

Isolation and diagnosis of a new isolate of *Potato mop-top virus* and using it to evaluate the gene silencing method in transgenic tobacco plants in resistance of the same virus

عزل وتشخيص عزلة جديدة من فايروس الممسحة القمي للبطاطا واستخدامها في تقييم كفاءة مقاومته بطريقة الاسكات الجيني في نباتات التبغ المعدلة وراثيا

عدنان عبد الجليل لهوف
قسم وقاية النبات/كلية الزراعة/جامعة كربلاء

الخلاصة

هدفت هذه الدراسة الى إيجاد طريقة فعالة لعزل عزلة جديدة من فايروس الممسحة القمي للبطاطا من التربة وتشخيصها احيائيا ومناعيا وجزئيا بعد ذلك استخدامها في تقييم فعالية طريقة الاسكات الجيني في مقاومة الفايروس نفسه في نباتات تبغ معدلة وراثيا. أظهرت النتائج ان الطريقة المائية كانت الأكثر فعالية في العزل وذلك لحصول الإصابة بالفايروس ونقله في جميع النباتات الكاشفة مقارنة بالطرق الأخرى كذلك اكدت الدراسات التشخيصية ان العزلة تعود لفايروس الممسحة القمي للبطاطا وأنها ذات إمراضية عالية. بينت النتائج ايضا عدم وجود فروقات معنوية بين نباتات التبغ المعدلة وغير المعدلة وراثيا في مقاومة الفايروس اعلاه في منطقتي الجذور والأوراق للنباتات المدروسة. ان هذه النتائج تشير الى ضعف طريقة الاسكات الجيني في مقاومة الفايروس وقد يعود سبب ذلك الى تأثير كبح فايروس الممسحة القمي للبطاطا الذي ربما يعمل على تقليل او إيقاف فعالية طريقة الاسكات الجيني في مقاومة الفايروس.

Abstract

This study was conducted to determine an active isolation method for obtaining a new isolate of *Potato mop-top virus* (PMTV) from soil and applying biological (Bioassay), immunological (TAS-ELISA) and molecular methods (RT-PCR + qRT-PCR + Nucleotide Sequencing) for diagnosing it. This is in order to utilize the new isolate in evaluation of the gene silencing method in resistance of the PMTV in transgenic *N. benthamiana* plants. The results showed that the liquid method was the most effective approach in obtaining PMTV viral infection in all tested plants. Additionally, the diagnosing methods confirmed that the isolate belong to PMTV and it had a high pathogenicity. The results also displayed no significant differences between the transgenic and non-transgenic *N. benthamiana* plants in resistance of PMTV in roots or leaves of tested plants. These results referred to a weakness of gene silencing method in resistance of the PMTV. This is possibly due to impact of the PMTV suppressor that might cause a reduction or prevention to the gene silencing efficacy in resistance of PMTV.

المقدمة

يحتل محصول البطاطا المرتبة الرابعة بين المحاصيل الاستراتيجية الأكثر أهمية في العالم وذلك بسبب فوائده الغذائية والصناعية المتعددة [1]. يصاب هذا المحصول بعدد كبير من الآفات منها الفايروسات التي يسبب العديد منها خفض كبير في نوعية وكمية الإنتاج. أحد هذه الفايروسات هو فايروس الممسحة القمي للبطاطا (*Potato mop-top virus* (PMTV)) الذي هو النوع الممثل للجنس *Pomovirus* الذي يعود للعائلة *Virgaviridae*. يسبب هذا الفايروس خسائر اقتصادية مهمة في نوعية الإنتاج نتيجة للأعراض التي تظهر على درنات البطاطا والمتمثلة بالحلقات البنية على السطح الخارجي يقابلها خطوط منحنية بنفس اللون تشبه الهلال تظهر في لب الدرنات المصابة للأصناف الحساسة وفي حالة زراعة الدرنات المصابة تظهر اعراض على المجموع الخضري متمثلة بالتبرقش او التلطح الأصفر على الأوراق السفلى عادتا ومناطق فاقدة للكوروفيل بشكل الحرف الانكليزي V تظهر على الوريقات مع تقزم شديد يسبب ظهور النباتات المصابة بهيئة ممسحة (Mop) بالإضافة الى ان النباتات المصابة تنتج درنات متشققة ومشوها [2;3]. جديرا بالذكر ان هنالك انواع أخرى تصاب بهذا الفايروس بالإضافة الى نبات البطاطا معظمها تعود الى العائلة الباذنجانية *Solanaceae* مثل نباتات التبغ والطماطة. ينتقل هذا الفايروس طبيعيا بواسطة الناقل *Spongospora subterranea* الذي يعود الى مملكة الطلائعيات Protista، رتبة *Plasmodiophorales* عائلة *Plasmodiophoraceae* والذي يسبب مرض الجرب المسحوق على البطاطا [2;4;5].

أن طريقة مصيدة التربة (Soil bait method) تستخدم لغرض عزل فايروس الممسحة القمي للبطاطا من التربة بواسطة زراعة نباتات كاشفة حساسة للإصابة بالفايروس مثل *Nicotiana benthamiana*، *N. debneyi* و *N. clevelandii* في

تربة ملوثة بالنائل *S. subterranea* الحامل لفايروس PMTV والذي عند اصابته للجذور ينقل اليها الفايروس الذي يصيب النبات في منطقة الجذور أولاً ثم يتحرك جهازياً في الاوعية الناقلة الى باقية أجزاء النبات [6;7]. تستخدم طرق مختلفة لغرض تشخيص فايروس الممسحة القمي للبطاطا في النباتات المصابة مثل الطرق المناعية التي تعتمد على التفاعل المناعي بين بروتينات الفايروس مثل غلافه البروتيني والاجسام المضادة المتخصصة. المثال الأبرز لهذه الطرق هو اختبار اليزا (Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) الذي يطبق بطريقتين الأولى باستخدام طبقتين من الاجسام المضادة Double antibody sandwich (DAS-ELISA) والثانية باستخدام ثلاثة طبقات من الاجسام المضادة Triple Antibody Sandwich (TAS-ELISA) [8;9]. أيضاً هناك الطرق الجزيئية التي تعتمد على مضاعفة جزء محدد من جينوم الفايروس وهذه الطرق تشمل تفاعل البلمرة المتسلسل بالنسخ العكسي Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) وتفاعل البلمرة المتسلسل بالنسخ العكسي الكمي quantitative RT-PCR (qRT-PCR) الذي يكشف ويقدر كمية الفايروس وبشكل دقيق. وهناك طريقة تجمع بين طريقتي التشخيص المناعية والجزيئية تسمى Immune capture RT-PCR [10;11].

استخدمت العديد من الطرق لغرض مقاومة فايروس الممسحة القمي للبطاطا وناقله الا انه لم توجد طريقة يمكن الاعتماد عليها في مقاومة الامراض التي يسببها [8]. لكن يعتبر استخدام الأصناف المقاومة من أكثر الطرق فعالية في مقاومة معظم الامراض النباتية ومنها الفايروسية ويمكن الحصول على هكذا أصناف باستخدام طريقة التربية النباتية التقليدية الا انه يعاب على هذه الطريقة انها تحتاج وقت طويل واموال وجهد أكثر مع عدم ضمان انتقال الجين المرغوب لوحده دون انتقال جينات أخرى غير مرغوبة ربما تؤثر بشكل او بأخر على قيمة الحاصل لذا كان لا بد من استخدام الطرق الحديثة كاستخدام الهندسة الوراثية التي تسمح بانتقال جين واحد او عدة جينات مرغوبة بشكل مباشر سواء بين الكائنات المتقاربة او حتى المتباعدة وراثياً [12]. توجد عدة استراتيجيات تستخدم الهندسة الوراثية لأجل انتاج النباتات المعدلة وراثياً المقاومة للفايروسات منها طريقة اسكات الجين (Gene silencing) ان هذه الطريقة عبارة عن ميكانيكية تنظيمية طبيعية موجودة في الحيوانات والفطريات والنباتات تستخدم من اجل السيطرة على التعبير الجيني بالإضافة الى عملها كوسيلة دفاعية طبيعية ضد الإصابة الفايروسية حيث تسمى هنا بعملية اسكات الجين المحث بالفايروس Virus induced gene silencing. تعتمد هذه العملية على سلسلة من النيوكليوتيدات المكتملة والمتخصصة للارتباط بتسلسل معين من سلسلة mRNA والتي تحث على تحطيم الـ mRNA او تثبط عملية ترجمته. تشمل هذه الطريقة سلسلة من المكونات تبدأ بشريط مزدوج من RNA الذي يثير او يحفز بروتين Dicer على تقطيعه الى قطع صغيرة طولها 21 الى 24 نيوكليوتيدة من الـ RNA تكون اما من نوع micro interfering RNA (miRNAs) او (siRNAs) small interfering RNA والذي بدوره يرتبط ببروتين Argonaute ليكون معقد يسمى بمعقد الاسكات (RNA induced silencing complex) في هذا المعقد يعمل الـ RNA القصير على توجيه وارتباط المعقد أعلاه بالـ mRNA وبعدها يعمل بروتين Argonaute على تقطيع الـ mRNA وبالتالي إيقاف عملية الترجمة والتعبير الجيني. استخدمت هذه الطريقة من قبل العديد من الباحثين لأجل مقاومة الفايروسات النباتية من خلال استخدام الهندسة الوراثية لغرض انتاج النباتات المعدلة وراثياً حيث يتم ادخال قطع قصيرة من RNA المكتملة لجزء من RNA الجينات المهمة والضرورية لدورة حياة الفايروسات الممرضة مثل جينات التكاثر والحركة الى داخل العائل بواسطة نواقل وراثية ليتكون بعدها شريط مزدوج من RNA الذي يحفز بدوره عملية الاسكات الجيني التي تسبب إيقاف تكاثر الفايروس وبالتالي مقاومته [13;14]. وبصورة عامة فإن عملية انتاج النباتات المعدلة وراثياً تتكون من أربعة مراحل تبدأ بعملية استخلاص (Extraction) الحامض النووي للفايروس ثم اجراء عملية كلونه (Cloning) بعدها عملية التحول (Transformation) وتنتهي بمرحلة تقييم المقاومة (Evaluation of resistance) في النباتات المعدلة وراثياً [15;16]. ان اهداف هذه الدراسة تشمل إيجاد طريقة فعالة لعزل فايروس الممسحة القمي للبطاطا من التربة وتشخيصها مناعياً واحيائياً وجزئياً بعد ذلك استخدامها في تقييم فعالية طريقة الاسكات الجيني في مقاومة الفايروس نفسه.

المواد وطرائق العمل

اجريت هذه الدراسة في معهد جيمس هاتن (The James Hutton Institute) الواقع في مدينة دندي/ اسكتلندا/ المملكة المتحدة.

