الفصل الرابع

دراسات تطبيقية على الفيرويدات

أولاً: ـ بناء فيرويد معدى فى المعمل:

In Vitro Synthesis of an Infectious Viroid

مقدمة: ـ

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

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

obeikandl.com

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

دبابيس الشعر:

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

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

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

هناك كثير من التقارير فى المراجع تدل على أن المنطقة المحتوية دبوس الشعر I يمكن أن تكون موجودة فى بناء ال Oligomeric وسيطات للتناسخ. يتكون دبوس الشعر I فى منطقة من الجزئ التى تظهر تماثل تتابع قوى بين كل الفيرويدات من مجموعة PSTVd هذه القطعة تسمى (UCCR) Upper central conserved Region. فى حالة PSTVd لقد ذكر حديثاً أن RNase T_1 يكون قادراً ليحفز فى لمعمل كلاً من تفاعل القطع واللحم بدون الحاجة إلى أى بروتين

آخر Tsagris et al سنة ١٩٩١ . وكعمليات فرضية لتفاعل التجهيز، فإن دخول أنزيمات مشابهة يمكن تخيلها ضمن خلية النبات. زيادة على ذلك نظراً لأن PSTVd يمثل فى كثير من الاعتبارات على أنه صف Class كبير من الفيرويدات، فإن المقدرة على التجهيز بواسطة RNase T_1 يمكن أيضاً أن يلزم للفيرويدات الأخرى. لمثل هذه الدراسة فإن العالم السابق ذكره استعمل نسخة مستقيمة أطول من وحدة الطول (٨٥ نيوكليتيدة إلى ٣٥٩ لكل واحد إلى ١٠٦ بإضافة ١٢ نيوكليتيدة على النهاية `5 وبإضافة ١٣ نيوكليتيدة على النهاية `3)، وبالتالى فإن النسخة تحتوى على الجزء المركزى من UCCR بمقدار الضعف، على النهاية `5 ونهاية `3. إن أربعة من vector -`5 النيوكليتيدات المجاورة للتتابع النوعى لـ PSTVd تكون متماثلة لتتابع G80 PSTVd إلى U 83، وبالتالى فقط فإن ال C84 تكون غائبة من خمسة نيوكليتيدات أطول فـى PSTVd المتخصـص الممتد على النهاية `5 للنسخة. إن الموقع G80 قد تحدد كموقع للقطع وإعادة اللحام فى نسخة RNA ذو الخيط الموجب بواسطة RNase T_1. نظراً لأن هذه النسخة غنية بالكثير من مواقع G التى عليها apriori قطع ولحام يمكن أن يؤدى إلى دوائر مضبوطة من PSTVd، ولكن التفاعل الكامل كان ملاحظاً فقط على G80. من هذا يمكن الاستنتاج بأن التفاعل يكون موجهاً بواسطة تركيب ثانوى خاص للنسخ.

بناء فيرويد CEVd فى المعمل:

لقد استعملت كلونات cDNA الفيرويدية المعدية على نطاق واسع لدراسة التتابع المطلوب لتضاعف ومرضية الفيرويد بواسطة طريقة Site Directed mutagene-sis. كما وأن حيوية كلونات DNA ونسخها الخاصة تعتمد على وجود تتابع فى فيرويد أطول من وحدة الطول فى تركيبات ال DNA. بعض كلونات ال Monomeric أيضاً تكون معدية كنتيجة لتزامن وجود تتابعات الفيرويد فى

الجزيئات الناقلة والتى تؤدى إلى تكوين أطول من وحدة الطول لـ cDNAs. تحتوى تحضيرات الفيرويد من النباتات على نسبة من الجزيئات فى شكل مستقيم والذى يكون عالى الحيوية (معدى) ويبدو أنه يحتوى على نهايات 2`, 3`- cy- clic phosphate والتى ذكر بأنها ضرورية للحيوية (العدوى).

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

١ ـ إكثار وتنقية فيرويد CEVd :

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

٢ ـ بناء cDNA :

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

يلزم فى هذه العملية ستة بوادئ primers ويرمز لها P_1، P_2، P_3 وتركيبها كالآتى: ـ

[dGCCGCCTCTTTTTTCTTTTCCTGCCTGCAGGG] = P_1

[dTAATACGACTCACTATAGGGGGAAGAAGTCCTTC] = P_2

[dGGAGAGCAGTGAAGATACAAGAAAAGGGGTT] = P_3

[dTAATACGACTCACTATAGGGCGAGGGTGAAAGC] = P_4

وهناك P_5، P_6 سنذكرها فيما بعد.

يتكامل P_1 مع P_3 حيث أن مركز 38 مع 69 فى (P_1) و300 مع330 (P_3) شكل (٢٩) مـن CEVd - A. أما P_2 و P_4 تشتمـل T_7 RNA polymerase محفز residues 1 - 18 وتتابعات CEVd ذات المعنى Sense متوافقة مع residues 70 - 86 (P_2) و 331 - 346 P_4 من هذا الفيرويد (شكل ٢٩). إن G ذات الموقع ١٨ المكتوبة بخط أسود غامق فى الشكل هى فى هذه البوادئ مشتركة للقطعتين ومتوافقة مع الموقع ٧٠ فى P_2 أو ٣٣١ فى P_4 فى جزئ CEVd.

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

obeikandi.com

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

٣ ـ النسخ فى المعمل In Vitro transcription :

يحضر قالب DNA (١٠٠ نانوغرام) وينسخ بأنزيم T_7 RNA Polymerase بشكل أساسى كما هو مذكور فى طريقة Melton et al سنة ١٩٨٤ . بالإضافة إلى القالب فإن التفاعلات تشتمل ٠,٥ ملى مول لكل rNTP و٤٠ ملى مول Tris - HCl, pH 7.6 و ٦ ملى مول كلوريد مغنيسيوم و ٠,١ ميكوغرام لكل ميكولتر أسيتيلتيد BSA (Promega)، ٥ ملى مول DTT و ٠,٢ وحدة ميكوغرام لكل ميكولتر أنزيم T_7 RNA Polymerase فى حجم كلى من ١٠٠ ميكولتر. يتبع ذلك التحضين على درجة ٣٧م لمدة ٣٠ دقيقة. المخاليط المنسوخة تستعمل إما مباشرة للحقن أو تعامل بـ ٠,١ وحدة لكل ميكولتر RNase - Free DNase أو مائة ميكوغرام لكل ملتر DNase - Free RNase على درجة حرارة ٣٧م لمدة عشرة دقائق قبل الحقن. تختبر مهضومات النيوكلييز بواسطة عينات Electrophoresing لكل مخلوط تفاعل على Polyacrylamide gel مدنتر ٦٪ محتوياً ٨ مول يوريا يتبع ذلك الصبغ بالفضة. تكون النسخ المعدة للاستعمال فى نهاية تفاعلات التكيف (التعديل) قد استخلصت بالفينول وأجرى لها ترسيب بالايثانول قبل المعاملات الأخرى.

٤ ـ تحوير خمسة فتحة الطرفية وتحليق نسخ RNA :

Modification of 5`- termini and Circularization of RNA transcrips.

إن جزيئات RNA المنتجة بواسطة النسخ فى المعمل تحتوى نهايات 5`- triphos- phate و3`- OH . إن النهايات 5`- triphosphate يجرى لها تحوير لتصبح 5`- OH وذلك عن طريق تحضين حوالى ١٠٠ نانوغرام من RNA مع وحدة واحدة من

أنزيم RNase Calf intentinal phosphatase يتبع ذلك الاستخلاص بالفينول ثم الترسيب بالايثانول. لقد أنتجت نهايات 5`- Monophosphate باستعمال نسخ مستقيمة مزالة عنها الفسفرة و ATP غير مشبعة وأنزيم Polynucleotide Kinase. يستعمل تفاعل متوازى مع ATP - [γP^{32}] لدمج Monitor phosphate. أما بالنسبة للتحليق فإن RNA المعامل بالكينيز يسخن على درجة ٦٥°م لمدة ١٠ دقائق لتثبيط الكاينيز ثم بعد ذلك يحضن مع T_4 RNA ligase.

٥ ـ تحديد التتابع فى نقط إتصال الربط فى الطبيعة:

Determination of The Sequence of The In Vivo Ligation Junction.

تعزل الفيرويدات الذرية (Progeny) من نسيج مصاب بنسخة مستقيمة من CEVd أنتجت باستعمال البوادئ P_1 و P_2 (CEVd - T_1) كما ذكر سابقاً وأجرى لها إكثار بواسطة النسخ العكسى / PCR باستعمال P_5 و P_6 وتركيبهما كالآتى.

[dCGAAAGGAAGGAGACGAGCTCCTG] = P_5

[dCTGCTGGCTCCACATCCGA] = P_6 تكون مرتبطة مع نيوكليتيدات ١٧٥ إلى ١٩٨، ونيوكليتيدات ١٩٩ إلى ٢١٧ من CEVd بالترتيب شكل ٢٩. إن ال DNA الذى حصل له إكثار أجرى له عملية تنقية بالهجرة الكهربائية فى أجروس ذو نقطة ذوبان منخفضة وحصل له تسلسل مباشرة بواسطة T_7 DNA polymerase (Bachmann et al سنة ١٩٩٠).

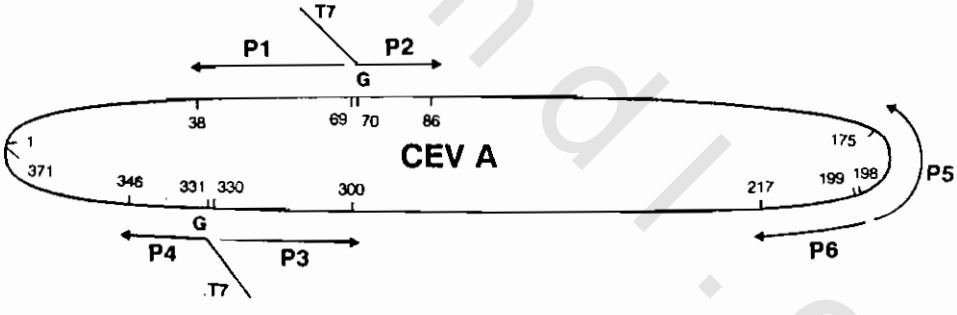
النتائج Results:

١ ـ توضيح لبناء الفيرويدات فى المعمل:

Scheme For The In Vitro Synthesis of Viroids

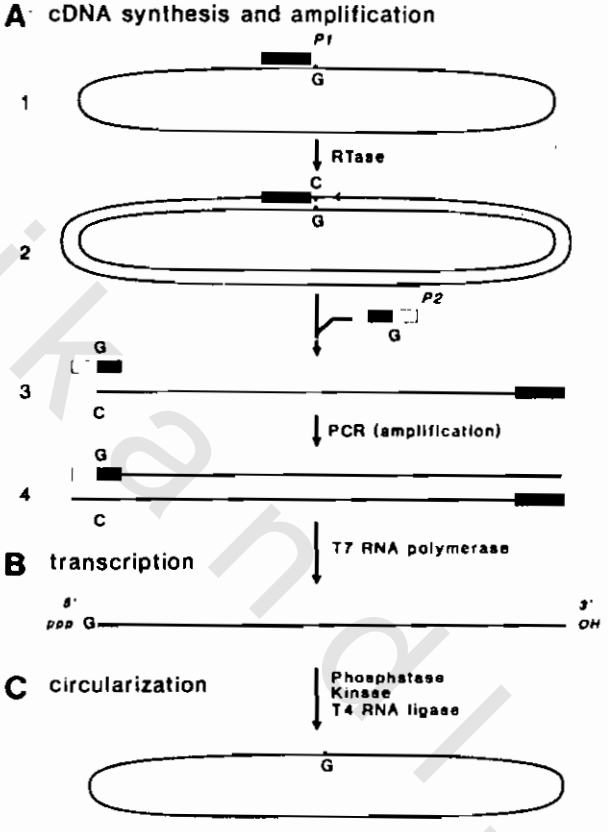
الخيط الأول البادئ Oligo deoxy ribonucleotide (شكل ٣٠ P_1) يختار من أى منطقة من الفيرويد 5` إلى آخر قاعدة G ويعاد إتحاده إلى RNA الفيرويدى. يؤدى النسخ العكسى إلى طول كامل من cDNA يحتوى نهايات 3` فى C. الخيط

