & Lipman سنة ١٩٨٣ وتستعمل فيها القياسات،  $g, W, K$  حيث أن  $K = 4$  وهذا يستعمل للمقارنة فى الطول حيث المقارنة تساوى  $K$  أو أكثر.

حجم الشق (Windo size)  $W = 100$

gap penalty  $g = 4$

في هذه التعريفات نفترض وجود أنواع الفيرويد منفصلة عن بعضها تماماً وليست إختلافات مستمرة في التتابع في الفيرويدات تحدث طبيعياً. مع أن هذا الأخير يعتبر غير محتمل فنحن نحتاج إلى وصف أنواع كثيرة من الفيرويدات وإلى العديد من تنوعات التتابع في كل نوع قبل أن نستطيع أن نكون واثقين عند التمييز الواضح بين أنواع الفيرويد.

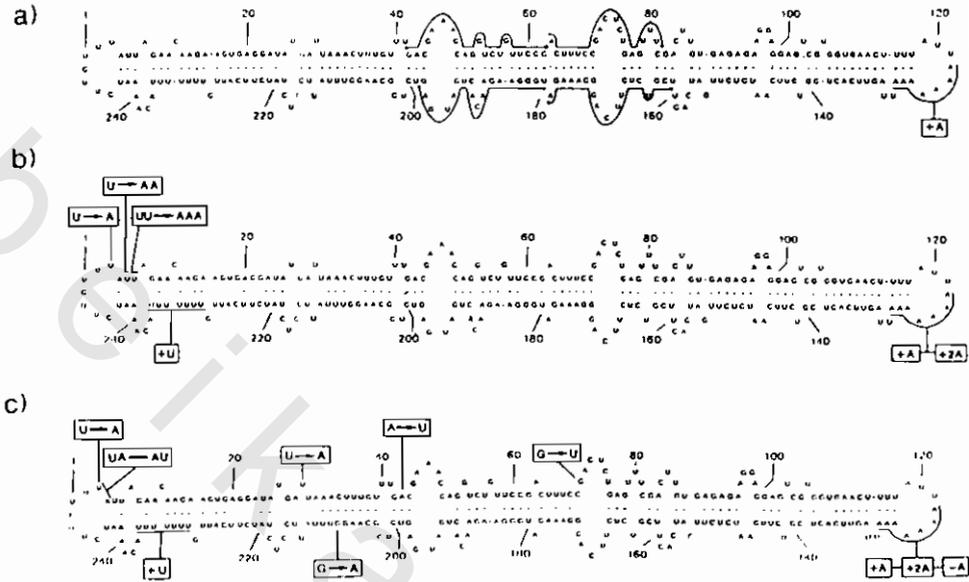
إن أكثر تنوعات التتابع دراسة وتمييزاً في صفاتها هي تلك التابعة لكل من HSVd و ASBVd و CEVd وإلى حد ما PSTVd و CCCVd وهناك توضيح كامل ومطول عن تنوعات التتابع مذكورة في كتاب Keese et al سنة ١٩٨٨.

### I - تنوعات التتابع في ASBVd :

#### Sequence Variants of ASBVd

كان أول تحليل واضح لتنوعات التتابع في ASBVd قام به Rakowski & Sy mons سنة ١٩٨٩. لقد حدا تنابعات ١٦ تنوع من ٢٤٧ نيوكليتيده ذات علاقة مع ASBVd مثل تنوع SB - 1 والتي كانت قد عزلت من أوراق ثلاثة أشجار أفوكادو في مناطق منعزلة في استراليا. كانت معظم النيوكليتيدهات المختلفة موجودة في اليد اليمنى واليسرى للعروات في جزئ ASBVd بينما العدد الباقي يختلف من ٢٤٦ إلى ٢٥١ نيوكليتيده.

يظهر في شكل ١٥ مواقع هذه التغيرات



شكل رقم ١٥ :

الاختلافات في تنوعات النتابع المأخوذة من ثلاثة عزلات (a) ، (b) و (c) من فيروس ASBVd. النيوكليوتيدة المتغيرة موضوعة في علبة وهي ذات علاقة بالنتابع وتقترح التركيب الثانوي في تنوعات النتابع SB-1 من الفيروس ASBVd الموجودة في عزلة (a). في عزلة a فإن الأربعة مواقع من الطبقة الأولى في مركز الجزيء الذي كان يستعمل لتوالد كلونات cDNA للنتابع تكون معلمة بخط.

## II - تنوعات النتابع في مجموعة PSTVd :

### Sequence Variants of PSTVd Group of Viroids

#### ١ : تنوعات النتابع في CEVd

لقد أجرى معظم هذا البحث على خمسة عزلات استرالية مستخلصة من حمضيات ثم بعد ذلك تكاثرت في الأقحوان والطماطم، وكان من المثير للاهتمام أنه على بادرات الطماطم فقد أعطت هذه العزلات الخمسة نوعين من الأعراض

فقط ١ - معتدلة أو صعبة الظهور. ٢ - شديدة حيث ظهر تدلى للأوراق شديد مع أوراق متجمدة وتقرزم. كانت هذه العزلات كما يلي :-

١ - العزلات المسببة لأعراض شديدة هي CEVd - J ، CEVd - DE 25 ، CEVd - A .

٢ - العزلات المسببة لأعراض معتدلة CEVd - DE 26 ، CEVd - DE 30 .

إن مقارنة التنوعات المتتابعة مع كل عزلة يتطلب تحضير الطول الكامل لكلونات cDNA والتحديد الكامل لتتابعها. فقط في هذه الطريقة يمكن لاختلاف التتابع ضمن تنوعات التتابع بالإضافة إلى تقدير عدد تنوعات التتابع في كل عزلة يمكن تحديده. وعلى أية حال فإنه من المهم أن ندرك أن التتابع في عدد كبير من كلونات cDNA يكون مطلوباً لاكتشاف عدد قليل من تنوعات التتابع. مثلاً إذا كان فرد معين من تنوع متتابع موجوداً بمستوى ٠.٥٪ من مجموع التنوعات عندئذ على الأقل يجب أن يكون هناك ٢٠ كلونة من cDNA معروفة التتابع لتزويدنا باحتمالية معقولة لاكتشاف هذا الفرد. زيادة على ذلك فإن الكمية النسبية لكل تنوع تتابع في أى عزلة يكون محتمل جداً لأن يتغير معتمداً على ظروف النمو وبشكل خاص أكثر على العائل النباتى المستعمل. وبالتالي فإن أعداد تنوعات التتابع في أى عزلة واحدة حددت بواسطة تنابعات كلونات cDNA بالتأكيد سوف يكون تقديراً غير سليم.

وبالنسبة للعزلات السابقة فإن عزلة CEVd - A تحتوى على الأقل إثنين من تنوعات التتابع والتي تختلف بواسطة قليل من النيوكليوتيدات، بينما CEVd - DE 25 وعزلة CEVd - DE 26 يبدو أنها تحتوى على تنوع متتابع واحد فقط. أما تنوعات التتابع في عزلة CEVd - A وعزلة CEVd - DE 25 فإنها كانت متشابهة جداً مع التنوع المتتابع المسمى Californian والتي تحددت بواسطة Gross et al سنة ١٩٨٢. أما التنوع المتتابع في CEVd - DE 26 فإنه يحتوى ٢٧ نيوكليوتيدة تختلف نسبياً مع التنوع المتتابع في CEVd - A. أما في عزلة CEVd - J يظهر أكبر إختلاط

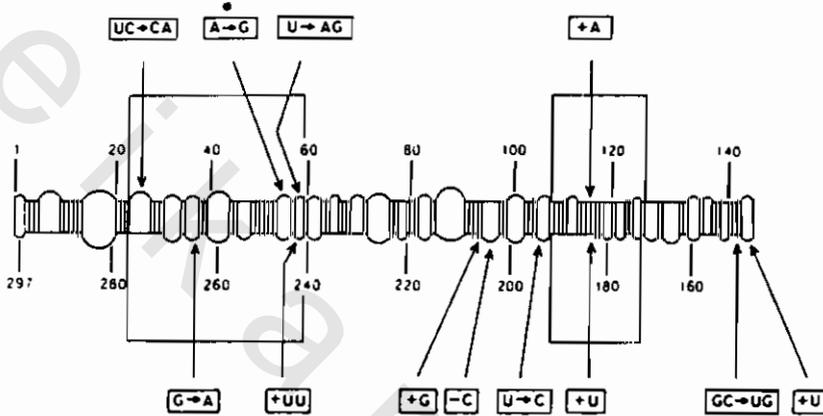
من تنوعات التتابع، فقد وجد أنه من تتابع حوالي ٢٠ كلونة من cDNA فقد وجد تسعة تنوعات متتابعة مختلفة. وهناك تجارب أخرى تدل نتائجها على وجود عدد كبير من تنوعات التتابع أكثر من تسعة في حقل واحد مزروع بأشجار البرتقال المطعمة على أصول *Poncirus trifoliata* والتي تظهر عليها الأعراض الكلاسيكية لمرض اكسوكورتز الحمضيات، مثل انفصال القلف عن جذع الأصل. بعد ذلك فإن أشجار الحقل يمكن أن تختلف بشكل كبير في عدد التنوعات المتتابعة لـ CEVd الموجودة فيها.

إن إختلافات التتابع الموجودة في ١٥ تنوع من CEVd الأسترالي بالإضافة إلى اثنين من تنوعات التتابع في كاليفورنيا كانت واقعة بشكل أكثر وضوحاً في نطاقى P و V (شكل ٩)، وبشكل أساسى فإن جميع التنوعات المتتابعة تكون زيادة على ذلك منحصرة في مناطق أصغر والتي نطلق عليها  $P_L$  و  $P_R$ . إن منطقة  $P_R$  تتكون من ٢٠ - ٢٤ نيوكليتيده من المجموع الكلى ٣٧٠ - ٣٧٥ نيوكليتيده (٦٪ من جزئ CEVd) يكون قابل للتغير جداً مع كثير من تغير النيوكليتيدهات، بينما منطقة  $P_L$  تتكون من ٤٩ نيوكليتيده تحتوى قليل من التغيرات.

## ٢ - تنوعات التتابع فى HSVd :

إن فيروس الثمرة الباهتة فى الخيار CPFVd وفيروس تقزم حشيشة الدينار HSVd تعتبر أصلاً كأنواع فيروس منفصلة عندما حددت التتابعات النيوكليتيده فيها لأول مرة فوجد أن طول الأول ٣٠٣ وطول الثانى ٢٩٧. وعلى أية حال فإنهما تنوعات تتابع حقيقية لنفس الفيروس بسبب أنها تمتلك أكثر من ٩٠٪ تتابع متماثل وعن طريق الاستعمال الشائع فقط يعتبر الفيروس HSVd هو الاسم المستعمل للفيروس وكأنه فيروس منفصل. تنوعات التتابع بين التنوعات الأصلية لـ HSVd و CPFVd المذكورة فى شكل ١٦، وهى تقع غالباً فى نطاقى P، V. وفى دراسات حديثة فإن Shikata سنة ١٩٩٠ لخص التوزيع والعلاقة بين تنوعات التتابع لـ HSVd المعزولة من مدى واسع لأنواع أشجار الفاكهة، وبالنسبة لعزلة حشيشة الدينار من HSVd،

فإن هناك سبعة تنوعات تتابع أخرى تختلف في الطول من ٢٩٧ - ٣٠٣ نيوكليتيده تصل إلى ١٣ متبادل، منها سبعة insertions داخلات وثلاثة deletions مشطوبات. وبالتالي فإن HSVd يكون مماثل لـ CEVd في إظهار مجال من تنوعات التتابع في العزلات الحقلية للفيروس ومع معظم الاختلافات الحادثة في نطاقى P و V.



شكل رقم ١٦ :

رسم توضيحي للنيوكليتيده الواجب تغييرها لقلب HSVd ليصبح CPFVd وإن مناطق النطاقات لكل من V و P معبر عنها بشكل مستطيلات.

