استخدام التقانات الحيوية في الكشف عن الممرضات

ياسين ابراهيم النعسان

ماجستير في الزراعة المتكاملة - معهد باري/ايطاليا

التشخيص الجزيئي:

يعد التشخيص الجزيئي من التطبيقات الهامة في مجال أمراض النبات على المحاصيل أو الأشجار المثمرة أو الغابات تطوير واستخدام طرائق سريعة في عملية التشخيص. من المعروف في مجال الأمراض البشرية أن التشخيص الصحيح للمرض ومعرفة العامل الممرض يجعل من السهل مكافحته بالطرق الملائمة واستبعاد الطرق غير الملائمة في علاجه وكذلك الأمر في أمراض النبات.

يزداد الاهتمام بعملية تشخيص الأمراض النباتية مع إزدياد التجارة العالمية بالنباتات وإنتاجها والذي يترافق عادة مع خطر حركة هذه الممرضات ونواقلها من بلد لأخر، لذا من الضروري التوصل لاختبارات موثوقة وسريعة ورخيصة للكشف عن الممرضات النباتية وكذلك لمنع الخسائر الناجمة عن الإصابة بهذه الممرضات.

إن عملية التشخيص ليست مهمة في عملية الكشف عن العامل المسبب فقط بل وأيضا في تعريف العزلات والسلالات والأنماط المرضية للكائن الممرض، وهكذا فإن المكافحة المعتمدة على التربية أو الحصول على أصناف مقاومة تعتمد أساساً على التنبؤ بالمشاكل المستقبلية التي يمكن أن تحدث.استخدم المسح الحقلي السنوي لمجتمعات الصدأ في الولايات المتحدة واستراليا لتحديد أي من مورثات المقاومة يمكن استخدامها للحد من تأثير الفطر على النبات أو الإنتاج. كما استخدمت مسوحات المقاومة للصادات الحيوية في السلالات البكتيرية أو مقاومة المبيدات الفطرية في المجتمعات الفطرية لتحسين المقاومة الكيميائية لهذه الممرضات باستخدام الخلائط أو الرش بمواد فعالة بديلة.

التطورات في الطرق التقليدية:

في معظم الحالات التي تصيب فيها الممرضات المحاصيل والأشجار المثمرة فإن الأعراض تكون واضحة ويمكن تشخيص هذه الأمراض بالاعتماد على الأعراض، كما يمكن الحصول على وصف دقيق لهذه الأعراض من الكتب والوريقات الإرشادية والإنترنيت وبالتالي القدرة على تشخيص المرض دون الحاجة لتدريب كوادر متخصصة بالكشف أو استخدام مواد تشخيص عالية الكلفة.

كما يؤخذ بعين الإعتبار في كل أنواع التشخيص التي تم إرساؤها من أن الكائن الممرض هو المسؤول فعلياً عن إحداث هذا المرض وليست الإصابة الثانوية الناتجة عن تكاثر فطريات أو بكتيريا رمّية أدت إلى حدوث هذه الأعراض، ولذلك فإن إختصاصي أمراض النبات يجب أن يتمتع بالخبرة الكافية لتمييز مثل هذه الحالات، فمن المفيد في بعض حالات التشخيص للفطريات دراسة الخواص المجهرية للفطر كالأجسام الثمرية والميسيليوم، كما أن استخدام مستنبتات غذائية إنتخابية يمكن أن تكون ملائمة للتحريض على تشكل

الأبواغ وتسهل عملية التبوغ. يمكن تشخيص الممرضات البكتيرية تحت المجهر كما أن استخدام المستنبتات الغذائية الانتخابية والاختبارات الحيوية على البكتيريا المعزولة مثل صبغة غرام والأحماض الدسمة والتحلل الغذائي يعتبر أساسياً في عملية التشخيص.

يمكن تشخيص بعض الأمراض الفيروسية والفيتوبلازما بالاعتماد على الأعراض الظاهرية لكن في أغلب الحالات من الضروري استخدام المجهر الالكتروني حتى نتمكن من رؤية العامل الممرض. كما يمكن استخدام اختبارات نقل الممرض كمؤشر لمعرفة النبات العائل لبعض الأمراض الفيروسية، أو الحساسية للمضاد الحيوي تتراسكلين في الفيتوبلازما.

استخدمت هذه الطرائق لسنوات عديدة وستبقى مستخدمة، لكن هناك حاجة دائمة لتحسين طرق التشخيص مثلاً كشف الممرض قبل تطور الأعراض أو غربلة أعداد ضخمة من العينات بشكل دقيق وسريع وموثوق وبحساسية عالية ممايزودنا بمعلومات هامة عن العامل المسبب كالتركيب الوراثي للمسبب المرضي ونوع الشراسة التي يملكها وهل هو مقاوم لمادة كيميائية معينة أم لا. كل ذلك يشكل معلومات إضافية مهمة حول الممرض. وقد أمكن الوصول إلى ذلك كله بإرسال العينات إلى مخابر التشخيص لاختبارها، قد تتضمن هذه الاختبارات تنمية العزلات على نباتات الإختبار أو الأصناف التفريقية لتحديد أي من مورثات المقاومة يمكن أن يتغلب عليه.

يمكن تحديد المقاومة للمبيدات أيضاً باختبار عدة جرعات من المبيد إما على النبات أو بزراعة العامل الممرض على مستنبت مغذي يحتوي تراكيز مختلفة من المبيد. لقد تم خلال الثلاثين سنة الماضية تحقيق اثنين من التطورات الهامة التي تساعد عملية التشخيص التقليدية وهما الأجسام المضادة والطرائق المعتمدة على الـ DNA ومع الثورة الحاصلة هذه الأيام في مجال التقانات الحيوية أصبح متاحاً الحصول على عملية تشخيص شاملة وسريعة وأكثر دقة.

1- استخدام الأجسام المضادة:

تعتبر الأمصال من أكثر الأنظمة المستخدمة في مجال تشخيص أمراض النبات. تتشكل الأجسام المضادة في أجسام الحيوانات ضد ممرض معين حيث تنقى هذه الأجسام ثم تستخدم في التشخيص.الجسم المضاد الرئيسي في الفقاريات هو الغلوبلين المناعي (Immunoglobulin G; IgG) وهو أكثرالغلوبلينات المناعية استخداماً، هوعبارة عن جزيئة لها شكل حرف Y وله ذراعين متخصصين بربط الجسم المولد للضد بينما المناطق الأخرى من هذا المضاد يمكن وسمها، على سبيل المثال الربط بانزيمات تستخدم في عملية التشخيص.