البادئ الثانى (شكل ٣٠، P_2) يحتوى علـى ال ١٨ نيوكليتيدة من T_7 يحفز البنـاء فى مواقع بدء العمل وترتبط مـع تتابع حوالـى ١٥ نيوكليتيدة مكملة لنهاية 3` من ال c DNA . النهاية G فى موقع ١٨ فى $P_2$ تشبك أو تربط القطعتين وتكون مكملة إلى C -3` من الخيط الأول من DNA . بناء الخيط الثانى وإكثار ال DNA يتحصل عليه بواسطة طريقة PCR . إن ds DNA المتحصل عليه يحتوى على محفز كامل من T_7 RNA polymerase وتشفر لتتابع الفيرويد بالطول المضبوط. يتم نسخ ال DNA بواسطة T_7 RNA polymerase وينتج فيرويد مستقيم كامل الطول. إن RNA المستقيم يمكن أن يتحلق بواسطة أنزيم الربط RNA ligase بعد أن يحدث تحورات فى 5`- triphosphate إلى Monophosphate .



شكل رقم ٢٩ :

مواقع برايمرز متخصصة تستعمل فى تفاعل cDNA / PCR وتتابع ذرية CEVd . برايمر P_1 ، P_3 وP_5 متكاملة ذات معنى أما برايمـر P_2 ، P_4 وP_6 كانت ذات معنى مع الفيرويد. برايمر P_2 و P_4 تحتوى بروموتر بولى ميريز T_7 RNA . أما برايمر P_5 و P_6 كانت تستعمل للإكثار وتتابع ذرية RNA الفيرويدى. رؤوس الأسهم تشير إلى إتجاه البناء.



شكل رقم ٣٠ :

شكل تخطيطى لبناء الفيرويدات فى المعمل. (A) بناء cDNA يجرى عن طريق إعادة الاتحاد مع برايمر P_1 بقالب الفيرويد الدائرى (خطوة ١) يتبع ذلك نسخ عكسى مؤدياً إلى جزئ منتهياً بنهاية C (خطوة ٢). أما البرايمر P_2، خطوة (٣) يحتوى مشجع T_7 ويستعمل للإكثار فى تفاعل PCR (خطوة٤). النسخ B والتحليق C مشروحة فى الكتاب.

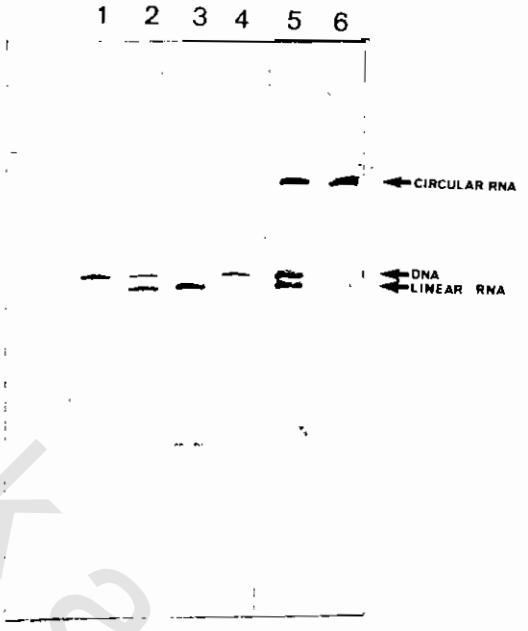
٢ ـ بناء الأشكال المستقيمة والدائرية من فيرويد اكسوكورتز الحمضيات:

Synthesis of Linear and Circular Forms of CEVd

لقد تم بناء فيرويد اكسوكورتز الحمضيات فى المعمل وظهرت بوضوح نشاطاته الحيوية فى تجارب على النبات العائل. إن الفيرويد CEVd -A هو خيط مزدوج من cDNA مندمج مع المحفز T_7 قد أنتج (شكل ٣١ شريحة ١) بواسطة عملية النسخ العكسى / PCR وإجراءات استعمل فيها البوادئ P_1 وP_2 شكل ٢٩. إنdsDNA قد عومل بأنزيم Ribonuclease لاستبعاد أى بقايا. يستعمل CEVd بشكل أساسى كقالب وبعد التنقية ينسخ بواسطة T_7 RNA Polymerase لانتاج منتج من RNA وحيد الخيط مساوياً لجزئ مستقيم من CEVd - A بنهايات تصل حتى رقم ٦٩ و ٧٠ (شكل ٣١ شريحة ٢، CEVd - T_1). إن هوية نسخة من- CEVd T_1 قد تأكدت بواسطة الهضم بأنزيمات DNase و RNase (شكل ٣١ شريحة ٣ و٤). يتبع ذلك الهجرة الكهربائية تحت ظروف الدنترة، إن نسخة من CEVd - T_1 لها نفس القابلية للتحرك والانتقال كما فى CEVd - A المستقيم ذو العدد ٣٧١ نيوكليتيدة (شكل ٣١ شريحة ٣، ٦) موجود فى تحضير منقى من الفيرويد من نباتات مصابة.

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

إن البوادئ P_3 وP_4 شكل ٢٩ كانت قد استعملت فى تفاعل موازى لانتاج أنواع أخرى من CEVd المستقيم بنهايات على ٣٣٠ و ٣٣١. هذه النسخة الثانية كانت قد استعملت لإختبار إمكانية الانتاج لهذا التكنيك ولفحص النسخ المبتدأة من مواضع مختلفة على جزئ CEVd الدائرى فيما إذا كانت معدية (حيوية).



شكل رقم ٣١ :

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

٣ ـ حيوية فيرويد اكسوكورتز الحمضيات المصنع فى المعمل:

Infectivity of In Vitro Synthesized CENd

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

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

أعيد اكتشاف ذرية الفيرويد من نباتات الطماطم المحقونة بنسخة CEVd - T_1 وأثبت أنها دائرية بواسطة الهجرة الكهربائية فى الجيل ثنائى الاتجاه. إن تحليل التتابع لذرية الفيرويد أثبت أنها كانت مماثلة للفيرويد الأصلى فى منطقة إتصال الربط فى تجارب المعمل.

جدول رقم ١٦: حيوية فيرويد اكسوكورتز الحمضيات المبنى فى المعمل:

اللقاح	الحمض النووى الأولى والتركيز		الحيوية					
	DNA	RNA	0_{10}	$1\text{-}10$	$2\text{-}10$	$3\text{-}10$	$4\text{-}10$	$5\text{-}10$
CEVd - T_1 PCR DNA	1000	—	0/6					
CEVd - T_2 PCR DNA	1000	—	0/6					
Untreated - CEVd - T_1	1	30	6/6					
DNase + Transcription	0	30	6/6					
RNase + Mixture	1	0	0/6					
Untreated - CEVD - T_2	1	30	6/6					
DNase + Transcription	0	30	6/6					
RNase + Mixture	1	0	0/6					
5`- Endmodified Triphosphate	0	30	6/6	3/6	0/6	0/6	0/6	0/6
CEVd - T_1 RNA Monophosphate	0	30	6/6	4/6	1/6	0/6	0/6	0/6
Transcript Hydroxyl	0	30	5/6	4/6	0/6	0/6	0/6	0/6
CEVd - A	—	30	N.T	6/6	6/6	5/6	2/6	0/6
T_E buffer	—	—	0/6					

ملاحظات:.

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

٤ ـ تأثير تحوير النهاية الطرفية خمسة فتحة على حيوية النسخة المستقيمة :

Effect of 5` - terminal modification on Linear Transcript Infectivity

أن تأثير التحور فى النهاية الطرفية `5 على حيوية نسخة CEVd - $T_1$ إختبرت بواسطة إنتاج نسخ تحتوى نهايات OH -`3 مرتبطة مع 5`- triphosphate أو monophosphate أو مجموعة OH - وأنجزت إختبارات الحيوية بواسطة سلسلة تخفيفات.

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

وجد أن CEVd - A الدائرى النوع الأصلى له نقطة تخفيف قصوى للاحتفاظ بحيويتـه وكفاءتـه هى ١٠$^{-٥}$. وعلى أية حال فإن النسـخ المستقيمة كانـت فعلاً أقـل حيويـة حيث تبدى نقطة تخفيـف ١٠$^{-٣}$ لـ RNA المستقيم المحتـوى 5`- monophosphate و١٠$^{-٢}$ لـ RNAs المستقيمة التى تحتوى 5`- triphosphate أو OH -`5 (جدول ١٦).

مناقشة النتائج

فى البحوث المذكورة سابقاً ذكر أنه تم بناء نسخاً معدية مستقيمة مختلفة لها الطول الكامل ومتوافقة مع CEVd (الحمض RNA)، كل من هذه النسخ تسبب أعراض مرضية فى نباتات الطماطم نموذجية للعزلة الشديدة من CEVd وتؤدى إلى إنتاج ذرية CEVd دائرية تشبه الطراز الأصلى. إن الدراسات السابقة للأشكال المستقيمة من الفيرويدات قد استعملت الفيرويدات المستقيمة التى نتجت إما بالحدوث الطبيعى لجزئ مستقيم عزل من نسيج مصاب أو RNA فيرويدى دائرى حدث له استقامة بواسطة فعل أنزيمات Nucleases أو أيونات Mg^{2+}. إن التحضير لهذا النوع يمكن أن يحصل له تلوث بواسطة RNA الدائرى ويصبح محتوياً على

obeikandl.com

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

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

إن الأشكال المستقيمة الحادثة طبيعياً للفيرويدات تتجمع فى النسيج المصاب، من المحتمل أن تكون كوسيطات تظهر فى نموذج التكاثر (النسخ) بطريقة الدائرة الملتفة. بغض النظر عن الأبحاث السابقة، فإن جميع الدراسات قد أظهرت أن هذه الجزيئات المستقيمة الحادثة طبيعياً أنها معدية. إن الأشكال المستقيمة التى تحدث طبيعياً لفيرويد تقزم الأقحوان وفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس هى معدية مثلها مثل الأشكال الدائرية الخاصة. بينما الشكل المستقيم لفيرويد تقزم الأقحوان قد ذكر بأنه ناتجاً عن الانشطار العشوائى، وأن فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس يبدو بأنه ناتج بواسطة الانشطار الذى يحدث فى بضع مواقع خاصة. إن هذه الجزيئات المستقيمة لفيرويد PSTVd قد وصفت وذكر لها مميزات أكثر وتبين بأنها تحتوى نهايات طرفية 5`- OH و 2`, 3`- cyclic phosphate. إن التجمعات غير المتجانسة من جزيئات فيرويد PSTVd التى أحدثت فيها ثغرة صناعية (nicked) المنتجة باستعمال Nucleases و Cl و $U_2$ والتى أيضاً تحتوى نهايات طرفية 5`- OH و 2`, 3`- cyclic phosphate ، قد تبين أيضاً أنها تظهر حيوية كاملة، بينما الجزيئات المشابهة والتى تحتوى نهاية 3`- OH و 5`- phosphate المنتجة بواسطة الثغرة مع S1 nuclease فإنها تعتبر غير معدية. هذه البيانات تقترح بأن حلقة 2`, 3`- cyclic phosphate هى خطوة أولية أساسية للحيوية (العدوى). وعلى أية حال فإن نتائج

هذا البحث على فيرويد اكسوكورتز الحمضيات لم تدعم هذه الفكرة (النظرية) بسبب أن النسخ المستعملة فى هذه الدراسة كلها تحتوى OH -3` وكانت معدية ولو على كميات صغيرة بالمقارنة مع الفيرويد الدائرى.