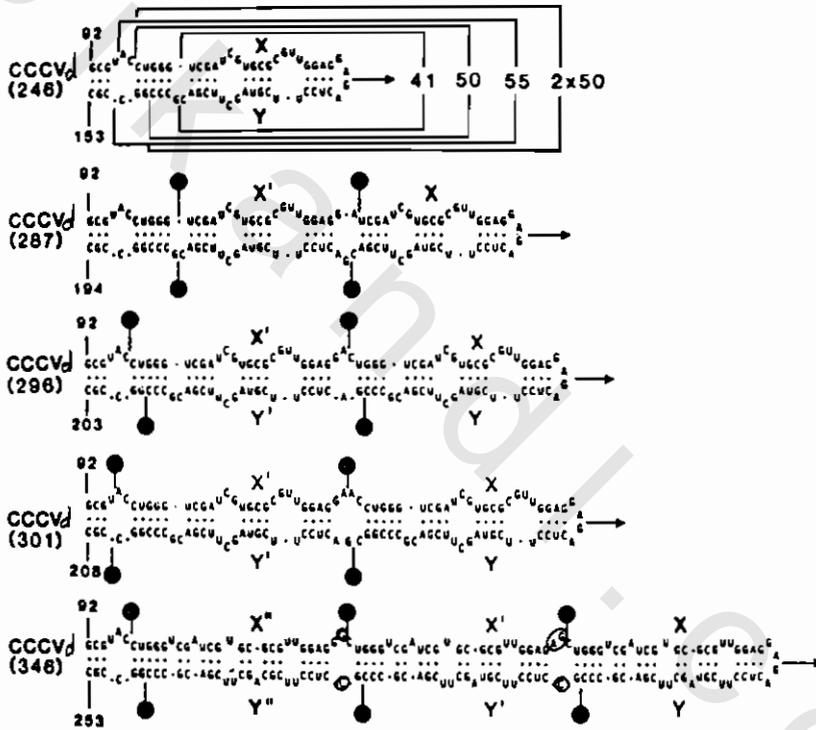
### ٣ - تنوعات التتابع فى فيروسات أخرى :

#### Sequence Variants of Other Viroids

لقد ذكر أن هناك إختلافاً فى النيوكليتيدهات فى تنوعات تتابع كانت قد وصفت فى PSTVd وبشكل أقل ذكرت فى CSVd. وكما قد ذكر سابقاً فى حالة CEVd و HSVd فإن معظم التغيرات تحدث فى نطاقى P و V.

أما فيروس CCCVd فإنه يتميز عن جميع الفيروسات الأخرى فى كونه نوع غير عادى من تنوع التتابع ينشأ منه مثل مرض كادانج - كادانج ويتقدم فى نخيل جوز الهند المصاب. إن التتابع فى عزلات CCCVd المأخوذة من نخيل محدد ومن أوراق ذات أعمار مختلفة ضمن نخلة مفردة أظهرت ثلاثة أنواع من تنوعات التتابع

بالإضافة إلى ٢٤٦ نيوكليوتيد وهى القواعد الأساسية للأنواع. هذه تشمل C in- serton فى موقع ١٩٨ من نطاق C ومضاعفات نطاق T<sub>2</sub> بالإضافة إلى جزء من نطاق V من ٤١، ٥٠، ٥٥ أو ١٠٠ (٢ × ٥٠) نيوكليوتيدة شكل ١٧ وطفرات فى القواعد المجاورة للحدود لبعض التضاعف الجزئى. يبدو أنه لا يوجد هناك إختلافاً فى نطاقى P و V فى تسعة عزلات منفصلة من CCCVd مأخوذة من مناطق مختلفة فى الفلبين والتي أيضاً تتعارض مع المواقع فى الفيروسيات الأخرى.



شكل رقم ١٧ :

تضاعف التابع فى نطاقى V و T<sub>2</sub> للفيروس CCCVd. إن طولى التابع X و Y إما ٤١، ٥٠ أو ٥٥ نيوكليوتيدة، تكون مضاعفة أما مرة واحدة فى CCCVd (٢٨٧)، CCCVd (٢٩٦) و CCCVd (٣٠١)، أو مرتين فى CCCVd (٣٤٦). تدل الأسهم فى الجهة اليمنى على روابط فى تتابعات X و Y بينما الدوائر المظلمة تدل على روابط التابع المضاعف. الحروف المحاطة بدائرة تدل على إختلاف تتابع فى تنوع التابع.

## رابعاً: - تشخيص الفيرويدات : Diagnosis of Viroids

### مقدمة:

هناك متطلبات ضرورية لتحسين وتطوير الإجراءات لسرعة وتخصص اكتشاف الفيرويدات ذات الأهمية الزراعية ويجب أن تكون هذه الإجراءات جاهزة للاستعمال في مثل تلك المعامل كما في أقسام كليات الزراعة وشركات البذور بالإضافة إلى مراكز الأبحاث. في حالة بعض المحاصيل، مثل البطاطس وفي تحليل عينات البذور فإن هذه الإجراءات يجب أن تسمح بإجراء الإختبار يومياً لكميات كبيرة من العينات. زيادة على ذلك فإن حساسية الطريقة يجب أن تكون عالية بشكل يكفي لاكتشاف موثوق به للمستويات المنخفضة لمسببات المرض الفيرويدي بالإضافة إلى أى تنوعات تتابع يمكن أن تحدث في الحقل.

هناك عدة طرق استعملت وتستعمل في الكشف عن وتشخيص الفيرويدات نذكر هذه الطرق للإستفادة.

### ١ - الإختبارات الحيوية Bioassays :

على نحو تقليدي فإن إجراءات التشخيص لمسببات الأمراض النباتية (الفيرويدات والفيروسات النباتية) هي إجراءات حيوية وتعتبر سهلة بشكل عام وتعتبر حساسة عند مقارنتها مع بعض الطرق الأخرى. منذ اكتشاف الفيرويدات سنة ١٩٧١ أجريت أبحاثاً كثيرة لإيجاد العوائل الطبيعية للفيرويد والتي تسمى العوائل المفرقة Differential hosts والتي تعطى أعراضاً جيدة. فمثلاً فيرويد الثمرة الباهتة في الخيار CPFDV يعطى أعراضاً مميزة في الخيار لذلك ليس هناك حاجة للبحث عن عوائل معرفة أخرى. ولكن لسوء الحظ فإن معظم الفيرويدات الأخرى تظهر أعراضاً ضعيفة غير مميزة في عوائلها الطبيعية الأخرى أو تسبب أعراضاً يمكن بسهولة أن تختلط مع أعراض مسببات أخرى. فمثلاً تقزم الاقحوان المتسبب عن CSVd تختلف أعراضه كثيراً باختلاف أنواع الأقحوان التي يصيبها وكثيراً ما

يكون من الصعب توفر قاعدة تعريف تعتمد على الأعراض فى العوائل الطبيعية فقط. إلا أن الصنف المزروع Mistletoe تظهر عليه الأعراض على شكل بقع عديدة على الأوراق مميزة وبالتالي يمكن استعماله فى الفهرسة. فمثلاً تؤخذ قمم نبات ال Mistletoe وتطعم على النباتات المراد إختبارها، بعد حوالى سبعة أسابيع يمكن قراءة النتائج. إلا أن هناك عيوباً لهذه الطريقة.

أما بالنسبة لفيروس الدرنه المغزلية فى البطاطس PSTVd فإن الكاشف المناسب له مهم جداً بسبب أن الأعراض على البطاطس من الصعب التعرف عليها، زيادة على ذلك فإن الإصابة فى السنة الأولى عادة ما تبقى بدون أعراض، هذا يعنى أنه من المستحيل استبعاد الفيروس من الأصول المستعملة للسنة القادمة. مع أن الفهرسة بالحقن فى نباتات الطماطم النوع Rutgers قد سبب تقدماً كبيراً فى التشخيص وأن نسبة كبيرة قد حلت، إلا أنه ليس كل الإصابات يمكن أن تظهر وتوجد وتحل بهذه الطريقة.

أجريت أبحاثاً كثيرة لزيادة تعبيرات الأعراض فى الإصابة الفيروسية على نباتات الاختبار. وجد أن ظروف النمو مهمة جداً، درجات الحرارة المرتفعة والكثافة الضوئية وطول فترة الإضاءة بشكل عام تخفض مدة الكمون وتلائم ظهور تعبيرات الأعراض. ولكن لا يوجد قانون عام فى هذا الموضوع كما ذكر Diener سنة ١٩٧٩.

هناك قليل من العوائل التى تعطى بقعاً موضعية Local lesions عند الإصابة الفيروسية (حيث أن هذه العوائل هامة فى التشخيص)، فمثلاً فيروس CSVd يسبب بقعاً موضعية على أوراق نبات Senecio cruentus بعد ١٢ - ١٨ يوم من الحقن. وكذلك وجد أن فيروس PSTVd يسبب بقعاً موضعية على نبات Scopolia sinensis.

إن التشخيص بالطرق الحيوية هى إجراءات حيوية فى الطبيعة شاملة الحقن بالعصارة أو بالتطعيم لنباتات كاشفة. هذه الإختبارات التى يبدو بأنها حساسة ودالة

على طبيعة العدوى للعامل المسبب، قد ثبت بأنها غير فعالة إلى حد ما. إن التعبير العرضي (بالأعراض المرضية) لبعض المسببات الخاصة يكون معتمداً على الجينوتايب Genotype وال phenotype وبالتالي فإن تلك الدراسات لهذه الظاهرة تصبح مؤكدة معملياً وكثيراً ما تتطلب أصناف نباتات كاشفة وفترة حضانة طويلة.

في حالة كثير من الفيروسات فإن تكشف الأعراض عادة ما يأخذ وقتاً طويلاً عنه في حالة الفيروسات. فمثلاً تكشف أعراض فيروس ASBVd يحتاج من ستة شهور إلى أكثر من سنتين بعد حقن بادران الأفوكادو القابلة للإصابة، وظهور الأعراض ليس مؤكداً ١٠٠٪. وبالتالي فإن هذا الإجراء الحيوي للتشخيص يكون عملياً فقط مع الفيروسات مثل PSTVd والتي تظهر أعراضاً خلال ٢ - ٤ أسابيع على بادران الطماطم. حتى في هذا الإجراء يمكن أن تظهر بعض الصعوبات، فمثلاً بعض سلالات الفيروس تعطي أعراضاً بسيطة جداً على نباتات الطماطم، وإن مثل هذه النباتات المصابة من الصعب تمييزها عن نباتات الكنترول السليمة. زيادة على ذلك فإنه نظراً لأن الفيروسات المختلفة يمكن أن تعطي بشكل أساسي نفس الأعراض على بادران الطماطم، لذا فإن إختبارات أخرى تكون ضرورية لتعريف الفيروس الحقيقي المسبب لإحداث الإصابة.

كثيراً من المشاكل المذكورة سابقاً والتي ترافق الإختبارات الحيوية للكائنات الممرضة الفيروسية أمكن التغلب عليها باستعمال الإختبارات المبنية على السيرولوجي. إن أكثر هذه الإختبارات شيوعاً هو إختبار ELISA الذي هو Enzyme linked immunosorbent assay الذي استعمله Clark سنة ١٩٨٤ و Cooper سنة ١٩٨٦. يعتمد هذا الإختبار على التعرف على أو تمييز الغطاء البروتيني بواسطة الأجسام المضادة Antibodies، لقد ثبت أن هذا الإختبار موثوق به ومتعدد الاستعمالات. وعلى كل حال فإن إختبار ELISA لا يتلائم مع الفيروسات نظراً لأن هذه العوامل المرضية (الفيروسات) هي أحماض نووية RNAs غير مغلفة فهي تفتقر إلى الغطاء البروتيني وبالتالي لا يمكن اكتشافها بالطرق السيرولوجية.

## ٢ . الهجرة الكهربائية فى بولى اكريلاميدجيل :

## Polyacrylamide Gel Electrophoresis

إن أول إختبار بيوكيميائى - بيوفيزيائى للفيرويدات كان طريقة الهجرة الكهربائية فى البولى اكريلاميد جيل (PAGE). هذه الطريقة اكتشفت بواسطة Morris & Wright سنة ١٩٧٥. وهى تعتمد على استخلاص الأحماض النووية من النسيج المصاب يتبع ذلك التحليل بواسطة Electrophoretic على ٧.٥ polyacrylamide gel. هذه الطريقة أجري عليها تحسينات وتتبع مع كثير من الفيرويدات.

تحتاج هذه الطريقة إلى يومين لكى تكتمل أما الإختبارات الحيوية مثلاً لفيرويد CSVd يحتاج ٤٩ - ٥٦ يوم. زيادة على ذلك فإن السلالات المعتدلة يمكن اكتشافها بسهولة كما هو الحال فى السلالات الشديدة. إن المأخذ الوحيد على هذه الطريقة هو عدد العينات التى يمكن أن تستعمل فى يوم واحد وهى محدودة فى ٢٠ - ٤٠ عينة. إلا أن هناك تحسينات أدخلت على هذه الطريقة بحيث يمكن استعمال ١٠٠ - ٢٥٠ عينة ويمكن أكثر الفيرويد فى نباتات الطماطم كخطوة وسيطة. هذه الخطوة الوسيطة حلت مشكلة كبيرة فى هذه الطريقة وهى مشكلة النسبة المنخفضة جداً من الفيرويد فى العينة النباتية.