1.1- الأجسام المضادة عديدة الكلون (متعددة النسيلة):

يعتمد نجاح هذه التقنية المصلية على قدرة الأمصال على التعرف على مواقع معينة على مولد الضد والتي تكون خاصة بالممرض المراد الكشف عنه، تستخدم الأمصال المضادة عديدة النسيلة على عدد من الممرضات خاصة الفيروسات بسبب سهولة إنتاج هذه الاجسام المضادة نسبياً. من الضروري تنقية الممرض نفسه أو جزء منه (الغلاف البروتيني) لأن نقاوة مولد الضد هامة وحيوية حيث أن الأجسام

المضادة ستتشكل في دم الحيوان لأي بروتين يتم حقنه، وهذا يؤدي إلى مشاكل في عملية التشخيص عند الكشف عن الممرض.

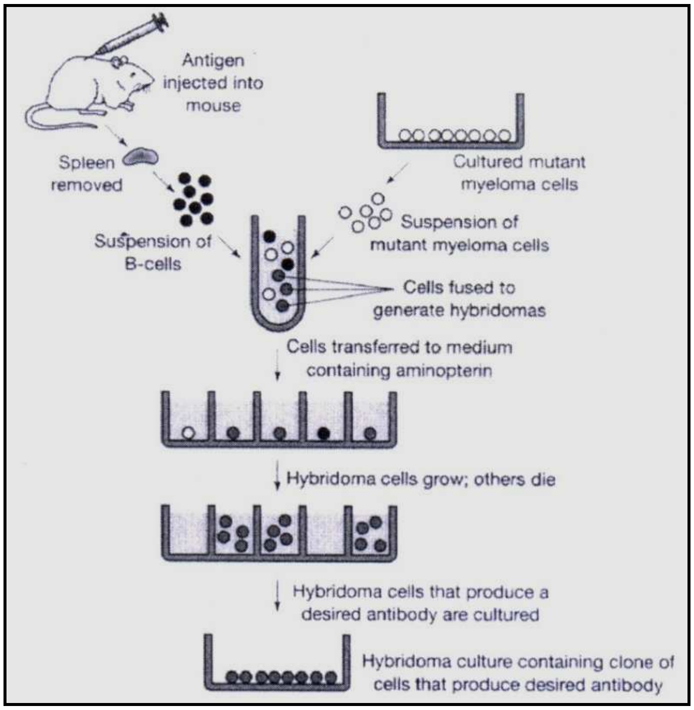
يتم حقن الممرض بعد تنقيته في جسم حيوان الإختبار مثل الأرنب، ثم يؤخذ دم الحيوان المحقون الذي يحتوي المصل فيه على مجتمعات من الأجسام المضادة التي تتفاعل مع عدة مناطق من مولد الضد المناعي والتي يمكن استخدامها في تقنيات الكشف.

هنالك الكثير من السلبيات عند استخدام تقنية الكشف بهذه الأجسام، فقد تقل مصادر الحصول على الأجسام المضادة عند موت حيوان التجربة مثلاً، كما أن البكتيريا أو الفطر الذي يتم تنقيته وحقنه سيشكل أجسام مضادة لمجال واسع من السلاسل الببتيدية وبذلك يصبح غير متخصص أو قد تشترك هذه السلاسل مع بكتيريا أو فطر أخر. يمكن التغلب على هذه المشاكل باستخدام الأجسام المضادة وحيدة النسيلة.

2.1- الأجسام المضادة وحيدة الكلون (وحيدة النسيلة):

تتفوق الأجسام المضادة وحيدة النسيلة على الأجسام المضادة عديدة النسيلة كونها مصدر دائم للأجسام المضادة ذات النوعية شديدة التخصص. لكن إنتاج هذه النوعية من الأجسام المضادة عالي الكلفة، وتحتاج إلى مستنبتات خاصة لزراعة الخلايا والتخزين على درجات حرارة منخفضة.

تم إنتاج أجسام مضادة وحيدة النسيلة على نطاق تجاري واسع وللعديد من الفيروسات كفيروسات البطاطا والفيروسات المحمولة بالبذور، كما أنتجت أجسام مضادة وحيدة النسيلة ضد متعدد السكاريد في السلاسل الجانبية لبكتير الـ *Erwinia* وضد البروتينات أيضاً في انواع بكتيرية أخرى وفيتوبلازما، وكذلك الأمر لبروتينات متخصصة من الممرضات الفطرية النباتية يمكن من خلالها الكشف عن الفطر الممرض*Botrytiscinerea* في عصير الأناناس والتمييز بين البقعة العينية على ساق القمح والأمراض الأخرى التي تعطي أعراض مشابهة على القمح.



3.1- الأجسام المضادة النانونية Single Domain Antibodies :

إكتشف مؤخراً أجسام مضادة تختلف عن الأجسام المضادة التقليدية وذلك عند حقن الجسم المولد للضد في الجمل، حيث أن هذا الحقن يحفز جهاز المناعة عند الجمل وينتج أجسام مضادة تتألف من السلسلتين الثقيلتين الثابتة والمتغيّرة أي أنها لاتحوي السلسلة الخفيفة المتواجدة في الأجسام المضادة التقليدية.