جزيئات فيرويد PSTVd والتى أجرى لها عملية الثغرة صناعياً nicked باستعمال Mg^{2+} لانتاج أشكال مستقيمة مع مخلوط من نهايات -2` و-3` phos- phate مقترنة مع OH -5` أظهرت بأنها ذات حيوية خاصة منخفضة بأضعاف ٣١٠ ـ ٤١٠ أو ٢١٠ أقل منه فى الفيرويد الدائرى مشابهة بذلك لحيوية الجزيئات المستقيمة المذكورة هنا. يبدو من المحتمل أن أطراف 2`- 3`Cyclic Phosphate يجب أن تكون موجودة فى ال RNA المستقيم ليظهر حيوية كاملة، ولأن الجزيئات تحتوى مجموعات أخرى على terminus -3` دائماً يبدو بأنها تظهر مستوى منخفض من الحيوية. إن التحوير أو التعديل فى ال End -5` يظهر بأن له قليلاً أو بدون تأثير على حيوية النسخ المستقيمة عند مقارنته بالفيرويد الدائرى.

هناك نـوع جديـد ذو حيوية مـن RNA ligase فى مستخلصـات جنين القمح والذى يتطلب أطـراف 2`, 3`- cyclic phosphate وأيضاً إما -5` phos- phate أو OH -5` قد تم وصفه ولقد استخدم فى المعمل مثل Viroid ligase. ولقد تبين أن نُسخ CEVd المستقيمة والتى لا تحتوى النهاية الطرفيةcyclic -2`, 3` phosphate كانت معدية وهذا يؤدى إلى الاعتقاد بأنه إما النوع الثانى من ال ligase يكون موجوداً فى العائل النباتى أو أن terminus -3` تخضع لعملية الفسفرة فى الطبيعة In Vivo Phosphorylation لانتاج 2`, 3`- cyclic phosphate والتى يمكن فيما بعد أن تعمل كمادة تفاعل لأنزيم ال Ligase الموصوف سابقاً.

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

أنتجت بواسطة S1 nuclease والذى يمتلك نهاية طرفية 3`- OH و 5`- phosphate مشابهة لواحدة من النسخ التى أظهرت أنها معدية فى هذه الدراسة.

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

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

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

مقدمة:

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

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

ملاحظة: قام بهذا البحث إثنان من العلماء فى وارسو (بولندا) والذى أمدنى بالبحث الدكتورة- E. Paduch .Cichal

فى الخيار CPFVd وتنمى فى مراقد نمو على درجة حرارة ٥°م وإضاءة ١٦ ساعة يومياً مع كثافة ضوئية 5.0001X. أما نباتات الكنترول من نفس الأنواع والأصناف المزروعة والتى أصيبت بنفس الفيروويد نميت فى صوبا زجاجية تحت ظروف نمو قياسية.

درنات بطاطس من الصنف Azalia والصنف Irys المصابة بالسلالة الشديدة من فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس s - PSTVd أو السلالة المعتدلة m - PSTVd تحفظ فى ثلاجة على درجة حرارة ٦ ـ ٧°م. أما الدرنات الكنترول من نفس الأصناف والتى أصيبت بنفس الفيرويدات حفظت على درجة حرارة الغرفة العادية.

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

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

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

النتائج :-

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

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

إن الأعراض النموذجية للإصابة بالفيرويدات ChMVd، CSVd وCPFVd كانت ملاحظة على نباتات الأقحوان النامية من قمم مرستيمية أخذت من نباتات

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

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

ومن ناحية أخرى ولا أى نبات من النباتات النامية من قمم مرستيمية المأخوذة من النباتات التى قد نمت لمدة ٦ شهور فى ظروف درجات حرارة منخفضة لم تظهر أعراض إطلاقاً للإصابة الفيرويدية خلال ستة شهور من النمو فى الصوبا الزجاجية. إن الإختبارات الحيوية وإختبارات الهجرة الكهربائية فىPolyacrylamide gel قد أثبتت أنه بعد شهرين من النمو فى الصوبا الزجاجية فإن أعداداً كبيرة من هذه النباتات كانت خالية من الفيرويدات. إعادة الاختبار لهذه النباتات بعد ٤ و٦ شهور من النمو فى الصوبا الزجاجية أظهرت الوجود للفيرويدات فى بعضها ولكن لا تزال ١٨,٥ ـ ٨٠٪ من هذه النباتات خالية من الفيرويد جدول ١٨.

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

جدول ١٧: حصر لنباتات البطاطس والدرنات ونباتات الأقحوان فى درجات الحرارة المنخفضة ٥م وحصر للنباتات الناتجة من القمم المرستيمية لهذه النباتات.

	الأجزاء النباتية والفيرويد	المعاملة	عدد النباتات (درنات) معاملة	قاومت ٣ شهور	المعالجة لمدة ٦ شهور	عدد المرستيمات المقطوعة من النباتات (درنات) بعد المعالجة ٣ شهور	٦ شهور	عدد النباتات النامية من المرستيمات المقطوعة بعد المعالجة ٣ شهور	٦ شهور
أ ـ	بطاطس نوع Prosna ـ نباتات								
١ ـ	نامية من درنات	معالجة	٢٠	١	صفر	٣	ـ	٢	ـ
٢ ـ	s - PSTVd	كنترول	٢٠	ـ	ـ	٤٠	ـ	١٠	ـ
ب ـ	بطاطس نوع Prosna نباتات								
١ ـ	نامية من عقل	معالجة	٢٠	٤	٤	١٢	١٢	٥	١١
٢ ـ	s - PSTVd	كنترول	٢٠	ـ	ـ	٣٠	٣٠	١٥	١٠
جـ ـ	بطاطس نوع أزاليا ـ درنات	معالجة	٤	٤	٤	١٠	٨	٥	٤
	s PSTVd	كنترول	٥	ـ	ـ	١٠	١٢	٨	٧
د ـ	بطاطس نوع أيرس درنات	معالجة	١٢	١٢	١٢	٢٤	١٨	١٠	٧
	s PSTVd	كنترول	١٢	ـ	ـ	٢٤	٢٤	١٢	١٠
هـ ـ	بطاطس نوع ازاليا درنات	معالجة	١٢	١٢	١٢	٢٤	٢٠	١٢	١٠
	m PSTVd	كنترول	١٢	ـ	ـ	٢٤	٢٤	١٠	١٦
و ـ	بطاطس نوع أيرس درنات	معالجة	١٢	١٢	١٢	٢٠	٢٠	١٠	٨
	m PSTVd	كنترول	١٢	ـ	ـ	٢٤	٢٤	١١	١٠
ز ـ	أقحوان نوع ديب رادج	معالجة	١٩	١٩	١٩	٥٧	٥٧	٢٨	٣٧
	ChCMVd	كنترول	١٩	ـ	ـ	٤٥	٥٠	١٩	٣٥
ح ـ	أقحوان نوع بون جين	معالجة	٢٥	٢٥	٢٥	٧٥	٧٥	٣٢	٢٧
	CSVd	كنترول	٢٥	ـ	ـ	٦٠	٦٥	٢٠	٣٠
ط ـ	أقحوان صنف مستيلبتو	معالجة	١٠	١٠	١٠	٣٠	٣٠	١٠	١٠
	CPFVd	كنترول	١٠	ـ	ـ	٢٥	٣٠	١٥	٢٥

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

المادة النباتية والفيرويد	مدة المعالجة بالأشهر	عدد النباتات النامية من المرستيم المقطوع	عدد النباتات الخالية من الفيرويد إعتماداً على الاختبار بعد فترة نمو فى الصوبا الزجاجية		
			٢ شهر	٤ شهور	٦ شهور
بطاطس ـ نباتات الصنف بروسنا	كنترول	٢٥	صفر	—	—
نباتات بطاطس نامية من الساق	٣	٥	صفر	—	—
نباتات بطاطس نامية من عقل المعاملة بالفيرويد s - PSTVd	٦	١١	٩	٨	٦
بطاطس ـ صنف بروسنا نباتات	كنترول	١٥	صفر	—	—
بطاطس صنف ازالا ـ درنات	٣	٥	صفر	—	—
s - PSTVd	٦	٤	٢	٢	١
بطاطس مزروعة صنف أيرس	كنترول	٢٢	صفر	—	—
بطاطس درنات	٣	١٠	صفر	—	—
s PSTVd	٦	٧	٥	٣	٢
بطاطس مزروعة صنف بروسنا	كنترول	٢٦	صفر	—	—
درنات صنف ازالا	٣	١٢	صفر	—	—
m PSTVd	٦	١٠	٧	٦	٥
بطاطس مزروعة صنف أيرس	كنترول	٢١	صفر	—	—
بطاطس درنات	٣	١٠	صفر	—	—
m PSTVd	٦	٨	٦	٥	٤
الأقحوان	كنترول	٥٤	صفر	—	—
أقحوان صنف ديب راجد	٣	٢٨	صفر	—	—
فيرويد ChCMVd	٦	٣٧	٣١	٢٩	٢٦
أقحوان	كنترول	٥٠	صفر	—	—
أقحوان صنف بون جين	٣	٣٢	صفر	—	—
CSVd	٦	٢٧	١٥	٥	٥
أقحوان	كنترول	٤٠	صفر	—	—
أقحوان صنف مستلوت	٣	١٠	صفر	—	—
CPFVd	٦	١٠	٩	٩	٨

obeikandl.com

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

Inhibition of Viroid Infection by Antisense RNA Expression in Transgenic Plants

مقدمة:ـ

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

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

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

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

١ ـ كلونة الجين المطلوب دراسته.

٢ ـ فصل التتابع الشفرى للجين عن منطقة البروموتور الخاص به باستخدام أنزيمات القطع المحددة المناسبة.

٣ إعادة إتحاد التتابع الشفرى للجين مع نفس البروموتور ولكن فى إتجاه معكوس التتابع.

٤ ـ إعادة إدخال هذا التتابع المعكوس المتحد بالبروموتور. أى الجين المضاد المعنى إلى الخلية المضيفة بإحدى طرق التحول الوراثى.

تكون المحصلة النهائية لهذه العملية هى أن الجين المعكوس التتابع سيتم نسخه إلى نسخ RNA مضاد المعنى، وهـذه بدورها عـند اصطـدامها بالنسخ الطبيعية لـ m RNA لنفس الجين (ذو المعنـى) تتزاوج معها مكـونة جزئ RNA مزدوج لا يمكن ترجمته مما يؤدى إلى توقف إنتاج البروتين الذى يشفر له هذا الجين.

لقد تم إستخدام RNA مضاد المعنى فى إيقاف تعبير عدد كبير من الجينات فى كل من غير مميزة النواة ومميزة النواة. بالإضافة إلى إستخدامه فى إيقاف تعبير الجينات معروفة الوظيفة فإنه يمكن استخدامه أيضاً فى التعرف على وظيفة الجينات المجهولة الوظيفة. إذ يمكن استخدام RNA مضاد المعنى فى إنتاج طفرات وظيفية بحيث يعطى الشكل المظهرى الطافر للكائن الذى حدثت به هذه العملية ومعلومات هامة عن وظيفة الجين فى الخلية المتأثرة.