عزل وتشخيص فايروس الممسحة القمي للبطاطا من التربة

اختبار مصيدة التربة Soil bait test

أجريت هذه التجربة لغرض التأكد من وجود فايروس الممسحة القمي للبطاطا وناقله في عينات التربة التي جمعت بشكل عشوائي من حقول موبوءة بهما تقع في مدينة دندي/ اسكتلندا/ المملكة المتحدة. وأيضاً تحديد الطريقة الأفضل في عملية العزل مع إمكانية عزل عذلة جديدة من هذا الفايروس. حضرت 3 مجاميع من نباتات التبغ *Nicotiana benthamiana* الحساسة للإصابة بالفايروس وناقله بعمر 4 أسابيع نامية في البيت الزجاجي تحت ظروف بيئة مسيطر عليها تتمثل بدرجة حرارة 25 مئوية و 16 ساعة اضاءة و 8 ساعات ظلام ورطوبة 75-80% وبواقع 10 نباتات في كل مجموعة. بعد عملية إزالة للسماد العضوي وغسل الجذور بحذر بماء مقطر نقلت المجموعة الأولى من النباتات الى اصص بلاستيكية سعة 0.5 كغ تحتوي 8 منها على تربة ملوثة فقط جمعت بشكل عشوائي من الحقول الموبوء بالفايروس وناقله بينما اثنتان تحتويان على سماد عضوي معقم بالاتوكليف للمقارنة ثم نقل نبات واحد لكل اصيص وسميت هذه الطريقة بالمباشرة بينما نقلت المجموعة الثانية الى اصص بلاستيكية بنفس السعة تحتوي 8 منها على خليط من التربة الملوثة أعلاه والسماد العضوي المعقم بنسبة 1:1 والاثنتان المتبقيتان مملوء بالسماد العضوي المعقم لغرض المقارنة أيضاً وسميت هذه الطريقة بالخليط اما المجموعة الثالثة فأنها نقلت الى حاويات سعة 800 مل

تحتوي 8 منها على 300 مل من المحلول المغذي (Formulex) الذي يحتوي على العناصر الغذائية الكبرى ومعظم العناصر الغذائية الصغرى) والمخلوط مع 30 غم من التربة الملوثة. اما الحاويتان المتنبهتان فكانت مملوءة فقط بالمحلول المغذي بنفس الكمية لغرض المقارنة وسميت هذه الطريقة بالمائية. نقلت بعدها جميع النباتات الى غرفة النمو (Growth chamber) تحت ظروف بيئية مسيطر عليها تشجع على احداث الإصابة بالنقل والفايروس وتتمثل بدرجة الحرارة 18 مئوي لمدة 16 ساعة اضاءة و 15 مئوي لمدة 8 ساعات ظلام والرطوبة 70%.

التشخيص الجزيئي لفايروس المسححة القمي للبطاطا وناقله *S.subterranea* باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل الكمي q RT-PCR و q PCR

بعد مرور 4 اسابيع من تاريخ بدء التجربة أجريت عملية التحقق من وجود الفايروس وناقله في جذور جميع نباتات التبغ *N. benthamiana* المستخدمة في اختبار مصيدة التربة. جمعت عينات من الجذور بشكل عشوائي من كل نبات وجرت عملية استخلاص الـ DNA الكلي بحسب طريقة العمل المرفقة مع عدة DNeasy Plant Mini Kit المجهزة من شركة Qiagen الألمانية بعدها حفظ الـ DNA في 30 مايكروليتر من الماء المقطر المعقم وجرى تقييم نقاوة وتركيز الـ DNA المستخلص باستخدام جهاز المطياف الضوئي Nanodrop ND-1000 وحفظ تحت درجة حرارة 20- مئوي لحين الاستخدام. اما الـ RNA الكلي فقد جرت عملية استخلاصه بحسب طريقة العمل المرفقة مع العدة RNeasy Plant Mini kit المجهزة من نفس الشركة أعلاه بعدها جرت عملية تقييم نقاوة والتركيز والحفظ بنفس الطريقة أعلاه.

استخدام التفاعل البلمرة المتسلسل الكمي (qPCR) Quantitative-Polymerase chain reaction لغرض تشخيص الناقل *S.subterranea* بحسب ما اوصى به [17].

حيث كان المسبار (Probe) بتسلسل ($5' \text{CAGACAATCGCACCCAGGTTCTCATG}3'$) و المحتوي على وحدات نيوكليوتيدية معلمة بجزيئات فلورية مشعة تتيح الرصد بعد عملية التزاوج بينه وبين الحمض النووي المكمل له بينما كان البادئ الامامي SsTQF بتسلسل ($3' \text{CCGGCAGACCCAAAACC}5'$) و البادئ العكسي

SsTQR ($5' \text{CGGGCGTCACCCCTTC}3'$). صممت هذه البادئات والمسبار لأجل استهداف مناطق ITS/1 و ITS/2 في الـ ribosomal DNA للناقل *S.subterranea* علما ان تكوين وتجهيز هذه البادئات والمسبار تم عن طريق الشركة الألمانية MWG-Biotech AG. كان مقدار حجم التفاعل لكل عملية تضاعف هو 25 مايكروليتر يتكون من الاتي: 12.5 مايكرو ليتر من TaqMan® Universal PCR وهو المخلوط الرئيسي المجهز من شركة Applied Biosystems و 1.5 مايكروليتر من البادئ SsTQF (تركيز 5 مايكرومولاري)، 1.5 مايكرو ليتر من البادئ SsTQR (تركيز 5 مايكرومولاري) و 0.5 مايكرو ليتر من المسبار SsTQP1 (تركيز 5 مايكرومولاري)، 2 مايكرو ليتر من عينات الـ DNA القالب و 7 مايكرو ليتر ماء مقطر خالي من انزيم RNase.

بالمقابل كان استخدام تفاعل البلمرة المتسلسل الكمي بالنسخ العكسي (Reverse transcriptase qPCR (RT-qPCR) بحسب الطريقة المتبعة [18] وكان المسبار (Probe) بتسلسل ($5' \text{ACCAGAACTACGGTGCCGCGTCG}3'$) بينما كان البادئ الامامي PMTV-1948 F بتسلسل ($5' \text{GTGATCAGATCCGCGTCCTT}3'$) والبادئ العكسي PMTV-2017R ($3' \text{CCACTGCAAAAAGAACCGATT TC}5'$) صممت هذه البادئات والمسبار لأجل ان تستهدف مناطق في جين الغلاف البروتيني (Coat protein) للفايروس المسححة القمي للبطاطا علما ان تكوين وتجهيز هذه البادئات والمسبار تم عن طريق نفس الشركة الألمانية المذكورة سابقا. كان مقدار حجم التفاعل لكل عملية تضاعف بنفس حجوم تفاعل qPCR الخاص بالناقل باستثناء تقليل كمية الماء المقطر الى 6.875 مايكرو ليتر و اضافة 0.125 مايكرو ليتر من الانزيم reverse transcriptase بتركيز (25 U) مع اضافة 2 مايكرو ليتر من الـ RNA كقالب للتفاعل بدلا من الـ DNA.

ولأجل تحديد ومتابعة تركيز الفايروس والناقل في العينات اثناء عملية التضاعف جرى الاعتماد على قيمة عتبة الدورة (cycle threshold (Ct) والتي هي عبارة عن عدد الدورات اللازمة لتجاوز الإشارات الفلورية في مستوى الخلفية وبكلمات أخرى هي عبارة عن المستوى الذي عند تجاوزه من قبل الكميات المتراكمة لإشارات الجزيئات الفلورية المولدة للضوء المرتبطة بالمسبار تكون النتيجة التشخيص إيجابية علما ان عدد الدورات هذا التفاعل هي 40 دورة وكلما قلت قيمة عتبة الدورة (Ct) دل على ان تراكيز الـ RNA او DNA للفايروس او ناقله في العينة عالية في حين كلما ازدادت قيمة العتبة (Ct) دل على ان تراكيز الفايروس او ناقله قليلة وبهذا تكون العلاقة بين التركيز وعدد الدورات او قيمة العتبة (Ct) هي علاقة عكسية. وكمثال على ذلك تركيز الفايروس او الناقل المكتشف في الدورة 25 هو اعلى من تركيزه في الدورة 35.

استخدمت الطريقة الموصى بها من قبل الشركة Applied Biosystems المورددة لجهاز التضخيم الحراري Applied Biosystems StepOne™ الخاص لكلى التفاعلين (qPCR) و (RTqPCR) وهي كالاتي: يبدأ التفاعل بدقيقتين على درجة حرارة 50 مئوي تتبعتها 10 دقائق على درجة حرارة 95 مئوي ثم دورة منكرة لأربعين مرة تتكون من 15 ثانية بدرجة حرارة 95 مئوي ودقيقة واحدة بدرجة حرارة 60 مئوي. علما انه في كل تفاعل يوجد هنالك عينات موجبة سواء للفايروس او الناقل وعينات سالبة والتي هي عبارة عن الماء المقطر فقط الذي يضاف للتفاعل بدلا عن الـ DNA او الـ RNA القالب.

**دراسات تشخيصية أحيائية، مناعية وجزينية لعزلة فايروس الممسحة القمي للبطاطا المعزولة من التربة
الاختبار الاحيائي**

لغرض تحديد شدة الامراضية لعزلة فايروس الممسحة القمي للبطاطا المعزولة من التربة أجريت عملية استخلاص للقاح الفايروس من النباتات المصابة وذلك من خلال سحق مجموعة من جذورها التي جمعت بشكل عشوائي في 10 مليلتر من المحلول الملحي الفوسفاتي (Phosphate-buffered saline) البارد باستخدام الهاون الخزفي المعقم بالاولئكليف. اخذ 3 مليلتر من اللقاح العالق ونشر بهدوء على أوراق نباتات التبغ *N. benthamiana* السليمة بعمر 4 أسابيع باستخدام القطن او السبابة بعد ارتداء كفوف معقمة. علما ان هذه الأوراق رشّت قبل عملية التلقيح بمسحوق الكربورندم (carborundum) الخادش لتسهيل تغلغل الفايروس الى داخل الانسجة النباتية. ترك اللقاح الفايروسي لمدة 3 دقائق على الأوراق ثم غسلت بالماء المقطر بلطف لغرض إزالة بقايا اللقاح ومسحوق الكربورندم. بعدها نقلت جميع النباتات الملقحة الى البيت الزجاجي تحت ظروف تتمثل بدرجة حرارة 25 مئوية و16 ساعة اضاءة و8 ساعات ظلام ورطوبة 75-80 وبعد أسبوع من عملية التلقيح تمت عمليه المتابعة اليومية لحين ظهور الاعراض المرضية المميزة للإصابة بفايروس الممسحة القمي على البطاطا [3].