هناك بعض الملاحظات على هذه الطريقة وهى أن سلوك الحزمة فى الجيل يختلف كثيراً مع النباتات مثل الأقحوان أو أنواع البطاطس المستعملة، وبالتالى فإن قراءة النتائج غالباً ما تكون صعبة جداً. لكن بالنسبة للفيرويد PSTVd فإن هذه المشكلة قد وجد لها حلاً عن طريق استعمال الطماطم كمائل وسيط. عندئذ فإن سلوك الحزمة لـ RNA المستخلص من نباتات الطماطم يكون جيداً، وهناك فائدة أخرى لإستعمال نباتات الطماطم وهى أن الفيرويد يتكاثر فى العائل الوسيط. وقد أجرى تحسين على هذه الطريقة وذلك باستبدال خطوة ال Dialysis

بخطوة Desalting باستعمال مرشح Sephadex. إن استعمال طريقة- Tomato PAGE لها ثلاثة مآخذ رئيسية هي :-

١ - تحتاج حوالي ستة أسابيع لاكتمالها.

٢ - تحتاج إلى جهد كبير.

٣ - تحتاج إلى تكاليف مادية كبيرة.

أما بالنسبة لاستعمال هذه الطريقة مع فيروسات الخيار فمن الصعب وجود عائل وسيط لها.

٣ - الهجرة الكهربائية ثنائية الاتجاه:

#### Bi - Directional Electrophoresis

إن طريقة الصبغ بمادة Toluidin blue تستعمل عادة في طريقة - Tomato PAGE وهي ليست شديدة الحساسية. إن استعمال طريقة صبغ أكثر حساسية يمكن أن تزيد كثيراً إمكانية اكتشاف الفيروسات. وعلى أية حال إذا كانت الحزم في الجيل الطبيعي يمكن أن تصبغ بنترات الفضة، فإن المنطقة بأجمعها التي فيها حزمة الفيروس تعين ويكون لونها مسود بسبب وجود مستوى مرتفع نسبياً من الاضطرابات في تلك المنطقة.

عند قطع حزمة الفيروس بعيداً عن الجيل الفاصل ثم وضعها عند قاعدة جيل آخر، فإن موقع حزمة الفيروس يمكن أن يتحدد بسهولة إذا أضيف Xylene cyanol FF في المنظم الحامل الأساسي ولكي يهاجر ال Xylene - cyanol أسرع إلى حد ما من الفيروس. الجيل الثاني هو جيل مدنتر يحتوي ٧ مول يوريا ويسيل على حرارة ٦٥ م.

كما هو معروف فإن الفيروسات هي جزيئات ذات تركيب دائري، تحت ظروف الدنترة فإن الجزيء يفقد تركيبه المعقد وعند الهجرة الكهربائية فإن الجزيئات

الدائرية سوف تتحرك ببطء أكثر من الأفراد الملتوية (غير الدائرية). أما الجزيئات الأخرى الموجودة في منطقة الفيرويد والتركييب المستقيم سوف لا تتأثر في حركتها النسبية بواسطة التغير في ظروف ال Electro phoretic. نتائج هذه الطريقة واضحة في شكل ١٨. كل الجزيئات المسببة للاضطرابات حول حزمة الفيرويد في الجيل الأول تتحرك بسرعة أكثر نسبياً، بينما جزيئات الفيرويد التي تتحرك ببطء تكون موجودة بالقرب من موقع الإبتداء في منطقة تكون خالية كلية من أى أحماض نووية أخرى والتي تسمح بالاستعمال لنظام الصبغ الحساس مثل نترات الفضة.

ولكى نثبت أن هذه المنطقة (الحزمة) هي فعلاً حزمة للفيرويد المطلوب، تقطع هذه الحزمة بعيداً عن الجيل ويستخلص الحمض النووي من الحزمة ويحقن في نباتات كاشف (مثلاً الطماطم لفيرويد PSTVd) عندها تتكشف أعراض نموذجية لتلك الفيرويد.



شكل رقم ١٨ :

إختبار الهجرة الكهربائية ثنائية الاتجاه للفيرويد PSTVd. في الجزء السفلى في الجيل - الفيرويد - ملاحظ في مستخلص النباتات المريضة ويشار إليه بالسهم.

## تحضير العينات:

يؤخذ ١ غرام من الأوراق وتسحق في ضاغط بينما يضاف ٠,٤ مول منظم الذى تركيبه (10 mM tris - HCl, 1 mM EDTA, 2% SDS, pH8) و ٠,٦ مول فينول مشبع بالماء يحتوى ١,٠٪ من hydroxyquinoline - 8 تضاف إلى عجلات الضغط، يضرب المخلوط ليتجانس لمدة ١,٥ دقيقة باستعمال Whirlmix. يوضع فى آلة الطرد عن المركز، بعد ذلك يؤخذ ٤٠٠ ميكولتر من العائم وترسب الأحماض النووية التى فيه بالايثانول. يعاد تعليق الكريات الصغيرة فى ٥٠ ميكولتر ماء وبعد إضافة ١٠ ميكولتر محلول مائى محتوياً ٤٠٪ سكروز، ٢٥٪ من Xylene - Cyanol FF و ٠,١٪ بروموفينول أزرق، يوضع المخلوط كله فوق الجيل.

يمكن تبسيط الإجراءات كالتالى:-

تستمر الهجرة الكهربائية تحت الظروف الطبيعية حتى يصبح The Xylene - Cyanol FF فى قاع الجيل، بعد ذلك تعكس قوة القطبية ونفس الجيل بهاجر كهربائياً على حرارة ٧٥م. فى هذه الحالة يمكن استعمال منظم واحد 20 mM tris 19 mM PO3 H3 ، 0.06 mM EDTA pH 8.3 ، . هذا الإجراء يحتاج قليل من التعديل فى الصبغ بالفضة: يجرى غسيل وتثبيت لمدة ١٥ ثانية بدلاً من ٢ × ١٠ ثانية، يكون الصبغ بـ ٠,٠٩٥٪ نترات فضة بدلاً من ١,١٩٪ نترات فضة. السائل المتكون يخفف بنسبة ١ : ١ بماء، هذا يحتاج لوقت من ١ - ٤٠ دقيقة. ويمكن ملاحظة ما يلى:-

١ - إن هذه الطريقة سريعة حيث أن الإجراء كله إبتداءً من قطف الأوراق حتى قراءة النتائج يكون فى حوالى ٨ ساعات.

٢ - الطريقة حساسة جداً حيث يمكن اكتشاف ٥ نانوغرام من الفيرويد / أثر فى الجيل. وبإجراء حسابات بالكمبيوتر يمكن أن نكتشف ١٠ نانوغرام فيرويد لكل غرام من الأوراق، وبهذه الحالة فإن هذه الطريقة تكون حساسة كما فى حالة طريقة التهجين الجزيئى (جدول ١٢).

٣ - هذه الطريقة أكثر أماناً حيث أنها مبنية على معيارين يصبح الفيرويد واضحاً عن طريق الصبغ وإن الصبغ يكون في مكان منخفض في الجبل وبالتالي فإن الفرصة الخاطئة بواسطة false positives (الكولونات الخاطئة) تكون منخفضة.

٤ - لا تتطلب كيمويات خطيرة مثل الفسفور المشع.

جدول ١٢: مقارنة بين طريقة الهجرة الكهربائية ثنائية الاتجاه BDE وطريقة التهجين الجزيئي لـ cDNA في مقدرتها على اكتشاف فيرويد PSTVd.

حجم العينة	الكمية المكتشفة		الطريقة
	مطلقة	تركيز / غرام من الأوراق	
٦٠ ميكولتر (٠,٥ غرام من الأوراق)	٥ نانوغرام	١٠ نانوغرام	BDE
٣ ميكولتر (٠,٠٠٦ غرام من الأوراق)	١٢٥ - ٢٥٠ بيكوغرام	٢٠ - ٤٠ نانوغرام	cDNA

وإذا وضعنا في الاعتبار المعلومات الآتية:

١ - تركيز الفيرويد PSTVd ١٥٠٠ - ١٩٠٠ نانوغرام / غرام أوراق.

٢ - تركيز الفيرويد PSTVd ١٢٦٠ نانوغرام / غرام من القمة النامية في النبات.

٣ - تركيز الفيرويد CSVd ١٢٠٠ نانوغرام / غرام أوراق.

يتبين لنا أن كلا الطريقتين تلائم متطلبات اكتشاف PSTVd و CSVd في النباتات المريضة. كذلك فإن المعلومات تدل على أن العينات يمكن أن تختبر بنجاح. في تجربة مع PSTVd وجد أن تحضير العينة كما سبق ذكره، بها نستطيع اكتشاف عينة مريضة واحدة مع ٤٩٩ عينة سليمة وأن حذف الترسيب بالإيثانول

واستعمال طور مائي مباشرة للهجرة الكهربائية، عندها يمكن إكتشاف عينة مريضة واحدة من بين ١٩٩ عينة سليمة.

#### ٤ - التهجين الجزيئي Molecular Hybridization :

بسبب أن طريقة التهجين الجزيئي ذات حساسية عالية وتسمح باستعمال اعداداً كبيرة من العينات فى وقت واحد، لذلك يجب استعمال منقبات cDNA . يجب أن يحضر نسخة كاملة الطول من cDNA للفيروس ويجرى لها كلونة فى البكتريا E. coli .

فى طريقة التهجين الجزيئي يؤخذ 3 UI aliquots من العصارة أو من مستخلص الحمض النووى من المادة المراد إختبارها وتوضع على Nitrocellulose filter . يرتبط الحمض النووى مع الفلتر عن طريق التحميص baking و-The Filter Pre - hybridized . وبعد ذلك يحضن الفلتر مع العينات - nick - translated PSTVd - p<sup>32</sup> cDNA وذلك لإحداث تهجين جزيئي فى هذه البقع حيث يوجد الفيروس. هذه البقع تصطاد النشاط الاشعاعى الذى بعد ذلك يمكن اكتشافه باستعمال التصوير بالاشعاع الذاتى .

من كمية مطلقة فى الصغر ١٢٥ - ٢٥٠ بيكوغرام / بقعة وعلى إفتراض أن ١ غرام من الأوراق تحتوى ٠,٥ مل عصارة يمكن أن نحسب بأن هذا النبات فيه تركيز ٢٠ - ٤٠ نانوغرام من الفيروس لكل غرام من الأوراق ويمكن أن تكتشف بهذه الطريقة . يمكن أن يضاف عينات كبيرة إلى الفلتر. إلا أن هذه التجارب فشلت بسبب أن بعض المواد لا ترتبط بشكل خاص مع الفلتر وتفقد خلال Pre - hybridization .

إن إختبار PAGE أقل حساسية ويمكنه أن يكتشف أى كمية مطلقة بحدود ٢٠٠ نانوغرام من الفيروس لكل حزمة فى الإختبار، ويمكن أن يكتشف تركيز ١٠٠ نانوغرام من الفيروس لكل غرام من الأوراق. أما طريقة cDNA تستطيع أن تكتشف ١٢٥ - ٢٥٠ بيكوغرام من الفيروس لكل حزمة فى الإختبار، ويمكن

أن يكتشف ٢٠ - ٤٠ نانوغرام / غرام أوراق. يعود ذلك بسبب أن العينات تكون أكبر من طاقة PAGE منه في طريقة cDNA.

مع أن إختبار التهجين الجزيئي على الحساسية ويمكن أن يستوعب أعداداً كبيرة من العينات إلا أنه ليس مناسباً للتطبيقات على نطاق واسع في معامل وقاية النبات.

#### ٥ . طريقة Dot - Blot Hybridization وتكتب DBH :

##### مقدمة :

إن أكثر طرق التشخيص حساسية وملائمة ومتخصصة لاكتشاف الفيروسيدات ولا يزال استعمالها جارٍ هي الطريقة القياسية التي تسمى - Standered dot - blot hybridization. كان أول تقرير عن اكتشاف كائن ممرض للنبات بواسطة DBH استعمال DBH عن الفيروس PSTVd وذلك بواسطة العالم Owens et al سنة ١٩٨١. في هذا التكنيك يستعمل شظية من حمض نووي (منقوب Probe) إما مشعة أو غير مشعة. هذه الطريقة أصبحت شائعة الاستعمال الآن في كثير من البلدان كطريقة روتينية لاكتشاف مجال واسع من الفيروسيدات. على الرغم من أن طريقة DBH ملائمة التخصص وعالية الحساسية لبعض الفيروسيدات حيث أنها يمكن أن تكتشف مدى منخفض جداً ١٠-١٢ غرام (picogram) في كثير من المستخلصات النباتية، إلا أن لها بعض العيوب وهو طول الوقت اللازم للحصول على تحضيرات مستخلص النبات الشامل (٢٤ ساعة تقريباً) ويمكن أن تحتاج ٤٨ - ٧٢ ساعة لاكتشاف المنقوب المرتبط. وبالتالي فإنه من المرغوب فيه أن يكون هناك تصميمات لطريقة أسرع، أبسط وحتى أكثر حساسية في التشخيص.