ولكى نضمن الحصول على إيقاف تام للتعبير الجينى فإنه إما أن يستخدم بروموتور قوى جداً لدفع عملية نسخ التتابع الشفرى المعكوس أو أن يتم ادخال عدد كبير من نسخ RNA مضاد المعنى إلى الخلية المضيفة.

(هذه المقدمة أخذت من كتاب البيولوجيا الجزيئية للدكتور محمد فتحى عبد الوهاب سنة ١٩٩٣).

استعمال RNA مضاد المعنى مع الفيرويدات:

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

هذه الحقائق تدعم فكرة أن الإصابة الفيرويدية أيضاً يمكن تثبيطها بكفاءة بواسطة RNA مضاد المعنى antisense بسبب موقعها فى النواة. إن عدم وجود دليل لأى ناتج مترجم للفيرويدات وعدم وجود غطاء بروتينى، فإن جميع النشاطات الأنزيمية والوقاية ضد التحطيم وتجهيز وتخزين الفيرويد يجب أن تتم بواسطة العائل وأن المعلومات الوراثية لـ RNA الفيرويدى لا يمكن أن تكون التتابع للبروتين ولكن يجب أن تكون لتركيبه الخاص.

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

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

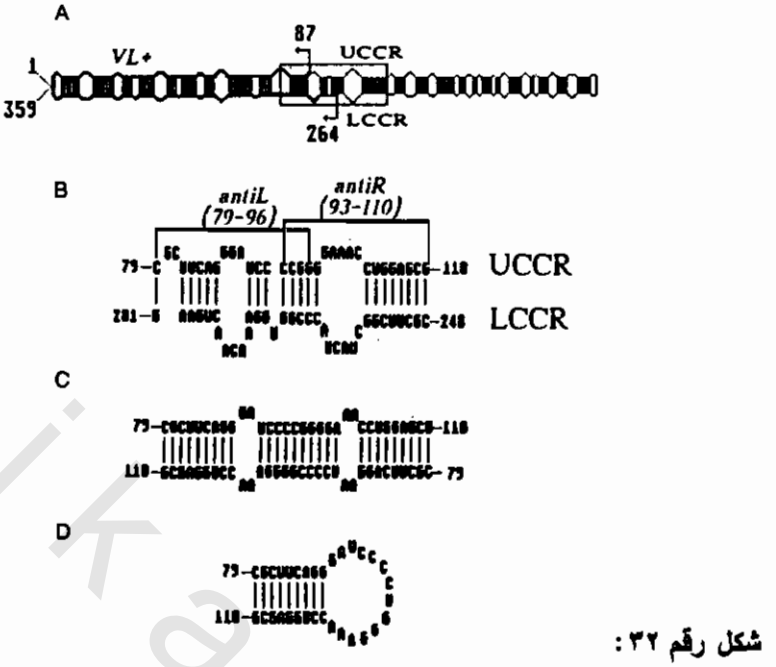
نظراً لأن التركيب والمقاطع التركيبية لـ RNA الفيرويدى كلها معروفة جيداً وهناك نماذج مفصلة موجودة وتوضح شمولها على حوافز تركيبية Structural motifs وخطوات وظيفية مثل التناسخ، التجهيز وغيرها.

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

فى الجزء الثانى من هذه الداسة فقد أختير cDNA ليغطى النصف الأيسر فقط من التركيب الثانوى شبه العصوى للفيرويد كتركيب RNA مضاد المعنى ضد تناسخ الخيط السالب الوسيط. هناك مستوى منخفض جداً من الخيوط السالبة

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

ولقد تبين قبل ذلك أن القطع القصيرة من ال DNA وال RNA المكملة تستطيع أن تثبط الإصابة بالفيرويد، هذا ما وجده Matousek سنة ١٩٩٤. هذه القطع كانت تحضن فى المعمل مع PSTVd والمعقد المتكون سابقاً كان يحقن فى النبات كان التثبيط أكثر فعالية عندما كان التحضين يجرى على درجات حرارة عالية حيث التركيب الثانوى للفيرويد كان يدنتر. وكنتيجة لهذه المعطيات فإن مركبات RNA مضاد المعنى الفيرويدى من الممكن أن لا يتكون تحت الظروف الفسيولوجية، التجهيز الخلوى لكل من بناء الفيرويد وال RNA مضاد المعنى ذو الفائدة وتكوين المركب يجب أن يقلد ويدرس فى المعمل تحت الظروف الفسيولوجية. بناء وسيطات تناسخ الفيرويد وال RNA مضاد المعنى يمكن أن تجرى فى المعمل عن طريق النسخ من قوالب DNA باستعمال أنزيم-T_7 RNA Polyme rase وتكوين مركبات بين RNA الهدف ومضاد المعنى، يمكن أن يتبع ذلك تقدير كمى بواسطة المدراج الحرارى للهجرة الكهربائية فى الجيل- Temperature gradient gel electrophoresis والذى يرمز له TGGE وبواسطة الأجسام المضادةanti dsRNA antibodies. لقد ظهر أن ال RNAs مضادات المعنى المختارة ضد الخيط الموجب وأيضاً ضد وسيطات تناسخ الخيط السالب تشكل مركبات ثنائية الخيط متخصصة مع أهدافها تحت الظروف الفسيولوجية، وهذا وسيط لـ RNA مضاد المعنى ذو أهمية فى تأثيرات التثبيط على إصابة الفيرويد قد لوحظت فى الطبيعة باستعمال نباتات بطاطس تجهز RNA مضاد المعنى.



شكل رقم ٣٢ :

RNAs مضاد المعنى والهدف. A= تركيب ثانوى للفيرويد PSTVd مع المنطقة المحفوظة المركزية (UCCR / LCCR) وموقع RNA VL_+ مضاد المعنى (الخط السميك) والذى يوجه ضد نسخ سالبة الخيط. B= توضح UCCR و Anti L.L CCR تمثل RNA مضاد المعنى مع التتابع التكميلى لتتابع الفيرويد (٧٩ ـ ٩٦) و anti R تمثل RNA التكميلى مضاد المعنى لتتابع الفيرويد (٩٣ ـ ١١٠). أما C= التركيب الثلاثى الحلزونى المتكون بواسطة وحدتين من UCCR. أما D= تركيب دبوس الشعر I المتكون ضمن الجزئ فى القواعد الزوجية للتركيب UCCR.

النتائج Results

١ ـ تحليل المركب المتكون من RNA مضاد المعنى و RNA الهدف فى المعمل :

إن RNA مضاد المعنى أختير ضد المنطقة المركزية العليا المحفوظة (UCCR) شكل ٣٢ فى نسخ الشريط الموجب بسبب دوره الأساسى فى تجهيز الفيرويد. هناك فى وسيطات تناسخ ال Oligomeric إثنتان من UCCR من الممكن أن تشكل منطقة حلزونية (لولبيه) ثلاثية ثابتة مكونة من ٢٨ زوج قواعد معترضة بواسطة إثنتين فقط

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

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

إن التحليل بطريقة TGGE أجرى مباشرة بعـد توقـف النسـخ بواسطة إضافة ٥ ملى مول EDTA. يظهر على الجيل فى شكل ٣٢، A الذى فيه المركب المتكون مع anti L كان قد تحلل، عديداً من المنحنيات للتحول واضحة، هذه يشار إليها

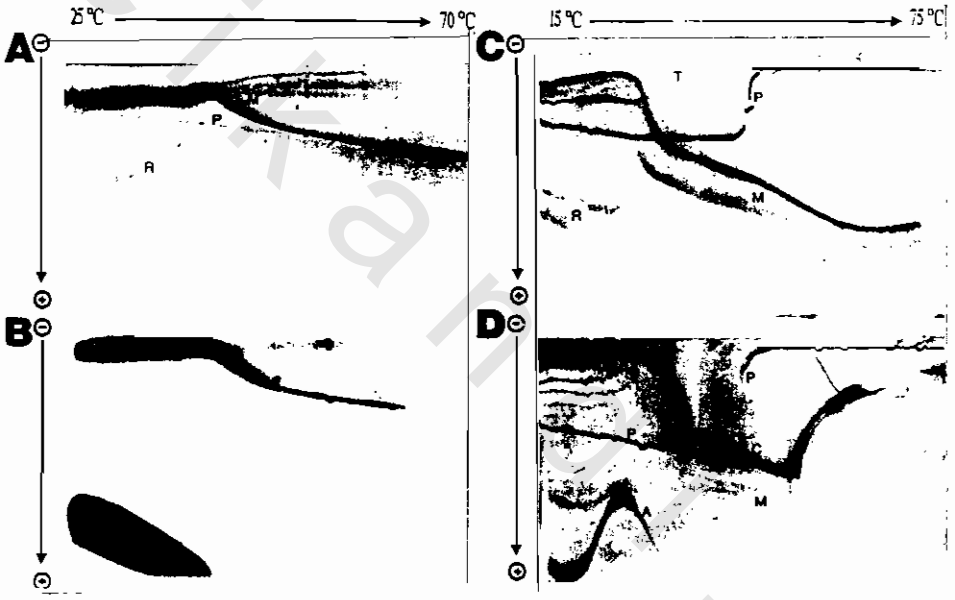
بواسطة R ، M ، T حيث حصل عليها مشابهة جداً لما ظهر عندما حللت نسخة من ال Dimeric فقط. يجب أن نذكر هنا بأن منحنى التحول M (عديد دبابيس الشعر) يكون مميز لموقع اليمين بعد النسخ، هذا التركيب لا يكون فى توازن ثيرمو ديناميكى ولكن يخضع لتغيرات بطيئة فى تركيبات مثلث بواسطة منحنيات T (حلزون ثلاثى، شكل ٣٢) و R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

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

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

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

ds RNA وعلى أية حال بالنسبة لنُسخ المائة وتسعون نيوكليتيدة لها نفس القطبية كما فى RNA الهدف. حتى بعد النسخ فإن الهضم بأنزيم DNase والاستخلاص بالفينول فقط فى الكمية الكلية من الحمض الأمينى، هذا يعنى أنه يمكن تحديد كمية الخيوط السالبة Trimeric والنسخ مضادة المعنى والنسبة المئوية للخيوط الثنائية لأى من الجزيئات يمكن تقديرها بصعوبة. يلاحظ أن إجراءات الهضم بأنزيم DNase، الاستخلاص بالفينول والترسيب التى تتبع النسخ لا تغير المدى لتكوين الخيط الثنائى.



شكل رقم ٣٣ :

TGGE لمعقد متكون بين RNA مضاد المعنى و RNA الهدف. الشريحة A و B تظهر تحليل معقدات من RNA قصير مضاد المعنى (anti L) ونسخ دايمرك موجبة الخيط من الفيرويد PSTVd بعد Pre - transcription للحمض RNA مضاد المعنى. شريحة A تمثل جيل مصبوغ بالفضة، شريحة B تمثل autoradiogram من RNA مضاد المعنى معلم إشعاعياً. إن أسرع شريحة فى الهجرة فى ال autoradiogram تكون أكثر احتمالاً من معقدات RNA مضاد المعنى مع النسخ المنتهية مبكراً. أما شريحة C فتمثل نسخة دايمرك سالبة الخيط. أما شريحة D تمثل نسخة دايمرك سالبة الخيط بعد Pre - transcription مع +VL لـ RNA مضاد المعنى. إن الشرائح معلمه لثلاثة تركيبات مختلفة (T. (R, T, M = التركيب الثلاثى الحلزونى، M = تركيب متعدد دبابيس الشعر، R= التركيب المتطاول شبه العصوى مشابهة للفيرويد الموجود فى الطبيعة. أما P فهى ناقل النسخ.