الاختبار المناعي TAS-ELISA

استخدم اختبار اليزا ثلاثي الطبقات (TAS-ELISA) لغرض تأكيد تشخيص عزلة فايروس الممسحة القمي للبطاطا في عينات أوراق نبات التبغ الملقحة وكذلك دراسة العلاقة المناعية بين بروتينات الفايروس والاجسام المضادة القياسية التي تستخدم في الكشف عن الفايروس نفسه. حضر المستخلص النباتي من الأوراق والجذور الطازجة المصابة وذلك باستخدام ماكينة العصر والاستخلاص MEKU ونقل 100 مايكرو ليتر من كل عينة مستخلص الى الحفر الموجودة في طبق Microtiter (96-well, Nunc-Immuno™ plates) التي تحوي الاجسام المضادة متعددة النسائل (polyclonal antibody) كطبقة اولى مضادة لفايروس الممسحة القمي للبطاطا بعدها حضن الطبق تحت درجة حرار 4 مئوية لمدة 10-12 ساعات تقريبا. غسل الطبق عدة مرات باستخدام محلول الغسل الملحي الفوسفاتي-توين (PBS-T) Phosphate-buffered saline-Tween واضيف الى كل حفرة 100 مايكرو ليتر من الاجسام المضادة أحادية النسائل (monoclonal antibody) الخليط التي تتكون من SCR68 + SCR69 كطبقة ثانية. حضن الطبق بعدها تحت درجة حرارة 37 مئوية لمدة ساعتين ثم غسل بمحلول الملحي الفوسفاتي-توين (PBS-T) عدة مرات ثم أضيف 100 مايكروليتر من الاجسام المضادة anti-mouse immunoglobulin G (IgG) المرتبطة بانزيم alkaline phosphatase كطبقة ثالثة ثم حضن الطبق تحت درجة الحرارة 37 مئوية لمدة ساعتين بعدها غسل بنفس محلول الغسل أعلاه. اخيرا اضيف 100 مايكروليتر من محلول p-Nitrophenyl phosphate لغرض الكشف عن فعالية انزيم alkaline phosphatase. حضن الطبق بدرجة حرارة الغرفة لمدة ساعة كاملة بعدها استخدم جهاز Multi-skan Ascent الذي يقيس امتصاصية العينات في الحفر على الطول الموجي 405 نانوميتر. العينات تعتبر موجبة أي مصابة بالفايروس عندما تكون قيمة الامتصاص اعلى بمرتين من عينات المقارنة الخاصة بالنباتات غير المصابة بالفايروس [3; 9].

الاختبارات الجزينية

جرت عملية استخلاص RNA الكلي من نباتات التبغ المصابة وغير المصابة بحسب طريقة العمل المرفقة مع العدة RNeasy Plant Mini kit بعدها جرت عملية تقييم النقاوة والتركيز والحفظ بنفس الطريقة أعلاه. حضر الـ DNA المتمم (Complementary DNA (cDNA) وذلك بخلط 5 مايكرو ليتر من الـ RNA تركيز (0.5-1 مايروغرام) مع 8 مايكرو ليتر من الماء المقطر مع إضافة 2 مايكرو ليتر من البادئ العكسي تركيز (10 بيكومولاري / مايكروليتر). حضن الخليط تحت درجة حرارة 70 مئوية لمدة خمسة دقائق بعدها نقل مباشرة الى وعاء يحتوي على الثلج وحضن لمدة دقيقتين. أضيف الى الخليط بعدها 5 مايكرو ليتر من محلول النسخ العكسي M-MLV ، 1 مايكرو ليتر من انزيم النسخ العكسي M-MLV (تركيز 200 وحدة)، 5 مايكرو ليتر من dNTPs (تركيز 10 ملي مولاري)، 1 مايكرو ليتر من انزيم المانع RNasin (تركيز 30 وحدة) و 3 مايكرو ليتر من الماء المعقم الخالي من RNA. مزج الخليط بهدوء ثم حضن تحت درجة حرارة 42 مئوية لمدة ساعتين. بعد انتهاء التفاعل أخذ 3 مايكرو ليتر من الـ DNA المتمم (cDNA) ليستخدم كقالب في التفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR) القياسي الخاصة بالكشف عن فايروس الممسحة القمي للبطاطا وحسب الطريقة المتبعة [7] مع بعض التعديلات.

الحجم النهائي للتفاعل كانت 50 مايكروليتر ويتكون من 10 مايكرو ليتر من محلول GoTaq تركيز X5، 3 مايكروليتر من MgCl₂ (تركيز 25 ملي مولاري)، 1 مايكروليتر من dNTPs (تركيز 10 ملي مولاري)، 1 مايكروليتر من كل من البادئات (3`5`-TTCGGATCCTCTCGGATAC`3) و (3`5`-AACAGCCATCTTACCTGC`3) (Rev. 5`3`-TTCGGATCCTCTCGGATAC`3) مولاري/مايكروليتر، 1 مايكرو ليتر من الانزيم Taq polymerase (تركيز 5 وحدة) و 3 مايكروليتر من ناتج cDNA ويتم الحجم بالماء المقطر.

برنامج التضاعف يبدأ بخطوة التفكك Denaturation، لمدة دقيقتين بدرجة حرارة 95 مئوية ثم 40 دورة تتكون من ثلاثة مراحل: تبدأ بالتفكك لمدة دقيقة ونصف بدرجة حرارة 94 مئوية ثم الالتصاق Annealing لمدة دقيقة ونصف بدرجة حرارة 54 مئوية بعدها التمدد Extension لمدة دقيقتين ونصف بدرجة حرارة 72 مئوية. بعدها تبدأ الخطوة الأخير للتفاعل التمدد النهائي Final extension لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة 72 مئوية. ناتج التفاعل يفحص على وسط Agrose تركيز 1% بعد إضافة صبغة بروميد الاثيديوم وباستخدام الاشعة فوق البنفسجية. بعدها أرسل ناتج التفاعل الفائض الى وحدة التسلسل النوكليوتيدي التابعة لمعهد جيمس هاتن التي تستخدم جهاز 3730 DNA Analyser. بعدها استخدم برنامج BioEdit لغرض تحليل البيانات

ثم استخدم برنامج Blast لمقارنة التسلسل النووي تيدي المستحصل عليه مع ما منشور عالميا على موقع المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) National Center for Biotechnology Information.

تقييم كفاءة طريقة الاسكات الجيني في مقاومة فايروس الممسحة القمي للبطاطا

تأكيد نباتات التبغ *N.benthamiana* المعدلة وراثيا بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR)

انتجت نباتات التبغ *N.benthamiana* المعدلة وراثيا في مختبرات معهد جيمس هاتن وذلك بالاستناد الى طريقة اسكات الجين التي تعمل على اسكات او إيقاف ترجمة جين انزيم RNA dependent RNA polymerase (RdRp) الذي يقع في الـ RNA1 من جينوم فايروس الممسحة القمي للبطاطا علما بان هذا الجين مهم لعملية التعبير الجيني والتكاثر للفايروس [19; 20] ولغرض التأكد من ان نباتات التبغ *N.benthamiana* المستخدمة في هذه الدراسة من انها معدلة وراثيا أجري التفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase chain reaction للكشف عن جين (RdRp). جرت عملية استخلاص DNA الكلي من عدة اوراق مأخوذة بصورة عشوائية من عدة نباتات تبغ معدلة وراثيا وذلك بحسب طريقة العمل المرفقة مع العدة DNeasy Plant Mini kit المجهزة من نفس الشركة أعلاه. ثم أجريت عملية التفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام بادئات خاصة تستهدف الجين المحدد وكانت (R: 5`GTCCACGGCATGTTTTGACT`3) + (F: 5`GTTAGCGTTAAAGAAATATA`3) كان حجم التفاعل الكلي 25 مايكروليتر يحتوي 2.5 مايكروليتر من محلول GoTaq (تركيز X5) ، 3 مايكروليتر من MgCl₂ (تركيز 25 ملي مولاري)، ونصف مايكروليتر من كل من dNTPs (تركيز 10ملي مولاري) و البادئات F+R (تركيز 10 بيكومولاري/ مايكروليتر) و انزيم التضاعف Taq polymerase (تركيز 5 وحدات) ثم اضيف 2 مايكروليتر من الـ DNA واكمل الحجم بالماء المعقم. برنامج التضاعف يبدأ بخطوة التفكك Denaturation، لمدة خمسة دقائق بدرجة حرارة 94 مؤي ثم 35 دورة تتكون من ثلاثة مراحل: الأولى التفكك لمدة دقيقة بدرجة حرارة 94 مؤي ثم المرحلة الثانية الالتصاق Annealing لمدة دقيقة بدرجة حرارة 59 مؤي بعدها المرحلة الثالثة التمديد Extension لمدة دقيقة بدرجة حرارة 72 مؤي. بعدها تبدأ الخطوة الأخير Final extension للتفاعل لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة 72 مؤي. ناتج التفاعل يكون بحجم 300 نيوكليوتيدة يفحص على وسط Agrose تركيز 1% بعد إضافة صبغة بروميد الاثيديوم وباستخدام الاشعة فوق البنفسجية.

اختبار كفاءة طريقة الاسكات الجيني في مقاومة فايروس الممسحة القمي للبطاطا في نباتات التبغ *N.benthamiana* المعدلة وراثيا

نفذت الطريقة المائية باستخدام لقاح التربة الملوثة بالعزلة الجديدة لفايروس الممسحة القمي للبطاطا لغرض تقييم كفاءة طريقة الاسكات الجيني ضد الفايروس حيث نقل 20 نبات بعمر 4 أسابيع من نباتات التبغ *N.benthamiana* المعدلة وراثيا بالإضافة الى نفس العدد من النباتات غير المعدلة وراثيا للمقارنة الى حاويات سعة 800 مل تحتوي 36 منها على 300 مل من المحلول المغذي (Formulex) + 30 غم من التربة الملوثة اما الأربعة حاويات المتبقية فأنها مملوء فقط بالمحلول المغذي بنفس الكمية لغرض المقارنة وجرى توزيع مجموعتي النباتات بالتساوي بواقع 18 نبات للمعاملة + 2 نباتات للمقارنة علما ان سبب اختيار الطريقة المائية يعود الى نتائج اختبار مصيدة التربة والتي سوف نصفها لاحقا. نقلت بعدها جميع النباتات الى غرف نمو بطروف بيئية مسيطر عليها تشجع على احداث الإصابة بالفايروس وناقله وتتمثل بدرجة الحرارة 18 مؤي لمدة 16 ساعة أضواء و 15 مؤي لمدة 8 ساعات ظلام والرطوبة 70%.

بعد مرور 6 أسابيع من بداية التجربة جمعت عينات من الجذور والأوراق من جميع نباتات *N.benthamiana* المعدلة و غير المعدلة وراثيا حيث تم استخلاص الـ DNA و الـ RNA واجريه تفاعل البلمرة المتسلسل الكمي بالنسخ العكسي لتشخيص فايروس الممسحة القمي للبطاطا في الأوراق والجذور و تفاعل البلمرة المتسلسل الكمي لتشخيص الناقل *S. subterranea* في الجذور فقط بنفس الطريقة المذكورة سابقا.