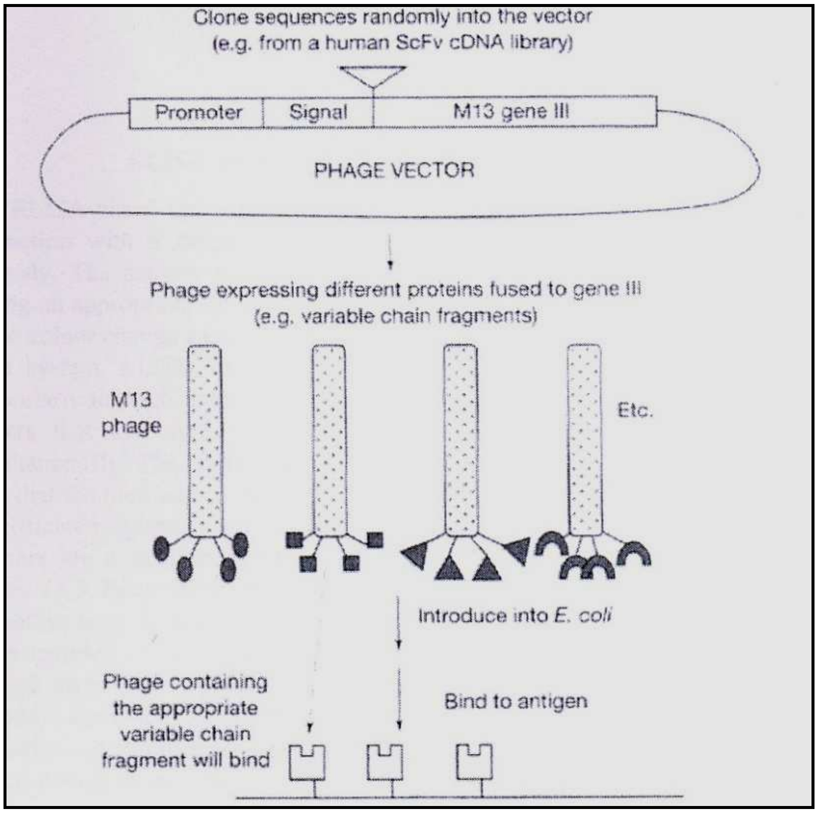
تحمل هذه الأجسام المضادة ميزات فيزيائية-حيوية جعلتها تمتلك أهمية خاصة في عملية التشخيص. أهم تلك الميزات:

صغر الحجم، مستويات تعبير عالية في الفطر والبكتيريا، ثباتية كيميائة وحرارية عالية حيث يبقى قادر على كشف المولد للضد على حرارة 90 °م.

4.1- تقنيات الـ DNAالمؤشب Recombinant DNA techniques :

تعتبر مكتبات العاثيات Phage Libraries مصدراً أخر لاستخدام الأجسام المضادة في الإختبارات المناعية يستخدم في هذه التقنية ملتهمات بكتيريا مذنّبة (عاثيات Filamentous bacterio-phages) مثل M13 أو fd، للتعبير عن سلاسل ببتيدية غريبة عنها وذلك من خلال لصقها مع واحد من بروتينات غلاف العاثية. تم عمل هذه المكتبات بشكل خاص بالاستنساخ أو التنسيل للجزءالمتغير من السلسلةالمفردة من الجينوم البشري (ScFv) ليتم إنتاجها في مكتبات تتألف من عاثيات تعبر عن كامل البروتين، أصبحت هذه المكتبات متوفرة تجارياً ويمكن استخدامها للكشف عن الممرضات النباتية أو عن سلاسل ببتيدية من الممرض النباتي وذلك

لتعريف المستعمرات التي تحتوي على أجسام مضادة قادرة على التحقق من وجود مضاد متخصص للمرض النباتي دون الحاجة لتحريض المناعة في حيوان التجربة، يمكن استخدام مثل هذه المستعمرات كمصدر للأجسام المضادة من أجل التشخيص.



تم تطوير هذه التقنية لعدد من فيروسات البطاطا ومن الممكن استخدامها على مجال واسع من الممرضات الأخرى نظراً للسرعة النسبية التي يمكن من خلالها الحصول على الأجسام المضادة المتخصصة من خلال استخدام هذه الطريقة أو تقنية الـ DNA المؤشب.

2- الاختبارات المصلية

1.2- إختبار الإدمصاص المناعي المرتبط بالانزيم(إليزا) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ELISA :

تجمع هذه التقنية بين التفاعل النوعي بين الأجسام المضادة ومولداته من جهة وبين نظام كشف يعتمد على اقتران انزيم الألكالاين فوسفات مع الجسم المضاد. يتم قياس نشاط هذا الانزيم باستخدام المطياف الضوئي بعد إضافة مادة تسمى ركيزة Substrate وتتغير كثافة لون هذه المادة تبعاً لكمية مولد الضد الموجودة. يملك نظام الإليزا العديد من الميزات وذلك من خلال القراءة الآلية عند استخدام أطباق قراءة متعددة الحفر وقارئة أطباق تسجل التغيرات في اللون بنفس الوقت في كل الحفر، أيضاً هذا النظام أمن من حيث الاستخدام ويمكن نقل هذه التقنية إلى مخابر تفتقر لهذه التجهيزات أو إلى مناطق بعيدة. هنالك عدة أنواع من اختبار إليزا، بماأن النظام إليزا باستخدام الاجسام المضادة المزدوج DAS-ELISA يعمل على حجز الجسم

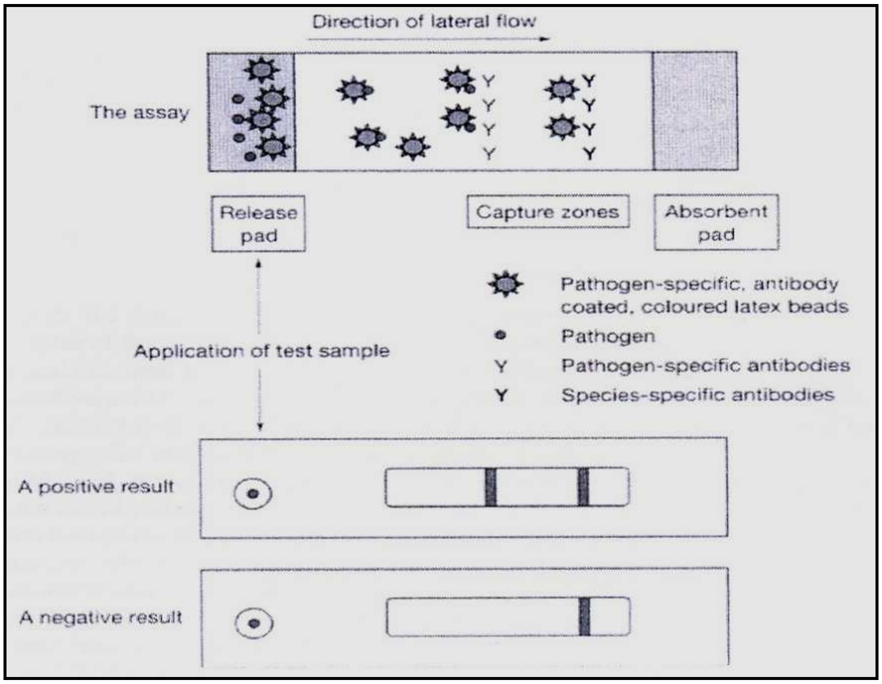
المولد للضد بالأجسام المضادة المتخصصة فإنه يستخدم في الكشف عن الممرضات في العينات الخام كعينات التربة و المستخلصات النباتية حيث أنه يتم غسل المواد الملوثة قبل الكشف الانزيمي.