جدول ١٩ : اكتشاف ds RNA بواسطة dot ELISA .

درجة الحرارة الأولية للتهجين مْ	٩٠	٨٠	٧٠	٦٠	٥٠	٤٠	٣٠
كمية المواقع المستهدفة ٪	٦٥	٦٥	٦٥	٦٥	٥٠	٣٠	١٥

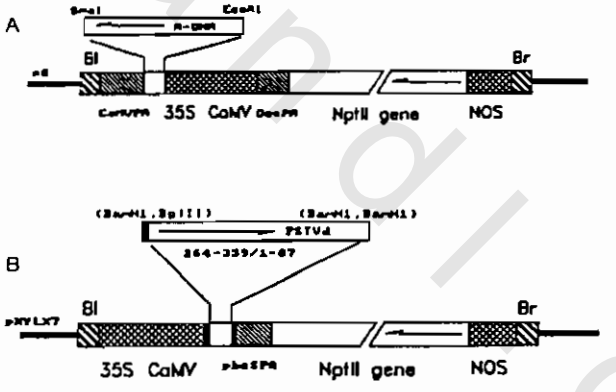
٢ ـ تعبيرات RNA مضاد المعنى فى نباتات البطاطس المحولة وراثياً:

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

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

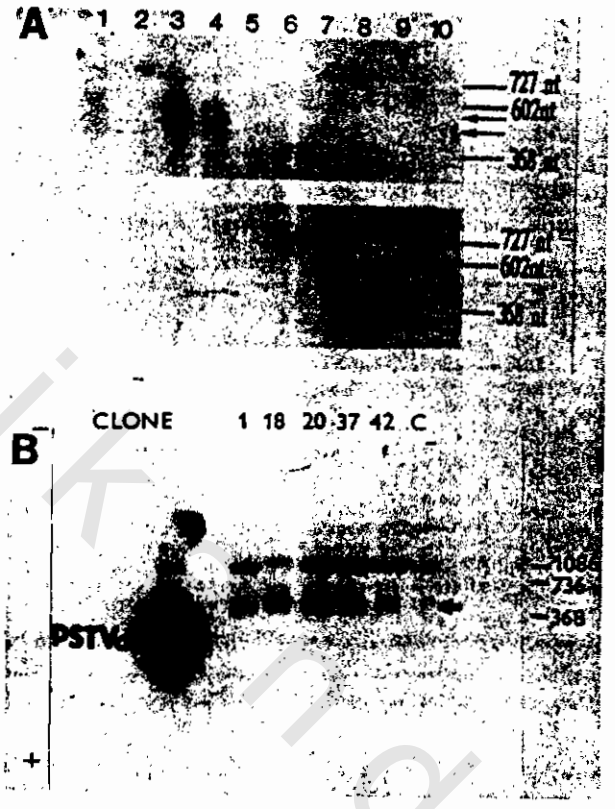
من تعبيرات RNA مضاد المعنى، إن التهجين المنظم مع نسخ خيط سالبة معلمة إشعاعياً من PSTVd كانت منجزة. إن الشكل ٣٥، A الجزء السفلى يبين عدم وجود إشارات من PSTVd الدائرى يمكن اكتشافه فى النباتات المحولة وراثياً.

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



شكل رقم ٣٤ :

عوامل تحول النبات للتعبير عن RNA مضاد المعنى. شكل A: ناقل مكوكى للتعبير عن RNA مضاد المعنى ضد ال UCCR. إن A - DNA يحتوى ١٨ قاعدة زوجية من النيوكليتيدات القصيرة المهجنة (Anti L / Anti L´) أو (Anti R / Anti R´) مع أربعة نيوكليتيدات إضافية كبولى لنكرز لانتاج موقع محدود Smal و EcoR1. أما شكل B فهو ناقل مكوكى لتعبير عن RNA - VL_+ مضاد المعنى ضد نسخ سالبة الخيط. توجيه تتابعات RNA الفيرويدى مشار إليه بأرقام. المواقع المحدودة المستعملة للكلونة موضوعة فى أقواس. أما العلب السوداء فهى مواقع التتابع المنسوخ الموجه من الناقل SCaMV 35 هو فيرس موزايك القرنبيط أما 35S فهو البرومتور و CaMVPA وrbcSPA فهى التتابع للبولى ادينيليشن. NOS، Nptil جين و OcsPA هى مشجع nopaline synthase، النيومايسن فسفوترانسفريز II جين وتتابع البولى ادينيليشن للجين OCS. وكذلك فإن B_1، B_r الحافة اليسرى والحافة اليمنى.



شكل رقم ٣٥ :

تعبير RNA مضاد المعنى فى نباتات البطاطس المحولة وراثياً. شكل A. تحليل RNA مضاد المعنى قصير ضد UCCR. أما الشكل (A) العلوى فهو تحليل بالنورثيرن بلوت لنسيج ورقة (RNA) محول وراثياً. (١، ٢، ٣، ٤، ٥ و٩) و ١٠ كنترول بعد دنترة الاجاروز والهجرة الكهربائية فى الجيل. شريحة ٦ = ١٠ نانوغرام خيط دايمرك موجب من نسخ PSTVd (٧٢٧) نيوكليتيدة و ١٠ نانوغرام من نسخ PSTVd خيط مونوميرك سالب (٣٦٨) نيوكليتيدة. شريحة ٧ = ١٠ نانوغرام من نسخ PSTVd خيط موجب (٦٠٢) نيوكليتيدة. شريحة ٨ = ١٠ نانوغرام مستخلص خام من PSTVd. الجزء السفلى A نفس بقعة RNA كما فى الجزء العلوى ولكنها غسلت وأعيد تهجينها مع نسخ PSTVd سالبة الخيط معلمه للكشف عن PSTVd تتابعات موجبة. أما شريحة B تحليل لـ VL_+ RNA مضاد المعنى ضد نسخ سالبة الخيط. حوالى ٥٠ بيكوغرام من الفيرويد PSTVd الطبيعى أضيفت إلى الموقع المعلم فى اليسار .C = RNA من نباتات بطاطس غير محولة وراثياً. تدل الأسهم على RNAs مضاد المعنى معبراً فى النباتات المحولة وراثياً.

٣ ـ تثبيط الإصابة الفيرويدية فى النباتات المحولة وراثياً:

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

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

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

فى رتبة ثلاثة وأربعة، نموذجياً مع ٠,٠٣ ـ ٣ بيكوغرام من الفيرويد لكل ملغرام من المادة الطازجة. مقارنة فهارس الحيوية لكلونات مختلفة ومجموعة الكنترول فى هذا الوقت تدل على خفض معنوى احصائياً للإصابة فى كلونات ١، ٦، ٢٠ و ٣٧ عند مقارنتها مع الكنترول غير المحول. فمثلاً فإن قيمة G كانت ٢٣، ٢٦، ٢٤ و ١٨ لكلونات ١، ٦، ٢٠ و ٣٧ بالترتيب. إن التساوى فى النسبة المئوية للنباتات المصابة يجب أن يطرح على مستوى ٠,٠٠١ من المعنوية الإحصائية. بالنسبة لكلون ١٨ فإن الاختلافات كانت معنوية على مستوى ٠,٠١ ولم يكن هناك إختلافات معنوية ملاحظة بين كلون ٤٢ ومجموعة الكنترول. كذلك فإن النتيجة قد أوضحت فرق كبير بين مختلف الكلونات المتحولة. فى بداية الإصابة (٢١ يوم بعد الحقن) فإن جميع النباتات المحولة وراثياً والمحقونة كانت (باستثناء واحد من كلون ٢٠) هذه فقط ضعيفة الإصابة (مرتبة ٣ و٤)، بينما أكثر من ٤٠٪ من نباتات الكنترول المحقونة تقع فى مرتبة ٢، هذا يعنى نباتات متوسطة الإصابة. أخيراً فإن ٣٥ يوم بعد الحقن فإن جميع فهرس الحيوية قد إزداد لكن لا يزال معظم الكلونات تختلف معنوياً عن الكنترول. مع أن مستوى PSTVd قد ازداد بشكل مثير، فإن متوسط كمية أل PSTVd فى الكلونات المصابة كان بشكل واضح أقل منه فى نباتات الكنترول. وعلى أية حال فإن كلون ٤٢ لم يختلف عن مستوى الكنترول (جدول ٢٠) هذه تؤكد بشكل عام الملاحظات التى شوهدت من قبل. هناك إصابات أقوى شاملة إلى حد ما قد حصل عليها بعد ٣٥ يوم من الحقن بالمقارنة فى التجربة فى جدول (٢٠، b) ومعظم النباتات المحقونة كانت مصنفة فى مراتب الإصابة ١ ـ ٣. فى سلسلة إختبارات الحيوية الثانية لقد تم إختيار تجمعات الفيرويد فى أنابيب. بالنسبة لكلونات ١، ٢٠ و٣٧ فإن نسبة الأنابيب المصابة قدرت بعد ٩٠ يوم من الحقن (جدول ٢١)، هذه النتائج أوضحت فى الأنابيب نفس النزعة كما فى نسيج الورقة الأخضر.

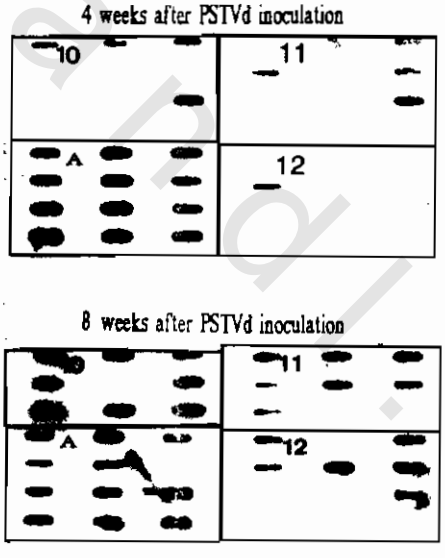
جدول ٢٠ : إختبار الإصابة فى نباتات البطاطس المحولة وراثياً.

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

١ ـ رتبت الإصابة حسب كمية الفيرويد PSTVd فى الأوراق المصابة: ١ = قوى: ٣٥ ـ ١٠ بيكوغرام / ملغ مادة طازجة. ٢ = متوسطة: ١٠ ـ ٣ بيكوغرام / ملغ. ٣ = ضعيفة = ٣ ـ ٠,٣ بيكوغرام / ملغ، ٤ = آثار = ٠,٣ ـ ٠,٠٣ بيكوغرام / ملغ

جدول ٢١ : تحليل الإصابة بفيرويد PSTVd فى درنات البطاطس. لحقن النباتات المتكاثرة خضرياً يكون مشابهاً لتلك التى فى الجدول السابق رقم C.