التحليل الاحصائي

استخدم التصميم تام العشوائية Completely Randomized Design (CRD) عند اجراء التجارب المختبرية مع استخدام برنامج Genstat package V. 16.1 لغرض تحليل البيانات احصائيا وكانت الفروقات تعتبر معنوية عندما تكون الاحتمالية (P) اقل من 0.05 فقط. بالإضافة الى ذلك استخدم تحليل الارتباط باستخدام نفس البرنامج اعلاه لغرض دراسة العلاقة بين نسبة وكمية الإصابة بالناقل والفايروس في النباتات المعدلة وغير المعدلة وراثيا.

النتائج والمناقشة

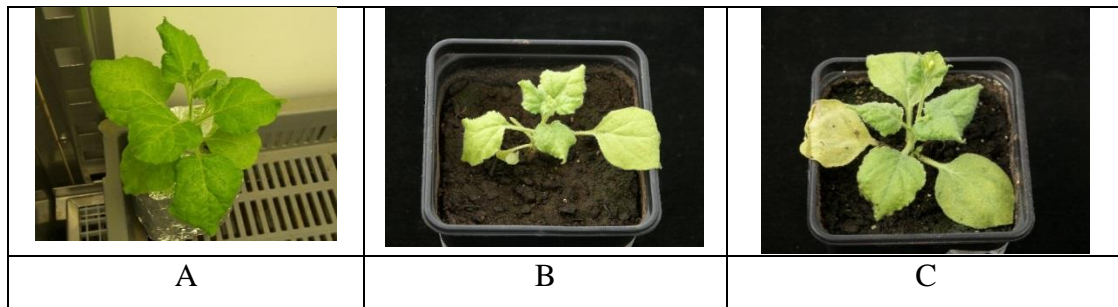
عزل وتشخيص فايروس الممسحة القمي للبطاطا PMTV من التربة

بينت النتائج الموضحة في جدول رقم (1) ان الطريقة المائية هي الأفضل في تقييم التربة الملوثة إذا انها الوحيدة التي من خلالها تم تشخيص فايروس الممسحة القمي للبطاطا PMTV وناقله *S. subterranea* في عينات جذور النباتات المدروسة وهذه النتيجة تتوافق مع وجده سابقا [21] من ملائمة الطريقة المائية في تقييم الترب الملوثة بفايروس الممسحة القمي للبطاطا في مناطق مختلفة في اليابان. بينما قد يعود سبب عدم تشخيص الفايروس وناقله في النباتات المزروعة في الطريقة الأولى (المباشرة) والثانية (خليب) الى التغيير في تركيبة التربة حيث لوحظ ان التربة في الطريقتين أعلاه كانت ثقيلة ومضغوطة مما أثر بشكل مباشر على نمو النباتات فيهما بحيث كان النمو بشكل عام ضعيف مقارنة بالنباتات النامية بالطريقة المائية كما يلاحظ في الصور رقم (1). هذا التفسير يتوافق مع ما ذكر سابقا [22] من ان تركيبة التربة تؤثر على نمو النبات بعدة طرق منها ان التربة الثقيلة

والمضغوطة تؤثر سلبا وبشكل كبير على نمو الجذور الذي يعتبر الجزء النباتي الأكثر أهمية لدورة الامراض التي تبدأ في الجذور مثل الإصابة بالناقل *S. subterranea* والذي بواسطته تحصل عملية نقل لفايروس الممسحة القمي للبطاطا الى داخل النبات فضلا على انه ضعف نمو الجذور بسبب ضعف عملية امتصاص الماء والعناصر الغذائية وبالتالي ضعف نمو المجموع الخضري. أيضا وجدا انه تركيبة التربة تؤثر على نشاط وحركة ابواغ الناقل *S. subterranea* حيث ان أفضل التربة هي تلك التي تحتوي مساحات مسامية واسعة نسبيا كما في التربة الرملية والمزيجية تحتفظ بالماء المهم لحركة ابواغ الناقل *S. subterranea* بينما ينخفض نشاطها وحركتها في التربة الطينية الثقيلة [25;24;23].

جدول رقم (1) تقييم كفاءة طرق الزراعة المستخدمة في اختبار مصيدة التربة في عزل وتشخيص فايروس الممسحة القمي للبطاطا وناقله *S. subterranea*

التشخيص الجزيئي	الطريقة المباشرة	الطريقة الخليط	الطريقة المائية
ف فايروس الممسحة القمي للبطاطا	-	-	+
الناقل الناقل <i>S. subterranea</i>	-	-	+
الإشلاء الإشارة الموجبة (+) تعني تشخيص الفايروس والناقل في عينات الجذور المدروسة بينما الإشارة السالبة (-) تعني عدم تشخيصهما.			

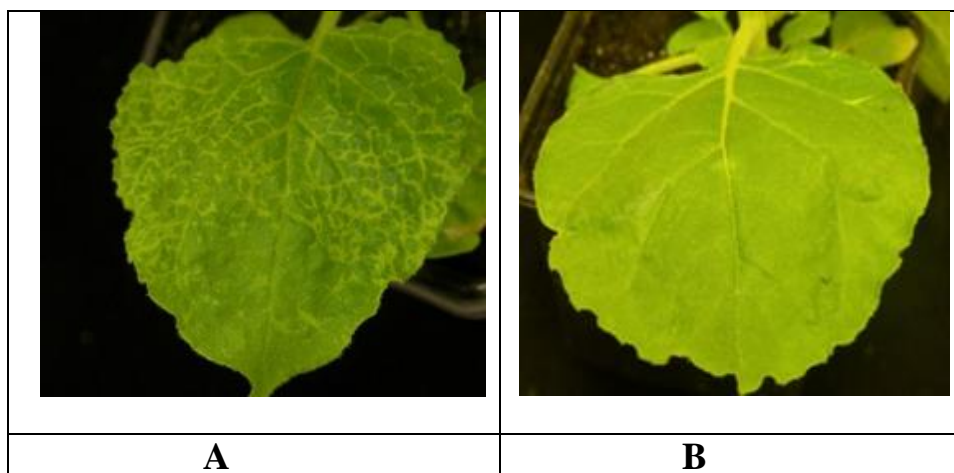


شكل رقم (1) عينة من النباتات النامية بالطرق الثلاث المختلفة المستخدمة في اختبار مصيدة التربة

- (A) (A) نبات نامي بالطريقة المائية
(B) (B) نبات نامي بطريقة الخليط
(C) (C) نبات نامي بالطريقة المباشرة

دراسات تشخيصية أحيائية، مناعيا وجزينيا لعزلة فايروس الممسحة القمي للبطاطا المعزولة من التربة الاختبار الاحيائي

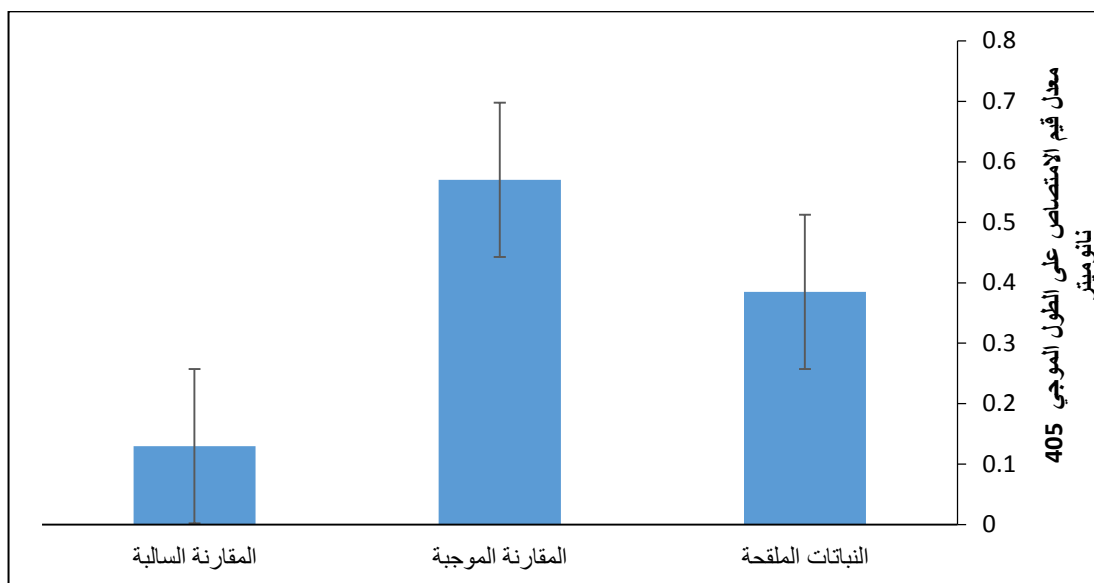
ان الهدف من اجراء هذا الاختبار هو لتحديد مدى شدة إمرضيه عزلة فايروس الممسحة القمي للبطاطا المعزولة من التربة بالطريقة المائية والتي سميت PMTV-Feb₁₂. سجلت سابقا عدة عزلات وسلالات تابعة لفايروس الممسحة القمي للبطاطا مثل PMTV-T و PMTV-S تختلف في تأثيرها على العوائل الحساسة فمنها من شديدة الامراضية تسبب في اظهار اعراض مرضية تدل على شدتها بينما هنالك أخرى ضعيفة لا تسبب في اظهار أي اعراض مرضية [4] وقد أظهرت النتائج الموضحة في صورة رقم (2) ان عزلة الفايروس PMTV-Feb₁₂ هي من نوع شديدة الامراضية وذلك من خلال ظهور اعراض مرضية جهازية في الأوراق التي تقع فوق الأوراق الملقحة بعد 15 يوم من عملية التلقيح تتمثل بالخطوط الفاقدة للكوروفيل وهي الاعراض النموذجية للإصابة بفايروس الممسحة القمي للبطاطا في نباتات *N. benthamiana* الحساسة مقارنة بالأوراق غير الملقحة التي لم تظهر عليه أي اعراض [26]. جدير بالإشارة هنا الى ان هذه عزلة PMTV-Feb₁₂ يمكن ان تنتقل ميكانيكيا وبواسط الناقل *S. subterranea* مثلما يحدث مع السلالة PMTV-S وهذا يشير الى عدم وجود طفرة وراثية في جين الغلاف البروتيني لفايروس الممسحة القمي للبطاطا والتي حدوثها يسبب في عدم إمكانية نقل الفايروس بواسط الناقل *S. subterranea* كما اكتشف في سلالة PMTV-T والتي تنتقل ميكانيكيا فقط [27].



صورة رقم (2) اعراض الإصابة بفايروس الممسحة القمي للبطاطا عزلة PMTV-Feb12 على اوراق نبات *N. benthamiana* بعد اجراء عملية التلقيح اليدوي. ظهور اعراض الإصابة المتمثلة بالخطوط المصفرة الفاقدة للكlorوفيل اوراق النباتات الملقحة (A) بينما اعراض الإصابة لم تظهر على اوراق نباتات المقارنة (B).