أما ميزات النظام الثلاثي للأجسام المضادة TAS-ELISA يتمثل في أن الأجسام المضادة المرتبطة بالانزيم والمنتجة في جسم الماعز ضد الأجسام المضادة للممرض المأخوذة من الجرذان متوفرة في السوق بشكل تجاري، وبالتالي لا حاجة لربط الانزيم إلى الجسم المضاد المتخصص على الممرض. وهنالك تعديل لاحق لهذه التقنية حيث يمكن استخدام أطباق خاصة باختبارإليزا (plated-trapped antigen) تعمل على حجز الممرض مباشرة على السطح البلاستيكي لطبق الإليزا دون الحاجة لتغطية مسبقة بالأجسام المضادة.

2.2- تقنيات الإنسياب الجانبي Lateral Flow Techniques:

تم تطوير طريقة عصا الغمس (Dipstick) كطريقة تشخيصية مناسبة للاستخدام الحقلي دون الحاجة لوجود تجهيزات خاصة للقيام بها، حيث يمكن مثلاً من خلال هذه التقنية الكشف عن فيروسات البطاطا PVY و PVX خلال بضعة دقائق وهو شبيه بالطريقة المتبعة للكشف عن الحمل عند النساء.

حيث يتم ربط الأجسام المضادة المتخصصة بالكشف عن الممرض على غشاء خاص وعند مرور العينة (المستخلص النباتي) على الخطوط الجانبية يتحرك المستخلص النباتي باتجاه الأعلى بالخاصية الشعرية، وبالتالي فإن أي جسم مولد للضد (ممرض) يمر فيها سيشكل معقداً أثناء مروره على الغشاء النيتروسللوزي. يتحرك معقد الجسم المضاد مع مولد الضد بالانسياب الجانبي حتى يصل إلى منطقة الكشف المؤلفة من خطي كشف يحتوي خط الكشف الأول على الأجسام المضادة المتخصصة بالكشف عن الممرض أنه مصمم ليلتقط معقد الأجسام المضادة مع مولدات الأضداد حيث يتغير لون الخط نتيجة لتراكم جزيئات الذهب أو المطاط الملونة التي حملت عليها الأجسام المضادة.



أما خط الكشف الثاني يحتوي على أنواع خاصة من الأجسام المضادة مخصصة لإلتقاط الأجسام المضادة غير المرتبطة أي تعمل كشاهد وبذلك يتم التأكد بأن الاختبار أجري بشكل صحيح.

2.3- استخدامات أخرى للأجسام المضادة:

بالإضافة لاستخدام الأجسام المضادة في عملية التشخيص، يمكن استخدامها في معرفة مكان الممرض في العينات المصابة. عموماً تعتمد هذه الطريقة على ربط بدائل أخرى للكشف عن الأجسام المضادة مثلاً الربط مع كاشف قابل للتوهج Fluorescein Isothiocyanate(FITC) و RhodamineIsothiocyanate (RITC) حيث تطبق هذه الأجسام المضادة إلى أجزاء من المادة النباتية وباستخدام مجهر فلوريسينتي Fluorescence Microscopy يمكن الكشف عن مكان وجود البكتيريا أو الفطر في النسيج النباتي المصاب. يمكن استخدام ذات التقنية للكشف عن موقع أو مكان وجود الممرض في التربة أو البذور أو غيرها أو حتى الكشف عن وجود بروتين معين متخصص على الممرضات خلال عملية العدوى. إضافة إلى ذلك فإن وسم الأجسام المضادة مع جزيئات الذهب يمكن استخدامه في الكشف بواسطة المجهر الالكتروني، حيث يتم تحضير أجزاء نباتية مصابة وتحضن مع الأجسام المضادة الموسومة بجزيئات الذهب والتي تبدي كثافة للإلكترونات في الماسح الالكتروني. هذه التقنية متوفرة للكشف عن الفيروسات في الأنسجة النباتية المصابة وكذلك لمعرفة مكان توضع البكتيريا والفطريات في النباتات المصابة.

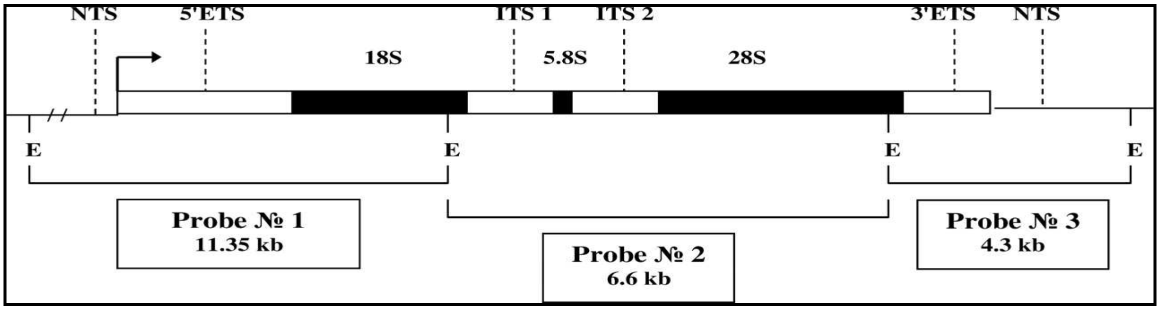
3- التقنيات التي تعتمد على الحمض النووي

1.3- تحديد المؤشرات الجزيئية المتخصصة بالممرض

تهدف طرائق التشخيص المرتكزة على الحمض النووي إلى تعريف السلاسل أو التتابع النيكليوتيدي للمرض (DNA للبكتيريا والفطريات و RNA لمعظم الفيروسات) حيث يمكن استخدام هذه السلاسل في تصميم مسابر Probes متخصصة للممرض.