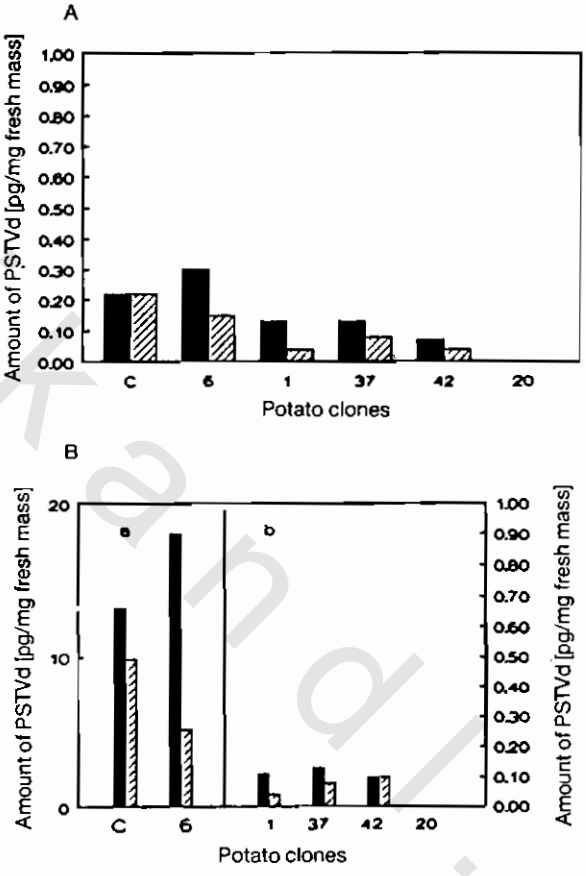
الكلون المحول	عدد الدرنات المختبرة على عدد النباتات التى هى حاملة الدرنات	٪ الدرنات المصابة
١	٢٧/١٠	٤٤
٢٠	٢٦/١٠	١٩
٣٧	٣١/١٠	٧٧
٩٥	٣٨/١٥	٩٥



شكل رقم ٣٦ :

تثبيط الإصابة الفيرويدية فى نباتات البطاطس المحولة وراثياً. تحليل حقن PSTVd فى الطرز المحولة وراثياً (١٠، ١١ و١٢) وفى الطراز غير المحول وراثياً الكنترول. A الطرز المحولة وراثياً ١٠ و ١١ تحولت مع RNA anti R مضاد المعنى، الطراز ١٢ مع RNA anti L مضاد المعنى. عقل البطاطس حقنت بمستخلص خام من النباتات المحقونة، وعزل الحمض النووى بعد ٤، ٨ أسابيع. نقلت مضاعفات من المستخلص على غشاء نايلون وهجنت مع نسخة PSTVd سالبة الخيط. إختبرت عشرة أفراد من كل طراز محول وراثياً أما فى الشريحة السفلى فإن تسعة نباتات من طراز ١٠ و ١١ وعشرة نباتات من طراز ١٢ بالترتيب.

يمكن تلخيص النتائج المتحصل عليها سابقاً بأن هناك إختلافات كبيرة ليس فقط بين الجينوتايب المختلفة ولكن أيضاً بين مختلف النباتات من نفس الكلون ضمن التجربة الواحدة. عند مقارنة التجارب المختلفة بعد التكاثر الخضرى لـ VL_+ المتحول جدول ٢٠ أدى إلى وجود على الأقل جينوتايب واحد كلون ٢٠، أظهرت مستوى ثابت منخفض من الإصابة بالفيرويد PSTVd وبالتالى أظهرت أعلى الدرجات من التثبيط للإصابة بالفيرويد. من ناحية أخرى حتى ضمن هذا الكلون فإن النباتات المصابة بشدة (مرتبة ١) قد لوحظت، هذا أدى إلى الاقتراح بأن المقاومة المحتملة يمكن أن تتحقق عن طريق التوسط بواسطة RNA مضاد المعنى لم تعمل، إذا كان من الممكن أن بعض المستوى البسيط من الفيرويد وصل فى نسيج النبات. إن الاختلافات العالية فى تجمع الفيرويد حتى ضمن الجينوتايب الواحد يمكن أن تنتج من إختلاف تعبير RNA مضاد المعنى فى النسيج المختلف من الممكن أن يتسبب عن DNA methylation وخفض التعبير فى علب T - DNA. لكى نجعل التجربة فى ظروف مثالية يؤخذ عديد من ال Subclonings من الجينوتايب VL_+ المحول وتوضع علـى بيئة محتوية 5`azacytidine وأجرى إختبار The leaf disc agroinoculation تحت ظروف إضاءة وحرارة قياسية فى Clima - boxes (شكل ٣٧). إن فحص معدل تجمع الفيرويد أظهر مستوى منخفض جداً من التجمع بعد عشرة أيام من ال agroinoculation. بعد ٢٠ يوم ظهرت تجمعات قوية للفيرويد فى أقراص الورقة الكنترول وفى أقراص ورقة كلون رقم ٦. كان هناك إنخفاضاً شديداً فى مستوى التجمع لوحظ فى كلونات ١، ٣٧ و ٤٢ ولم يمكن اكتشاف فيرويد لكلون ٢٠. يحب أن نذكر هنا أنه لم يكن هناك إختلافات معنوية فى مستوى PSTVd فى الحلقة الخارجية ومركز القرص فى تنوع الكنترول بينما المستوى من PSTVd قد إنخفض معنوياً فى أنسجة مركز القرص من الجينوتايبات المحولة. هذا الميل أو النزعة لوحظت حتى فى أقراص من الجينوتايب المصابة بشدة رقم ٦ شكل ٣٧، A.



شكل رقم ٣٧ :

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

obeikandl.com

مناقشة النتائج :-

لقد سبق وبينا أن RNA المتخصص لـ PSTVd متماثل الازدواجات وأن ازدواج من نسخ مضادة المعنى طويلة غير كاملة مع PSTVd كانت فعلاً غير معدية فى نباتات الطماطم. هذه النتيجة أدت إلى الاقتراح بأن تداخل RNA - RNA يمكن أن يشكل حقيقة أساس وسيط لـ RNA مضاد المعنى يثبط إصابة الفيرويد. فى هذه الدراسة ثم إختيار RNA مضاد المعنى غير كامل ضد ال UCCR من الخيط الموجب وضد النصف اليسارى من وسيط التكاثر السالب لـ PSTVd لتحليل التأثير المثبط على إصابة الفيرويد فى النباتات المحولة وراثياً. كما ذكر سابقاً فإن التأثيرات المثبطة تصبح متوسطة بواسطة تعبيرات RNA مضاد المعنى الخلوى وقد ذكرت لبعض RNA الفيروسى للنبات و DNA الفيروسى، ولكن النتائج لا يمكن أن تنطبق على الفيرويدات خاصة بسبب الصفات التركيبية الخاصة للفيرويدات والتى تشكل ازواج مضاعفة. هذه الصفة يجب إعتبارها خاصة بالنسبة لوسيطات التكاثر الأطول، والتى بطريقة أخرى يمكن أن تكون هدفاً مناسباً بسبب تركيزها المنخفض فى الخلايا المصابة. مجرد التحضين لـ RNA مضاد المعنى أو الهدف قد أظهر أن التحضين يجب أن يجرى على درجات حرارة عالية غير فسيولوجية لكى نحصل على إنتاج عال من المركب المعقد. لكى نوجه هذه المشكلة فى مصطلحات ثيرموديناميكية إختبر التداخل بين RNA مضاد المعنى و RNA الهدف عندما بنى RNA الهدف تحت ظروف فسيولوجية بواسطة أنزيم T_7 Polymerase فى وجود RNA مضاد المعنى قبل النسخ والمعقد المتكون أجرى له تحليل بواسطة TGGE والاكتشاف بواسطة Immunochemical لـ ds RNA. هناك طرق مشابهة يكون من المحتمل أن تحدث فى الخلايا المحولة وراثياً بعد دخول الكائن الممرض النواة وتكون طريقة التناسخ قد إبتدأت. من التحليل بواسطة TGGE يمكن القول بأن إنتاج المعقد المتكون كان تقريباً ١٠٠ ٪. هذه النتيجة كان من السهل الحصول عليها من المعقدات مع النصف اليسارى من RNA مضاد المعنى، بسبب الانتقال الواضح فى الشرائح. المعقد المتكون من RNA مضاد المعنى القصير ضد

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

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

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

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

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

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

إن ال Physiological mosaic المعروف جيداً فى خلايا النبات من الممكن أن يقود أيضاً إلى تركيز RNA مضاد المعنى باختلاف من خلية إلى خلية حتى إذا نظم بواسطة محفز تأسيسى. إن المستوى الحدى الأولى من RNA الفيرويدى يمكن أن نصل إليه بسهولة أكثر فى هذه الخلايا بدون تعبيرات RNA مضاد المعنى أو بكمية بسيطة جداً منه، هذه الفيرويدات يمكن أن تنتشـر فى الأنسجة المحيطة. من المعروف أن الفيرويدات تتراكم بسرعة أكثر فى النسيـج المرستيمى ومن هناك يمكن أن تنتقل ضمن النبات خلال خلايا اللحاء هذا ما وجده Palukaitis سنة ١٩٨٧.

فى هذا النسيج فإن التناسخ يمكن أن يحدث بمعدل أعلى، بينما مستوىRNA مضاد المعنى يمكن أن يكون غير كاف تماماً لأن يتداخل مع مسار التناسخ وبالتالى يقود إلى تنافس مختلف تماماً. من هذا الاتجاه فإن نتائج البحث تكون أكثر تشابهاً للتأثيرات الملاحظة لـ RNA الفيروسى للنبات. بالنسبة للفيروسات المتجمعة

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

رابعاً: الوقاية بالتضاد بين أربعة فيرويدات:

Cross Protection Among Four Viroids

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

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

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

إن الدراسة التى أجريت على RNA بطريقة بصمة الأصبع Finger printing فى كل من السلالة الشديدة والمعتدلة قد أظهرت أن هاتين السلالتين للفيرويد PSTVd فيهما إختلافات بسيطة فقط فى تتابع نيوكليتيداتها. لقد أجرى عدة أبحاث لتحديد فيما إذا كانت الوقاية بالتضاد التى بين الفيرويدات هى مقصورة فقط على تلك الفيرويدات التى تظهر درجة عالية من تماثل التتابع فى أحماضها RNAs.

لكى نجرى إختبارات الوقاية بالتضاد بين أى فيرويدين فمن الضرورى أن نلاحظ: ـ

١ ـ توفر العائل المشترك بين الفيرويدين موضوع الداسة.

٢ ـ دراسة سابقة لهذين الفيرويدين تثبت بأنهما يتناسخان فى العائل المشترك.

أجريت دراسة الوقاية بالتضاد على نباتات الطماطم و / أو نباتات الأقحوان وذلك باستعمال الفيرويدات الآتية: ـ

١ ـ السلالة الشديدة من فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس PSTVd - s.

٢ ـ السلالة المعتدلة من فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس PSTVd - m.

٣ ـ فيرويد اكسوكورتز الحمضيات CEVd.

٤ ـ فيرويد تقزم الأقحوان CSVd.

٥ ـ فيرويد الشحوب المتبرقش فى الأقحوان ChMVd.

أظهرت الدراسات السابقة أن السلالة الشديدة والسلالة المعتدلة وفيرويد اكسوكورتز الحمضيات تتناسخ فى نباتات الطماطم، بينما الدراسات التى ذكرت عن بصمة الاصبع المذكورة سابقاً قررت أن السلالة الشديدة والمعتدلة لفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس ذات علاقة متقاربة جداً. أما عند المقارنة بين PSTVd وفيرويد CEVd لم يظهر مناطق واسعة ذات تماثل متقارب فى RNAs التابعة لها.