الاختبار المناعي TAS-ELISA

اكتشف الفايروس بواسطة طريقة TAS-ELISA في جميع عينات الاوراق المأخوذة من نباتات التبغ الملقحة بالفايروس بعد اسبوعين من اجراء عملية التلقيح حيث كان معدل قيم الامتصاص على الطول الموجي 405 للنباتات الملقحة 0.38 وللنباتات المقارنة الموجبة 0.57 وهذه القيم أعلى بمرتين من القيم في عينات النباتات المقارنة السالبة 0.13 الخاصة بالنباتات غير الملقحة شكل رقم (1). وتشير هذه النتائج ايضا الى ان بروتينات عزلة فايروس الممسحة القمي للبطاطا المعزولة من التربة والتي سميت PMTV-Feb₁₂ لها خصائص مستضدة ثابتة مشابهة لبروتينات سلالات فايروس الممسحة القمي للبطاطا مثل PMTV-S و PMTV-T و PMTV-Sw المكتشفة سابقا [28;27] والتي استخدمت في انتاج الاجسام المضادة القياسية المستخدمة في اجراء اختبار TAS-ELISA [9;8]

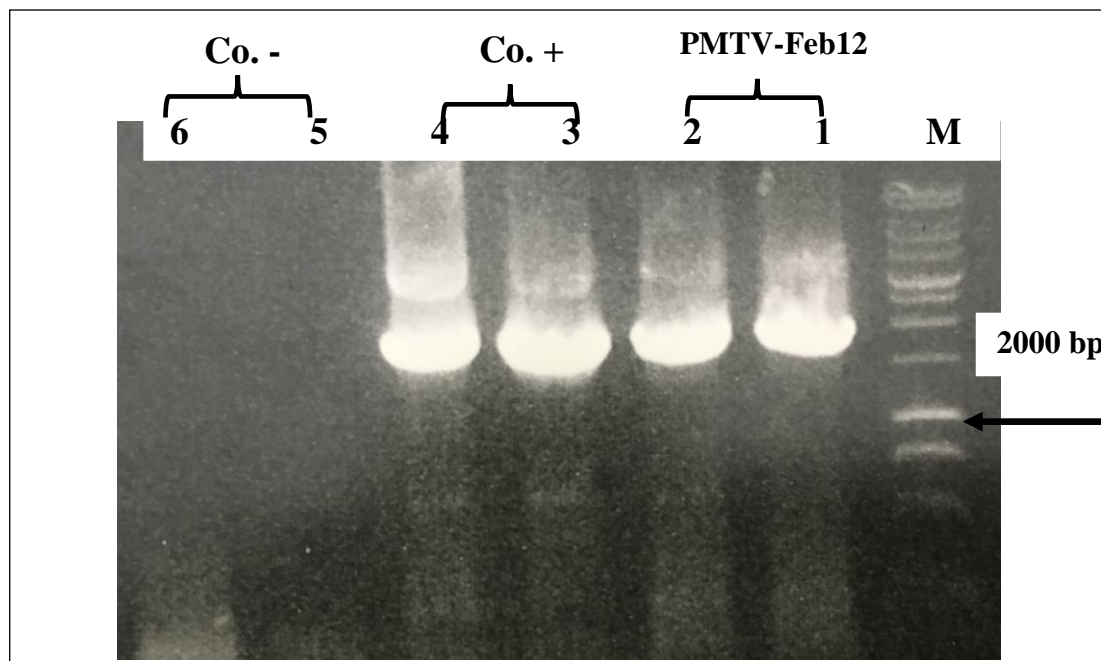


شكل (1): معدلات قيم الامتصاص على الطول الموجي 405 نانوميتر الخاصة في الكشف عن فايروس الممسحة القمي للبطاطا في اوراق نباتات التبغ الملقحة ونباتات المقارنات الموجبة والسالبة.

الاختبارات الجزيئية

اجريت طريقة تفاعل البلمرة المتسلسل بالنسخ العكسي (RT-PCR) لغرض تأكيد تواجد عزلة الفايروس الممسحة القمي للبطاطا PMTV-Feb12 في نباتات التبغ الملقحة. لقد كان حجم ناتج عملية التضاعف للعينات كما موضح بالشكل رقم (2) وتحديد الخط الأول والثاني هو الحجم المتوقع (تقريبا 2000 زوج قاعدي) والذي كان مماثلا لحجم عينة المقارنة الموجبة الواضحة في الخط الثالث والرابع بينما لم ينتج لعينة المقارنة السالبة المأخوذة من النباتات السليمة الغير ملقحة أي ناتج تضاعف وكما هو واضح في الخط الخامس والسادس. تسلسل النيوكليوتيدات لناتج عملية التضاعف في العينات أعلاه حدد وتمت مقارنته مع

ما موجود في موقع المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) حيث أوضحت نتائج التحليل انه على الرغم من ان طول التسلسل النيوكليوتيدي المستحصل على لعزلة الفايروس PMTV-Feb12 المدروسة قصير نسبيا الا انها أظهرت ان هنالك نسبة تشابه كبيرة بينها وبين العزلات العالمية لفايروس المسححة القمي للبطاطا تصل الى 70% شكل رقم (3).



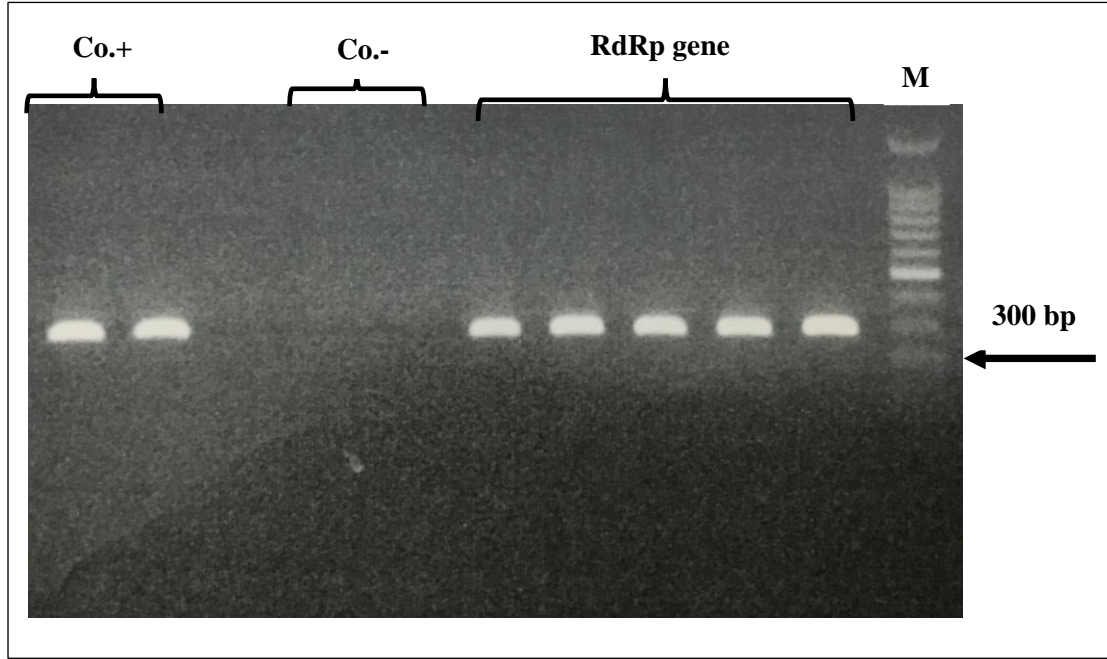
شكل (2): الكشف عن نتائج عملية التضاعف بطريقة تفاعل البلمرة المتسلسل بالنسخ العكسي لفايروس المسححة القمي للبطاطا باستخدام الترحيل الكهربائي. (M) مقياس وراثي (1 kbp) لتحديد حجم DNA العينات، (Co.+) المقارنة الموجبة، (Co.-) المقارنة السالبة.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
358 bits(396)	9e-95	408/548(74%)	0/548(0%)	Plus/Plus
Query 1	TGGAAATTTACCTGCTGGTAATAAATTGTGCGTATGAGCGAATAAAAACCGAAAAC	60		
Sbjct 239	TGGAAGTTCACCTTGTGGTGATAAATTGTACGTATGTCTGAATGAAACCGAATGAAAAC	298		
Query 61	CGTGTGGAATAATATAAAGTGCAGCGTGGCGGATAGCGAACGTCGTCGTCGGGGCAAAC	120		
Sbjct 299	CGCGTTGAATAATATAAATTGTAGCGTTGCAGATAGTGAACGGCGAAGGGCGGGCAAGACG	358		
Query 121	ATTTCGTAGCGAACGTAGCTTTTCGTGAACATCGTCGTCGGCGGCTAACGTAGCGAATGCGGC	180		
Sbjct 359	ATTAGGTCCGAGAGAAGCTTCCGCGAACACCGGGGGGAGGATAGCGCTCTGAATGTGGC	418		
Query 181	ACCAGCACCCGTCGTCGGCGCGCTTTTATTAATAAATAAATAAATTTTGAACGTAGCTGC	240		
Sbjct 419	ACATCAACTCGCAGAGGTGGACGATTTATTAAGTGAAGTTTTGTAGAGAAGCTGT	478		
Query 241	TTTTATAGCGGCCAGATTTAAGCGCGTGAACGTGTGACCCCTGGGCTGGTGCATTGCGATT	300		
Sbjct 479	TTTTACTCAGGACAAATATGAGTCTCGTGAACGGGTTACGCTGGGCTGGTGCATAGCAATT	538		
Query 301	AACCGTAGCGGCTTTTCTGGTGCCTCGTCAGCGTTCGTTATCGTCGTAACATAAAGCACC	360		
Sbjct 539	AACCGCTCAGGCTTTTCTGGTTTACGCTCAACGCGCTATCGACGAAATTGATAATCGACT	598		
Query 361	GCGAGCGGGCGGCTGCGTGAAAACCATTCGTCGGGCGGGCAAAGCCGTCGGTGGAGCAGC	420		
Sbjct 599	GCTAGCGCGGCTGCGTTAAGACTATTGCCCTGGGCGGCAAATCACGTGGATGGTCTAGT	658		
Query 421	GTGTATAAAGTGCCTACCATTGGCTAAAGCATTGAATGCTGCTGGCGTGAATATTTTACC	480		
Sbjct 659	GTCTATAAATTACGCACAATTGGATAGAGCATTGAGTGTGTTGGTGGGAATATTTTACC	718		
Query 481	AGCGATGTGGGCGATAACAGCTAACGTAAAAAAAAAAGCGATTACCTAAGGCCAGAGCTAT	540		
Sbjct 719	TCAGACGTTGGAGATAACTCGTGACGAAAGAAAAGCAATTACCTGAGGTCAGAGTTAT	778		
Query 541	CGTCGTCG	548		
Sbjct 779	CGACGGCG	786		

شكل (3): المقارنة بين تسلسل النيوكليوتيدي للجين CPRT العائد لعزلة الفايروس PMTV- Feb₁₂ (Query) مع التسلسل النيوكليوتيدي النموذجي (Sbjct) العائدة لنفس الجين لعزلات الفايروس المسححة القمي للبطاطا والموجود في موقع المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI).