فعلى سبيل المثال من الشائع تصميم مسابر لمورثات الغلاف البروتيني لفيروس معين أو لمورثات الممرض عند البكتيريا أو الفطر. قد تكون هذه المسابر متخصصة على مستوى الأنواع وبذلك يمكن استخدامها على مستوى النوع أو قد تكون متخصصة لتشخيص أنماط مرضية معينة وبشكل إفرادي.

تم إنجاز أبحاث عديدة على سلاسل شائعة مثل الـ DNA الريبوزومي حيث يعتبر الحصول عليها من الكائنات سهل نسبياً. تترتب هذه المورثات عند الفطريات على شكل عناقيد يطلق عليها المورثات 28 S - 5.8 S -18 S يفصل بين المجموعات الثلاث فواصل داخلية منسوخة Internal Transcribed Spacers (ITS) وفواصل وراثية بينيّة Intergenic Spacers (IGS) تفصل ترادفيا النسخ المرتبة من تسلسل مورث معين.



عموماً تم الكشف عن معظم الاختلافات في مناطقITS و IGS في البكتيريا فإن المجموعات الفرعية للمورثات 23S -5S -16S يمكن أن توجد في وحدة مفردة أو أن المورثات الإفرادية في المجموعات الفرعية يمكن أن تنتشر بشكل واسع في الجينوم وقد تم تطوير مؤشرات جزيئية بالاعتماد على المورثات 23S- 16S.

إضافة إلى ذلك فقد تم خلال السنوات الماضية تطوير العديد من المؤشرات الجزيئية لتعريف مؤشرات جزيئية عشوائية يمكن بواسطتها الكشف عن التعدد الشكلي بين عزلات الممرضات وقد تم تطبيق العديد منها على الممرضات النباتية. تتراوح هذه التقنيات بين RFLP [Restriction Fragment Length Polymorphism] و RAPD [Randomly Amplified Polymorphic DNA] و AFLP [Amplified Fragment Length Polymorphism] و SSR [Simple Sequence Repeat]

وقد أثبتت التجارب أن جميع هذه الطرائق ذات قيمة في البصمة الوراثية للعزلات وقد طوّرت هذه السلاسل في أنظمة التشخيص للأمراض النباتية.

كما طوّر في الوقت الراهن محضرات جاهزة للاستخدام في عمليات التشخيص لممرضات معينة بالاعتماد على المؤشرات الجزيئية لمورثات الشراسة لممرض معين.

2.3- الحمض النووي الريبي المضاعف السلسلة Double-Stranded RNA (dsRNA):

يعتبر وجود السلسلة المضاعفة للحمض النووي الريبي في النبات مؤشر قوي جداً على وجود فيروس في النبات لأن الفيروس يستخدم هذا الشكل من الحمض النووي أثناء دورة حياته في النبات وتدعى الشكل التضاعفي أو Replication Form (RF)، يمكن عزل هذا الشكل من الحمض النووي في المخبر ومن كميات قليلة من النسيج المصاب وبعد العزل يمكن الكشف عن عدد، حجم، كثافة و تعقيد الـ dsRNA باستخدام الرحلان الكهربائي على هلامة البولي أكرلاميد وتكون هذه الصفات متميّزة وثابتة في كل مجموعة من الفيروسات ويمكن أن تساعد في معرفة المجموعة التي ينتمي لها الفيروس المدروس ويمكن أن تعرّف هذه الطريقة الفيروسات على مستوى الفصائل وحتى السلالات، استخدمت هذه التقنية في الكشف

عن فيروسات جديدة تصيب النباتات كان يعتقد سابقاً انها عزلات تنتمي لفيروسات معرّفة، على سبيل المثال الكشف عن فيروس موزاييك التين المنتمي لعائلة الـ *Closteroviridae* وفيروس التبقع الأصفر في التين.

3.3- تقنيات التهجين Hybridization techniques :

استخدمت تقنيات تهجين الحمض النووي ولسنوات طويلة في اختبارات البيولوجية الجزيئية والتي تعتمد على مبدأ توريث أو إنتقال سلسلة مزدوجة من النكليوتيدات، وقد بذلت جهود حثيثة لتطوير هذه التقنية بحيث تستخدم في التشخيص المرضي، حيث إستخدمت هذه التقنية في الكشف عن فيروئيدات البطاطا في ثمانينيات القرن الماضي ثم نقلت هذه التقنية للكشف عن الفيروسات. يمكن في الوقت الحاضر استخدام طرائق لا إشعاعية في وسم الـ DNA تستخدم في تشخيص الأمراض وذلك بالكشف عن المسبر الموسوم في تجارب التهجين من خلال الطرق الانزيمية أو تلك المعتمدة على التوهج الفلوريسانتي.

من جهة أخرى تم تطوير طرائق لاستخلاص الـ DNA من النبات وعينات من التربة وغيرها وذلك لتقليل خطر الحصول على نتائج تهجين إيجابية خاطئة ناتجة عن إرتباط غير متخصص للمسبر مع الـ DNA.

تعتمد إحدى طرق التهجين على استخدام الجمع بين الأجسام المضادة المتخصصة على ممرض معين من جهة وعملية التهجين للـ DNA من جهة ثانية. حيث تستخدم الأجسام المضادة المتخصصة لحجزالممرض في أطباق خاصة ثم يهجن مع الـ DNAالموسوم لهذا الممرض، ومن ثم يُكشف عن الـ DNA الموسوم (فلوريسينتي) حيث يستدل على وجود الممرض في العينة من خلال التوهّج الذي يكشف عنه في الأطباق. يمكن قراءة النتائج بواسطة قارئ الأطباق الذي تم تطويره أساساً من أجل إختبارات الإليزا ELISA للقيام بالعمل بشكل آلي.

4.3- التقنيات التي تعتمد على التفاعل السلسلي البوليميرازي PCR:

يعد هذا الاختبار من الطرق المتطورة للتشخيص ويتميز بسرعته ودقته وسهولة استخدامه بالاضافة لعدم وجود تجهيزات معقدة للقيام بها مما يجعل منه وسيلة جيدة للكشف في المخابر البعيدة غير المجهّزة بشكل جيد. من التجهيزات الملحقة باختبار الـ PCR جهاز الرحلان الكهربائي وتجهيزات لتلوين الهلامة وإظهار الصورة باستخدام الكاميرا والأشعة فوق البنفسجية UV كما نحتاج لأدوات بلاستيكية تستخدم لمرة واحدة فقط (أنابيب تفاعل، رؤوس ماصات) إضافة إلى الانزيمات والمواد الكيميائية. وقد أمكن إجراء هذا الاختبار في مناطق مختلفة من العالم دون صعوبات تذكر.