إن الدراسات المبكرة التي كانت تجرى على تهجين الأحماض النووية الفيروسية في النبات كانت تستعمل السائل أو محلول التهجين وذلك من قبل Gould & Symons سنة ١٩٨٣. في هذه الطريقة يحضر خيط مفرد من cDNA فيه فسفور مشع ٣٢ (p<sup>32</sup> - cDNA) مقابل لـ RNA لفيرس معين أو فيروس وهذا يهجن في

محلول لمدة ١٩ - ٢٤ ساعة مع تحضير من حمض نووي منقى جزيئاً من نباتات مصابة. عندئذ يعامل مخلوط التهجين بأنزيم Nuclease S1 والذي هو مخصص للأحماض النووية أحادية الخيط. تحت الظروف المستعملة فإن أى من cDNA - p<sup>32</sup> احادى الخيط غير مهجن يجرى له عملية تحليل مائية إلى أحادى النيوكليوتيدات أو قطعة صغيرة من قليلة النيوكليوتيدات Oligonucleotides بينما لا يتأثر التهجين الناتج وهو RNA : cDNA - p<sup>32</sup>، ما عدا التحليل المائى لأطراف أى حمض نووي احادى الخيط. بالإضافة لذلك فإن أى جزء من cDNA - p<sup>32</sup> الموجود فى مناطق عدم التزواج يعنى (عدم التطابق Mismatched) من التهجين الخاطى لـ: cDNA RNA فإنه يذهبهم. أما التهجينات الباقية الثابتة RNA : cDNA - p<sup>32</sup> عندئذ تجمع بالترسيب الحمضى وتعد. كان الكنترول دائماً يشمل cDNA - p<sup>32</sup> مهجناً مع نظيره RNA (هذا يعنى مع RNA الذى عنه كان قد حضر cDNA)، بسبب تهجينات الكنترول هذه فإنه ينشأ ٨٠ - ٩٠٪ من أقصى حد نظرى. بالإضافة لذلك فإن هناك Background control أساسى يتكون من منقب cDNA - p<sup>32</sup> مهجن مع مستخلص حمض نووي محضر من نباتات سليمة.

هذا التكنيك وصف أساساً لفهرسة فيروس ASBVd وله عدة إنتقادات هى: -

- ١ - الطبيعة المملة لهذا التكنيك نفسه.
  - ٢ - يظهر قيم غير واضحة للكميات المحسوبة دائماً أو أحياناً.
  - ٣ - غير مناسبة لدراسة كميات كبيرة من العينات.
- وبالتالى فإن تكنيك التهجين فى السائل قد توقف حالياً بواسطة استعمال طرق أكثر كفاءة وحدائة من DBH.

إن أساسيات DBH سهلة حيث أن DNA أو RNA المدنتر يجمد فى مكانه على دعامة غير فعالة مثل نتروليلوز أو أغشية نايلون بطريقة يمنع فيها التلدن

الذاتي Self annealing بجانب توفر تتابعات للتهجين مع منقّب من حمض نووي مضاف. هذا المنقّب يمكن أن يعلم بنوع من النظائر isotope ( $p^{32}$ ) أو بإشارى غير نظير nonisotopic ligand مثل بيوتين أو Digoxigenin أو معلم مباشرة بأنزيم Horseradish peroxidase أو alkaline phosphatase. بعد التهجين يجرى عملية غسل واسعة للراشح يزيل المنقّب المهجن بنسبة بسيطة أو غير المتفاعل. يكون اكتشاف الهجن المرتبطة بواسطة أى من :-

١ - Autoradiography .

٢ - Enzymatic Colorimetric Detection .

٣ - Chemiluminescence .

بينما تعتبر طريقة DBH هى حالياً على نحو عام الطريقة الممتازة لتشخيص مسببات أمراض النبات، إلا أنه يجب أن نتذكر أنها يجب أن تشمل تطبيق مباشر على راشح الحمض النووى غير المجزئ. إن هذه الطريقة لا تميز حجم جزيئات الهجن وبالتالي فإن علامة التهجين تكون عبارة عن مجموع التتابعات المهجنة مع المنقّب تحت الظروف المستعملة. هناك تكتيكان يسمحان بالتحليل الكيفى لأنواع الحمض النووى هى Northern blotting protocole و Southern blotting proto- cole. هنا فإن أنواع DNA أو RNA أولاً تقسم إلى أجزاء تحلل بواسطة ال Agarose أو بالهجرة الكهربائية فى الجيل-Polyacrylamide gel electrophore. ثم بعد ذلك تنقل بواسطة Blotting من الجيل إلى مرشح نتروسليلوز بيولوجى والذى بعد ذلك يستعمل فى التهجين. تدل النتائج على إختلاف الحجم والكميات النسبية التقريبية للأنواع المفردة.

أ: التعرف على الفيرويد باستعمال منقّبات مشعة:

#### Detection of Viroid by Using Radioactive Probes

إن طرق التعرف على الفيرويدات المبنية على طريقة DBH والمتضمنة استعمال منقّبات مشعة قد استخدمت بنجاح فى السنوات الحديثة. لقد أثبتت هذه الطريقة

ثقة وحساسية كبيرتين، وأمكن بواسطتها التعرف وإكتشاف الفيروسات الموجودة على مدى منخفض جداً يقدر بالبيكوغرام في كثير من عصارات النبات. كما هو واضح في جدول رقم ١٣ قائمة بالدراسات التي استعملت في هذا المجال للتعرف وإكتشاف العديد من الفيروسات في المدة من ١٩٨٥ - ١٩٩٠. كما يمكن أن نلاحظ فإن هذا التكنيك له مدى استعمال واسع وهو في الوقت الحاضر الطريقة الروتينية المستعملة في التعرف على الفيروسات في كثير من البلدان.

من جدول رقم ١٣ يمكن ملاحظة أن هناك أنواعاً مختلفة من المنقبات قد استعملت في التعرف على الفيروسات من هذه المنقبات.

١ - cDNAs أحادي الخيط (هذا يحضر أما بواسطة primer extension لإعادة الاتحاد في الفاج  $M_{13}$  DNA أو بواسطة النسخ العكسي للحمض RNA الفيروسي).

٢ - إعادة الاتحاد Recombinant DNA ثنائي الخيط.

٣ - RNAs ذات خيط وحيد مصنعة في المعمل.

٤ - نيوكليوتيدات قصيرة محضرة صناعياً.

إن أكثر الطرق شيوعاً لتحضير المنقب هي إعادة الاتحاد لكلونات DNA، مثل هذه الكلونات تسمح بالعزل لكميات كبيرة من الحمض النووي، وهكذا تكون ضرورية للمدى الواسع من العمل التشخيصي. وكذلك فإنها تزود العمل بتخصص عال ومصدر يمكن تجديده بسهولة. هناك شرح كبير عن المنقبات وتحضيرها واستعمالها مذكور بواسطة McInnes & Symons سنة ١٩٨٩ في كتاب Nucleic acid probes.

جدول رقم ١٣: دراسة Dot - blot Hybridization: التعرف على مدى من الفيروسات باستعمال المنقبات المشعة من سنة ١٩٨٥ إلى سنة ١٩٩٠.

الفيروس	رقم المنقب	المستخلص	مدى الصساسية على RNA فيروس نفى بالبيكوجرام
ASBVd	١	حمض نووي منقى جزئياً	٥
	٣	عصارة ورقة افوكادو	-
	١	حمض نووي من ورقة افوكادو	-
ASSVd	٤	RNA الكلبي، جلد ثمرة التفاح، قلف أو ورقة، بذرة.	-
CCCVd	١	حمض نووي ورقة نخيل جزر الهند.	-
CCCVd	١	حمض نووي، ورقة نخيل جزر الهند أو ورقة نخيل الزيت.	-
CEVd	١	عصارة الأبقوان أو حمض نووي من النبات.	١٠٠ - ٥٠
		<b>Gynura aurantiaca</b>	
CEVd	١ و ٤	حمض نووي، ورقة حمضيات أو قلف ورقة أبقوان.	-
CSVd	٢	عصارة أبقوان.	٥
	٢	حمض نووي ورقة أبقوان.	-
	٥	عصارة أبقوان.	أقل من ١
HSVd	٢	حمض نووي ورقة خشبة الدينار	-
PSTVd	٢	عصارة بطاطس، نموات بطاطس.	٨٠
	١	حمض نووي، ورق بطاطس أو طماطم.	-
	٤، ٢	مخلوط متجانس من ورقة بطاطس أو طماطم.	١,٤ - ١١,٢
	٢	حمض نووي خام، ورقة بطاطس أو طماطم.	٥٠
	١	حمض نووي ورقة بطاطس أو درنه.	-
	٤، ٢، ١	مخلوط متجانس من ورقة طماطم، ورقة بطاطس، تبرعات بطاطس أو بذور حقيقية للبطاطس، درنه بطاطس.	١٠٠ - ٠,٣٣
	٢، ١	حمض نووي، ورقة بطاطس أو طماطم.	-
	٢	عصارة خلية ورقة طماطم.	٢٠
	٤	حمض نووي، ورقة طماطم.	حوالي ١
	٥	عصارة طماطم.	أقل من ١

أرقام المنقبات تضر:

١ = خيط واحد من cDNA، ٢ = إعادة إنتاج بلازم DNA نهائي الخيط

٣ = قليل من النيوكلييدات المصعة، ٤ = Sp6 RNA Polymerase transcript.

٥ = T<sub>3</sub> or T<sub>7</sub> RNA polymerase transcript.

فيما يتعلق بطبيعة ونقاوة مستخلص الحمض النووي من النبات المنقول على نتروسيليلوز أو نايلون، فإن العينات يمكن أن تختلف بشكل كبير (جدول ١٣). ومن الجدير بالاهتمام أن الفيروسات بتركيبها الثانوي العال من RNA ترتبط مع النتروسيليلوز بدون متطلبات الخطوة الأولية من الدنترة، من المحتمل أن تحدث الدنترة خلال خطوة التحميص على درجة ٨٠م in Vacuo لمدة ساعتين وذلك لتجميد عينات ال RNA على الفلتر. يحصل على أقوى علامات التهجين عادة باستعمال عينات غير بروتينية نظراً لأن التجمد المشترك للبروتين يتنافس مع الحمض النووي على مواقع الارتباط وتنضم أيضاً إلى ال Background. لهذا السبب فإن كثيراً من إجراءات طريقة DBH في الاستعمال الحالي تستخدم درجة تنقية الفيئول. على أية حال وكما يمكن ملاحظته من جدول رقم ١٣ فإن كلاً من عصارة النبات ونسيج الورقة المتجانس نسبياً يمكن أن يضاف إلى النتروسيليلوز مؤدية إلى إكتشاف الفيروس.

لقد تم بنجاح تطوير طريقة مثالية من DBH بمنقبات cDNA - p<sup>32</sup> للاكتشاف الروتيني لكثير من فيروسات النبات. فمثلاً إن فيروس ASBVd قد تم اكتشافه عند وجوده على مستوى منخفض يقدر بحوالي ٢٠ بيكوغرام لكل وزن غرام واحد من الأوراق الطازجة، باستعمال مستخلصات حمض نووي منقى جزئياً. المنقب الذى كان يستعمل روتينياً هو خيط مفرد من cDNA معلماً بفسفور مشع ٣٢ وكان يحضر من إعادة الاتحاد لكلونة DNA محتوية على كلونة ذات طول كامل من ال monomer تدخل فى ASBVd فى الخيط المفرد من الناقل M13 phage. هذا الموضوع أثبت بأنه ذو فائدة كبيرة فى السنوات الأخيرة عند اكتشاف عديد من الفيروسات فى مدى مختلف من مستخلصات نبات من استراليا.

لقد ذكر White & Bancroft سنة ١٩٨٢ أنه من الممكن إحداث زيادة معتبرة فى قوة إشارة الهجين بواسطة إجراء معاملة لفترة وجيزة للنسيج أو مستخلص الخلية بـ ٢٠٪ (W/V) فورمالدهيد لكل ١٠× SCC محلول لمدة ١٥ دقيقة على ٦٥م

قبل نقلها على النتروسيليز و قبل تحميتها في *in Vacuo* على درجة ٨٠م لمدة ساعتين. عندما تضاف إلى مستخلصات نبات من الأقحوان، جوز الهند أو نخيل الزيت أو من البطاطس أو الطماطم لتشخيص الفيرويد فإن زيادة مشابهة في قوة إشارة التهجين قد لوحظت. هذه الملاحظة يمكن أن تكون بسبب الدنتر الكمية للحمض RNA في الفيرويد و / أو بسبب الارتباط العال مع النتروسيليز. ولسوء الحظ فإن المستخلصات المحضرة من نسيج نبات مصاب بـ HSVd أو ASBVd ومعامل بالحرارة مشابهاً لما هو في حالة وجود الفورمالدهيد ويظهر روتينياً خفض في قوة الإشارة بعد التهجين. هذا التأثير كان متغيراً إلى حد ما، بينما معظم المستخلصات أظهرت نقصان ملحوظ في الإشارة، يعطى المستخلص العرضى نقصان غير ملموس. إن الطبيعة الحقيقية للعوامل الداخلة في ذلك لم يجرى عليها إختبارات زيادة. وعلى أية حال فإن معاملة مستخلصات النبات المصاب بفيرويد HSVd و ASBVd في غياب الحرارة قبل خطوات نقلها وتحميصها يعطى تقريباً زيادة الضعف في قوة إشارة التهجين.