تقييم كفاءة طريقة الاسكات الجيني ضد فايروس الممسحة القمي للبطاطا في نباتات التبغ *N.benthamiana* المعدلة وراثيا
التأكيد الجزيئي للتعديل الوراثي لنباتات التبغ *N.benthamiana* المدروسة

استخدمت طريقة تفاعل البلمرة المتسلسل لغرض تأكيد ان جين RdRp موجود ومتضمن في النباتات المعدلة وراثيا من خلال استخدام بادئات تستهدف تضاعف جزء مميز منه حيث كانت نتيجة التضاعف الجزيئي شكل رقم (4) الحصول على الحجم المتوقع من الـ DNA ومقدارها 300 زوج قاعدي لجميع العينات المعدلة وراثيا والتي كانت مماثلة لحجم الـ DNA في المقارنة الموجبة بينما لم يتم ملاحظة أي تضاعف للـ DNA في المقارنة السالبة والتي كانت نباتات غير معدلة وراثيا.

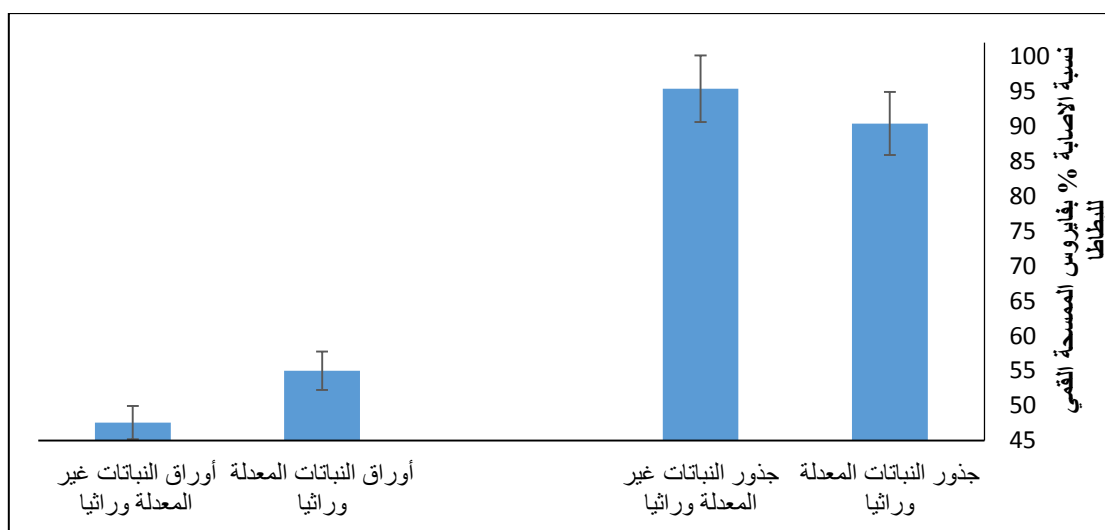


شكل (4): الكشف عن ناتج عملية التضاعف بطريقة تفاعل البلمرة المتسلسل لجزء مميز من الجين RdRp العائد لفايروس الممسحة القمي للبطاطا باستخدام الترحيل الكهربائي. (M) مقياس وراثي (100 bp) لتحديد حجم DNA العينات ، (RdRp) تضاعف جزء من جين انزيم النكاث لفايروس الممسحة القمي للبطاطا، (Co.+) المقارنة الموجبة، (Co.-) المقارنة السالبة.

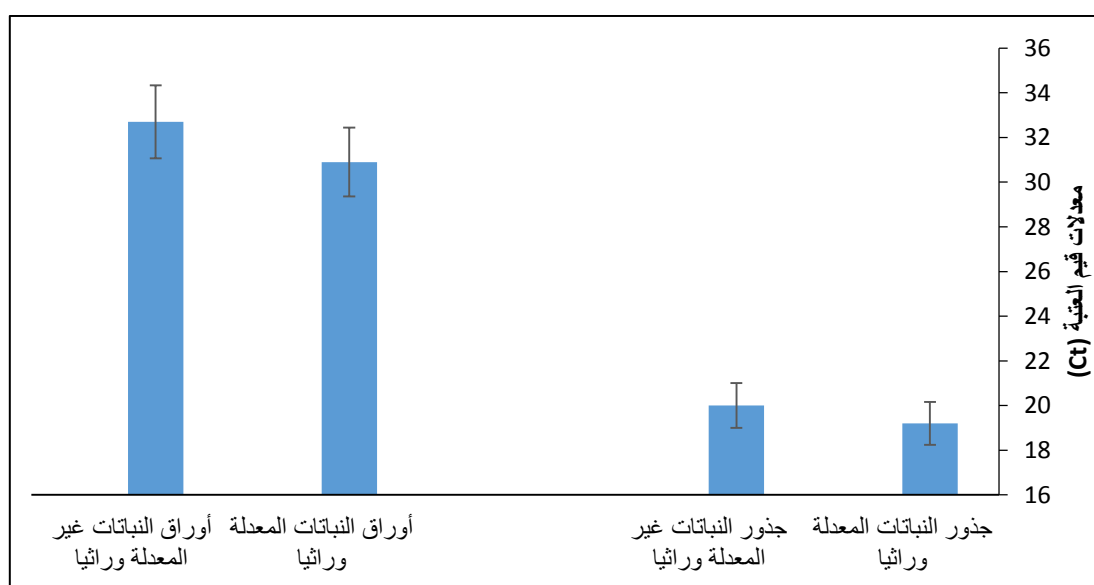
اختبار المقاومة لفايروس الممسحة القمي للبطاطا في جذور واوراق نباتات التبغ *N.benthamiana* المعدلة وراثيا

اجرى التقييم من خلال تحديد نسبة حدوث الإصابة بفايروس الممسحة القمي للبطاطا في جذور واوراق نباتات التبغ المعدلة وغير المعدلة وراثيا باستخدام طريقة تفاعل البلمرة المتسلسل الكمي بالنسخ العكسي RT-qPCR. حيث لوحظ انه بالرغم من عدم وجود فروق معنوية بين المعاملات الا انه نسبة الإصابة في جذور النباتات المعدلة وراثيا كان الاقل حيث بلغ (90.4 % في حين بلغ في جذور النباتات غير المعدلة وراثيا (95.4%) ومن ناحية أخرى كان مستوى الإصابة في أوراق النباتات المعدلة وراثيا اكثر (55 %) مما كان في أوراق النباتات غير المعدلة وراثيا (47.6 %) شكل (2). وبصورة عامة فانه مستوى الإصابة في الأوراق كان اقل مما في الجذور سواء كانت للنباتات المعدلة او غير المعدلة وراثيا.

من جانب اخر اظهرت النتائج الموضحة في شكل (3) أن مستوى تركيز الـ RNA لفايروس الممسحة القمي للبطاطا المكتشف في جذور واوراق النباتات المعدلة وراثيا كان اعلى (قيم العتبة =Ct 30.9 و 19.2 على التوالي) بالمقارنة مع ما موجود في جذور واوراق النباتات غير المعدلة وراثيا (قيم العتبة =Ct 20 و 32.7 على التوالي). وبصورة عامة فانه تركيز الحامض النووي الخاص بالفايروس كان في الأوراق اقل مما في جذور النباتات المعدلة وغير المعدلة وراثيا. علما انه لم توجد فروقات معنوية بين المعاملات.



شكل (5): معدلات نسبة الإصابة بفيروس المسحة القمي للبطاطا في جذور واوراق النباتات المعدلة وغير المعدلة وراثيا. البيانات مع الخطأ القياسي هي عبارة عن معدلات الإصابة بالفيروس المشخص بطريقة RT qPCR في جذور واوراق النباتات المعدلة وغير معدلة وراثيا.



شكل (6): معدلات قيم العتبة (Ct) لتشخيص فيروس المسحة القمي للبطاطا في جذور واوراق النباتات المعدلة وغير المعدلة وراثيا. البيانات مع الخطأ القياسي هي عبارة عن معدلات الإصابة بالفيروس المشخص بطريقة RT-qPCR في جذور واوراق النباتات المعدلة وغير معدلة وراثيا.

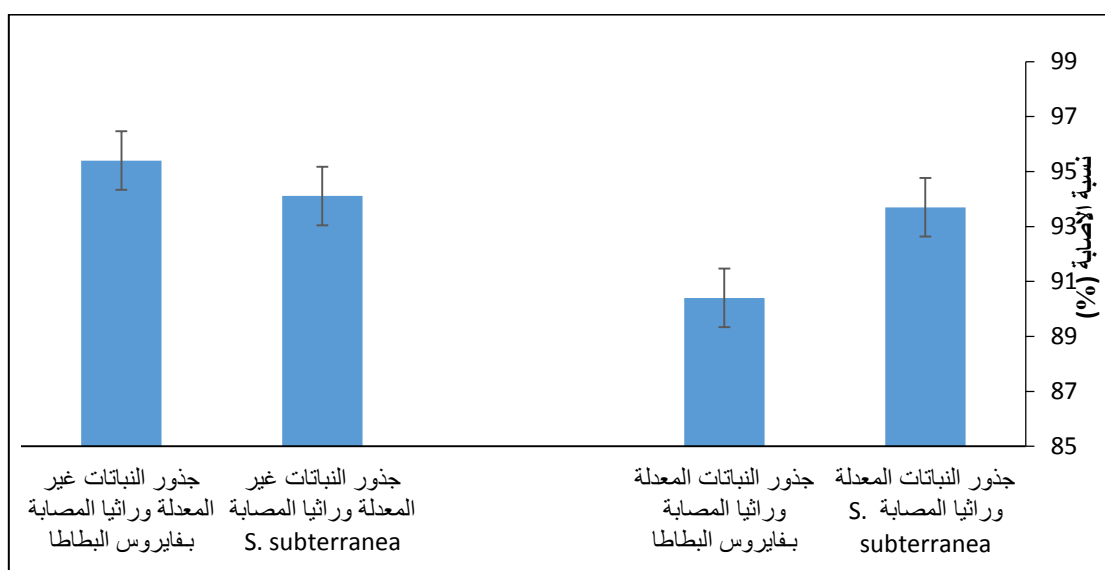
ان طريقة الاسكات الجيني تنظم العديد من العمليات الحيوية المهمة في الكائنات الحية منها تكوين الدفاعات ضد الإصابات الفيروسية [29;30]. تم الاستدلال على هذه الطريقة من خلال عدة ملاحظات منها الارتفاع العالي في تركيز التراكيب الـ RNA المتداخلة القصيرة التي تستهدف RNA الفيروسات لأجل تحطيمه اثناء عملية الإصابة. بالإضافة الى ذلك معظم اذا لم تكن كل الفيروسات النباتية قد طورت بروتينات تسمى بالكابح الفيروسي لـ RNA (viral suppressor of rna silencing) للتغلب على عملية اسكات الجين المسؤولة عن مقاومة العائل للإصابة الفيروسية وبالتالي استمرار الإصابة بالفيروس. يوجد هنالك أكثر من 50 كابح فيروسي تم التعرف عليها تقريبا في كل اجناس الفيروسات النباتية حيث وجدنا عمليا ان كل فيروس نباتي يكون على الأقل كابح واحد [31;32]. ومن هذه الفيروسات فايروس المسحة القمي للبطاطا حيث حدد أحد جيناته وهو جين البروتين الغني بالسيسئين (CRP) الذي يقع في الـ RNA الثاني لجينوم الفيروسي على انه هو كابح ضعيف لعملية الاسكات الجيني [33]. وقد يكون الكابح (CRP) هو السبب وراء عدم وجود فروق معنوية بين النباتات المعدلة وغير المعدلة وراثيا بنسبة الإصابة وتركيز الحامض النووي لفايروس المسحة القمي للبطاطا وهنا لا بد من الإشارة الى ان هذه النتيجة تتعارض مع نتائج الدراسة السابقة [33] التي أوضحت ضعف كابح (CRP) ولكن في هذه الدراسة اظهر فعالية واضحة كانت كافية في تقليل او تثبيط عملية الاسكات الجيني المستخدمة في انتاج نباتات التبغ المعدلة وراثيا. وبصورة عامة يعتبر تكوين الكوابح الفيروسية عملية حديثة التطور في صراع لي الاذرع الدائر بين العائل النباتي والفايروس.