يستخدم في هذه التقنية بادئات قليلة النكليوتيد تم تصميمها على أساس التتابع النكليوتيدي لممرض، حيث يتم الحصول على هذه التتابعات النكليوتيدية من خلال تقنيات دراسة التتابع النكليوتيدي أو بواسطة تقنيات أخرى كالبصمة الوراثية للممرض. أحياناً نحتاج لتحسين هذه التقنية بأن نستخدم تقنية Nested PCR والتي يتم فيها تخفيف ناتج تفاعل الـ PCR الأولي ثم يعاد تضخيمه أو مكاثرته بمجموعة بادئات أكثر تخصصاً في الكشف عن الممرض.

أثبتت التجربة بأن تقنية الـ PCR كانت فعالة في تشخيص الممرضات الفطرية والبكتيرية والأمراض المترافقة مع الفيتوبلازما بالاعتماد على بادئات متخصصة تم تصميمها على أساس التتابع النكليوتيدي لمورثات المجموعات الفرعية للحمض النووي الريبوزمي rRNA وذلك نظراً للاختلافات الوراثية بين هذه المناطق عند العزلات المختلفة.

كما أصبح من الممكن حالياً تعريف مواقع قطع انزيمات التحديد والتي تعطي نماذج قطع مختلفة عند هضم نواتج الـ PCR بإختلاف العزلات وبالتالي تعاظمت أهمية هذه التقنية بشكل خاص في الكائنات الممرضة التي لا يمكن إكثارها بعيداً عن العائل النباتي مثل الفيتوبلازما، ونظراً لتخصص البادئات المستخدمة على الفيتوبلازما فإنها ستضخم قطع الـ DNA الخاصة بالممرض فقط والموجودة مع جينوم العينة النباتية.

تم أيضاً تطوير بادئات متخصصة بشكل أكبر مثل استخدام التتابع النكليوتيدي للمورثة argk-tox للبكتيريا *Pseudomonassyringaepv.phaseolica* المسؤولة عن تركيب سمّ الـ phaseolotoxin وبذلك يمكن استخدام هذه البادئات لتشخيص البكتيريا التي تملك هذه الصفة، أو المورثة aflR للفطر *Aspergillusflavus* والتي تنظم عملية إنتاج الأفلاتوكسين في هذا الفطر.

إضافة إلى ذلك أثبتت التجارب أن التقنيات التي تعتمد على الـ PCR كانت مفيدة في تعريف الأمراض المنقولة بالحشرات. فعلى سبيل المثال تمكن العلماء من الكشف عن أنواع نطاطات الأوراق الناقلة للفيتوبلازما بواسطة تقنية الـ PCR للـDNA المعزول من عدة أنواع من هذه النطاطات. مع الأخذ بعين الاعتبار بأن الـ DNA المستخلص من النبات أو التربة أو من عينات الحشرات يمكن أن يحتوي على عوامل تثبط عمل الـ Taq-polymerase لذا يجب التخلص من هذه المثبطات واستخدام عينة شاهد في التفاعل للتأكد من أن النتائج السلبية هي نتائج حقيقية أي أن العينة خالية من الممرضات وليس السبب هو وجود العوامل المثبطة لذلك الانزيم.

يمكن الكشف عن الفيروسات الحاوية على سلسلة RNA مفردة بتعديل تقنية الـ PCR لتشمل عملية النسخ العكسي Reverse Transcriptase (RT-PCR) حيث يستخدم في هذه التقنية بادئات متخصصة لتركيب سلسلة DNA مكمّلة cDNA لسلسلة الـ RNA في الفيروس، ثم تضخم سلسة الـ cDNA باستخدام الـ Taq polymerase خلال عملية تفاعل الـ PCR العادي. استخدمت تقنية RT-PCR في تشخيص الأمراض الفطرية والبكتيرية والفيروسية، وذلك من خلال تعريف مورثات معينة تعبر عن نفسها خلال مراحل نمو الفطر أو مراحل تطورية معينة وبذلك يمكن تعريف المرحلة التطورية للفطر أو الممرض في المادة النباتية المصابة.

إن تقنية الـ PCR غير قادرة على التمييز فيما إذا كان الممرض حياً أم ميتاً حيث ستقوم البادئات بمكاثرة قطعة الـ DNA من الكائن سواءاً أكان ميتاً أم حياً وتعتبر هذه أحد سلبيات استخدام اختبار الـ PCR التقليدي حيث أن حساسية الاختبار تدفع البادئات المستخدمة لالتقاط ومضاعفة قطع DNA لمتعضيات غير حية وكائنات أخرى لاعلاقة لها بالممرض الذي نكشف عنه.

تم تطوير تقنيات أخرى لتحسين كفاءة وموثوقية اختبار PCR وتقليل كلفته، حيث استخدامت تقنية الحجز المناعي Immunocapture للجزيئات الفيروسية قبل إجراء تفاعل الـ PCR، أو استخدام عِصي الغمس Dipsticks المشربة بمواد جاذبة كيميائية تجذب الأبواغ الحيوانية للفطور البيضية مثلاً *Oomycetes* كفطور *Pythia* و *Phytophthora* قبل التحليل التشخيصي.

من الممكن أيضاً القيام بتفاعل التضخيم المتزامن Multiplex PCR باستخدام مزيج تفاعل جاهز Kit حيث يمكن من خلال هذا التفاعل الكشف عن أكثر من ممرض في العينة النباتية أو عينة التربة.

يتوفر الأن في الأسواق مزيج تفاعل جاهز للكشف عن معقدات الاصابة الفطرية على ساق القمح والمكونة من الفطريات *Tapesiayallundae*و *T.acuformis* (البقعة العينية) ، *Fusarium culmorum* ، *F. avenaceum* ، *F. graminearum* و*F. poae* (لفحة السنابل). وفطريات *Microdochiumnivale* المسببة للعفن الأبيض على النجيليات.