ب: التعرف على الفيرويد باستعمال منقبات غير مشعة:

### Detection of Viroid by Using Non - radioactive Probes

#### ١ - منقبات معملة بالبيوتين Biotin - Labeled Probes

إن الحاجة إلى طرق تشخيصية روتينية للفيرويد مبنية على إجراءات بسيطة لا يستعمل فيها الإشعاع أصبحت الآن في متناول اليد. هناك طرق عديدة متوفرة الآن في تعليم الحمض النووي ومنقبات من نيوكليوتيدات قصيرة تسمى nonisotopically بواسطة إما تقنيات أنزيمية أو كيميائية. يحوى جدول رقم ١٤ قائمة دراسات على طريقة DBH مستعمل فيها منقبات RNA و DNA معاملة بالبيوتين Biotinylated للتعرف واكتشاف مدى من الفيرويدات أجريت من سنة ١٩٨٨ - ١٩٩٠. ومن جدول رقم ١٤ يتبين لنا أن طريقة التعليم المفضلة حالياً لتعليم منقب الفيرويد nonisotopic هي التعليم بالبيوتين.

لقد استعملت المواد Photobiotin و Photoactivatable analog of biotin لإنتاج منقبات من إعادة الاتحاد لـ DNA معاملة بالبيوتين للتشخيص الروتيني للفيرويدات في مستخلصات النبات. يتكون آل Photobiotin من بيوتين مرتبطاً مع ذراع رابط مشحون يوصل بمجموعة Photoreactive aryl azide. عندما يعرض مخلوط من حمض نووي و Photobiotin إلى ضوء قوى واضح لمدة ١٥ - ٢٠ دقيقة فإن مجموعة aryl azide تنقلب إلى aryl nitrene شديد التفاعل والذي يسمح بتكوين روابط مع الحمض النووي. مع أن الأصل الدقيق (الصحيح) ومواقع الروابط غير معروفة فإن الرابطة تكون ثابتة تحت ظروف التهجين القياسية ومن المفترض أنها تساهمية. تحت الظروف المحددة والموصى بها فإن بيوتين واحد يقترن مع كل ١٠٠ - ١٥٠ قاعدة من الحمض النووي. مثل هذا المدى من التعليم يكون من غير المحتمل لأن يتدخل في تهجين المنقب المعامل بالبيوتين مع تتابعات الهدف المتتامة (المتتامة لبعضها البعض).

إن منقبات DNA المعاد صياغتها Recombinant والمعاملة بالبيوتين المذكورة سابقاً تحتوي إما جزء من الطول أو الطول الكامل لـ monomer Viroid مغروزة في ناقلات البلازميد pSP64 أو pUCq حيث تستعمل بنجاح للتعرف على HSVd، CSVd، CCCVd، ASBVd، PSTVd في مستخلصات حمض نووي منقى جزئياً مأخوذ من أنسجة النبات. مستخلصات النبات المأخوذة من مدى واسع من عينات الحقل توضع على نتروسيلليوز وتعرض للتهجين، DNA المعلم بالبيوتين الذي ارتبط مع الحمض النووي الهدف اكتشف عن طريق إتحاده مع an avidin - alkaline phosphate. تحت طريقة التهجين المعينة وظروف الغسيل، فإن كل منقب مفرد لفيرويد كان متخصصاً وكل فيرويد كان يكتشف بحساسية مشابهة لتلك المتحصل عليها عند استعمال نفس أو شبه المنقب المعلم بالفسفور المشع .٣٢

جدول رقم ١٤: دراسات على DBH لاكتشاف مدى من الفيرويدات باستعمال منقبات غير مشعة. الدراسة من ١٩٨٨ - ١٩٩٠.

الفيروس	نوع المنقب	تعلم المنقب	المستخلص	مدى الحساسية بالنيكوغرام
١ - ASBVd	١	فوتريونين	حمض نووي، ورقة افوكادو	٥
٢ - CCCVd	١	فوتريونين	حمض نووي، ورقة نخيل جوز الهند	لم تحدد
٣ - CSVd	١	فوتريونين	حمض نووي، ورقة أقحوان	لم تحدد
٤ - CSVd	٣	Bio-11-UTP	عصارة أقحوان	٥
٥ - HSVd	١	فوتريونين	حمض نووي، ورقة حشيشة الدينار	لم تحدد
٦ - PSTVd	١	فوتريونين	حمض نووي، ورقة طماطم أو بطاطس	لم تحدد
٧ - PSTVd	٢	Bio-11-UTP	حمض نووي، ورقة طماطم	٨٠
٨ - PSTVd	٣	Bio-11-UTP	عصارة طماطم	٥

المنقبات:

١ = DNA بلازميد نائي الخط معاد صياغته، Sp6 RNA polymerase = ٢.

٢ = نسخة من T<sub>3</sub> or T<sub>7</sub> RNA polymerase.

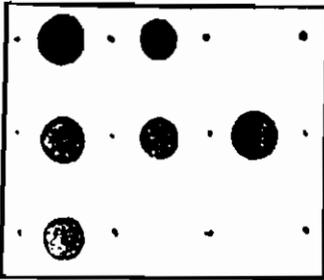
يظهر في شكل ١٩ دراسة نموذجية لطريقة DBH بدون إشعاع لاكتشاف RNA للفيروس HSVd. حضرت مستخلصات من نسيج ورقة مصابة (بقع ٢، ٤ إلى ٧) أعطت إشارات موجبة للتهجين، بينما المستخلصات المحضرة من مواد ورقة سليمة (بقع ٣، ٨، ٩) أظهرت عدم التهجين. كما هو متوقع فإن ٢٠٠ بيكوغرام RNA لفيروس HSVd نقي (بقعة ١) أعطت إشارة تهجين قوية.

هناك طريقة بديلة لاكتشاف الفيروس بواسطة وسائل غير مشعة، يكون باستعمال منقب RNA معامل بالبيوتين (Biotinylated RNA). هنا تتم معاملة RNA بالبيوتين في فاج نظامي Sp6 عن طريق نظام نسخ RNA polymerase باستعمال رايونيوكلوتوتايد معاملة بالبيوتين (Bio-11-UTP) الذي يكون فيه

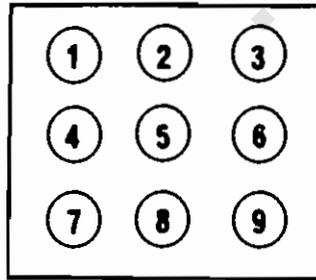
الرايوز متناظراً مع Bio - 11 - deoxyuridine triphosphate والذي يكتب باختصار (bio - 11 - dUTP). مثال على ذلك لتحضير Sp6 RNA احادى الخيط معاملة بالبيوتين لاستعماله كمنقب، فإن تتابع DNA مناسب يكون أولاً فى ناقل مناسب والذي يحوى المحفز Sp6 قبل بدء النسخ من المنطقة عديدة الوصلات (ناقلات pSP64 و pS p65). بعد جعل DNA clone بشكل مستقيم بعد بدء النسخ من الجزء الداخلى المكلون، فإن RNA المنسوخ ذو الطول المحدد ينتج بواسطة Sp6 RNA polymerase مستعملاً ATP، CTP، GTP و bio - 11 - UTP كمواد تفاعل.

بالإضافة إلى النظام المذكور سابقاً فإن فاج T<sub>3</sub> RNA polymerase و T<sub>7</sub> يمكن أن يستعمل بطريقة مشابهة. ولسوء الحظ فإن RNA Polymerase لثلاثة فاجات (SP6، T<sub>7</sub>، T<sub>3</sub>) تختلف فى مقدرتها على ادخال bio - 11 - UTP فى الحمض RNA. إن أنزيم الفاج T<sub>3</sub> يدخل bio - 11 - UTP بأعلى كفاءة وإنه يصنع تقريباً ثلاثة أمثال الحمض RNA المصنع بواسطة أنزيم الفاج SP6 وضعف ما يصنعه أنزيم الفاج T<sub>7</sub>. وعلى أية حال فإن منقبات RNA المعامل بالبيوتين وجد أن استعمالها محدد فى تشخيص الفيرويد. كما هو فى جدول ١٤ استعمال فى اكتشاف CSVd و PSTVd فى مستخلصات النبات.

A



B



شكل رقم ١٩ :

اكتشاف فيرويد تقزم حشيشة الدينار فى أوراق حشيشة الدينار الاسترالى بواسطة التحليل بطريقة Dot - blot hybridization. عينة رقم ١ تعنى ٢٠٠ ميكوغرام منقى من RNA للفيرويد HSVd، عينة ٢ تعنى نسيج مصاب من فيرويد HSVd. عينة ٣ نسيج سليم من حشيشة الدينار. العينات من ٤ - ٩ عينات مأخوذة من نباتات نامية فى الصويا الزجاجية. B مواقع العينات على غشاء نتروسيليلوز.

## ٢ - منقبات معملة بالداى جوز جنين Digoxigenin labeled Probes :

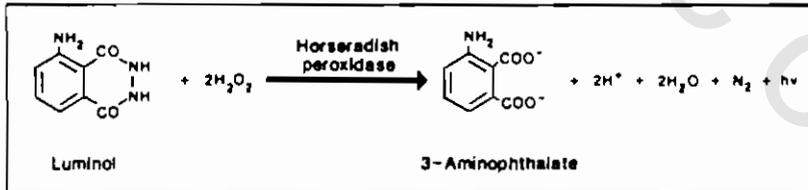
إن مادة الداى جوز جنين عبارة عن ستيرويد نباتى والذى يتكون على وجه الحصر فى نبات *Digitalis*، يمكن أن يستعمل كإشارى بديل Alternative ligand للبيوتين وذلك لتحضير منقبات من RNA ومن DNA معاد صياغته. مع أن هذه الطريقة قد وجدت تطبيقاً مباشراً فى تشخيص الفيروسيدات، إلا أنه لا يوجد أى سبب يوضح لماذا لم تقابل نجاحاً كبيراً. التعليم الأنزيمى للداى جوز جنين فى منقب DNA يكون متمماً بواسطة Random - primed أو Nick translated تندمج مع Digoxigenin - 11 - deoxyuridin triphosphate والذى تكتب باختصار (dig - dUTP) مستعملاً أنزيم Klenow أو بواسطة النهاية 3` لمنقبات DNA المعلم والذى هو أقل من ٢٠٠ قاعدة زوجية مع وجود أنزيم transferase الطرفى Terminal transferase. كما وأن المنقبات من RNA المعلمة بمادة داى جوز جنين يمكن أن تصنع فى المعمل بنسخ ال DNA أو الكلونة قبل بدء النسخ فى كل من SP6، T7 أو مناطق المحفز أو تتابع الابداء Promoter فى T3 مع استعمال ال polymerase الخاص واستعمال dig - UTP كمادة تفاعل. كما وأن تعليم منقبات إما DNA أو RNA يمكن أن تتحقق بواسطة الأشعة فوق البنفسجية المحفزة catalyzed تندمج مع Photodigoxigenin أو كاشف يحتوى داى جوز جنين مرتبطاً مع ذراع مبادئ مع مجموعة azido - Phenyl (Photoactivated). إن الإشعاع بالأشعة فوق البنفسجية ( $260 \text{ nm} < \lambda < 300 \text{ nm}$ ) تؤدي إلى تفاعل غير معكوس ذو ازدواج ثابت واندماج حوالى واحد من الداى جوز جنين لكل ٢٠٠ - ٣٠٠ من المتبقى.