نبات الأقحوان:

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

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

تحضير اللقاح:

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

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

الإختبارات على نباتات الطماطم:

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

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

الإختبارات على نباتات الأقحوان:

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

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

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

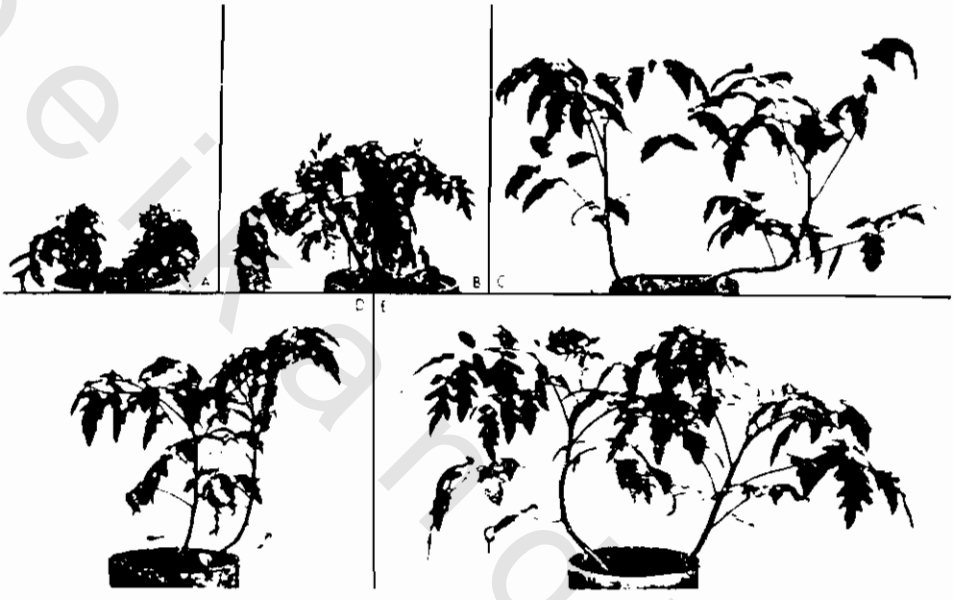
نتائج الإختبارات:

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

١ ـ نتائج الإختبارات على الطماطم:

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

شديدة مثل تقزم القمة الشديد، الالتفاف والتدلى والنكروزز، هذه الأعراض نموذجية للسلالات الشديدة من PSTVd والفيرويد CEVd وقد خفضـت فى الوزن بنسبـة ٧٠ ـ ٨٠٪ وخفضت الطول بنسبة ٥٠٪ (شكل ٣٨ وجدول ٢٣).



شكل رقم ٣٨ :

الوقاية بالتضاد فى نباتات الطماطم صنف Rutgers عن طريق الحقن بالتتابع بالسلالة المعتدلة من فيرويد PSTVd وفيرويد CEVd. الحقن الأول كان فى طور الفلقات والحقن الثانى بعد ١٤ يوم مـن الحقـن الأول. المعـاملـة A = حقـنـت CEVd مع منظـم، B = حقنـت بالمنظـم أولاً ثم بالفيـرويد CEVd، المعاملة C = سلالة معتـدلة ثم منظم. D = سلالـة معتدلـة ثـم CEVd أما E = حقنت أولاً وثانياً بالمنظم. النباتات صـورت بعـد ٥٢ يوم من الحقن الأول.

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

الفيرويدات	الأعراض	إختبارات الوقاية بالتضاد				
	الوصف	الأيام	PS	CEVd	CSVd	ChCMVd
الطماطم CSVd	لا شئ		غير مؤكد	غير مؤكد	—	—
PM	تحت المعدل فى الطول والوزن	٥٢	+	+	غير مؤكد	—
PS	تقزم شديد، تدلى أوراق، تكتل فى القمة	١٨	—	—	—	—
CEVd	تقزم شديد، تدلى أوراق، تكتل فى القمة	١٨	—	—	—	—
الأقحوان PM	بقع شاحبة متوسطة		—	+	—	—
ChCMVd	نظام التبرقش والشحوب		لا يوجد وقاية	لا يوجد وقاية	لا يوجد وقاية	—
PS	بقع شاحبة، تقزم متوسط		—	+	—	لا يوجد وقاية
CSVd	تقزم، بقع شاحبة، تدلى الورقة		+	+	—	غير مؤكد
CEVd	تقزم شديد وتشوه الورقة وشحوب		—	—	—	—

ملاحظات على الجدول:-

١ - رتبت الفيرويدات تصاعدياً حسب ازدياد شدة الأعراض. PM = السلالة المعتدلة من فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس، PSالسلالة الشديدة من فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس.

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

٣ - الوقاية بالتضاد أجريت كما هو مشروح فى الموضوع. حقنت النباتات أولاً بالفيرويد المذكور فى الجهة اليمنى من الجدول ثم بعد ذلك حقنت بالمتحدى (١٤ يوم فى الطماطم، ٤٠ - ٥٠ يوم فى الأقحوان) بالفيرويدات المذكورة فى أعلى الجدول.

+ تعنى حصلت وقاية. أما (-) تعنى لم تسجل النتائج.

جدول ٢٣ : تأثير الحقن بالفيروبد على تكشف الأعراض وشدتها وعلى الوزن والطول فى نباتات الطماطم صنف Rugers .

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

ملاحظات على الجدول: ـ

١ ـ الحقن الأول كان فى طور الفلقات. الحقن الثانى كان بعد الحقن الأول بمدة ١٤ يوم وفى طور أربعة أو ثلاثة ورقات. كان هناك ١٤ نبات لكل معاملة. متوسط الوزن للنباتات الكنترول ٥٥ غرام أما متوسط الطول كان ٤٨سم.

٢ ـ فهرس الشدة كان (-) لا يوجد أعراض، (+) = أعراض معتدلة، (++) أعراض متوسطة، (+++) أعراض شديدة يمكن ملاحظة ذلك فى شكل ٣٨.

٣ ـ استمرت التجربة ٦٥ يوم. يحسب اليوم عندما يظهر نصف أو أكثر من نباتات التجربة الأعراض المذكورة.

obeikandl.com

حقنت نباتات الطماطم أولاً بمنظم ثم بعد ذلك بالمتحدى مثل السلالة الشديدة أو CEVd، فكانت النتيجة أن تكشفت أعراض فيرويدية واضحة وخفضت حوالى ٥٠٪ من الوزن و٤٠٪ من الطول (شكل ٣٨، B جدول ٢٣). مع أن الأعراض المميزة للفيرويد قد أنتجت فى هذه النباتات، إلا أن الأعراض كانت أقل شدة من تلك الواضحة فى شكل ٣٨، A، نظراً لأن النباتات كانت أكبر بمدة ٢ أسبوع عندما حقنت. على كل حال فإن تعبيرات الأعراض فى هذه المجموعة من النباتات معنوياً وأكثر شدة من تلك الملاحظة فى النباتات المحقونة فى اليوم الأول بالسلالة المعتدلة. النباتات التى حقنت فى اليوم الأول بالسلالة المعتدلة وبالمتحدى ثم بعد ١٤ يوم من ذلك بالسلالة الشديدة أو CEVd كانت غير متميزة عن تلك المحقونة بالسلالة المعتدلة لوحدها (شكل ٣٨، D وجدول ٢٣). وبالتالى فإن الحقن السابق بالسلالة المعتدلة حفظ هذه النباتات من تكشف أعراض فيرويدية شديدة تتسبب عن السلالة الشديدة أو عن CEVd. النباتات الموجودة فى شكل (٣٨، D) كانت قد اختبرت لإظهار القوة القليلة من الأربعة عشر نبات فى تلك المعاملة، علاوة على ذلك فإنها لم تظهر أعراض فيرويدية. التجارب الأخرى المستعمل فيها خمسة عزلات إضافية أظهرت نفس الوقاية.

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

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

٢ ـ نتائج الإختبارات على الأقحوان:

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

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

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

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

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

إدخال فيرويد ثمرة الخيارة الباهتة فى التجربة:

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

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

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

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

جميع حزم RNA للفيرويدات كانت واقعة على نفس المسافة من قمة الجيل، هذا يدل على أنها لا تختلف فى حركتها فى الهجرة الكهربائية Electrophoreti-cal mobility فى ٥٪ بولى اكريلاميد جيل. يظهر فى جدول ٢٤ أن الفيرويد ChCMVd أصاب نبات الأقحوان فقط من الثلاثة أصناف المزروعة واحدث أعراض تبرقش الورقة النموذجية على الصنف Deep Ridge وعلى الصنف Bonnie Jean. أما الفيرويدات الثلاثة الأخرى أصابت جميع أنواع النبات المحقونة والمزروعة باستثناء نباتات الخيار صنف Sporu والتى كانت أصيبت فقط بالفيرويد CPFVd. نباتات الخيار المصابة نمت أبطأ من الأفراد السليمة، أوراقها كانت أصغر وشاحبة بأطراف مجعدة لأسفل، ازهارها كانت صغيرة ذات بتلات خشنة مثلمة وكانت ثمارها صغيرة شكل الكمثرى وذات لون أصفر باهت.

جدول ٢٤ : تفاعل عدة نباتات إختبار للحقن بأربعة فيرويدات.

النبات المختبر	التفاعل مع الحقن بالفيرويدات				
	s-PSTVd	m-PSTVd	CSVd	CPFVd	ChCMV
١ ـ نبات الأقحوان					
صنف Bonnie Jean	ss	ss	ss	ss	ss
صنف Mistletos	ss	ss	ss	ss	ss
صنف Deep Ridge	si	si	si	si	ss
٢ ـ Gynura aurantiaca	ss	si	ss	si	0
٣ ـ نبات الخيار صنف Sporu	0	0	0	ss	0
٤ ـ الطماطم صنف Najwczesniejszy	ss	ss	ss	ss	0
الطماطم صنف New York	ss	ss	ss	ss	0
الطماطم صنف Rutgers	ss	ss	ss	ss	0
٥ ـ البطاطس صنف Line PW 22 / 70	ss	ss	ss	ss	0
البطاطس صنف Scopolia sinensis	lsss	lsss	lsss	si	0

ملاحظات على الجدول: ـ

ls = أعراض موضعية

ss = أعراض جهازية

si = إصابة جهازية بدون أعراض

0 = بدون إصابة

جدول ٢٥ : نتائج إختبارات الوقاية بالتضاد مع أربعة فيرويدات على الأقحوان صنف Bonnie Jean .

الفيروويد الموجود فى اللقاح المضاف إلى النبات خلال الحقن الأول	الحقن الثانى	الأعراض الملاحظة على النباتات بعد ستة أسابيع من الحقن بالمتحدى
m - PSTVd	—	m - PSTVd
m - PSTVd	s - PSTVd	m - PSTVd
m - PSTVd	CSVd	m - PSTVd
m - PSTVd	CPFVd	m - PSTVd
m - PSTVd	ChCMVd	m - PSTVd + ChCMVd
s - PSTVd	—	s - PSTVd
s - PSTVd	m - PSTVd	s - PSTVd
s - PSTVd	CSVd	s - PSTVd
s - PSTVd	CPFVd	s - PSTVd
s - PSTVd	ChCMVd	s - PSTVd + ChCMVd
CSVd	—	CSVd
CSVd	m - PSTVd	CSVd
CSVd	s - PSTVd	CSVd
CSVd	CPFVd	CSVd
CSVd	ChCMVd	CSVd + ChCMVd
CPFVd	—	CPFVd
CPFVd	m - PSTVd	CPFVd
CPFVd	s - PSTVd	CPFVd
CPFVd	CSVd	CPFVd
CPFVd	ChCMVd	CPFVd + ChCMVd
ChCMVd	—	ChCMVd
ChCMVd	m - PSTVd	ChCMVd + m - PSTVd
ChCMVd	s - PSTVd	ChCMVd + s - PSTVd
ChCMVd	CSVd	ChCMVd + CSVd
ChCMVd	CPFVd	ChCMVd + CPFVd
none	m - PSTVd	m - PSTVd
none	s - PSTVd	s - PSTVd
none	CSVd	CSVd
none	CPFVd	CPFVd
none	ChCMVd	ChCMVd

خامساً: التداخل بين الفيرويدات المحقونة معاً:

Interference Between Coinoculated Viroids

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

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

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

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

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

النباتات التى أعطيت لقاح مخلوط يحتوى ٠,٢ ميكوغرام لكل مللتر من السلالة المعتدلة من فيروید الدرنة المغزلية فى البطاطس و ٠,٢ ميكوغرام لكل مللتر من السلالة الشديدة من نفس الفيروید كانت نتائجها من حيث منحنى النمو والأعراض الجانبية مطابقة لتلك النباتات المحقونة بكمية ٠,٢ ميكوغرام لكل مللتر من السلالة الشديدة لنفس الفيروید لوحدها. هذا يدل على إخفاق للسلالة المعتدلة فى أن تقلل التعبيرات المرضية للأعراض المتسببة عن السلالة الشديدة أما النباتات المحقونة بكمية ٠,٢ ميكوغرام لكل مللتر من السلالة المعتدلة نمت بسرعة أكثر ووصلت إلى طور نهائى أكبر من النباتات المحقونة إما بمخلوط من السلالة المعتدلة والشديدة معاً أو السلالة الشديدة لوحدها. وعلى كل حال فإن النباتات المحقونة بالسلالة المعتدلة يمكن أن تميز عن النباتات المحقونة بالكنترول على أساس الارتفاع وعلامات الشكل الظاهرى. النباتات المحقونة بعشرة أضعاف زيادة من السلالة المعتدلة فوق السلالة الشديدة (٠,٢ ميكوغرام لكل مللتر من السلالة المعتدلة و٠,٠٢ ميكوغرام لكل مللتر من السلالة الشديدة) كانت غير مميزة عن النباتات المحقونة بالسلالة الشديدة بتركيز ٠,٠٢ ميكوغرام لكل مللتر. وبالتالى حتى عندما يكون اللقاح محتوياً عشرة أضعاف زيادة من السلالة المعتدلة فإن العزلة الشديدة كانت سائدة سيادة كاملة على مستوى التعبير العرضى للمرض.

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

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

الجرعة المطلوبة لتعبيرات الأعراض:

هل من الممكن أن تلك الأعراض سوف تختلف ليس فقط مع السلالة ولكن أيضاً مع جرعة اللقاح؟؟. للإجابة على هذا السؤلا فإن مجموعات من النباتات الكنترول حقنت إما بالسلالة المعتدلة من فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس لوحدها (بتركيز ٠,٤، ٠,٢، ٠,٠٢ و ٠,٠٠٢ ميكوغرام / مللتر) أو بالسلالة الشديدة لوحدها (فوق نفس المستوى المستوى من التركيز) ثم وضعت تحت المراقبة لمدة عشرة أسابيع. وجد أن الوقت اللازم لبداية ظهور الأعراض الفيرويدية النموذجية يتناسب عكسياً مع تركيز اللقاح. وعلى أية حال فإن هذا التأثير الذى كان أكثر وضوحاً خلال أول أسبوعين بعد الحقن لم يستمر. بمضى عشرة أسابيع بعد الحقن فإن جميع المجموعات النباتية المحقونة بالسلالة المعتدلة مطابقة تماماً لبعضها البعض بغض النظر عن التركيزات التى استعمل فيها اللقاح، سواء حقنت بتركيز ٠,٤ ميكوغرام لكل مللتر أو ٠,٠٠٢ ميكوغرام لكل مللتر فهى تعبر عن نفس المستوى من أعراض السلالة المعتدلة وكانت كلها أقصر قليلاً من نباتات الكنترول المحقونة بالمنظم. وبالمثل فإن النباتات المحقونة بتركيز ٠,٠٠٢ ميكوغرام لكل مللتر من السلالة الشديدة أظهرت نفس الخفض العنيف فى الدرجة وحصلت على نفس الأعراض مقدرة مثل تلك المحقونة بتركيز ٠,٤ ميكوغرام. فى كل حالة فإن الأعراض الخاصة المميزة للسلالة وجد أنها تتكشف فى النباتات المحقونة بمدى جرعات من الفيرويد متفاوتة وإن إختلاف التركيز فى الحقن يظهر تأثير فى أول ٧٠ يوم ثم بعد ذلك لا يعود لاختلاف التركيز أى أثر على الأعراض.

تثبيط تناسخ فيرويد تقزم حشيشة الدينار بعد الحقن المشترك بفيرويد PSTVd :

نظراً لأن عزلات الفيرويد تحدث طبيعياً، مثل العزلة المعتدلة والشديدة لفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس، فإنها يمكن أن تحتوى خليطاً من تنوعات التتابع. إن هذه الدراسة إمتداداً للدراسة السابقة وذلك لمقارنة كفاءة التناسخ فى النباتات المحقونة بنسخ من تتابع فيرويد مكلون. هذه النسخ ممكن أن تزود بلقاح يحتوى تتابعات نقية مفردة.

لقد إختير فيرويد تقزم حشيشة الدينار HSVd وفيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس PSTVd لهذه التجربة لعدة أسباب منها:ـ

١ ـ هذان الفيرويدان يحدثان أعراضاً مختلفة جداً فى نباتات الطماطم.

٢ ـ الإصابة بفيرويد تقزم حشيشة الدينار تسبب أعراضاً غير ظاهرة فى البطاطس بينما فيرويد الدرنة الغزلية الهولندية يسبب أعراضاً شديدة جداً تحت ظروف النمو المستعملة فى التجربة.

٣ ـ نظراً لأن الفيرويدين يمتلكين تماثل تتابع محدود فقط فمن الممكن تمييزهما بطريقة تهجين الحمض النووى.

٤ ـ إن نسخ ال Dimeric من HSVd و PSTVd قد تبين أنها معدية فى نباتات الخيار والطماطم بالترتيب.

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

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

إن تهجين الحمض النووى قد بين أن تناسخ HSVd يحدث فى نباتات الطماطم المحقونة بكل من النسختين HSVd dimeric. وعلى أية حال كما هو متوقع فإن هذه النباتات لم يتكشف عليها أية أعراض يتعرف عليها. إن نسخة ال PSTVd 8A قد أظهرت فى تجارب سابقة أنها معدية لنباتات الطماطم، هذا يكون باعثاً على نضج أل PSTVd RNA الدائرى لتتابع الهولندى. إن الحقن بـ 8A أنتج أعراضاً مميزة لمرض فيرويدى شديد. المقارنة بـ dot intensities بين أن نباتات الطماطم المصابة بفيرويد PSTVd يتجمع فيها على الأقل ٥٠ ضعف من RNA الفيرويدى أكثر منه فى نباتات الطماطم المحقونة بفيرويد HSVd.

هناك إجراءان مختلفان إستعملا للحقن المشترك للنباتات بفيرويد HSVd وفيرويد PSTVd. فى تصميم مشابه لذلك المستعمل فى دراسة السلالة المعتدلة والشديدة فى فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس فإن نسخاً من ال Dimeric من HSVd و PSTVd خلطت مع بعضها بمعدلات مختلفة وحقنت فى بادرات الطماطم. فى التجربة الثانية، فإن نسخاً مزدوجة حضرت والتى تحتوى صورتين (نسختين) من ال PSTVd إرتبطت مع صورتين من HSVd. هذه النسخة BPH 21 ضمنت إضافة التتابعات من HSVd و PSTVd بتركيزات متساوية. كانت النتائج من كلا التجربتين متشابهة بغض النظر عن التصميم. إن وجود ال PSTVd كان مقترناً بخفض ملحوظ فى تناسخ ال HSVd.

فى تجارب أولية للتنافس بين HSVd و PSTVd فإن نسخاً من HSD_3 و 8A خلطت بمعدلات بنسبة تتراوح من ١ : ١ إلى ١٠٠ : ١. النباتات التى تحصل على نفس اللقاح كانت تعامل كمجموعة. بالمقارنة مع عينات من النباتات حقنت بنسخاً من HSVd لوحده، فإن التركيز من HSVd كان يخفض بالتدريج فى الأحماض النووية من النباتات المحقونة بـ HSVd و PSTVd بنسبة ١ : ١. لوحظ بعض الخفض فى HSVd فى مستخلصات من النباتات حقنت بعشرة

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

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

إن طريقة Dot hybridization أظهرت أن واحداً فقط من ثمانية نباتات يتجمع فيها مستويات ممكن التعرف عليها منHSVd RNA عندما حقنت بمخلوط محتوياً ٢٠ ميكوغرام لكل مللتر من HSD_3 و ٢,٠ ميكوغرام لكل مللتر من نسخ Dimeric PSTVd. ومن ناحية أخرى فإن ثلاثة من أربعة نباتات تنسخ HSVd عندما حقنت بـ HSD_3.

إن كفاءة ال PSTVd فى وقف تناسخ ال HSVd كان أيضاً مؤكداً فى النباتات المحقونة بمقدار ٤٠ ميكوغرام لكل مللتر من النسخة المزدوجة، BPH 21. هذه النباتات أظهرت أعراض مرض شديدة يتعذر تمييزها عن تلك الناتجة بواسطة الحقن بنسخة ال PSTVd لوحدها. إن الفيرويد PSTVd يتجمع فى الخمسة نباتات كلها، بينما HSVd لم يمكن اكتشافه فى أى منها. إن النسخة من-HSVd dimer ic أكثر تشابهاً للنسخة المزدوجة التى تسمى BH_2. هذه النسخة تصيب ثلاثة من خمسة نباتات عندما حقنت بمقدار ٢٠ ميكوغرام لكل مللتر. كذلك فإن BH_2 تصيب ثلاثة من خمسة نباتات عندما حقنت بمقدار ٥٠ ميكوغرام لكل مللتر. إن إصابة ٦ من ١٠ نباتات طماطم محقونة بمقدار ٢٠ ـ ٥٠ ميكوغرام لكل مللتر من BH_2 أدى إلى الاقتراح بشدة بأن HSVd فشل فى التناسخ فى النباتات المحقونة بنسخة مزدوجة من BPH 21 بسبب التداخل من PSTVd.

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

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

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

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

مراجع خاصة بالفصل الرابع

1 - Bachmann, B., Luke, W. and Hunsmann, G. 1990. Nucleic Acid Res. 18 : 1309.

2 - Cassells, A. C. and Herrick, C.C. 1977. Virology 78 : 253 - 260.

3 - Fernow, K. H. 1967. Phytopathology 57 : 1347 - 1352.

4 - Hecker, R. **et al**. 1988. Gene 72. 59 - 74.

5 - Loss, P., Schmitz, M., Steger, G. and Riesner, D. 1991. EMBO J. 10 : 719 - 727.

6 - Matousek, J, Trnena, L. Rakousky, S. ad Riesner, D. 1994. J. Phyto-pa., 140 : 10 - 24.

7 - Mellor, F. C. and R. Stace - Smith. 1977. Applied and Fundemental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer Verlag, Berlin.

8 - Melton, D. A. **et al** 1984. Nucl. Acids. Res. 12 : 7045 - 7056.

9 - McKinney, H. H. 1929. I. Agric. Res. 39 : 557 - 578.

10 - Palukaitis, P. 1987. Virology, 158 : 239 - 241.

11 - Riesner, D. **et al**. 1989. Electrophoresis 10, 377 - 389.

12 - ____, ____ , ____.1990. New Series in biophysics. Nucleic Acids Vol IV PP. 194 - 243.

13 - Steger, G. **et al**. 1992. J. Mol. Biol. 227 : 719 - 737.

14 - Tsagris, M., Tabler, M. ad Sanger, H. L. 1991. Nucleic Acid Res. 19 : 1605 - 1612.

15 - Wassengger, W. J. **et al**. 1994. Cell. 76 : 267 - 276.

obeikandi.com