أيضاً يمكن ومن خلال استخدام بادئات متخصصة ونظام التضخيم المتزامن أن نحدد نمط التزاوج للـ Tapesia الموجودة في الـ DNA. يستخدم في نظام التضخيم المتزامن توليفات من البادئات تعطي قطع بأحجام مختلفة لكل واحد من هذه الأنواع، كما يستخدم مع نظام التضخيم المتزامن بادئات موسومة (وسم فلوريسينسي) تعكس أطوال موجات مختلفة للممرضات المختلفة.

أخيراً تجدر الاشارة بأنه عند استخدام هذا النظام عند الثدييات يمكن استخدام 92 بادئة بنجاح في تفاعل واحد.

5.3- التقنيات التي تعتمد على تصفيف المورثات Gene-array-based techniques:

بما أن التتابع النكليوتيدي أصبح متوفراً لعدد من الممرضات أصبح من الممكن تطوير تقنية التصفيف المصغّر للتشخيص أو الكشف عن وجود عدة ممرضات فطرية في إختبار واحد. تستخدم هذه التقنية بنجاح في الوقت الحاضر للكشف عن فيروس نقص المناعة البشري (Human Immunodeficiency Virus; HIV) وكذلك في الكشف عن الممرضات البكتيرية. على سبيل المثال وبالإعتماد على التتابع النكليوتيدي لمورثة RNA الريبوزومي 23S تم تصميم عديدات نكليوتيد ثم تم صفّها على غشاء نايلوني حيث يمكن من خلالها الكشف عن أكثر من 90 نوع من البكتيريا في عينات الدم. حيث تستخدم بادئات عامة لتضخيم مناطق مختلفة من 23SDNA الريبوزومي من أي بكتيريا موجودة في الدم ثم يتم وسم هذه الـDNA لتستخدم كمسابر في الكشف، يمكن تطوير هذه التقنية لتستخدم في الكشف عن الممرضات النباتية حيث تستخدم البادئات العامة المتوفّرة لتضخيم مناطق ITS. عندها يمكن أخذ عينات من التربة أو سطح النبات أو غيرها وفحصها بهذه التقنية (Micro-array) لتعريف الكائنات المتواجدة في هذه العينات وعندها يمكن أن تتطور هذه التقنية للكشف عن فاعلية المكافحة في التخلص من واحد من هذه الكائنات أو نوعاً معيناً منها.

بعبارة أخرى، إن تقنية DNA Microarray والتي صممت أساساً لدراسة التعبير الجيني وتوليد مظاهر التغير الشكلي وحيد النكليوتيد Single Nucleotide Polymorphism (SNP) تعتبر الأن تقنية جديدة

وصاعدة في عملية تشخيص الممرضات النباتية وتوفر نظرياً قاعدة لقدرات متعددة الأهداف وغير محدودة، وينظر لها كتقنية تغيّر التشخيص الجزيئي بشكل أساسي. حيث تعتمد هذه التقنية على التهجين بين تتابعات نيكليوتيدية معلّمة وميضياً مع التتابعات النيكليوتيدية المكمّلة لها والمثبتة على سطح صلب، مثل الزجاج الصلب، والتي تعمل كمسابر (Probes)، يمكن تثبيت عشرات الألاف من مسابر الـ DNA في ترتيب محدد ومعروف على صفيحة زجاجية مشكلّة شريحة خاصة تدعى Chip. إن القدرة غير المحدودة لهذه التقنية في الكشف الآني عن الممرضات تجعلها منهج يستطيع الكشف عن جميع الممرضات المطلوبة لمحصول معيّن.استخدمت هذه التقنية لكشف وتصنيف العديد من الفطريات مثل الفطور البيضية *Oomycetes* النيماتودا وأنواع بكتيرية أخرى.

مازال هنالك بعض العوائق التي تحد من تطبيق هذه التقنية كصعوبة تنقية الـ DNA من الأبواغ الفطرية أو التخلص من مثبطات الـ PCR والتأكد من أن هذا الكائن الحي هو المسؤول فعلاً عن هذه الأعراض. أخيراً يمكن القول أنه تم تحقيق نجاح ملحوظ في تطوير هذه الطرائق واستخدامها في الكشف.

6.3- التفاعل السلسلي البوليميرازي الكميQuantitative Polymerase Chain Reaction:

بالعودة لمعوقات التفاعل السلسلي البوليميرازي بالمقارنة مع اختبار الإليزا وتقنية التهجين يؤخذ على هذه الطريقة عدم القدرة على التقدير الكمي للمجتمعات المستهدفة، ونظراً للاختلافات الصغيرة في أي من متغيرات التفاعل التي تؤثر على كفاءته يمكن أن تؤثر على ناتج التفاعل مباشرة. فقد تم إقتراح عدد من الحلول لهذه المشكلة. أحد هذه الحلول هي معايرة الـ DNA المستهدف مع كميات معروفة من DNA داخلي قياسي. يشار للـ DNA الداخلي القياسي بأنه تنافسي حيث أنه يملك نفس مواقع إرتباط البادئات التي يملكها الـ DNA المستهدف ويتم تصميم هذه البادئات بحيث أنها تضخم الـ DNA المستهدف والـ DNA الداخلي القياسي بنفس الكفاءة، وبالتالي عند معايرة كميات غير معروفة من عينة DNA متباينة مع سلسلة من تخفيفات DNA المنافس يمكن من خلال تحليل صورة هلامة الأغاروز للكثافة النسبية لنواتج الـ PCR معرفة كمية الـ DNA التي بدأ منها التفاعل.

من التطورات التي حصلت في هذا المجال وأصبحت بديلة للطريقة السابقة ومتوفرة في الأسواق لكل من الـ *Septoria* وأمراض الأصداء على القمح بمشاركة كاشف فلوريسانتي مثل picogreen يمكن قياس كمية الـ DNA في العينات، حيث يجرى تفاعل الـ PCR في أطباق خاصة ثم يضاف الكاشف الذي يرتبط مع سلاسل الـ DNA المزدوجة ثم يقاس التوهج بواسطة مقياس خاص flourometer، بالنتيجة يقارن التوهّج الناتج عن العينات القياسية معروفة التركيز مع تلك الناتجة عن عينات غير معروفة يمكن تحديد كمية الـ DNAالتي بدأ منها التفاعل ولكن هذا التفاعل ليس دقيقاً أيضاً مثل التفاعل السابق.