بعد التهجين مع الحمض النووى الهدف، فإن الهجن تعرف بواسطة ELISA باستعمال تزاوج الأجسام المضادة (هذا يعنى تزاوج Anti - digoxigenin alkaline Phosphate) وتفاعل لوني للمحفز الأنزيمى. إن اكتشاف المنقبات المعاملة بالداى جوز جنين بواسطة الكيماويات المتألقة Chemiluminescence يكون أيضاً إختيار



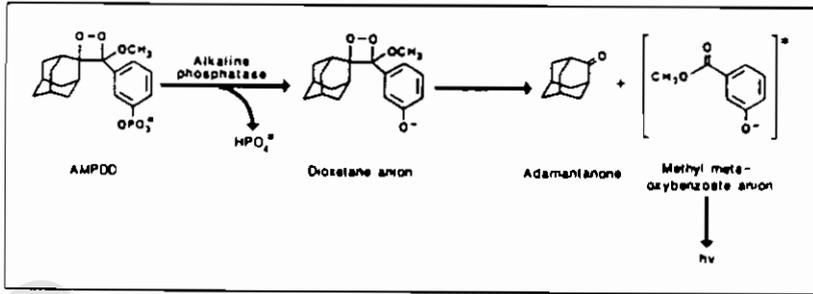
إن كلاً من منقبات الحمض النووي المعلم بالبيوتين المتحد مع-Avidin streptav- idin - alkaline phosphatase والمنقبات قصيرة النيوكليوتيدات المعلمة مباشرة بمادة alkaline phosphatase يمكن أن تكتشف بسهولة على أغشية خلال تفاعلات تهجين عادية وباستعمال فلم أشعة X. إن الميكانيكية التي تؤدي إلى AMPPD الكيماوية المتألقة في وجود alkaline phosphatase يشمل خطوتين وظاهرة في شكل ٢١. في الخطوة الأولى يحدث فصل للفسفات بواسطة أنزيم alkaline phosphatase ويتولد مادة ثابتة نسبياً اسمها Dioxetane anion. أما الخطوة الثانية فتشمل تحطيم كبير لمادة Dioxetane anion لتكون مادة Adamantanone وتنتقل الشحنة ويتكون حالة مثارة (متهيجة) من مادة Methyl meta - oxybenzoate anion والتي ينبعث منها إضاءة. عند مقارنة حساسية كل من AMPPD ومادة الكروموجنك BCIP / NBT والتي تتكون من -5 - bromo - 4 - chloro - 3 - indo والتي تتكون من -5 - bromo - 4 - chloro - 3 - indo - yl - phosphate / nitro blue tetrazolium salt monohydrate.

في التعرف على alkaline phosphatase. قد أجريت في إختبار تهجين منقب DNA مع أنتجين DNA المركزي لفيروس التهاب الكبد B. إن حساسية الإختبار قد تحسنت بأكثر من رتبتين تكبير باستعمال موضوع الكيماويات المشعة وباستعمال مادة AMPPD أيضاً تقلل وقت الاكتشاف من ٢٤٠ دقيقة تقريباً إلى ٣٠ دقيقة.



شكل رقم ٢٠:

صيغة تفاعل الكيماويات المتألقة الداخل فيه ليمونول.



شكل رقم ٢١ :  
تفاعل الكيماويات المتألقة الداخل فيه AMPPD .

## الإنجازات المستقبلية لتكنولوجيا المنقب

### Future Directions of Probe Technology

#### مقدمة:

بينما يعتبر إختبار Dot - blot hybridization ويرمز له DBH لاكتشاف الفيرويد من الاختبارات الشائعة الاستعمال كما هو واضح من جدول ١٤، ١٣، إلا أن هناك عدة إنتقادات له. لكي نستبعد المشاكل الأساسية فيما يتعلق بالمنقيات غير المشعة، فمن الإجراءات العادية هو تحضير مستخلص نباتى منقى جزئياً لعملية ال DBH، العملية التى تشمل عادة خطوة إزالة البروتين بالفينول و / أو الكلوروفورم على أية حال بينما النسغ (عصارة النبات) المعصور وغير المنقى يمكن أن يستعمل أحياناً (جدول ١٤)، هنا يمكن أن يحدث تخفيض فى حساسية الاختبار، وكفاءة تهجين المكونات الأخرى فى العينات السليمة تزداد. إن الحساسية المنخفضة ليست ذات إعتبرات هامة عندما يكون تركيز الفيرويد فى العصارة مرتفعاً نسبياً، ولكن يكون ذو إعتبرات هامة عندما يكون التركيز منخفضاً ومن المهم كشف جميع النباتات المصابة. ومثال على الحالة الأخيرة هو اكتشاف فيرويد ASBV فى أشجار الأفوكادو مصممة على أساس استعمالها كأصل ليستعمل للبذور أو التطعيم الخشبي. هنا فإن خطوة إزالة البروتين وتركيز الحمض النووى قبل إختبار DBH يكون مطلوباً بشكل واضح.

هناك بالتأكيد حاجة إلى إجراءات إستخلاص بسيطة ويفضل تقليل الخطوات كلما أمكن ذلك واستبعاد استعمال الفينول لإزالة البروتين. وبالنسبة لأعداد كبيرة من العينات، فإن مستخلص النسيج يجب أن يكون غير معقد نظراً لأن الإجراءات المعملية العادية مثل التجانس في الخلاط أو السحق في هاون ومدقة تكون غير عملية. إلا أنه بوجود مستخلص للعصارة من ماركة Eric pollahne, Germany يكون ذو كفاءة عالية، ويمكن أن يستعمل للأنسجة الطرية مثل الطماطم، البطاطس وأوراق حشيشة الدينار وبالإضافة لذلك أوراق الأشجار الخشبية مثل الأفوكادو ونخيل الزيت. إن إختبارات ال DBH مملدة أيضاً في متطلباتها لنقل حجم صغير من كل عينة على غشاء فلتر والتسخين لتجميد الأحماض النووية قبل التهجين ثم عندئذ تهجن قبل الغسيل وقبل التصوير بالإشعاع الذاتى، يتكشف التلون الأنزيمى أو الكيماويات المتألثة.

سيكون من المفضل تطوير تكنولوجيا منقب لتشخيص الفيروس بحيث لا تكون الإشارة مثلاً منتج غير ذائب ملون على غشاء فلتر، ولكن يكون منتج ذائب ملون أو بعض المنتجات الذائبة الأخرى كلاهما يمكن أن يقاس بطرق مناسبة مثل ELISA والنتائج النهائية تطبع في مكان معين. هذا الموضوع يكون أساسى لجعل نظام الكشف أوتوماتيكياً. وفيما يلي بعض الأبحاث المستقبلية لتشخيص الفيروس.

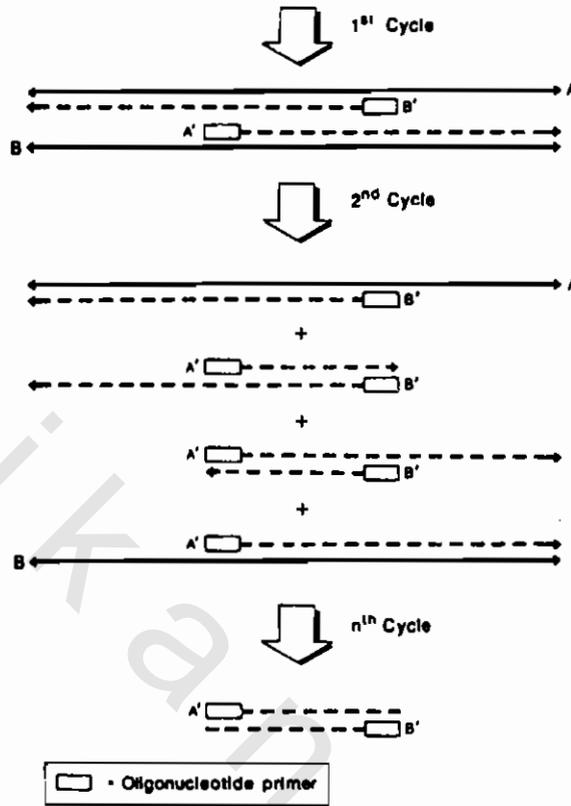
#### ١ - التزايد العددي الأنزيمى للحمض النووى الهدف:

#### Enzyme Amplification of Target Nucleic Acid

إن من المثير نوعاً ما للدهشة أنه مع جميع طرق الكشف المشعة وغير المشعة المتوفرة لتشخيص الفيروس جدول ١٤، ١٣، فإن المستوى المنخفض في الكشف

عن الأحماض النووية الهدف، يكون دائماً في مستوى بيكوغرام منخفض. مع أن هذه الحساسية تكون دائماً ملائمة لمعظم الفيرويدات التي تكون موجودة بتركيزات مرتفعة نسبياً في مستخلصات النبات. أيضاً فإن حساسية أكبر تكون مطلوبة بالنسبة للفيرويدات الموجودة على تركيزات منخفضة أو حيث يوجد قيوداً على كمية عينة النسيج المتوفر. من ناحية نظرية فإن حساسية الكشف يمكن أن تتحسن عن طريق زيادة عدد جزيئات الحمض النووي الهدف في العينة الأصلية. مثل هذا البحث قد تطور وفقاً للزيادة العددية الأنزيمية التي تحدث في تتابعات الحمض النووي الخاصة بالهدف في المعمل بنمط أسي ودقة عالية. إن هذا التكنيك يشار إليه باسم طريقة سلسلة تفاعل البوليميريز - Polymerase Chain reac- (PCR) tion وهو موصوف في شكل ٢٢. إن طريقة PCR مبنية على دورات متكررة من :-

- ١ - الدترة بالحرارة لقلب ثنائي الخيط.
  - ٢ - بادئ معاد إتحاده Annealing من مجموعة نيوكليوتيدات قصيرة.
  - ٣ - إطالة البوادي المعاد إتحادها بأنزيم DNA Polymerase.
- يحدد الهدف المخصص عن طريق إختيار بادئين قصيرين (مثلاً ٢٠ - ٢٥ نيوكليوتيدة) والتي تصمم لتجهن مع خيوط DNA المتقابلة مضافة إلى جانبي التابع لتزداد في العدد مع كون نهاياتها 3' تتجه إلى الداخل. تؤدي الدورات المتلاحقة من الزيادة العددية إلى استمرار التضاعف والزيادة الأسية في عدد نسخ التابع. نظراً لذلك يصبح هناك نسخاً مصنعة جديدة متوفرة لترتبط مع البادئ شكل ٢٢. وبالتالي فإن عشرين دورة من PCR تنتج نظرياً ما يزيد عن مليون ضعف من الأعداد المتزايدة.



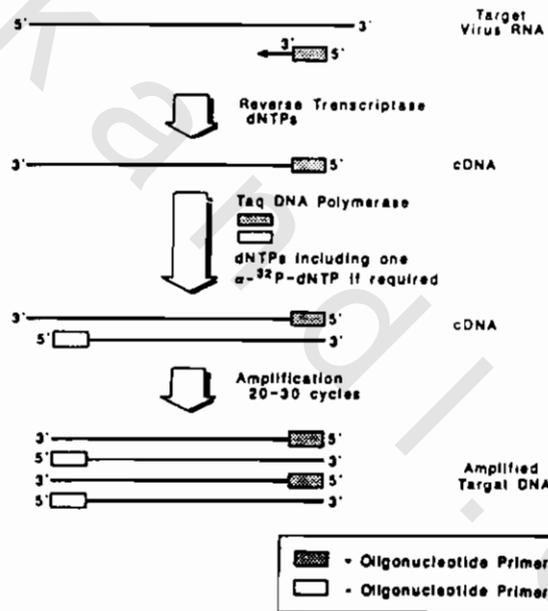
شكل رقم ٢٢ :

تضاعف DNA الهدف بواسطة سلسلة تفاعل البوليميريز (PCR). قالب DNA الأصلي A. الخيط الأول و B للخيط الآخر. بادئ النيوكليوتيدات القصيرة. الخيوط المقطعة تمثل DNA المبني في المعمل.

وبشكل أولى فإن Klenow fragment من DNA Polymerase للبكتريا *E. coli* كان قد إستعمل في PCR لإطالة البودائ المعاد إتحادها Annealed. وعلى أية حال فإن هذا الأنزيم كان قد تثبط بواسطة الحرارة العالية المطلوبة لفصل خيطي ال DNA في بداية كل دورة من PCR. وبناء على ذلك يجب إضافة أنزيم جديد خلال كل دورة. إن إدخال أنزيم Taq DNA Polymerase الثابت حرارياً المعزول من البكتريا *Thermus aquaticus* حول عملية ال PCR إلى تفاعل بسيط وقوى، هذا

بدوره سمح بجعل هذا الإجراء أوتوماتيكياً مع فوائده المهمة من سرعة، تخصصية، حساسية وملائمة.

قام العالم Rathjen سنة ١٩٨٩ بإجراء بحث يهدف إلى الزيادة العددية في طريقة PCR كطريقة روتينية ممكنة للتعرف على المستويات المنخفضة من فيروس ASBVd في نسيج الأفوكادو المصاب. نظراً لأن PCR تتطلب قالب من DNA فيجب أن يصنع نسخة معكوسة من RNA الفيرويدي قبل الزيادة العددية. وبالتالي فإن هذا الإجراء يتطلب خطوتين عمليتين كما هو مذكور في شكل ٢٣.