ولقد وجدنا عمليا ان كل خطوات عملية اسكات الجين تستهدف بواسطة الكوايح الفايروسية وتكون عملية الاستهداف بطريقتين رئيسيتين:

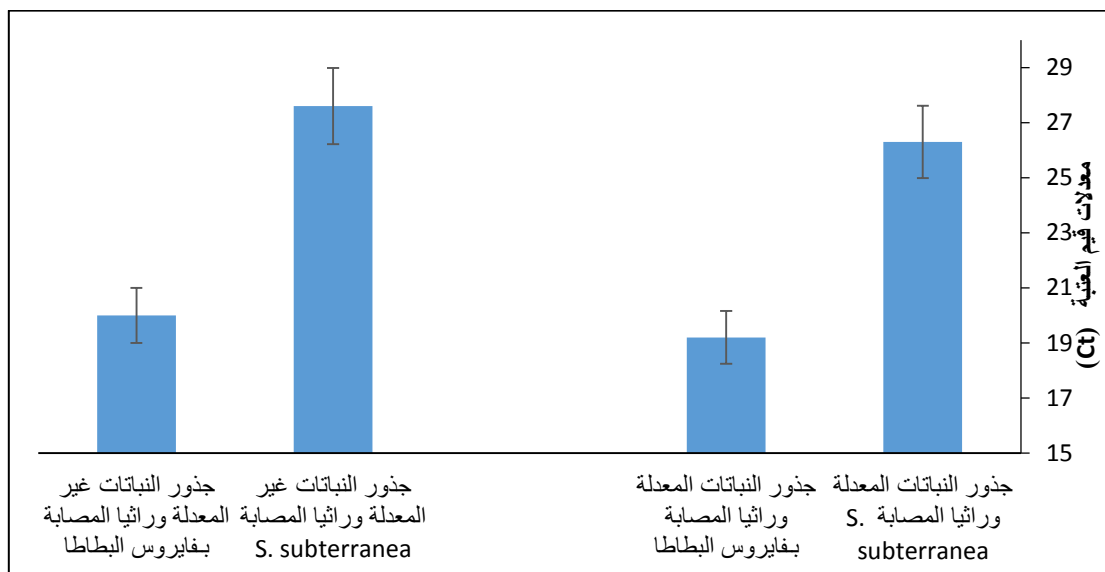
الأولى: بواسطة العمل على تثبيط او تحطيم جزئيات الـ RNA القصيرة المهمة والمرتبطة بعملية الاسكات الجيني حيث تعتبر هذه الاستراتيجيات من أكثر الاستراتيجيات استخداما من خلال اعتمادها من قبل العديد من الاجناس الفايروسية مثل اساليب منها حيز قطع الـ RNA القصيرة المزدوجة الشريط والتي تؤدي الى منع تجمع معقد الـ RNA الحاث لعملية الاسكات الجيني ((RNA-induced silencing complex (RISC) المهم لبدأ عملية الاسكات الجيني [34; 35]. مثالها البروتين الكايح (P19) المستخدم من قبل فايروس تقزم الطماطة الشجري *Tomatoto stunt bushy virus* الذي يعمل مثل الفرجار او الفرجار (caliper) الذي يقيس طول قطع الـ RNA القصيرة ويرتبط بها بشدة في منطقة طولها 19 زوج قاعدة نايتروجينية وبالتالي تعطيل قطع الـ RNA القصيرة التي تعتبر العنصر الأهم في عملية الاسكات الجيني لبدأ المقاومة للفايروسات [36; 37]. اما الطريقة الثانية فتعمل من خلال اسلوب التداخل بين بروتين الكايح الفايروسي وبروتينات مهمة لعملية الاسكات الجيني مثل بروتين Argonaute الذي يعمل كمكون رئيسي ومهم في معقد الـ RNA الحاث لعملية الاسكات الجيني (RISC) وذلك من خلال العمل على تحطيم الـ RNA الفايروسي. تكون نتيجة التداخل والارتباط بين بروتين الكايح الفايروسي و بروتين Argonaute تثبيط عمل الأخير وبالتالي إيقاف فعالية عملية الاسكات الجيني ضد الفايروس نفسه. مثال لهذه الظاهرة هو الكايح P1 الذي يتواجد في فايروس التبرقش الخفيف على البطاطا الحلوة *Sweet potato mild mottle virus* [38] كذلك يعمل الكايح 2b التابع لفايروس موزايك الخيار *Cucumber Mosaic Virus* على منع انتشار اشارات الاسكات الجيني بعيدة المدى وبالتالي تسهيل عملية الإصابة الفايروسية الجهازية [39]. ان الالية الأخير قد تكون مستخدمة من قبل الكايح (CRP) التابع لفايروس الممسحة القمي للبطاطا وذلك بسبب اكتشاف الفايروس في أوراق النباتات المعدلة وراثيا بنسبة إصابة وتركيز متقاربة مع غير المعدلة وراثيا على الرغم من ان الإصابة بهذا الفايروس تبدأ في منطقة الجذور. أما تفسير سبب انخفاض نسبة الإصابة وتركيز RNA فايروس الممسحة القمي للبطاطا في الأوراق مقارنة بالجذور فانه قد يعود الى حقيقة ان حركة الفايروس بصورة عامة بداخل انسجة النبات المصاب معروف عنها انها بطيئة وغير منتظمة [40; 5].

دراسة العلاقة بين الفايروس وناقله

أوضحت النتائج في شكل (4) ان نسبة الإصابة بالناقل *S. subterranea* كانت اقل (93.7%) في جذور النباتات المعدلة وراثيا مما في جذور النباتات غير المعدلة (94.11%) وهذا انعكس على مستوى الإصابة بفايروس الممسحة القمي للبطاطا حيث كان اقل (90.4%) في جذور النباتات المعدلة وراثيا مقارنة بغير المعدلة وراثيا (95.4%). من جانب اخر كان مستوى تركيز الـ DNA للناقل والـ RNA للفايروس اعلى (قيم العتبة = 26.3 و 19.2 على التوالي) في جذور النباتات المعدلة وراثيا مقارنة بتركيزهما في جذور النباتات غير المعدلة وراثيا (قيم العتبة = 27.6 و 20 على التوالي) شكل (5). يتضح انه بالرغم من ان التحليل الاحصائي اظهر عدم وجود علاقة إيجابية قوية بين الفايروس وناقله الا ان النتائج كانت تشير الى انه عند ارتفاع نسبة الإصابة وتركيز DNA للناقل يرافقه ارتفاع في نسبة الإصابة وتركيز RNA للفايروس بينما عند انخفاضهما للناقل ينخفضا ايضا للفايروس بغض النظر عن نوع النباتات سواء كانت معدلة ام غير معدلة وراثيا وهذه النتيجة تتوافق مع نتائج العديد من الدراسات [41; 42; 43] التي أظهرت وجود علاقة طردية بين مستويات الناقل *S. subterranea* والمنقول فايروس الممسحة القمي للبطاطا.



شكل (7): معدلات نسب الإصابة بفايروس الممسحة القمي للبطاطا وناقله *S. subterranea* في جذور النباتات المعدلة وغير المعدلة وراثيا. البيانات مع الخطأ القياسي هي عبارة عن معدلات الإصابة بالفايروس المشخص بطريقة RT-qPCR و q PCR في جذور النباتات المعدلة وغير معدلة وراثيا.



شكل (8): معدلات قيم العتبة (Ct) لتشخيص فايروس الممسحة القمي للبطاطا وناقله *S. subterranea* في جذور النباتات المعدلة وغير المعدلة وراثيا. البيانات مع الخطأ القياسي هي عبارة عن معدلات الإصابة بالفايروس المشخص بطريقة RT-qPCR و qPCR في جذور النبات المعدلة وغير معدلة وراثيا.

ان هذه الدراسة أوضحت فعالية اختبار الطريقة المائتية في تقييم مقاومة النباتات المعدلة وراثيا ضد فايروس الممسحة القمي للبطاطا مع إمكانية تطبيقها في اختبار مقاومة نباتات أخرى معدلة او غير معدلة وراثيا ضد نفس الفايروس أعلاه او ضد فايروسات أخرى تنتقل بواسطة نواقل حية كامنة في التربة مثل أنواع من الجنس *Polymyxa* التي تنقل عدة فايروسات منها فايروس الموزائيك الأصفر على الشعير *Barley Yellow Dwarf Virus* بالإضافة الى إمكانية استخدامها لدراسة العلاقة بين النباتات وبعض الكائنات الممرضة الكامنة في التربة مثل *Pythium spp.* و *Phytophthora spp.* من جانب اخر أوضحت النتائج أعلاه عدم جدوى استخدام عملية الاسكات الجيني في مقاومة فايروس الممسحة القمي للبطاطا ربما بسبب الفعالية القوية للكباح الجيني (CRP) الخاص بالفايروس اعلاه والذي خفض وبشكل فعال من تأثير عملية الاسكات الجيني مع إيقاف الإشارات بعيدة المدى الخاصة بنفس العملية وهذه الحقائق حسب معلوماتنا قد تعرف لأول مرة. وبصورة عامة ان دراسة طبيعة تأثير الكباح (CRP) بشكل تفصيلي باستخدام النباتات المعدلة وراثيا موضوع مثيرة للاهتمام مع وجوب التفكير بوسائل دفاعية أخرى تستخدم التكنولوجيا الجينية لأجل إيجاد طريقة مقاومة أكثر فعالية ضد فايروس الممسحة القمي للبطاطا.