أكثر التطورات التي حدثت في هذا المجال هو نظام Taqman للوقت الحقيقي لتفاعل الـPCR أو ما يسمى Real –Time PCR وترتكز هذه التقنية على التشارك بين كاشف فلوريسينتي في مزيج تفاعل PCR وقد تم تطوير هذا النظام لعدد من الممرضات النباتية. الميزة الرئيسية لهذه الطريقة هي أنها آلية بشكل كامل ورخيصة نسبياً ويتوفر أجهزة محمولة تعطي نتائج يمكن الاعتماد عليها في تقدير الكميات.

من التطورات الأخرى في هذا المجال أن هناك تقنيات وآلات متطورة يمكن بواسطتها الكشف عن عدة ممرضات نباتية في ذات الوقت حتى لو كانت درجة حرارة إرتباط البادئات متفاوتة بشكل كبير فيما بينها.

تم تطوير بادئات تستخدم في جهاز Real –Time PCR وذلك للكشف عن ممرضات النباتية الفطرية والبكتيرية مثل *RalostoniaSolanacearum* في درنات البطاطا، *Pseudomonas syringae*p v. *phaseolicola* في بذور الفاصولياء، *Phytophthora* spp. في البطاطا والحمضيات، *Tilletiaindica* في القمح.

أصبح في الوقت الراهن متوفر في الأسواق محضرات تفاعل جاهزة للاستخدام للكشف عن طيف واسع من الممرضات بسرعة وفعالية، وبقي في هذا المجال توفر محضرات تفاعل جاهزة للكشف عن الأنماط المرضية و أنماط التزاوج عند الفطريات أو إذا كانت هذه الكائنات تملك المقاومة للمكافحة الكيميائية أو المقاومة لمبيد فطري معين.

وهنا يمكن القول أنه مع زيادة الاهتمام بتعريف التتابع النكليوتيدي لمورثات القدرة الإمراضية وتطور هذا المجال فإنه يمكن استخدامها كمؤشرات جزيئية فمثلاً يتوفر في الوقت الراهن أنظمة يمكن من خلالها الكشف عن التعدد الشكلي على مستوى نكليوتيد واحد Single Nucleotide Polymorphism (SNP) بين سلاسل المورثات وبالتالي يمكن استخدامها كقاعدة في أنظمة التشخيص لتعريف الطفرات التي حدثت في مورثات ممرض معين.

4- التحليل التطوري Phylogenetic Analysis :

من الحقول الاخرى التي يستفاد منها في من التعدد الشكلي لسلاسل RNA الريبوزومي والمؤشرات الجزيئية العشوائية بين العزلات هو التصنيف النشوئي أو التطوري لهذه العزلات. وتعتبر شجرة القرابة الوراثية ذات قيمة لتحديد الزمن النسبي للنشوء لمجموعة تصنيفية معينة وأيضاً لتحديد درجة التنوع ضمن مجموعات الكائنات الحية. تم التوصل من خلال التحليل التطوري إلى أن الفطريات البيضية قد إنفصلت حديثاً عن الفطريات الحقيقية إلى Chromista. تم في الوقت الحاضر إضافة مقارنات التتابعات النكليوتيدية إلى التصنيفات المبنية على أساس الخواص المورفولوجية كطريقة لتركيب شجرة التطور. يمكن الحصول على التتابعات النكليوتيدية للعديد من المورثات وذلك من خلال قواعد بيانات دولية، كما يمكن استخدام برامج كمبيوتر وتحاليل إحصائية مجانية بهدف رسم شجرة القرابة الوراثية أو التطور.

References

- Elbeaino, T., Digiaro, M., De Stradis, A., Martelli, G.P.(2006). Partial characterization of a closterovirus associated with a chlorotic mottling of fig. *Journal of Plant Pathology*, 88: 187-192.
- Elbeaino, T., Digiaro, M., De Stradis, A., Martelli, G.P. (2007). Identification of a second member of the family CLOSTEROVIRIDAE in mosaic-Diseased figs. *Journal of Plant Pathology*, 89(1): 119-124.
- Fessehaie, A., De Boer, S.H. & Lévesque, C.A. (2003). An Oligonucleotide array for the identification and differentiation of bacteria pathogenic on potato. *Phytopathology,*93: 262-269
- Joshi, S. and Haenni, A.L., (1980). Double-stranded RNA in detection of diseases of known and unprovenviral etiology. *ActaHorticalturae,* 164, pp. 101–108.
- Irving, M.B., Pan, O. and Scott, J.K. (2001) Random-peptide libraries and antigen-fragment libraries for epitope mapping and the development of vaccines and diagnostics. *Current Opinion in Chemical Biology,* 5:314-324.
- Lévesque, C.A. (2001) Molecular methods for detection of plant pathogens- What is the future? *Canadian Journal of Plant Pathology,*24:333-336.
- Lievens, B., Brouer, M., Vanachter, A.C.R.C., Lévesque C.A., Cammue, B.P.A. &Thomma, B.P.H.J. (2003). Quantitative assessment of phytopathogenic fungi in various substrates using DNA macro-array. *Environ. Microbiol*. 7: 1698-1710.
- Mackay, I. M., K. E. Arden, and A. Nitsche (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research,* 30:1292–305.
- Martin, R.R., James, D. and Lévesque, C.A. (2000). Impacts of molecular diagnostic techniques on plant disease management. *Annual Review of Phytopatholog,* 38:207-239.
- Nicolaison, M., Justesen, A.F., Thrane, U., Skouboe, P. &Holmstrom, K. (2005). An oligonucleotide microarray for identification and differentiation of trichothecene producing and non-producing *Fusarium* species occurring on cereal grain. *Journal of Microbiology Methods,* 62: 57-69.
- Schaad, N.W. and Frederick, R.D. (2002). Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *CanadianJ. Plant Pathology,* 24, 250–258.
- Sicheritz-Ponten, T. and Andersson, S. G. (2001) A phylogenomic approach to microbial evolution. *NucleicAcids Research,* 29, 545–552.
- Stowell, L.,J., and Gelernter W.D. 2001. Diagnosis of Turf grass Diseases. *Annual Review of Phytopathology,*39:135-155.
- Tillib, S. V. and Mirzabekov, A. D. (2001) Advances in theanalysis of DNA sequence variations using oligonucleotide mi-crochip technology. *Current Opinion in Biotechnology,* 12:53-58.