شكل رقم ٢٣ :

مرحلتين من إجراءات اكتشاف مستويات منخفضة من RNA الفيروسي الهدف في مستخلص نباتي باستعمال طريقة PCR. الخيط الأول هو cDNA ويصنع بواسطة النسخ العكسي لقالب RNA. كما وأن التضاعف باستعمال PCR لـ cDNA يحصل عليه باستعمال Taq DNA بوليميريز.

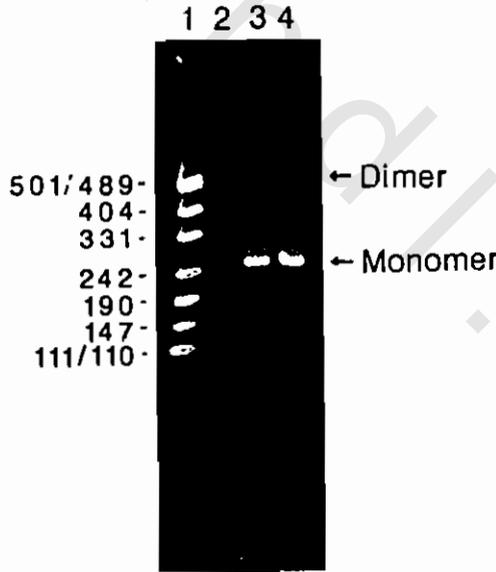
خييط أولى مكمل من DNA وهو (cDNA) يجب أن يصنع بشكل أساسي بواسطة النسخ العكسي للقالب RNA فى وجود البادئ الأول و dNTPs. عندئذ يمكن أن يستعمل الـ DNA كقالب للزيادة العددية فى PCR عن طريق إضافة البادئ الثانى وأنزيم Taq DNA polymerase. عادة ما يلزم إضافة أكثر من البادئ الأول و dNTPs. ولسوء الحظ فإن بناء الخييط الأول من cDNA الفيروى بواسطة أنزيم النسخ العكسى فى كثير من الأحيان يكون أقل كفاءة من نفس التفاعل المستعمل فيه mRNA كقالب بسبب المميزات العالية للتركيب الثانوى للفيروسات، عندما يحدث لها إعاقة بواسطة التركيبات الثانوية للحمض RNA، فإن أنزيم النسخ العكسى يميل إما إلى البناء (النسخ) الطرفى أو يتقلب عكسياً ويبنى شريط ثانوى من cDNA ثم نسخه من الخييط الأول لـ cDNA الوليد. وبالتالي فإن العالم Rathjen وضع الظروف المثلى لدنترة الفيروى قبل خطوة النسخ العكسى.

إن شكل ٢٤ هو النتيجة للزيادة العددية فى طريقة PCR المثلى (٣٠ دورة) باستعمال مستخلص حمض نووى منقى جزئياً من أوراق أفوكادو سليمة ومصابة. إن الزيادة العددية الناتجة (مر ٣ و ٤) من المستخلصات المصابة توطدت وثبتت على ٣٪ TAE أجاروس جيل Agarose gel ويعمل على إظهارها بواسطة Ethidium bromide fluorescence. يكون الإنتاج الأساسى فى الإكثار ظاهر وبوضوح وبطول ٢٥٠ نيوكليتيده تقريباً (باستثناء مونومرك ASBVd فىكون ٢٤٧ نيوكليتيده) إن الحزمة ذات الوزن الجزيئى الأعلى ذات طول ٥٠٠ نيوكليتيده تقريباً ظهرت على الجيل (مر ٣ و ٤)، من المحتمل أنها تتوافق مع تكاثرات ASBVd dimer والذى من المعروف أنه موجود بتركيزات منخفضة فى أوراق الأفوكادو. لم يكن هناك إنتاج واضح عند استعمال مستخلص أوراق سليمة كقالب (مر ٢). هناك زيادة فى الحساسية على الأقل ١٠٠٠ ضعف لعملية الـ PCR، هذه عند مقارنتها مع طريقة DBH القياسية بمنقبات حمض نووى معلم بالفسفور ٣٢.

جدول ١٥ : طرق اكتشاف منتجات PCR.

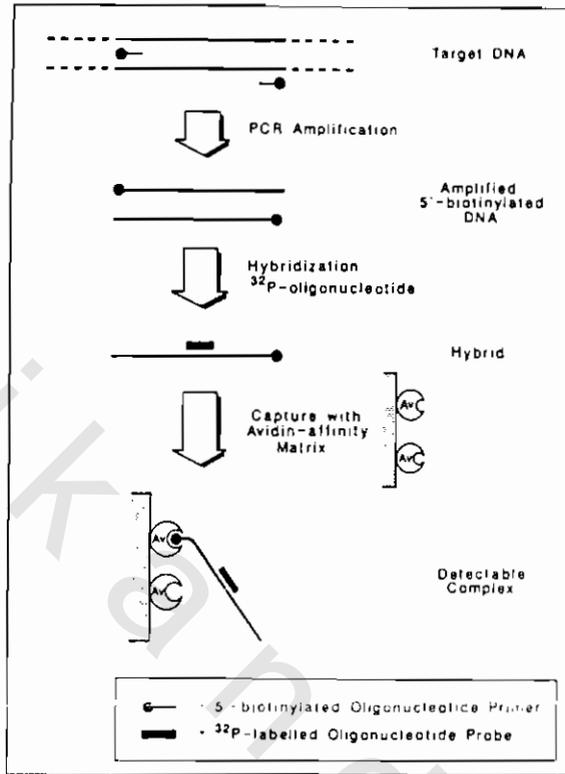
METHOD	PCR round 1 Primers: P1, P2	PCR round 2 Primers: P3, P4	Labelling of PCR product	Detection
1 - Agarose gel electrophoresis	Nonlabeled	---	Nonlabeled	Ethidium bromide fluorescence
2 - Polyacry lamide gel electrophoresis	Non labeled	---	P32	P32- autoradiography
3 - Affinity collection with avidin (or streptavidin)	Biotin - labeled	---	P32	Liquid scintillation counting
4 - Affinity collection with avidin (or streptavidin)	Biotin - labeled	---	Biotin	Hybridization with P32- labeled oligonucleotide; liquid scintillation counting
5 - Affinity collection with avidin (or streptavidin)	Biotin - labeled	---	Biotin	Hybridization with alkaline phosphatase - labeled oligonucleotide; enzymatic colorimetric assay
6 - Affinity collection with avidin	Non labeled	P3, biotin - labeled; P4, dinitrophenyl (DNP) - labeled	Biotin / DNA	Immunoenzymatic colorimetric assay
7 - Affinity collection with avidin	Non labeled	P3, biotin - labeled; P4, I125- labeled	Biotin I125	Gamma Counting
8 - Affinity collection with DNA - binding protein, GCN4	Non labeled	P3, biotin - labeled; P4 contains GCN4 binding site	Biotin / GCN4 binding site	Enzymatic colorimetric assay
9 - Affinity collection with DNA - binding protein TyrR	Non labeled	P3, biotin - labeled; P4 contains TyrR binding site	Biotin / TyrR binding site	Enzymatic colorimetric assay

هناك أنواعاً من الطرق متوفرة حالياً للتعرف على ناتج ال PCR. إن جدول رقم ١٥ يذكر بعضاً من أكثر الطرق إنتشاراً والمستعملة حالياً. إن فحص ناتج ال PCR بعد الهجرة الكهربائية في الجيل إما بـ Ethidium bromide fluorescence أو بالتصوير بالإشعاع الذاتى فسفور ٣٢ (جدول ١٥ طريقة ١، ٢). استعمال الوزن الجزيئى كتعريف منفرد. ومن سوء الحظ فإن إحدى المشاكل هنا هى الكلوونات الخاطئة التى يمكن أن تنشأ إذا ظهرت ناتجات إكثار غير حقيقية لأشياء لها نفس الحجم تقريباً كما هو متوقع لفيروس معين. يمكن التغلب على هذه المشكلة عن طريق الاكتشاف المتخصص لناتجات الإكثار بواسطة التهجين بمنقب مشع (داخلى) متبوعاً بطريقة مجموعة هجن القواعد المتجاذبة Affinity - based hybridization collection. هذا البحث (فى جدول ١٥ طريقة ٤) قد تطور أساسياً بواسطة Syva-nen et al سنة ١٩٨٨ لاكتشاف DNA فى فيروس تضخم الخلية فى الإنسان Cytomegalovirus متبوعاً بالإكثار فى PCR وطورت إلى أكثر حداثة بواسطة العالم Harju et al سنة ١٩٩٠. يبين شكل ٢٥ الخطوات العريضة لهذه الطريقة.



شكل رقم ٢٤ :

طريقة الإكثار باستعمال PCR للحمض RNA فى الفيروس ASBVd الموجود فى مستخلص ورقة أفوكادو يتبع خطوة نسخ عكسى أولية. شريحة ١ تعنى ٥٠٠ نانوغرام HpaII مهضومة فى pUC DNA 19 كدليل. شريحة ٢ = مستخلص ورقة أفوكادو سليمة. شريحة ٣ و ٤ = مستخلص أوراق مصابة إصابات مختلفة من فيروس ASBVd.



شكل رقم ٢٥ :

رسم تخطيطي يبين خطوات طريقة

Affinity - based hybrid Collection method لإكثار DNA الهدف بالبيوتين.

تستخدم هذه الطريقة منقبات معاملة بالبيوتين في 5' لإدخال بقايا البيوتين في أجزاء ال DNA الهدف خلال عملية الإكثار العدي في PCR. إن أجزاء ال DNA المعاملة بالبيوتين في 5' والمتكاثرة عندئذ يمكن اكتشافها بواسطة التهجين في المحلول مستعملاً منقياً من مجموعة نيوكليوتيدات قصيرة معلم بالفسفور المشع ٣٢. الهجن المعلمة بالفسفور المشع إما أن تجمع على Avidin - coated polystyrene microparticiles أو تجمع على Streptavidin - coated microtitre wells. إن حاصلين على فوائد تفاعل البيوتين مع الأفيدين وهو ما يسمى Streptavidin. إن

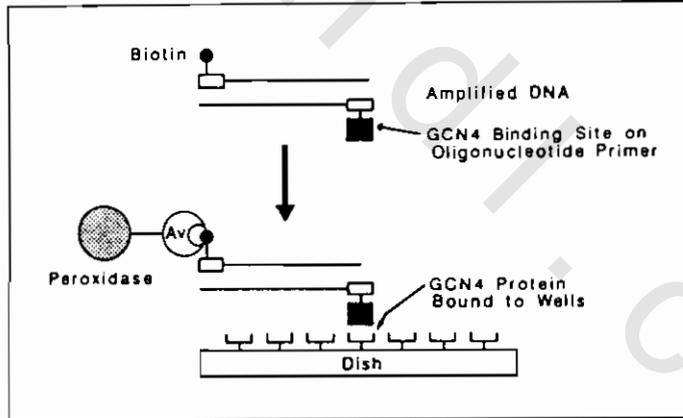
إشعاعية الهجن المرتبطة على دعامات صلبة يمكن عندئذ قياسها شكل ٢٥. إن طريقة مجموعة الهجن للقواعد المتجاذبة Affinity - based hybrid collection (ABHC) تكون فعالة وتكون مقياس لكمية ال DNA المنتج في عملية الإكثار في PCR.

هناك بديلاً للطريقة المذكورة سابقاً هو استعمال المنقب المتكون من Enzyme - linked oligonucleotide (الداخلي) لاكتشاف النواتج المتكاثرة لـ PCR المعاملة بالبيوتين على 5' متبوعاً بطريقة مجموعة هجن القواعد المتجاذبة ABHC. جدول ١٥ طريقة ٥. من هذه المنقبات Alkaline phosphatase labeled يمكن أن يحضر في المعمل حسب طريقة Li et al سنة ١٩٨٧. باستعمال مثل هذه الطريقة فقد أمكن اكتشاف الهدف في DNA المتكاثرات باختبار قياس الألوان Colorimetric لفيروس ASBV باستعمال Para - nitrophenyl phosphate كمادة تفاعل واستعمال Avidin - coated microtitre plate كمادة صلبة سائدة، إلا أن هناك بعض العيوب لمثل هذه الطريقة.