المصادر

- 1- FAOSTAT,(2013). FAOSTAT (Food and Agriculture Organisation of the United Nations statistics). Retrieved September 30, 2015, from <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>.
- 2- Calvert, E. L. and Harrison, B. D. (1966). Potato mop-top, A soil-borne virus. *Plant Pathology* 15 (3): 134–139.
- 3- Lahuf, A. A. (2014). Host resistance and molecular interaction studies on *Potato mop-top virus* and its vector *Spongospora subterranea*. Ph.D. thesis. University of Aberdeen, Scotland, UK.
- 4- Harrison, B. D. and Jones, R. A. C. (1970). Host range and some properties of *Potato mop-top virus*. *Annals of Applied Biology* 65 (3): 393–402.
- 5- Davey, T. (2009). The importance of *Potato mop-top virus* (PMTV) in Scottish seed potatoes. PhD thesis. Heriot Watt University, Edinburgh, Scotland, UK.
- 6- Arif, M., Ali, M., Rehman, A. and Fahim, M.(2014). Detection of *Potato mop-top virus* in soils and potato tubers using bait plant bioassay, ELISA and RT-PCR. *Journal of Virological Methods*.195:221-242.
- 7- Arif, M., Torrance, L. and Reavy, B. (1995). Acquisition and transmission of *Potato mop-top virus* by a culture of *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* derived from a single cystosorus. *Annals of Applied Biology*. 126 (3): 493–503.
- 8- Santala, J., Samuilova, O., Hannukkala, A., Latvala, S., Kortemaa, H., Beuch, U., Kvarnheden, A., Persson, P., Topp, K., Ørstad, K., Spetz, C., Nielsen, S. L., Kirk, H. G., Budziszewska, M., Wiczorek, P., Obrepalska-Stepłowska, A., Pospieszny, H., Kryszczuk,

- A., Sztangret-Wisniewska, J., Yin, Z., Chrzanowska, M., Zimnoch-Guzowska, E., Jackeviciene, E., Taluntyte, L., Pupola, N., Mihailova, J., Lielmane, I., Järvekülg, L., Kotkas, K., Rogozina, E., Sozonov, A., Tikhonovich, I., Horn, P., Broer, I., Kuusiene, S., Staniulis, J., Uth, J. G., Adam, G. and Valkonen, J. P. T. (2010). Detection, distribution and control of *Potato mop-top virus*, a soil-borne virus, in northern Europe. *Annals of Applied Biology* 157: 163–178.
- 9- Torrance, L., Cowan, G. and Pereira, L. (1993). Monoclonal antibodies specific for *Potato mop-top virus*, and some properties of the coat protein. *Annals of Applied Biology* 122 (2): 311–322.
- 10- Germundsson, A., Sandgren, M., Barker, H., Savenkov, E. I. and Valkonen, J. P. T. (2002). Initial infection of roots and leaves reveals different resistance phenotypes associated with coat protein gene-mediated resistance to *Potato mop-top virus*. *Journal of General Virology* 83 (5): 1201–1209.
- 11- Latvala-Kilby, S., Aura, J. M., Pupola, N., Hannukkala, A. and Valkonen, J. P. T. (2009). Detection of *Potato mop-top virus* in potato tubers and sprouts: combinations of RNA2 and RNA3 variants and incidence of symptomless infections. *Phytopathology* 99 (5): 519–531.
- 12- International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA). (2014). Agricultural Biotechnology (A Lot More than Just GM Crops). ISAAA SEAsiaCenter/o IRRI, Los Baños, Laguna 4031, Philippines. Available at: <http://www.isaaa.org>.
- 13- Eamens, A., Wang, M. B., Smith, N. A. and Waterhouse, P. M. (2008). RNA Silencing in Plants: Yesterday, Today, and Tomorrow. *Plant Physiology Journal* 147 : 456–468.
- 14- Duan, C.G., Wang, C. H. and Guo, H. S. (2012). Application of RNA silencing to plant disease resistance. *Silence A journal of RNA regulation* 3(2):1-8.
- 15- Foster, G. D. and Taylor, S. C. (1998). *Plant Virology Protocols: From Virus Isolation to Transgenic Resistance*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- 16- Peña, L. (2010). *Transgenic Plants: Methods and Protocols*. Humana Press, New Jersey, USA.
- 17-van de Graaf, P., Lees, A. K., Cullen, D. W. and Duncan, J. M. (2003). Detection and Quantification of *Spongospora subterranea* in Soil, Water and Plant Tissue Samples Using Real-Time PCR. *European Journal of Plant Pathology* 109 (6): 589–597.
- 18-Mumford, R. A., Walsh, K., Barker, I. and Boonham, N. (2000). Detection of *Potato mop-top virus* and *Tobacco rattle virus* using multiplex real-time fluorescent reverse-transcriptase polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* 90 (5): 448–453.
- 19-Torrance, L. (2008). Pomovirus. pp. 282-287 in MAHY, B. W. J. and VAN REGENMORTEL, M. H. V. (eds). *Encyclopedia of virology*. Elsevier Press, London, UK.
- 20-King, A. M., Adams, M. J., Carstens, E. B. and Lefkowitz, E. J. (2012). *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Press, London, UK.
- 21-Nakayama, T., Maoka, T., Hataya, T., Shimizu, M., Fuwa, H., Tsuda, S. and Mori, M. (2010). Diagnosis of *Potato mop-top virus* in soil using bait plant bioassay and RT-PCR-microplate hybridization. *American Journal of Potato Research* 87 (2): 218–225.
- 22-Passioura, J. B. (1991). Soil structure and plant growth. *Australian Journal of Soil Research* 29(6): 717 – 728.
- 23-Bus, C. (2000). Powdery scab control in the Netherlands. pp. 45–48 in MERZ, U. and LEES, A. (eds). *Proceedings of the First European Powdery Scab Workshop*, Aberdeen, Scotland, UK, July 20-22 2000.
- 24-van de Haar, J. (2000). The powdery scab situation in the Netherlands. pp. 21–22 in MERZ, U. and LEES, A. (eds). *Proceedings of the First European Powdery Scab Workshop*, Aberdeen, Scotland, UK, July 20-22 2000.
- 25-Brierley, J., Lees, A. and Wale, S. (2008). *Powdery Scab-Strains and Conducive Conditions*. Potato Council Ltd, London, UK.

- 26-Harrison, B. D., Jones, R. A. C. (1971). Effects of light and temperature on symptom development and virus content of tobacco leaves inoculated with *Potato mop-top virus*. *Annals of Applied Biology* 67: 377–387.
- 27-Reavy, B., Arif, M., Cowan, G. H. and Torrance, L. (1998). Association of sequences in the coat protein/readthrough domain of *Potato mop-top virus* with transmission by *Spongospora subterranea*. *The Journal of General Virology* 79 (10): 2343–2347.
- 28-Sandgren, M., Savenkov, E. I. and Valkonen, J. P. T. (2001). The readthrough region of *Potato mop-top virus* (PMTV) coat protein encoding RNA, the second largest RNA of PMTV genome, undergoes structural changes in naturally infected and experimentally inoculated plants. *Archives of Virology* 146 (3): 467–477.
- 29-Dougherty, W. G., Lindbo, J. A., Smith, H. A., Parks, T. D., Swaney, S. and Proebsting, W. M. (1994). RNA-mediated virus resistance in transgenic plant: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* 7:544–552.
- 30-Ratcliff, F., Harrison, B. D. and Baulcombe, D. C. (1997). A Similarity Between Viral Defence and Gene Silencing in Plants. *Science* 276:1558–1560.
- 31-Diaz-Pendon, J. A., Li, F., Li, W. X. and Ding, S. W. (2007). Suppression of antiviral silencing by cucumber mosaic virus 2b protein in *Arabidopsis* is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs. *Plant Cell Journal* 19:2053–2063.
- 32-Ding, S. W., and Voinnet, O. (2007). Antiviral Immunity Directed by Small RNAs. *Cell Journal* 130:413–426.
- 33-Lukhovitskaya, N., Thaduri, S., Garushyants, S. K., Torrance, L. and Savenkov, E. I. (2013). Deciphering the Mechanism of Defective Interfering RNA (DI RNA) Biogenesis Reveals That a Viral Protein and the DI RNA Act Antagonistically in Virus Infection. *Journal of Virology* 87(11): 6091–6103.
- 34-Merai, Z., Kerenyi, Z., Kertesz, S., Magna, M., Lakatos, L. and Silhavy, D. (2006). Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *Journal of Virology*. 80:5747–5756.
- 35-Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E. J., Carrington, J. C., Liu, Y. P Dolja, V. V., Calvino, L. F., Lopez-Moya, J. J. and Burgyan, J. (2006). Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral Suppressors. *EMBO Journal* 25:2768–2780.
- 36-Ye, K., Malinina, L. and Patel, D. J. (2003). Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature* 426:874–878.
- 37-Vargason, J., Szittyta, G., Burgyan, J. and Hall, T. M. (2003). Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell Journal* 115:799–811.
- 38-Csorba, T., Pantaleow, V. and Burgyan, J. (2009). RNA Silencing: An Antiviral Mechanism. pp.36-59 in LOEBENSTEIN, G. and CARR, J. P. (eds.). *Advances in Virus Research (Natural and Engineered Resistance to Plant Viruses, Part I)*. Elsevier Press, London, UK.
- 39-Guo, H. S. and Ding, S.W. (2002). A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene-silencing signal. *EMBO Journal* 21:398–407.
- 40-Canadian Food Inspection Agency, (2014). *Potato mop-top virus* (PMTV) Fact sheet. Retrieved August 17, 2016, from <http://www.inspection.gc.ca/plants/plant-pests-invasive-species/diseases/pmtv/factsheet/eng/1327452784025/1327452899956>.
- 41-Cooper, J. I., Jones, R. A. C. and Harrison, B. D. (1976). Field and glasshouse experiments on the control of *Potato mop-top virus*. *Annals of Applied Biology* 83 (2): 215–230.
- 42-Sokmen, M. A., Barker, H. and Torrance, L. (1998). Factors affecting the detection of *Potato mop-top virus* in potato tubers and improvement of test procedures for more reliable assays. *Annals of Applied Biology* 133 (1): 55–63.
- 43-Davey, T., Carnegie, S. F., Saddler, G. S. and Mitchell, W. J. (2014). The importance of the infected seed tuber and soil inoculum in transmitting *Potato mop-top virus* to potato plants. *Plant Pathology* 63 (1): 88–97.