هناك أبحاثاً عديدة قد طورت هذه الطرق وأدخلت فيها بعض الاختلافات، فمثلاً Sauvaigo et al سنة ١٩٩٠ استعمل دورتين من الإكثار في PCR مستفيداً من الإجراء الثاني لـ PCR لإدخال بواقي معالجة بالبيوتين وتحمل علامات في مخلوط PCR (جدول ١٥ طريقة ٦ و٧). هذا أدى إلى إنتاج هجن من DNA تحمل جزء بيوتين على إحدى النهايات وداي تتروفينيل DNP معلم أو يود مشع ١٢٥ على النهاية الأخرى. بعدئذ فإن النواتج المتكاثرة تنتزع بواسطة جزئ البيوتين على Avidin - affinity matrix وبعد ذلك تكتشف باستعمال نظام Enzyme antibody أو عداد جاما.

أما العالم Kemp et al سنة ١٩٨٩ فقد أحدث تطوراً في إجراء الاكتشاف بقياس الألوان لنواتج ال PCR (جدول ١٥ طريقة ٨) مستعملاً DNA ثنائي

الخيط مرتبطاً مع بروتين اسمه GCN4 هذا البروتين عزل عن طريق استعمال ناقل تعبير خاص Constructed في بكتيريا *E. coli*، وهو بروتين إندماجي ويحتوى قطعاً من العامل الناسخ GCN4 من الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* مندمجاً مع Glutathione S - transferase من *Schistosoma japonicum*. وبشكل أساسي فإن هذه الطريقة تشمل ربط GCN4 إلى Wells of microtitre plates بعدئذ يضاف DNA المتكاثر بطريقة PCR والذي فيه أماكن ارتباط لـ GCN4 مرتبطة مع مجموعة نيوكليوتيدات قصيرة ومجموعة بيوتين مرتبطة مع مجموعة نيوكليوتيدات قصيرة أخرى. الجزء المعرض من البيوتين عندئذ يكتشف عن طريق إضافة Avidin Peroxidase conjugate متبوعاً بكشف البيروكسيديز بمادة تفاعل كروموجنك. هذه الطريقة مذكورة في شكل ٢٦. هناك أبحاثاً مشابهة (جدول ١٥ طريقة ٩) باستعمال أنواع مختلفة من البروتين المرتبط مع DNA مثل TyrR المأخوذ من *E. coli* قد تكلم عنه Triglia et al سنة ١٩٩٠.



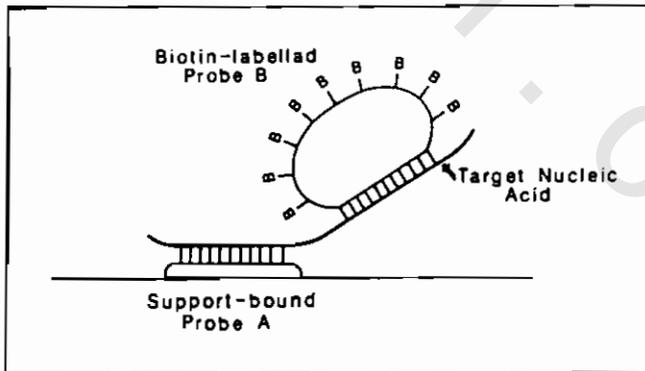
شكل رقم ٢٦:

الكشف بالدليل اللوني لمنتجات PCR باستعمال DNA ثنائي الشريط مرتبط مع البروتين، GCN4. إن DNA المكبر بواسطة PCR مبنى عن طريق ربط GCN4 بمواقع ملائمة بإحدى مجموعة النيوكليوتيدات القصيرة ومجموعة بيوتين مرتبطة مع مجموعة نيوكليوتيدات قصيرة أخرى.

## ٢ - اكتشاف الحمض النووي الهدف بطريقة ساندوتش هايبردايزيشن :

### Detection of Target Nucleic Acid by Sandwich Hybridization

بينما طرق مجموعة هجن القواعد المتجاذبة ABHC لاكتشاف نواتج PCR المتكاثرة حملت آمالاً لتطبيقها على الفيروسات، إلا أن الباحث يجب أن لا يتغاضى عن الإجراءات المبنية على طريقة Sandwich Hybridization (SH). إن العالم Ranke et al سنة ١٩٨٣ قد أدخل تطويراً أساسياً في مرحلتى هذه الطريقة وذلك للاكتشاف والتقدير الكمي للأحماض النووية في العينات المريضة الخام، باستعمال DNA لفيرس الغدة في الإنسان كنموذج. إن الأساس العام لهذه الطريقة المذكور في شكل ٢٧. باستعمال منقبات DNA أحادى الخيط فى الفاج M13 الناقل لـ DNA كمثال. من الضروري أن يكون هناك منقبتين كل منهما يتهجن مع مناطق مختلفة غير متشابهة من الحمض النووي الهدف. يرتبط أحد المنقبتين مع المادة الصلبة الداعمة أو الساندة وهذه تكون مثل نتروسيليلوز، Receptal surfaces، Microtitre plate wells، Sephacryl، أو مع أجزاء دقيقة مغناطيسية، بينما المنقب الآخر يعلم بالبيوتين مثل الفوتوبيوتين. إن الـ DNA المرتبط بالمادة الصلبة الداعمة (المنقب الجاذب) يهجن مع عينات إختبار الحمض النووي فى وجود المنقب الثانى المعلم بالبيوتين (المنقب الكاشف) والذى يمكن أن يرتبط فقط مع المادة الصلبة الساندة عن طريق كوبرى أو جسر من الحمض النووي الهدف شكل ٢٧. بعد

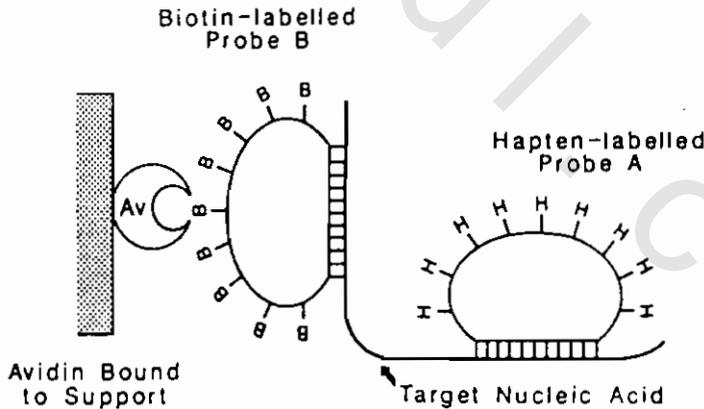


شكل رقم ٢٧ :

شكل تخطيطى يوضح المبادئ الأساسية فى مرحلتى التهجين بالسندوتش. يلاحظ المنقبتين كمثال، منقب ذو خيط وحيد من DNA فى الفاج الناقل M13. إحداهما مرتبط إلى المادة الصلبة الداعمة A والآخر معمل بالبيوتين B.

إجراءات الغسيل العادية، فإن منقب الكشف المتجمد يقاس بواسطة التفاعل مع أفيدين أو ستربتافدين وأنزيم الربط.

لغاية الآن فإن الباحثين مدركون بأن طورى طريقة SH لم يستعملوا لاكتشاف الفيروسات ولا الفيروسات النباتية، إلا أن Keller et al سنة ١٩٨٩، ١٩٩٠ ذكر إمكانية استعمال إختبار Microtiter Sandwich hybridization فى اكتشاف تتابعات التكاثرات العددية فى PCR لفيرس نقص المناعة فى الإنسان HIV وتتابعات فيرس التهاب الكبد B (HBV) من سيرم المريض. فى الحالة الأخيرة فإن المنقب الجاذب (المكلمون فى الفاج M13 DNA الناقل) ارتبط مع Microtitre Wells والمنقب الكاشف (المكلمون فى الفاج pB322 DNA الناقل) قد علم ببيوتين ضوئى Photobiotin. كل منقب قد تجانس مع نصف تتابعات HBV المتكاثر سامحاً بتكوين تركيبة السندوش التى تجمد منقب الكشف المعلم فى Microtitre well كان التهجين فقط لمدة ٤ ساعات وبعد الغسيل فإن منقب الكشف المتجمد يقاس باستعمال Streptavidin - Peroxidase و Tetramethyl benzidine.



شكل رقم ٢٨ :

رسم تخطيطى يبين المبادئ الأساسية للطور المفرد فى تهجين السندوش يظهر المنقبان هنا. الأول معلم بالبيوتين B والثانى معلم بالهيبتين H ويظهر باسم منقب A أما الأول فهو منقب B.

هناك طريقة بديلة للطورين فى الإجراء المتبع فى طريقة SH تكون لكل من الحمض النووى الهدف وللمنقبين المهجنين فى المحلول. مثل هذا النظام (طور وحيد فى طريقه SH) أحدث تحسناً كبيراً فى الصفات الحركية، مؤكداً تأثير تحديد معدل السرعة لنظام Solid support - based. إن الخطوة الحرجة فى هذه الطريقة هى الفصل الملائم والمريح وذو الكفاءة العالية للمنقب (الهجن المقصودة من المنقب غير المهجن قبل اكتشاف الإشارة). هذا يمكن الوصول إليه عن طريق ادمصاص معقد الهجن إلى مادة صلبة سائدة، يكون ذلك متبوعاً بالغسيل الكامل ١٠٠٪ فى المثال المذكور فى شكل ٢٨ فإن الأفدين المرتبط بالمادة الداعمة يستعمل لادمصاص منقب B المعلم بالبيوتين فى معقد الهجن. طريقة الاستخلاص هذه قد تكون بكفاءة حوالى ٣٠٪ فقط. الاكتشاف يكون خلال منقب A المعلم بالهبتين، ويمكن أن يستعمل Antibody - enzyme conjugate.

إن النظام المذكور سابقاً له إمكانية كبيرة فى التشخيص الروتينى للفيروسات وفيروسات النبات باستعمال منقبات غير مشعة. مع أن تفاعلات التهجين تكون دقيقة نسبياً فإن مستخلصات النبات وإجراءات الكشف يجب أن تكون سريعة وموثوقة أثناء إجراءها.

## مراجع خاصة بالفصل الثالث

- 1 - Allison, R., Thompson, C. and Ahlquist, P. 1990. Proc. Natl. Acad Sci. USA. 87, 1820.
- 2 - Clark, M. F. and Bar - Joseph, M. 1984. Methods in Virology. Academic Press New York.
- 3 - Cooper, J. I. and Edwards, M. L. 1986. Applied Biology, Wellesbourne U. K. 139.
- 4 - Diener, T. O. 1979. Viroids and viroid diseases, John Wiley & Sons, New York.
- 5 - Gould, A. R. and Symons, R. H. 1983. Annu Rev. Phytopathol. 21 : 179.
- 6 - Gross, H. J. et al. 1982. Eur. J. biochem. 121, 249.
- 7 - Harju, L. et al 1990. Mol. Cell. Probes 4, 223.
- 8 - Kemp, d. J. et al 1989. Proc Natl. Acad Sci USA 86, 2423.
- 9 - Keese, P. and Symons, R. H. 1985. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 82, 4582.
- 10 - Keese, P., Visvader, J. E. and Symon, R. H. 1988. Variability of RNA Genom CRC Press, Boca Baton - FL.
- 11 - Koltunow, A. M. and Rezaian, M. A. 1989. Intervirology 30 : 194.
- 12 - Keller, G. H. et al. 1989. Annal Biochemi 177 : 27.
- 13 - \_\_\_\_\_ , \_\_\_\_\_ 1990. J. Clin Microbiol. 28 : 1411.

- 14 - Li, R. et al. 1987. *Nucleic Acid Res.* 15 : 5275.
- 15 - Luria, s. E. et al. 1978. *General Virology*. 3rd edition. New York, Wiley. 578p.
- 16 - Lwoff, A. 1981. *Ann. Virol.* 132 E (2) : 121 - 134.
- 17 - Morris, T. J., Wright, N. S. 1975. *Amer. Potato J.* 52 : 57 - 63.
- 18 - Owens, R. A., Diener, T. O. 1981. *Science*. 213.
- 19 - Rathjen, J. P. 1989. B. Sc. (Honours) Thesis, University of Adelaide.
- 20 - Renz, M. and Kurz, C. 1984. *Nucleic Acid Res.* 12 : 3435.
- 21 - Rank, M. et al. 1983. *Gene.*, 21 : 77.
- 22 - Sauvaigo, S. et al. 1990. *Nucleic Acid Res.* 18, 3175.
- 23 - Shikata, E. 1990. *New Viroids From Japan. Semi. Virol.*, 1 : 107.
- 24 - Syvanen, A. C. et al. 1988. *Nucleic Acid Res.* 16 : 11327.
- 25 - Triglia, T. et al. 1990. *Nucleic Acid Res.* 18 : 1080.
- 26 - White, B. A., and Bancroft, F. C. 1982. *J. Biol. Chem.*, 279 : 8569.
- 27 - Wilbur, W. J. and Lipman, d. J. 1983. *Proc Natl, Acad. Sci. USA* 80 : 720.